

灯盏花乙素苷元离解常数和油水分配系数测定*

张 伟¹, 荣娜娜², 催文博³, 杨兆祥³

(1. 昆明制药集团股份有限公司药物研究院, 云南昆明 650100;
2. 昆明医学院, 云南昆明 650500; 3. 大理学院, 云南大理 671003)

〔摘 要〕目的: 通过高效液相色谱 (HPLC) 研究了灯盏花乙素苷元的离解常数和油水分配系数。方法: 利用待测组分的保留因子 (k 值) 与流动相的 pH 值, 导出了 $\text{pH}-k$ 的曲线方程, 并通过曲线拟合软件求出拐点即是灯盏花乙素苷元的离解常数。采用振荡-液相色谱法测定了灯盏花乙素苷元的油水分配系数。结果: HPLC 对灯盏花乙素苷元离解常数的测定中 $k-\text{pH}$ 曲线符合 S 型数理模型, 灯盏花乙素苷元的油水分配系数在水相 pH 3.0~8.0 范围内不随 pH 变化而变化。结论: 用所建立的方法分别测定了灯盏花乙素苷元的离解常数和油水分配系数, HPLC 法准确度高, 重现性好, 方便简单, 分析快速、准确。

〔关键词〕灯盏花乙素苷元; 高效液相色谱法; 离解常数; 油水分配系数

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2010)05-0028-05

灯盏花, 又名灯盏细辛, 系菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Van. t) Hand - Mazz 的干燥全草^[1-4]。性寒, 味苦、微辛, 具有散寒解表、祛风除湿、活络止痛之功效^[5]。临床主要用于治疗脑血栓形成、脑栓塞等脑血管意外所致完全性及不全性瘫痪。其主要有效成分为灯盏花素 (breviscapine)^[5], 以灯盏乙素 (scutellain) - 4', 5, 6 - 三羟基黄酮 - 7 - 葡萄糖醛酸苷为主 (占 80% 以上), 还包括少量灯盏花甲素 (芹菜素 - 7 - O - 葡萄糖醛酸苷)。灯盏花乙素苷元 (Scutellarein) 的化学结构是 5, 6, 7, 4' - 四羟基黄酮, 与灯盏花乙素的区别在于 7 位羟基上未接葡萄糖醛酸。结构式见图 1。

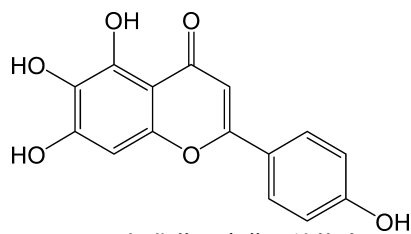


图 1 灯盏花乙素苷元结构式

目前, 临床上使用的灯盏花制剂, 其有效成分为灯盏花乙素, 葛庆华等对灯盏花乙素在犬体内的

药动学和绝对生物利用度进行了研究, 发现灯盏花乙素体内消除迅速, 不适于静脉注射给药, 且口服制剂的生物利用度极低, 几乎不吸收^[6]。灯盏花乙素在大鼠胆汁中的代谢产物研究^[7] 结果发现, 中间产物灯盏花乙素苷元是灯盏花乙素吸收的主要形式。此外, 在对灯盏花乙素苷元代谢产物的研究中发现, 灯盏花乙素苷元口服吸收后在体内主要转化成灯盏花乙素^[8-9]。

本文针对灯盏花乙素苷元的基本理化性质, 采用 pH 高效液相色谱法测定了灯盏花乙素苷元的离解常数。采用振荡-液相色谱法测定了灯盏花乙素苷元的油水分配系数。

1 仪器与试剂

美国 Agilent1200 高效液相色谱仪, 包括 G1322A 真空脱气机, G1311A 四元梯度泵, G1329A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315D 二极管阵列检测器, Chemstation 化学工作站。Luna 5u C18 150 × 4.6mm 色谱柱。雷磁 pHs - 3C 酸度计灯盏花乙素苷元对照品: 昆明制药集团股份有限公司药物研究院制备, 含量 99.5%。尿嘧啶对照品: FMC 公司, 含量 99.5%。甲醇、四氢呋喃为色谱纯, 磷酸、磷酸氢二钠、氯化钠、正辛醇为分析纯。水为重蒸馏水。

