

碱水解转化 - 紫外分光光度法测定聚乙二醇负载 葛根素前药的载药量研究*

刘霞¹, 蒋福升¹, 马哲龙², 李亚楠², 陈铤铍¹, 丁志山^{1**}

(1. 浙江中医药大学生命科学学院 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学药学院 杭州 310053)

摘要 目的: 建立聚乙二醇负载葛根素前药的载药量测定方法。方法: 将葛根素溶于不同浓度的氢氧化钠溶液中在 60 °C 水浴中进行水解, HPLC 跟踪筛选出较适宜的水解方法, 并将水解产物用 NMR 进行表征。将葛根素前药通过相应方法水解后, 紫外分光光度法测定其水解产物吸光度从而确定葛根素前药载药量。结果: 实验发现, 葛根素在 1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 60 °C 水浴孵育 30 min 后水解完全, 水解后葛根素转化形成的产物经结构鉴定为二氢葛根素, 该物质在碱性溶液中在 336 nm 处有稳定吸收峰, 并且在 1.378 ~ 28.947 μg · mL⁻¹ 范围内浓度与吸光度呈良好的线性关系, 回归方程为: $Y = 0.0432X + 0.077$ $r = 0.9996$; 平均回收率为 99.1%。结论: 本方法简便、快速、准确且成本低, 可用于葛根素前药的质量控制。

关键词: 葛根素; 前药; 载药量; 水解; 紫外分光光度法; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793 (2011) 07 - 1273 - 05

Determined the drug loading of PEGylation puerarin prodrug by alkali hydrolysis conversion - UV spectrophotometry method*

LIU Xia¹, JIANG Fu - sheng¹, MA Zhe - long², LI Ya - nan²,
CHEN Ni - pi¹, DING Zhi - shan^{1**}

(1. College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract Objective: To develop a method for determine the drug loading of the puerarin prodrug. **Methods:** The puerarin was dissolved in NaOH solution with different concentrations and was hydrolyzed in 60 °C bath, HPLC was used to trace detection and select the opportunely method for hydrolysis. And the product was characterized by NMR. The prodrug was hydrolyze by the corresponding method and the absorbance of the product of hydrolysis was determined by UV - spectrophotometry, and then the drug loading was caculated. **Results:** It was found that the puerarin was completely hydrolyzed and conversion after 30 min incubation in 1 mol · L⁻¹ NaOH solution and 60 °C bath. The product is dihydro puerarin after structure identification, which has a stable absorption peak at 336 nm in alkaline solution, and it showed good linearity in the range of 1.378 - 28.947 μg · mL⁻¹. The regression equation was $Y = 0.0432X + 0.077$ $r = 0.9996$; the average recovery was 99.1%. **Conclusion:** We established a simple, rapid, accurate and low cost method, which was fit for the quality control of puerarin prodrug.

Key words: puerarin; prodrug; drug loading; hydrolysis; ultraviolet spectrophotometer; HPLC

葛根素 (puerarin) 是豆科植物野葛 (*Pueraria lobata* (Wild) Ohwi) 根中的主要活性成分之一, 具有较强的降血压、扩张冠脉及脑血管、改善脑部微循环等作用^[1-3], 是目前临床上治疗心脑血管疾病的代表药物之一, 加之药源丰富, 应用及安全范围广, 具有

广阔的发展前景, 因此受到广泛的关注。但因葛根素的水溶性和脂溶性均较差, 口服吸收生物利用度低, 而葛根素注射剂在体内的半衰期短, 不能很好地发挥疗效^[4,5], 针对葛根素以上缺陷, 本实验室运用聚乙二醇 (PEG) 负载技术合成了葛根素前药, 以达

* 浙江省自然科学基金资助 (Y206776); 浙江省中医药重点项目研究计划 (2005Z001); 浙江省教育厅科研项目 (Y200805067); 浙江省中医药青年课题研究计划 (2009YB001)

