

紫外分光光度法测定芒果苷苷元的解离常数

宋亚林¹, 普俊学^{3△}, 张伟³, 宋立明³, 高小惠²

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

3. 云南芒泰高尿酸痛风研究中心, 云南昆明 650100)

摘要: **目的** 采用紫外分光光度法测定芒果苷苷元的解离常数。**方法** 将芒果苷苷元溶于一系列的 pH 值磷酸缓冲盐溶液中,并在芒果苷苷元合适的波长处分别测定吸光值并计算其 pKa 值。**结果** 以 253nm 和 315nm 作为分析波长,利用作图软件拟合曲线求出拐点即是芒果苷苷元的解离常数,计算得到平均值为 6.72。**结论** 通过紫外分光光度法测定了芒果苷元的解离常数,对进一步研究芒果苷苷元的吸收、分布、代谢和排泄等具有重要的参考意义。该方法简单快速,准确可靠。

关键词: 芒果苷苷元; 解离常数; 紫外分光光度法

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)05-0020-04

芒果苷(Mangiferin),为淡黄色针状结晶(50%乙醇。熔点 267~272℃(分解)。旋光度+43.3°(c=0.9,吡啶)。略溶于甲醇、乙醇、水,可溶于热稀甲醇、热稀乙醇,不溶于非极性溶剂。主要存在于漆树科植物芒果树的叶^[1](*Mangifera indica* L.),扁桃树(*Mangifera persiciformis*)的叶、果实、树皮^[2],龙胆科植物东北龙胆(*Gentiana manshurica* Kitag),川西獐芽菜(*Swertia mussotii* Franch),百合科植物知母(*Anemarrhena asphodeloides* Bge.),水龙科植物光石韦 [*Pyrosiaclvata* (Bak)Chin], 瑞香科树木(*Gnidia involucrata*)的地上部份,贯叶连翘[St.Johns' wort(*Hypericum perforatum* L.)],暴马丁香[*Salacia reticulata* (SRE)]的根等,资源非常丰富。芒果苷对中枢神经^[3],对心血管系统^[4-5]等都有良好的药理活性。最新药理研究表明,芒果苷具有显著的降血清尿酸^[6]的作用。但芒果苷溶解性低,口服生物利用度差^[7],是限制其应用的一个重要原因。黄慧学^[8]等在研究离体人肠道菌群在体外对芒果苷代谢转化时,发现在离体条件下,芒果苷可被人肠道菌群代谢,主要代谢产物为芒果苷的苷元(如图 1)。芒果苷和芒果苷元在犬体内的药动学和绝对生物利用度研究中表明,芒果苷元灌胃给药后 Beagle 犬的绝对生物利用度远远高于芒果苷。因此,直接采用芒果苷苷元替代芒果

苷在临床中的应用中具有一定的优势。本文将测定芒果苷苷元的基本理化性质解离常数,为芒果苷苷元进一步的研究提供参考。

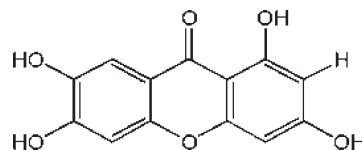


图 1 芒果苷苷元结构式

解离常数是药物的重要理化性质之一,测定药物解离常数的方法有毛细管电泳法^[9]、电位滴定法^[10]、紫外可见分光光度法^[11]、高效液相法^[12]、电导法^[13]等。本文针对芒果苷苷元的基本理化性质,采用紫外分光光度法测定芒果苷苷元的解离常数,简单易行,准确可靠。

1 实验原理

有机弱酸弱碱药物在介质中可以发生电离,以一元有机弱酸为例,在水中达到电离平衡: $\text{HB} = \text{H}^+ + \text{B}^-$,在稀溶液中解离常数 $K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{B}^-]}{[\text{HB}]}$ 。两边取负对数得:

$$\text{p}K_a = \text{pH} + \lg \frac{[\text{HB}]}{[\text{B}^-]} \quad [1]$$

收稿日期: 2014-06-24

作者简介: 宋亚林(1990-),女,山东济宁人,在读硕士研究生,研究方向:药剂学。

△通信作者: 普俊学, E-mail: junxue.pu@holley.cn.