* 收稿日期: 2010-07-05 修回日期: 2010-08-30

作者简介: 张伟 (1973 ~), 男, 云南昆明人, 高级工程师, 主要研究方向: 新药研发, 药物分析。

试验用容量仪器均经过校正符合一、二等品。

2 实验原理

pH 高效液相色谱法的原理是: 有机酸或生物碱经同一色谱柱中洗脱, 但每次洗脱时, 所使用流动相都用不同 pH 值缓冲溶液调配。这样即可得到一系列 t_R 值, 用尿嘧啶测定死时间 t_0 , 再根据物质保留因子 k 值与 t_R 值的关系求出 k 值。然后用 k 值和对应的 pH (pOH) 值作图, 就可得到该物质的 k - pH (pOH) 曲线。依此曲线采用恰当的数理模型拟合, 并求出该曲线的拐点, 即二阶导数为零所对应 pH, 就可求得该物质的离解常数。原理如表 1^[7]。

3 实验部分

3.1 pH - HPLC 测定灯盏花乙素苷元的离解常数

3.1.1 色谱条件

用十八烷基键合硅胶为填充剂; 以甲醇—四氢呋喃—不同 pH 缓冲溶液 (35: 10: 55) 为流动相; 分别在 336nm 和 259nm 检测, 流速为 1mL/min, 进样量为 1 μ L, 理论板数按灯盏花乙素峰计

表 1 pH - HPLC 原理	
相关说明	pH 高效液相色谱法原理
分配系数	$k = C_s/C_m$
分配系数与保留时间的关系	$t_R = t_0 [1 + k (V_s/V_m)]$
分配系数与保留体积关系	$V_R = V_0 [1 + k (V_s/V_m)]$
容量因子与保留时间关系	$t_R = t_0 (1 + k)$
k —pH 关系式	$k = a k_a / (k_a + [H]^+)$

注: C_s : 样品组分在固定相中的浓度; C_m : 样品组分在流动相中的浓度; t_0 : 不被固定相吸附或溶解的组分的保留时间即死时间; V_0 : 未被固定相所占有的空间即死体积; V_s : 在色谱柱中固定相所占有的体积; V_m : 在色谱柱中流动相所占有的体积; k_0 : 未离解酸的分配系数。

算应不低于5 000。柱温控制在 35℃。检测图见图 2、3。

不同 pH 流动相的配制: 试验设计缓冲溶液的 pH 范围为 2.00 ~ 9.00, 此范围的缓冲溶液用 0.1% 磷酸和 0.01mol/L 的磷酸氢二钠混合配制,