** 通讯作者 Tel: (0571) 86613666; E-mail: zjtcmdzs@sohu.com

到既改善葛根素水溶性,又延长其体内半衰期的目的。

目前,测定葛根素制剂中葛根素含量的方法主要有高效液相色谱法(紫外检测器)^[6-8]、紫外分光光度法^[9]、薄层扫描法^[10]、高效毛细管电泳法^[11]、液相色谱-串联质谱法^[12]等,但是以上方法主要是针对游离葛根素的测定,而经聚乙二醇修饰过的前药是由载体与葛根素分子共价连接而成,这必将导致葛根素分子的共轭体系发生改变,进而使前药中葛根素吸收峰峰位及强度发生改变,因此在使用紫外检测器测定该类制剂中葛根素含量时将会出现误差。故笔者综合以上测定方法的优缺点,拟建立碱水解转化-紫外分光光度法以准确测定聚乙二醇负载葛根素前药的载药量。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(戴安 UltiMate3000);核磁共振波谱仪(Bruker500);UV8500 紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司);DK-S24 恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司);葛根素前药为本实验室自制;氢氧化钠(NaOH)购于杭州萧山化学试剂厂;葛根素对照品(安康禾烨麦迪森植物药业有限公司,含量99.9%);甲醇(杭州大方化学试剂有限公司)为分析纯,水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 HPLC 跟踪检测葛根素碱液转化实验 称取葛根素 1.5 mg,加入 0.5 mL 1.5 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 3 mL 置于 60 °C 水浴中孵育,于孵育不同时间取样 30 μL 并用甲醇稀释至 1 mL 后调节 pH 为 2~3 过 0.45 μm 微孔滤膜后, HPLC 进样检测水解情况。

2.2 色谱条件

色谱柱: Acclaim 120 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 250 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 15 μL; 流动相: 水(A) - 甲醇(B); 流速: 1.0 mL·min⁻¹。采用梯度洗脱程序: 0~5 min A-B(85:15); 5~15 min A-B(50:50)。在本实验色谱条件下,各样品的色谱图如图 1。

由图 1 可见,葛根素在碱性溶液 60 °C 水浴的条件下会逐渐转化成为另外 1 种物质,通过对不同浓度的氢氧化钠溶液在不同时间点实验的比较发现,在氢氧化钠浓度大于等于 1 mol·L⁻¹ 孵育 30 min 时葛根素可以充分地转化为另外 1 种物质,而在氢氧化钠浓度为 0.5 mol·L⁻¹ 时转化过于缓慢,因此为了保证转化后物质稳定性,并节省实验时间,选用

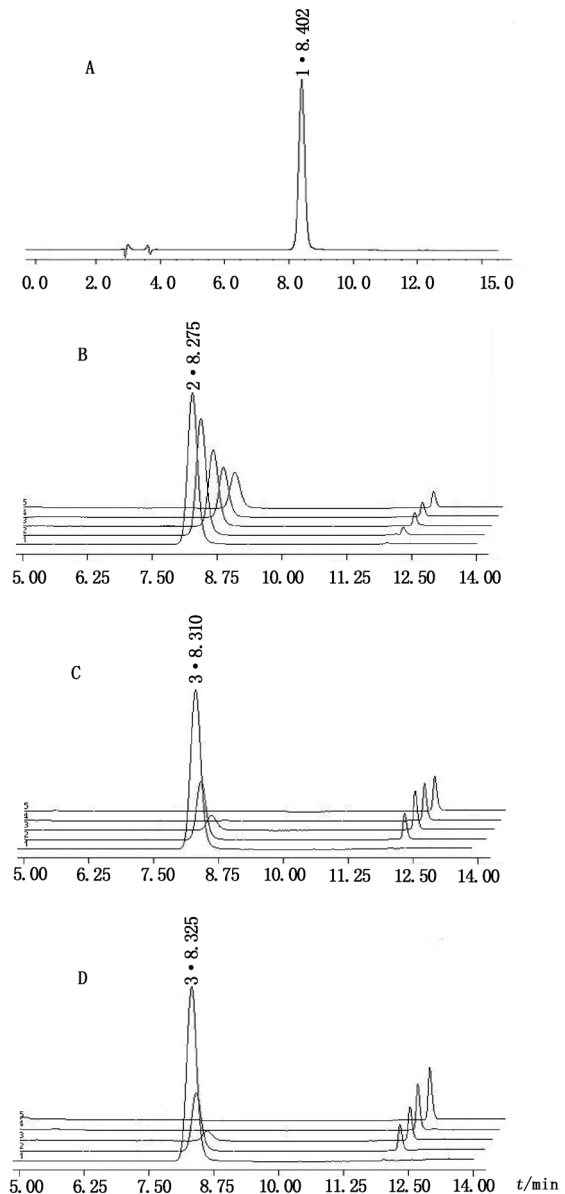


图 1 葛根素及其在不同氢氧化钠溶液中孵育 0, 10, 20, 30, 60 min 后各样品色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of puerarin and the converted products which hydrolyzed in different concentrations of NaOH solution at 0, 10, 20, 30, 60 min

