

HPLC 法测定胡黄连苷 I 的表观油水分配系数和平衡溶解度*

金诚¹, 陈丽英², 吴飞^{1,2**}, 胡佳亮¹, 冯怡^{1**}

(1. 上海中医药大学 创新中药研究院 中药现代制剂技术教育部工程研究中心, 上海 201203;

2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

摘要 目的: 测定胡黄连苷 I 在不同 pH 水溶液中的平衡溶解度及其在正辛醇-水系统中的油水分配系数。方法: 采用摇瓶-高效液相色谱法测定胡黄连苷 I 在水和不同 pH 缓冲液介质中的平衡溶解度及在正辛醇-水/缓冲液中的油水分配系数。色谱条件: 采用 Agilent Zorbax SB-Aq 色谱柱(4.6mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.125% 磷酸水溶液(22:78), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 275 nm, 柱温 30 °C。结果: 在 37 °C 下, 胡黄连苷 I 在 pH 为 1.2、2.0、5.0、6.8 和 7.4 的缓冲液以及水中, 平衡溶解度分别为 42.32、39.76、46.85、52.69、55.00 和 75.23 g·L⁻¹, 表观油水分配系数平均值分别为 0.265、0.253、-0.010、0.171、0.112 和 0.073。结论: 本文建立的测定胡黄连苷 I 的摇瓶-HPLC 法简单可行。胡黄连苷 I 是高溶解性及低渗透性的药物, 水溶性好, 脂溶性差, 且 pH 能影响平衡溶解度和表观油水分配系数。
关键词: 胡黄连苷 I; 平衡溶解度; 油水分配系数; 摇瓶法; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)04-0744-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.04.22

Determination of equilibrium solubility and apparent oil-water partition coefficient of picroside I by HPLC*

JIN Cheng¹, CHEN Li-ying², WU Fei^{1,2**}, HU Jia-liang¹, FENG Yi^{1**}

(1. Innovative Research Institute, Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. College of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To determine the equilibrium solubility of picroside I in water with different pH and the oil-water partition coefficient in *n*-octanol-water solution. **Methods:** The concentration of picroside I in solutions at different pH values and the partition coefficients in *n*-octanol-water and *n*-octanol-buffer solution systems were measured by shaking flask-HPLC method. Separation was performed on an Agilent Zorbax SB-Aq column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of acetonitrile-0.125% phosphoric acid (22:78) at a flow

* 上海中医药大学杏林青年学者基金资助

** 通信作者 吴飞 Tel:(021)51322431; E-mail: wufei_shutcm@126.com

冯怡 Tel:(021)51322493; E-mail: fyi@vip.sina.com

第一作者 Tel:(021)51322431; E-mail: Jin_Cheng312@126.com

rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The detective wavelength was 275 nm and the column temperature was $30 \text{ }^\circ\text{C}$. **Results:** At $37 \text{ }^\circ\text{C}$, the equilibrium solubilities of picroside I in buffer solutions (at pH 1.2, 2.0, 5.0, 6.8 and 7.4) and in water, were 42.32, 39.76, 46.85, 52.69, 55.00 and $75.23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. And the oil-water partition coefficients were 0.265, 0.253, -0.010, 0.253, 0.112 and 0.073, respectively. **Conclusion:** The shaking flask-HPLC method is simple and rapid to determine the oil-water partition coefficient of picroside I. Picroside I has characteristics of high solubility, low permeability, good water solubility and poor lipid solubility. The equilibrium solubility and apparent oil/water partition coefficient of picroside I are greatly influenced by pH value.

Keywords: picroside I ; equilibrium solubility; apparent oil-water partition coefficient; shake-flask method; HPLC