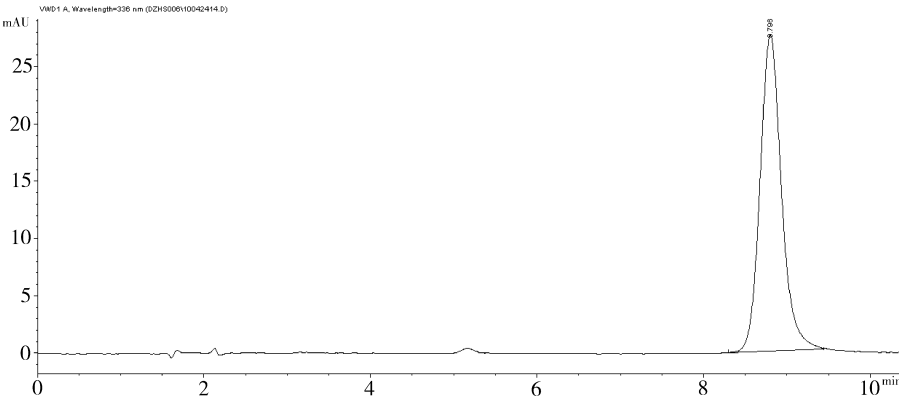


图 2 灯盏花乙素苷元 HPLC 色谱图

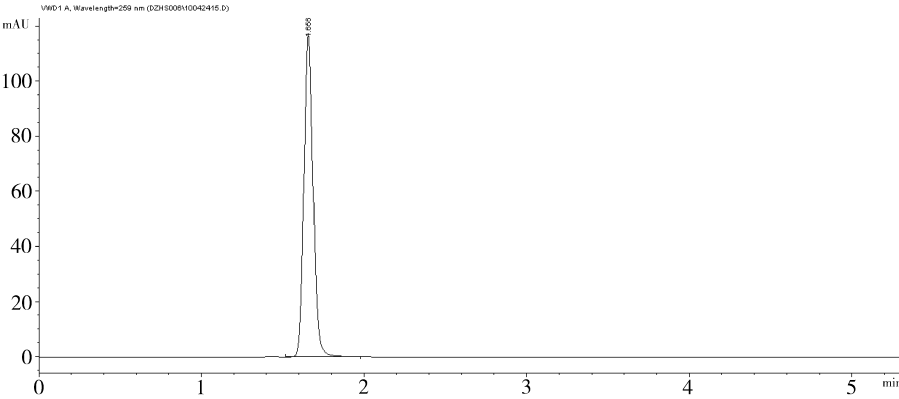


图 3 尿嘧啶 HPLC 色谱图

各缓冲液中分别加入一定量的 50mmol/L 的氯化钠以控制离子强度，每一种缓冲液的 pH 值用酸度计检测，准确度为 0.02pH 单位。

3.1.2 pH-HPLC 测定灯盏花乙素苷元的离解常数方法

取灯盏花乙素苷元适量，精密称定，置于 50mL 容量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，制成 0.1mg/mL 的溶液，即得灯盏花乙素苷元的对照液。取尿嘧啶适量，精密称定，置于 50mL 容量瓶中，用水加热溶解并稀释至刻度，制成 0.1mg/mL 的溶液，即得到尿嘧啶对照液。按照规定的色谱条件，分别精密吸取灯盏花乙素苷元对照液和尿嘧啶对照液各 1μL，注入液相色谱仪测定，即得到灯盏花乙素苷元的保留时间 t_R 和尿嘧啶的保留时间 t_0 （即死时间），从而求得容量因子 k ，然后再以 pH- k 作图，并利用合适的数理模型求得灯盏花乙素苷元的离解常数，结果见表 2、3，图 4。

利用拟合曲线方程进行二阶求导，可以求出 pK_a 。

HPLC 法测定离解常数 $pK_a=6.54189$ 。

利用拟合曲线方程进行二阶求导，可求出 pK_a 。HPLC 法测定灯盏花乙素苷元离解常数 $pK_a=6.54$ 。

表 2 pH-k 表

编号	pH	t_R	t_0	k
1	2.35	8.908	1.649	4.402
2	3.39	8.796	1.651	4.328
3	3.80	8.778	1.658	4.294
4	4.48	8.799	1.656	4.313
5	4.90	8.779	1.652	4.314
6	5.39	8.563	1.650	4.189
7	5.81	7.559	1.646	3.592
8	6.20	5.906	1.645	2.590
9	6.79	4.622	1.644	1.811
10	7.30	2.850	1.687	0.689
11	8.20	1.740	1.579	0.102

表 3 Logistic 数理模型拟合 pH-k 图

拟合曲线名称	拟合曲线方程	R^2
Logistic	$y = -0.14672 + [4.38099 + (-0.14672)] / 1 + (x/6.54189)^p$	0.99355

3.2 pH-HPLC 测定灯盏花乙素苷元的油水分配系数

3.2.1 色谱条件

参照 pH-HPLC 测定灯盏花乙素苷元的离解常数的色谱条件，其中缓冲溶液采用 0.1% 磷酸水溶液。但油水分配系数的测定是定量实验，进样量为 10μL。

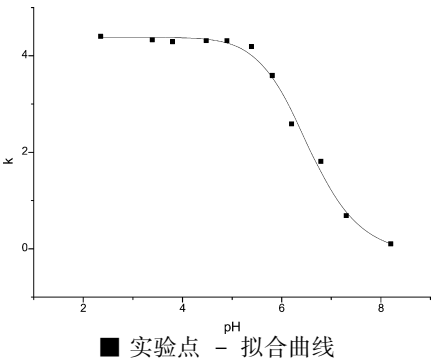


图 4 Logistic 数理模型拟合 pH-k 图

3.2.2 不同 pH 条件流动相的配制

实验设计缓冲溶液的 pH 范围为 3.0~9.0，此范围的缓冲溶液按《中国药典》2005 年版二部附录 XV D 配制，经测定 pH 值为 3.00，3.50，4.00，5.00，6.00，6.50，7.00，8.00，9.00。然后将不同 pH 值的缓冲液与正辛醇按 1:1 的比例混匀，分别饱和 4~5h，再用分液漏斗萃取，所得上层溶液为正辛醇，下层溶液为不同 pH 值的缓冲液。