A. 葛根素(puerarin) B. 0.5 mol·L⁻¹ NaOH C. 1 mol·L⁻¹ NaOH
D. 1.5 mol·L⁻¹ NaOH

浓度为 1 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液孵育时间为 30 min 的条件下对葛根素及前药进行水解转化。

取前药适量(该前药为本实验室自制,在其合成过程中已将大部分游离葛根素析晶除去,前药中少量游离葛根素经 Sephadex G25 分离去除),按上述方法进行水解孵育,并 HPLC 检测,色谱图如图 2。

由图 2 可知,前药在以上条件下也是转化为相同的产物,因此此方法对于葛根素及其前药均适用。

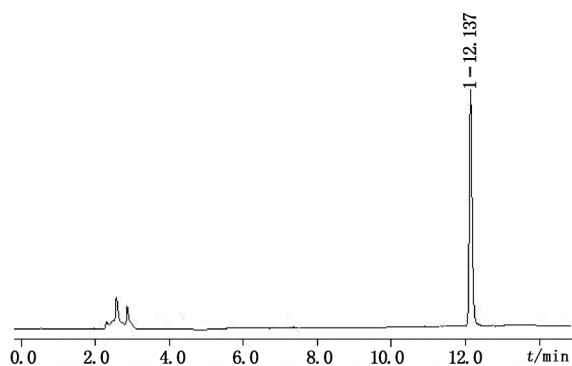


图2 葛根素前药在 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液中孵育 30 min 色谱图
Fig 2 HPLC chromatogram of prodrug which incubated in $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH solution for 30 min

2.3 转化产物的结构表征 为了明确经碱液孵育后葛根素的转化产物,称取葛根素 20 mg,加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 5 mL 至于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中孵育 30 min,孵育完毕后用水饱和正丁醇萃取 3 次,合并正丁醇萃取液,减压蒸干后取样品 5 mg,用氘代甲醇溶解,以四甲基硅烷为内标,做核磁氢谱及碳谱扫描,结果如图 3。

由核磁数据可以看出,该物质 $^1\text{H-NMR}$ 与葛根素 $^1\text{H-NMR}$ 相似^[13,14],而主要差别是葛根素在 $\delta: 8.14(1\text{H}, \text{S}; \text{C}2-\text{H})$,而在转化产物中没有这一信号,推测 2 位双键被取代或氢化。再有 $^{13}\text{C-NMR}$ 信号发现在 $\delta: 100$ 到 170 之间仅有 12 个碳(2 个苯环)证明了双键不存在,并且在 DEPT135 上比葛根素多 1 个 $-\text{CH}_2$ 出现,证明了双键被还原,因此可以确证该转化产物为二氢葛根素。

2.4 紫外分光光度计检测葛根素及其前药碱水解转化试验

准确称取葛根素及前药适量,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠定容至 10 mL 备用。取 2 只试管,标记为前药和葛根素,每管中加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠 1.9 mL,然后分别加入前述葛根素及前药母液 100 μL ,用保鲜膜封口,并将上述各管放入 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中孵育 30 min,为保证产物稳定性,样品取出后迅速冷却至室温,并加入双蒸水 9 mL,将氢氧化钠浓度降低为 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,以 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠为空白对照对葛根素及前药水解转化产物做全波长扫描,结果见图 4。

比较图 4-A,图 4-B 可以明显看出葛根素和前药在以上实验条件处理后产物紫外图谱一致,并且在碱性条件下在 336 nm 及 240 nm 处均有吸收峰,但相对于 336 nm 来说,240 nm 处往往存在较多干扰因素,所以选择 336 nm 处的吸光度,以葛根素为对照品,经同样条件处理后用紫外可见分光光度