胡黄连是传统清热中药,来源于玄参科胡黄连属植物西藏胡黄连 (*Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell) 的干燥根茎,性寒味苦,有清热、除湿、明目、补肝、益胆、杀虫的效用^[1]。胡黄连的主要活性成分为环烯醚萜苷类,以胡黄连苷 I、II 和 III 为主^[2]。现代药理研究表明,胡黄连具有保肝利胆,保护肾、脑缺血再灌注、局部缺氧损伤,抗炎,保护骨损伤、神经细胞及抗肿瘤等作用。胡黄连苷 I (结构见图 1) 具有很好的生理活性^[3-4],但是目前国内尚无测定胡黄连苷 I 的表观油水分配系数和平衡溶解度的文献报道,本研究采用饱和溶液法、摇瓶法和 HPLC 法测定其平衡溶解度,通过胡黄连苷 I 分配平衡后在油相(正辛醇)和水相的质量浓度比,计算油水分配系数,采用 HPLC 法测定样品溶液的质量浓度,方法简便,结果可靠,为胡黄连苷 I 的剂型选择及给药途径,以及进一步的新药研究提供参考。

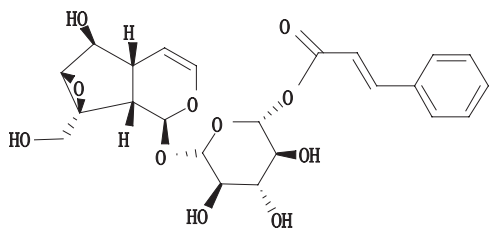


图 1 胡黄连苷 I 的结构式

Fig. 1 The chemical structure of picroside I

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪 [四元泵, 自动液体进样器 (ALS), 柱温箱 (TCC), 检测器 (VWD) 和 ChemStation 化学工作站, 安捷伦科技公司], Sartorius BP 211D 型精密天平 (0.01 mg, 赛多利斯科

学仪器有限公司), TGL-18C 离心机 (上海安亭科学仪器厂), Sartorius PB-10 型 pH 计 (赛多利斯科学仪器北京有限公司), SK7210HP 型超声仪 (上海科导超声仪器有限公司), ZHWY-211B 型恒温振荡器 (上海智城分析仪器制造有限公司), $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜 (上海青阳生物科技有限公司)。

1.2 试剂

胡黄连苷 I 对照品 (批号 111727-201702, 纯度在 95.6% 以上, 中国食品药品检定研究院), 胡黄连苷 I 原料药 (批号 H-008-180102, 纯度在 98% 以上, 成都瑞芬思生物科技有限公司), 乙腈、甲醇为色谱纯 (国药集团化学试剂有限公司), 磷酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠、磷酸二氢钾、正辛醇、盐酸均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 不同 pH 的缓冲液 按《中华人民共和国药典》2015 年版四部缓冲液的配制方法^[5], 分别配制 pH 为 2.0、5.0、6.8、7.4 的磷酸盐缓冲液。另称取氯化钠 2 g, 置于 1 000 mL 量瓶中, 加入浓盐酸 7 mL, 加水溶解并稀释至刻度, 配成 pH 1.2 的缓冲液。

2.1.2 对照品储备液 精密称取胡黄连苷 I 对照品适量并按照纯度为 95.6% 折算后, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 $48.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

2.2 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB-Aq ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相: 乙腈 -0.125% 磷酸溶液 (22:78); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 275 nm; 柱温: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样量: $10 \mu\text{L}$ 。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系的考察 精密量取对照品储备液适量,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制得质量浓度分别为 1.95、4.87、9.75、19.50、48.90 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液;分别按照“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图 2)。以峰面积对进样浓度进行线性回归,得回归方程:

$$Y=2\ 390X+3.212\ 3 \quad R^2=0.999\ 9$$

结果表明胡黄连苷 I 进样浓度在 1.95~48.90 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

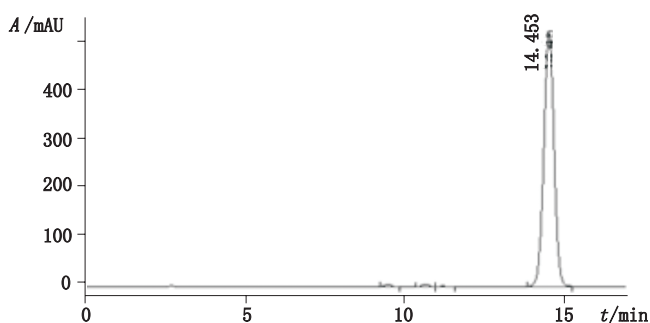


图 2 胡黄连苷 I 对照品的色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of picroside I reference substance