3.2.3 线性关系考察

精密称取灯盏花乙素苷元对照品适量，用甲醇溶解并稀释制成 0.2mg/mL 的对照品溶液。精密称吸取对照品溶液 5、7、10、12、15、20μL，注入液相色谱仪，以对照品进样量（μg）为横坐标，峰面积积分值为纵坐标，绘制标准曲线，计算回归方程。异可利定和普罗托品的回归方程分别为：

$y = 40310x - 269331 \quad r = 0.9998$

结果表明灯盏花乙素苷元在 1μg ~4μg 范围内线性良好。

3.2.4 pH – HPLC 测定灯盏花乙素苷元的油水分分配系数方法

取灯盏花乙素苷元适量，精密称定，置于 25mL 容量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，配制浓度为 0.4mg/mL 的溶液作为母液。精密量取一定量的母液置于 10mL 的容量瓶中，分别用 3.00，3.50，4.00，5.00，6.00，6.50，7.00，8.00，9.00 的等不同 pH 缓冲液，稀释至刻度，摇匀作为供试液，按照规定的色谱条件，用注射器吸取溶液 10.0μL，经 0.45 微米微孔滤膜过滤，注入高效液相色谱仪检测。

精密量取各供试液适量与被饱和过的正辛醇置于具塞试管中，实验前蒸馏水和正辛醇分别用正辛醇和蒸馏水饱和。将具塞试管放入恒温振荡器中，于 37℃ 振摇 4h 平衡，再以 4 000r/min 离心 10min，使两相分离，取下层水溶液 10.0μL，经 0.45μm 微孔滤膜过滤，注入高效液相色谱仪检测。两者之差为灯盏花乙素苷元在正辛醇中的浓度也就是在油相中药物的浓度，并按下式计算油水分分配系数：

$$P_{o/w} = C_{\text{正辛醇}} / C_{\text{水}}$$

式中 $P_{o/w}$ 为油水分分配系数； $C_{\text{正辛醇}}$ 为分配后油相中的药物浓度； $C_{\text{水}}$ 为水相中的药物浓度；然后根据数据计算出 $\log P_{o/w}$ 的数值，做出一个曲线，横坐标为 pH 值，纵坐标为 $\log P_{o/w}$ 的数值。通过结果，我们可以看到灯盏花乙素苷元的油水分分配系数随 pH 的变化关系。结果见表 4，图 5。

结果表明，灯盏花乙素苷元在正辛醇 – 缓冲溶液中的分配系数受溶液的 pH 值影响不大。pH 在 3.0 ~8.0 范围内，灯盏花乙素苷元的油水分分配系数 $P_{o/w}$ 为 0.99， $\log P_{o/w}$ 趋近于零。表明：灯盏花乙素苷元具有较好的亲脂性，透过生物膜的性能较好，是灯盏花乙素在体内的主要吸收形式，故灯盏花乙素苷元在体内的生物利用度较高。

4 讨论

pH – HPLC 法测定离解常数的关键在于：（1）虽然准确配制了 pH 值不同的缓冲溶液，但由于固定相十八烷基键合硅胶中的硅胶显弱酸性，所以需要花较长时间平衡色谱柱，方可进样；（2）加入离子强度调节剂；（3）流动相中有机溶剂与缓冲溶液的比例应恒定。

表 4 pH – $P_{o/w}$ 表

编号	pH	$C_{\text{水}}$	$C_{\text{水}}'$	$C_{\text{醇}}$	$P_{o/w}$	$\log P_{o/w}$
1	3.00	13.48	0.12	13.36	0.991	-0.00393
2	3.50	38.04	0.27	37.77	0.993	-0.00305
3	4.00	6.13	0.07	6.06	0.989	-0.0048
4	5.00	9.20	0.13	9.07	0.986	-0.00612
5	6.00	10.98	0.11	10.87	0.990	-0.00436
6	6.50	15.18	0.20	14.98	0.987	-0.00568
7	7.00	15.54	0.35	15.19	0.977	-0.01
8	8.00	14.40	0.49	13.91	0.966	-0.02
9	9.00	1.04	0.13	0.91	0.875	-0.06

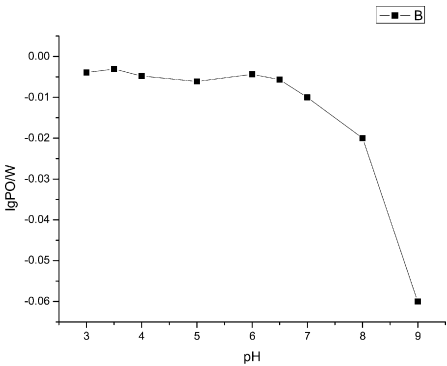


图 5 pH – $\log P_{o/w}$ 图

pH – HPLC 法测定离解常数中，由于测定的是流动相混合前的水溶液时 pH 值，严格地讲不能代表混合后流动相的 pH 值，但是又由于含有机溶剂的流动相 pH 难测定准确，经过比试实验流动相混合前后 pH 值差别，混合后的 pH 变化范围不大，可忽略。