计检测前药中葛根素含量是具有一定的可行性的。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察

准确称取葛根素对照品 5.5 mg,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液定容至 10 mL(浓度 $0.55 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 精密吸取上述葛根素母液 25,50,75,100,125,175,200,225,250,275,300,500 μL 分别置于试管中,加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液补足体积至 2 mL,用保鲜膜封口,至于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴孵育 30 min。取出后冷却稀释至 10 mL,测定 336 nm 处吸光度,以吸光度值为纵坐标,葛根素浓度为横坐标,绘制标准曲线。由结果可得,葛根素在此条件下转化产物在相当于葛根素浓度为 $1.38 \sim 28.95 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的范围内线性良好,其 336 nm 处吸光度值与浓度呈线性关系,回归方程:

$$Y = 0.0432X + 0.077 \quad r = 0.9996$$

2.5.2 葛根素转化产物稳定性试验 取 16 只试管,每管中加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1.9 mL,然后分别加入“2.5.1”项下葛根素母液 100 μL ,用保鲜膜封口,并将上述各管放入 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中孵育 30 min 后全部取出,立即用自来水冷却;然后每管各自用蒸馏水定容至 10 mL。以 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液为试剂空白,室温放置不同时间取其中 4 管做全波长扫描,观测其转化产物稳定性,经测定,各管在孵育 30 min 后室温放置 0,30,60,90 min 样品吸光度分别为 0.317,0.32,0.318,0.32,其平均吸光度为 0.319。由此可见 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min 所得产物在室温下 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液中比较稳定,90 min 内基本不发生变化,336 nm 处吸光度的 RSD 仅为 0.47%,表明在该条件下该转化产物稳定性良好。

2.5.3 精密密度试验 取“2.5.1”项下葛根素对照品母液 60 μL ,按“2.5.2”项下相同方法处理后,重复测定 5 次,吸光度分别为 3.28,3.31,3.35,3.4,3.3,将其代入标准曲线计算其葛根素浓度,得 RSD 为 1.4%。

2.5.4 重复性试验 取同一批葛根素前药 5 份,每份 15.0 mg,分别用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液定容至 10 mL,另取试管 5 只,每只中加入对应前药母液 0.5 mL,加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 0.5 mL,混匀后置于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴下孵育 30 min 后,取出冷却后稀释至 10 mL,测定 336 nm 处各样品吸光度,带入标准曲线计算前药平均载药量为 6.87%,RSD 为 1.8%。

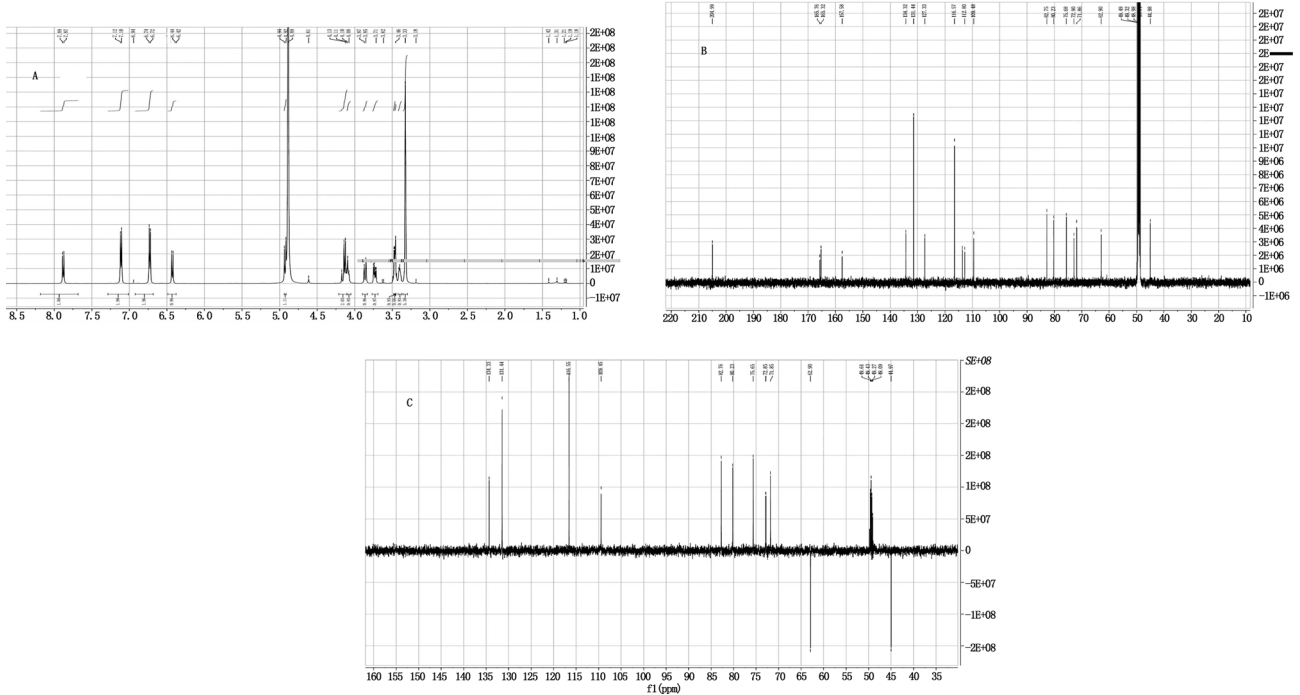


图3 转化产物核磁图谱
 Fig 3 The NMR spectra of the converted product
 A. ¹H - NMR B. ¹³C - NMR C. DEPT