2.3.2 精密度试验 取高、中、低浓度(48.90, 9.75, 1.95 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的对照品溶液,分别按“2.2”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。计算 RSD,考察日内精密度;连续进样 3 d,每天 1 次,计算 RSD,考察日间精密度。结果高、中、低 3 个浓度对照品溶液的日内 RSD ($n=6$) 分别为 1.8%、3.4%、2.4%,日间 RSD ($n=3$) 分别为 3.1%、2.3%、2.6%。表明精密度良好。

2.3.3 准确度试验 取高、中、低浓度(48.90, 9.75, 1.95 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样,测得峰面积,依据标准曲线得到对应的浓度,利用准确度 = 测定浓度值 / 真实浓度值 $\times 100\%$ 求出高、中、低浓度的准确度分别为 102%、104%、103%,表明该方法的准确度良好。

2.3.4 稳定性试验 取高、中、低浓度(48.90, 9.75, 1.95 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件下于室温放置 0、24、48、72 h 后测定峰面积,计算 RSD ($n=4$) 分别为 1.3%、1.6%、1.5%、2.0%,结果表明胡黄连苷 I 溶液在室温下存放 3 d 内基本稳定。

2.4 胡黄连苷 I 表观油水分配系数测定

吸取正辛醇溶液适量,分别与同体积水及 pH 为

1.2、2.0、5.0、6.8、7.4 的缓冲液混合,在恒温 (37 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 条件下振摇 24 h,离心 ($12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 下同),分取上层和下层,即得水饱和的正辛醇、正辛醇饱和的水溶液。

吸取水饱和的正辛醇溶液 2 mL,置具塞刻度试管中,加入过量胡黄连苷 I 原料药粉末至溶液中出现大量白色不溶性沉淀,置恒温振荡器中,在 (37 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 条件下振摇 24 h,经 0.45 μm 滤膜滤过,吸取续滤液,加水稀释 500 倍,进行 HPLC 测定,测定色谱峰面积,以外标法计算胡黄连苷 I 初始浓度 C_0 。

精密吸取含胡黄连苷 I 的水饱和的正辛醇溶液 0.5 mL,置 5 mL 具塞离心管中,分别加入 0.5 mL 正辛醇饱和的水及正辛醇饱和的 pH 为 1.2、2.0、5.0、6.8、7.4 的缓冲液,将具塞离心管放入恒温振荡器中,在 (37 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 条件下振摇 24 h,离心,分取水层,0.45 μm 滤膜滤过,吸取续滤液,加水稀释 500 倍,进行 HPLC 测定,测得色谱峰面积,以外标法计算胡黄连苷 I 质量浓度 C_w ,并根据 $(C_0 - C_w) / C_w$ 计算表观油水分配系数 P ,结果见表 1。

表 1 胡黄连苷 I 表观油水分配系数计算结果

Tab. 1 Apparent *n*-octanol-water partition coefficient of picroside I

pH	C_0	C_w	P	$\lg P$
1.2	5.988	2.108	1.841	0.265
2.0	5.333	1.912	1.790	0.253
5.0	3.675	1.859	0.976	-0.010
6.8	4.940	1.990	1.482	0.171
7.0	6.263	2.867	1.184	0.073
7.4	5.887	2.567	1.294	0.112

2.5 平衡溶解度的测定

吸取不同 pH 缓冲液和水各 1 mL,分别置 5 mL 具塞刻度试管中,加入过量的胡黄连苷 I 原料药粉末至溶液中出现大量白色不溶性沉淀,置恒温振荡器中,在 (37 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 条件下振摇 48 h,0.45 μm 滤膜滤过,吸取续滤液,加水稀释 800 倍,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图 3),计算胡黄连苷 I 在不同 pH 缓冲液及水中平衡溶解度分别为 42.32、39.76、46.85、52.69、55.00、75.23 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,见图 4。