油水分分配系数的测定方法有很多，如摇瓶法、HPLC 法等，本实验采用振荡 – 高效液相法。正辛醇极性与多数有机体液的极性相差不大，其溶解度参数与生物膜的溶解度参数一致，可以选用正辛醇作为模拟生物膜相的有机溶剂，故本实验中采用正辛醇 – 水体系。药物在正辛醇 – 水体系的分配系数不等于药物在正辛醇中的溶解度和在水中的溶解度之比。因为体系的有机相不是纯正辛醇，水相也不是纯水，两相平衡时有机相含少量水，水相中含少量正辛醇。因此，先用纯水饱和正辛醇，避免实验过程中伴随正辛醇与水的分配过程。

本实验测定了灯盏花乙素苷元的油水分配系数,结果表明:不同 pH 的缓冲溶液对灯盏花乙素苷元的油水分配系数的影响较小。体内胃肠道 pH 值范围在 1.4~8,本实验设计缓冲溶液的范围是 3.0~8.0,是为了较好的模拟生物体,故可初步认为灯盏花乙素苷元在整个胃肠道均有较好的吸收。

[参考文献]

[1] 徐莲英,毛展凯,叶娇云,等. 灯盏花素的理化性质及其稳定性影响因素研究 [J]. 中国中药杂志 2009, 04.

[2] 薛王景,贾晓斌,谭晓斌,等. 雷公藤甲素表观油水分配系数的测定及其对吸收预测的研究 [J]. 中国药 学杂志, 2009, 20 (44): 1560-1563.

[3] 林春,刘鸿高,余选礼,等. 药用植物灯盏花的研究 进展 [J]. 中国野生植物资源, 2003, 22 (1): 8- 11.

[4] 中国药典. 一部 [S]. 1977: 245.

[5] 卫生部药品标准. 中药成方制剂. [S]. 1990: 103.

[6] GE Q H, ZHOU Z, ZH IX J, et al|Pharmacokinetics and absolute bioavailability of breviscap ine in Beagle dogs [J] 1Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2003, 24 (12): 6182-6201.

[7] ZHANG J L, CHE Q M, L I S Z| Study on metabolism of scutellarin in rats by HPLC2MS and HPLC2NMR [J] 1J N atural Products Res, 2003, 5 (4): 2492-2561

[8] 葛庆华,周臻,支晓瑾,等. 灯盏花乙素在犬体内的药 动力学和绝对生物利用度研究 [J]. 中国医药工业杂 志, 2003, 34 (12): 6181

[9] Zhang J L, Che Q M, Li S Z| Study on metabolism of scutellarin in rats by HPLC2MS and HPLC2NMR [J] 1 J Nat Prod, 2003, 5 (4): 2491.

(编辑:迟越)

Determination of Dissociation Constant and Oil/water Partition Coefficient of Scutellarein

ZHANG Wei¹, RONG Na-na², CUI Wen-bo³, YANG Zhao-xiang¹

(1. Institute for Drug Research and Development of Kunming Pharmaceutical Corporation, Kunming Yunnan 650100, China; 2. Kunming Medical College, Kunming Yunnan 650031, China; 3. Dali University, Dali Yunnan 671003, China)

[ABSTRACT] Objective: To study the dissociation constant and oil/water partition coefficient of scutella-rein by pH-chromatography. Methods: The dissociation constant of scutellarein is calculated respectively from the retention factors-pH of mobile phase in the pH-chromatography; A oscillate method was established to determine n-octanol/water partition coefficient of scutellarein. Results: The curve of pH-chromatography showed to be suitable for Logistic fit; The pH 3.0-8.0 of buffer solution had no influence on the distribution coefficient of scutellarein. Conclusions: pH-chromatography can be used to determine the dissociation constant of scutellarein accurately; The oscillate method can be used to determine the oil/water partition coefficient of scutellarein.

[KEY WORDS] scutellarein; HPLC; dissociation constant; oil/water partition coefficient

欢迎订阅《云南中医学院学报》
邮发代号：64-43