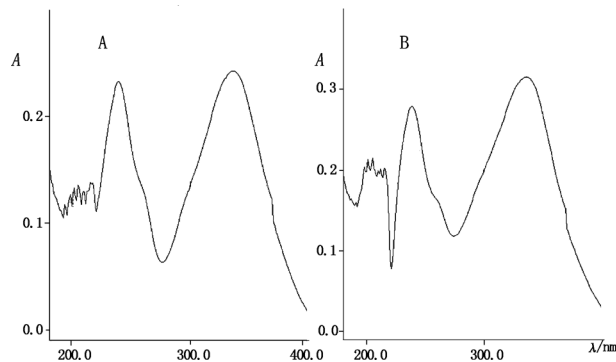


图4 葛根素(A)及其前药(B)水解转化产物紫外全波长扫描图
 Fig 4 UV spectra of puerarin (A) and prodrug (B) after hydrolysis conversion

2.5.5 回收率试验 取3份已测定含量的葛根素前药(含葛根素6.87%)20.0 mg,用1 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液定容至10 mL,各前药样品分别取250 μL置于试管中,分别加入0.55 mg·mL⁻¹葛根素对照品60,80,100 μL,再按“2.5.2”项下方法进行操作,并根据标准曲线方程计算加样回收率,回收率分别为99.33,100.2,97.83%,平均值99.19。

3 样品含量测定

取前药15.0 mg 3份,用1 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液定容至10 mL,按“2.5.2”项下方法进行操作,通过标准曲线方程计算前药中葛根素含量,测得其

含量分别是6.95%,6.91%,7.04%,平均含量为6.97%,RSD为2.1%,计算前药载药量为理论载药量的91.57%。

4 讨论

运用PEG负载技术合成小分子药物前药是近年来载药系统的研究热点,PEG修饰技术能够改善小分子药物的许多不良特性,如增加药物水溶性,延长药物半衰期,减小药物不良反应等^[15,16],这使得许多疗效显著但由于其疏水性和毒性大等缺陷而限制临床应用的小分子药物有了新的发展前景。目前聚乙二醇修饰药物技术已比较成熟,并已有产品走向临床应用。

而前药载药量是评价前药质量的一项重要指标,因此建立一套准确简便的检测方法对药物的质量标准的制定具有重大意义。虽然核磁等方法准确,但这类测定方法仪器费用昂贵,一般实验室难以开展;而将前药水解释放出葛根素,然后用液相色谱分离、定量检测,灵敏度高,准确性好,但一样涉及贵重仪器及试剂,且每次操作要求较高而烦琐等。考虑到葛根素及其前药水解转化特性,及前药分析样品量较大等特点,我们建立了碱水解转化-紫外分光光度法测定前药载药量。在本文实验中,经过HPLC检测水解转化产物可以发现,葛根素可经水解转化后形成单一产物,此产物经结构鉴定后确定

为二氢葛根素,该化合物在 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液中于 336 nm 处有一特征吸收峰,且该吸收峰强度较处理前葛根素的强度大,干扰少,因此作为测定波长。此外,由该吸收峰所建立的标准曲线的线性范围较广 ($1.38 \sim 28.95 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),线性良好;回收率实验结果表明,该方法回收率高,检测结果较准确。

综上所述,本文首次将葛根素进行碱液孵育并将其转化产物进行结构鉴定,其实验结果不仅在考察葛根素前药质量标准中具有较高的实用价值,而且可以为其他制剂或药物中葛根素的含量测定提供一种全新便捷的测定方法,因此笔者认为本文中建立的简便、快捷、重复性好且成本低的碱水解转化-紫外分光光度法测定葛根素含量具有较大的实用价值。