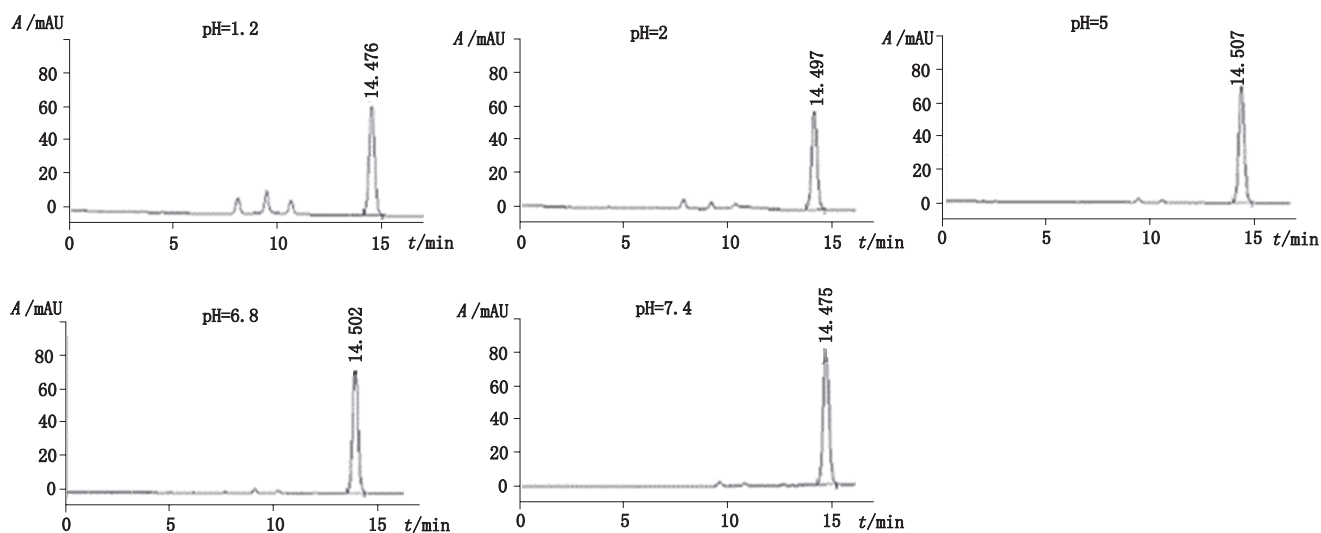


图3 37 °C条件下胡黄连苷 I 在不同缓冲液中的平衡溶解度色谱图

Fig. 3 Equilibrium solubility chromatograms of picroside I in different buffer solutions at 37 °C

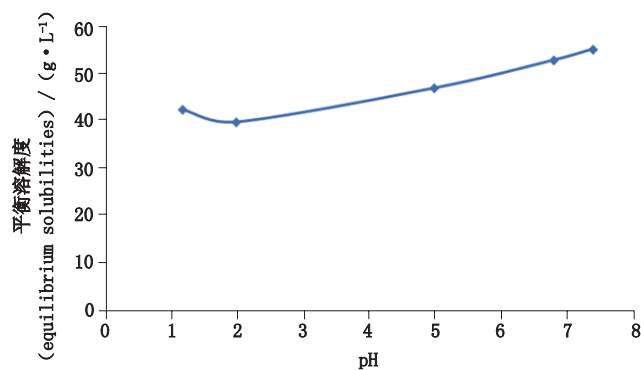


图4 37 °C条件下胡黄连苷 I 在不同缓冲液中的平衡溶解度

Fig. 4 Equilibrium solubilities of picroside I in different buffer solution at 37 °C

3 讨论

本研究建立了胡黄连苷 I 的 HPLC 含量测定方法并进行了方法学考察,表明该方法准确可行。采用经典摇瓶法制备溶液, HPLC 法测定了胡黄连苷 I 在水及不同 pH 缓冲液中的表观油水分配系数和平衡溶解度,为胡黄连苷 I 的剂型选择和制剂研究提供基础数据支持。

平衡溶解度是反映药物溶解性的重要指标^[6]。本研究对胡黄连苷 I 在水和不同 pH 缓冲液中的平衡溶解度进行了测定,结果表明在 pH 为 1.2~2.0 时,平衡溶解度有降低的趋势;在 pH 2.0~7.4 的磷酸盐缓冲液中,胡黄连苷 I 的平衡溶解度随着 pH 的升高而增大;在水中,平衡溶解度最大,达到 $75.23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

体外测定油水分配系数是为了模拟生物体内药物在水相和生物相之间的分配情况,从而预测其在

肠道中的吸收情况^[7]。试验中考虑到正辛醇与生物膜整体的溶解度参数接近,故选择正辛醇模拟生物膜^[8]。油水分配系数测定方法有摇瓶法和产生柱法等。与其他测定方法相比,经典摇瓶法操作简单,成本低,故选用摇瓶法测定^[9]。由于胃肠道不同位置的 pH 分别为胃 1~3,十二指肠 4~6,空肠 6~7,回肠 7,结肠 8^[10],体内温度约为 37 °C,因此选择 37 °C 条件下此 pH 区间的缓冲液作为溶剂^[11]。药物的最佳 $\lg P$ 值为 $-1 < \lg P < 2$,一般认为在胃肠道有较好吸收的药物 $\lg P > 1$ ^[12]。有研究表明,胡黄连苷 I 在十二指肠、空肠和回肠中吸收较低^[13],通过本文的研究发现,胡黄连苷 I 在 pH 1.2~7.4 的缓冲液和水中, $\lg P$ 为 $-0.01 \sim 0.26$,胡黄连苷 I 的亲水性较强,脂溶性较差,口服吸收不佳。动物实验研究也表明,胡黄连苷 I 口服后在体内很快被代谢,半衰期短且血药浓度较低,生物利用度不高^[14]。根据生物药剂学分类系统,胡黄连苷 I 属于高溶解性及低渗透性的药物,可能存在主动转运和特殊转运过程,可通过改善药物的脂溶性来增加药物的吸收,且口服药物的吸收是在胃肠道上皮细胞进行,胃肠道生理环境的变化对吸收有较大影响。

针对胡黄连苷 I 的上述性质,也有研究尝试将其开发为注射剂。大鼠为研究对象,胡黄连苷 I 静脉注射分布广,消除迅速,在体内滞留时间短,不易蓄积^[14]。注射用胡黄连总苷(主要成分为胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II,总量达到 90% 以上)具有较好的药效活性^[15-16];对于中国健康受试者,单剂量 30~300 mg 和多剂

量 180~240 mg 注射胡黄连总苷安全性和耐受性较好, 并且广泛分布于细胞内、血浆、外液和组织器官内^[17-18]。

由于不同剂型中药物的吸收和生物利用度情况取决于该剂型释放药物的速度与数量, 而不同的给药部位和吸收途径各异, 药物被吸收的速度与量也可能不同, 笔者认为, 通过改善药物剂型和制备工艺等方法来改善胡黄连总苷 I 的体内吸收, 进而提高生物利用度将是今后胡黄连总苷 I 口服制剂研发的重点。