参考文献

- 1 Fan LL, Sun LH, Li J *et al.* The protective effect of puerarin against myocardial reperfusion injury. Study on cardiac function. *Chin Med J*, 1992, 105(1): 11
- 2 Zhang SY, Chen SL, Shen YJ, *et al.* Puerarin induces angiogenesis in myocardium of rat with myocardial infarction. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(5): 945
- 3 DUAN Zhong-gao(段重高), LI Hong-wei(李宏伟), XU Li-na(徐理纳). The effect of puerarin on the brain microcirculation of golden hamster(葛根素对金满地鼠脑微循环的影响). *Chin Med J* (中华医学杂志), 1991, 71(9): 516
- 4 Cui SM, Zhao CS, Tang X, *et al.* Study on the bioavailability of puerarin from pueraria lobata isoflavone self-microemulsifying drug-delivery systems and tablets in rabbits by liquid chromatography-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*, 2005, 19(5): 375
- 5 ZHU Xiu-yuan(朱秀媛). Pharmacokinetics of puerarin(葛根素的药代动力学). *Acta Pharm Sin*(药学学报), 1979, 17(6): 349
- 6 YANG Li-fang(杨立芳), LI Xiao-yan(李小燕), LUO Wei-qiang(罗伟强), *et al.* Determination of puerarin content in Guangxi Radix Puerariae Thomsonii by HPLC(高效液相色谱法测定广西粉葛中葛根素的含量). *Shizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2007, 18(3): 578
- 7 LI Jing(李晶), JIN Yi(金艺), CUI Yu-qin(崔玉琴) *et al.* RP-HPLC simultaneous determination of puerarin, ferulic acid, isoferulic acid, osthol and isosimperatorin in Shengyang Sanhuo powdered

- extract(RP-HPLC 法同时测定升阳散火汤浸膏粉中葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素和异欧前胡素的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2009, 29(9): 1415
- 8 YE Xiao-ping(叶晓平), MAO Ren-gang(茅仁刚), YUAN Ping(袁萍). RP-HPLC simultaneous determination of salvianolic acid B, puerarin and paeoniflorin in Zhishenzhenggan capsules(RP-HPLC 法同时测定芝参正肝胶囊中丹酚酸 B、葛根素和芍药苷的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2010, 30(5): 887
- 9 FANG Chong-bo(方崇波), GONG Yan-bo(龚燕波). Determination of content in puerarin and products chelating with ion by ultraviolet spectrophotometric(离子络合紫外分光光度法测定葛根素及其制剂的含量). *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2005, 25(3): 219
- 10 LEI Gen-hu(雷根虎), YANG Pei(杨沛). Determination of puerarin in Radix Puerariae by TLC fluorospectrophotometry(薄层色谱-荧光分光光度法测定葛根中葛根素的含量). *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 2000, 15(5): 204
- 11 LUO Qi-zhi(罗奇志), DAI Kai-jin(戴开金), MA An-de(马安德), *et al.* Analysis of puerarin and daidzein in Gegenqinlian preparations by high performance capillary electrophoresis(葛根苓连汤及微丸中葛根素、大豆苷元的 HPCE 分析). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2004, 24(1): 11
- 12 FENG Yi(冯怡), XUE Su-qin(薛素琴), SUN Li(孙丽). Determination of plasma puerarin by LC-MS-MS(液相色谱-串联质谱法测定兔血浆中葛根素的浓度). *Acad J Guangdong Med Pharm Coll* (广东药学院学报), 2007, 23(3): 266
- 13 Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences(中国科学院上海药物研究所植物化学研究室). Identification of Flavonoids Compounds Manual(黄酮体化合物鉴定手册). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1981. 518
- 14 GUO Yan-sheng(郭延生), WEI Yan-ming(魏彦明), LIANG Jian-ping(梁剑平), *et al.* The extract and structure transformation of puerarin(葛根素的提取及结构改造). China Institute of Veterinary Animal Husbandry and Veterinary Credit Association 2005 Annual Conference Proceedings(中国畜牧兽医学会中兽医学分会 2005 年学术年会论文集)
- 15 Richard BG, Yun HC, Jeffrey M, *et al.* Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Adv Drug Delivery Rev*, 2003, 55(2): 217
- 16 JIANG Fu-sheng(蒋福升), DING Zhi-shan(丁志山), Lü Gui-yuan(吕圭源). Research of poly(ethyleneglycol) prodrug(聚乙二醇前药的研究进展). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2007, 42(12): 881

(本文于 2010 年 12 月 6 日收到)