参考文献

- [1] 黄开毅, 何乐, 王大成, 等. 西藏胡黄连的化学成分[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(18): 1382
HUANG KY, HE L, WANG DC *et al.* Chemical constituents of *Picrorhiza scrophulariiflora* [J]. *Chin Pharm J*, 2008, 43(18): 1382
- [2] 金诚, 吴飞, 郑晓, 等. 胡黄连的化学成分、质量分析和药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(3): 292
JIN C, WU F, ZHENG X, *et al.* Research progress on the chemical composition, analytical method and pharmacological action of *Rhizoma Picrorhizae* [J]. *Chin J New Drugs*, 2019, 28(3): 292
- [3] 龚苏晓. 胡黄连中增强神经生长因子作用的化合物[J]. 国际中医中药杂志, 2001, 23(6): 343
GONG SX. Compounds that enhance the role of nerve growth factors in *Picrorhiza scrophulariiflora* [J]. *Int J Tradit Chin Med*, 2001, 23(6): 343
- [4] KAPADIA GJ, SHARMA SC, TOKUDA H, *et al.* Inhibitory effect of iridoids on Epstein-Barr virus activation by a short-term *in vitro* assay for anti-tumor promoters [J]. *Cancer Lett*, 1996, 102(1-2): 223
- [5] 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015: 324
ChP 2015. Vol IV [S]. 2015: 324
- [6] PARDEIKE J, MULLER RH. Nanosuspensions: a promising formulation for the new phospholipase A2 inhibitor PX-18 [J]. *Int J Pharm*, 2010, 391(1/2): 322
- [7] 钱桂英, 狄留庆, 单进军, 等. 祖师麻总香豆素物理化学常数的测定[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(10): 521
QIAN GY, DI LQ, SHAN JJ, *et al.* Determination of the physical chemistry constants of total coumarin [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2006, 13(10): 521
- [8] 史小玉, 张广彬, 魏赛丽. HPLC-荧光法测定土大黄苷平衡溶解度和油水分配系数[J]. 西安交通大学学报, 2013, 34(5): 682
SHI XY, ZHANG GB, WEI SL. Determination of the equilibrium solubility of rhaponticin and oil-water apparent partition coefficients using HPLC-fluorometric method [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci*, 2013, 34(5): 682
- [9] 朱伊婷, 陈英杰, 夏媛媛, 等. 甲磺酸普依司他油水分配系数的测定[J]. 广东化工, 2018, 45(10): 36
ZHU YT, CHEN YJ, XIA YY, *et al.* Determination of the partition coefficient for purinostat mesylate [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2018, 45(10): 36
- [10] 姚媛, 廖琼峰, 曾丽英, 等. 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯表观油水分配系数的测定及 pH 值对其的影响[J]. 中药材, 2009, 32(10): 1610
YAO Y, LIAO QF, ZENG LY, *et al.* Determination of apparent oil-water partition coefficient of andrographolide and dehydroandrographolide and effect of pH on them [J]. *J Chin Med Mater*, 2009, 32(10): 1610
- [11] DRESSMAN JB, AMIDON GL, REPPAS C, *et al.* Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms [J]. *Pharm Res*, 1998, 15(1): 11
- [12] 熊耀坤, 梁爽, 杜焰, 等. HPLC 法测定洋川芎内酯 I 的平衡溶解度和表观油水分配系数[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1644
XIONG YK, LIANG S, DU Y, *et al.* HPLC determination of equilibrium solubility and apparent oil/water partition coefficient of senkyunolide I [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32(9): 1644
- [13] 高宏伟, 匡海学, 阎雪莹. 胡黄连苦苷 I 大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中医药信息, 2011, 28(4): 7
GAO HW, KUANG HX, YAN XY. The absorption kinetics of picroside I in the body intestinal of rats [J]. *Inf Tradit Chin Med*, 2011, 28(4): 7
- [14] 张卫平, 孙小成, 王静, 等. 胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II 在大鼠体内的药物动力学[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(9): 724
ZHANG WP, SUN XC, WANG J, *et al.* The pharmacokinetics of picroside I and picroside II in rats [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2013, 30(9): 724
- [15] 梁晓东, 张丽, 贾志丹, 等. 注射用胡黄连总苷对 α -萘异硫氰酸酯诱发小鼠胆汁淤积性黄疸的保肝退黄作用[J]. 中国药物警戒, 2014, 11(8): 453
LIANG XD, ZHANG L, JIA ZD, *et al.* Effects of total glucoside of on intrahepatic cholestasis in mice induced by α -naphthylisothiocyanate [J]. *Chin J Pharmacovigil*, 2014, 11(8): 453
- [16] 王淑娟, 贾志丹, 魏怀玲, 等. 注射用胡黄连总苷对 ConA 引起小鼠急性免疫性肝损伤的保护作用研究[J]. 中国药物警戒, 2013, 10(12): 705
WANG SJ, JIA ZD, WEI HL, *et al.* Protective effect of total glucoside of *Picrorhiza scrophulariiflora* for injection on concanavalin A-induced liver injury in mice [J]. *Chin J Pharmacovigil*, 2013, 10(12): 705
- [17] 李静姿, 田硕涵, 赵侠, 等. 注射用胡黄连总苷在健康人体的药动学[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(21): 2526
LI JZ, TIAN SH, ZHAO X, *et al.* The pharmacokinetics of total glucosides of *Picrorhiza scrophulariiflora* for injection in healthy subjects [J]. *Chin J New Drugs*, 2014, 23(21): 2526
- [18] 周颖, 赵侠, 向倩, 等. 注射用胡黄连总苷耐受性研究[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(17): 1529
ZHOU Y, ZHAO X, XIANG Q, *et al.* Tolerance of total glucosides of *Picrorhiza scrophulariiflora* for injection in Chinese healthy volunteers [J]. *Chin J New Drugs*, 2008, 17(17): 1529

(本文于 2018 年 4 月 11 日收到)