[1]式中 HB 为共轭酸, B^- 为共轭碱。如果 HB 和 B^- 均有紫外吸收, 且紫外吸收光谱又有明显的差异, 就可以用分光光度法测定 pK_a 值。测定时, 可取待测药物, 配制 3 份浓度相等的溶液, 通过调节 pH 值, 使溶液(1)中的药物部分 HB 以的形式存在, 部分 B^- 以存在; 溶液(2)中的药物以 HB 的形式存在; 溶液(3)中的药物以 B^- 的形式存在; 设溶液(1)(2)(3)中药物的浓度分别为 C , 溶液(1)中 HB 的浓度为 C_{HB} , B^- 的浓度为 C_{B^-} , A_{HB} 、 A_{B^-} 分别为在一定波长处溶液(1)(2)(3)的吸光度。如果 HB 与 B^- 的紫外吸收均符合吸收定律, 那么:

$$\frac{A - A_{B^-}}{A_{HB} - A_{B^-}} = \frac{(\varepsilon_{HB}C_{HB} - \varepsilon_{B^-}C_{B^-}) - \varepsilon_{B^-}C}{\varepsilon_{HB}C - (\varepsilon_{HB}C_{HB} + \varepsilon_{B^-}C_{B^-})} = \frac{\varepsilon_{HB}C_{HB} - \varepsilon_{B^-}C_{B^-}}{\varepsilon_{HB}C_{B^-} - \varepsilon_{B^-}C_{B^-}} =$$

$$\frac{C_{HB}(\varepsilon_{HB} - \varepsilon_{B^-})}{C_{B^-}(\varepsilon_{HB} - \varepsilon_{B^-})} = \frac{C_{HB}}{C_{B^-}}$$

将 $\frac{C_{HB}}{C_{B^-}} = \frac{A - A_{B^-}}{A_{HB} - A_{B^-}}$ 代入[1]式则可推出

$$pK_a = pH + \lg \frac{A - A_{B^-}}{A_{HB} - A_{B^-}} \quad [2]$$

即可计算出有机弱酸药物的 pK_a 值。其中[2]式中 pH 值为溶液(1)的 pH 值^[14]。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Sartorius CP225D 型电子天平, 梅特勒-托利多 FE20 型 pH 计, 日本岛津 UV-2450 紫外-可见分光光度计, 芒果苷元(批号: 20131210 含量 98.73% 昆明制药集团股份有限公司药物研究院制备), 磷酸二氢钾(批号: 20130214 分析纯 天津市风船化学试剂科技有限公司)氢氧化钠(批号: 20111126 分析纯 云南杨林工业开发区汕滇药业)磷酸(批号: 20120625 分析纯 云南杨林工业开发区汕滇药业)甲醇(批号: L4BON52 色谱纯 北京百灵威科技有限公司)实验用水为超纯水。

2.2 实验方法

分别取 0.1mol/L 的磷酸二氢钾 50mL 于 10 个锥形瓶中, 用 0.2mol/L 的氢氧化钠调 pH, 配制一系列 pH 值为 2.52, 3.47, 4.47, 5.13, 5.58, 6.05, 6.44, 7.10, 8.10, 9.23 的缓冲溶液(20±1)℃, 备用。精密称取芒果苷元 10.21mg, 置 100mL 量瓶中, 加甲醇使完全溶解并定容, 摇匀, 作为储备液备用。准确量取 2mL 的储备液于 10 个 25mL 量瓶中, 分别用不同的 pH 值的缓冲溶液定容, 摇匀, 得到不同 pH 值得芒果苷元供试品溶液。分别将不同 pH 的

芒果苷元供试品溶液置 1cm 吸收池中, 以对应的 pH 缓冲液做空白, 在 190~400nm 波长范围内扫描, 得到不同 pH 值的芒果苷元溶液的紫外吸收光谱(图 2), 选择合适波长处测定不同 pH 值得芒果苷元供试品溶液的吸光度值, 利用 Origin7.5 作图软件拟合曲线求出拐点即是芒果苷元的解离常数。

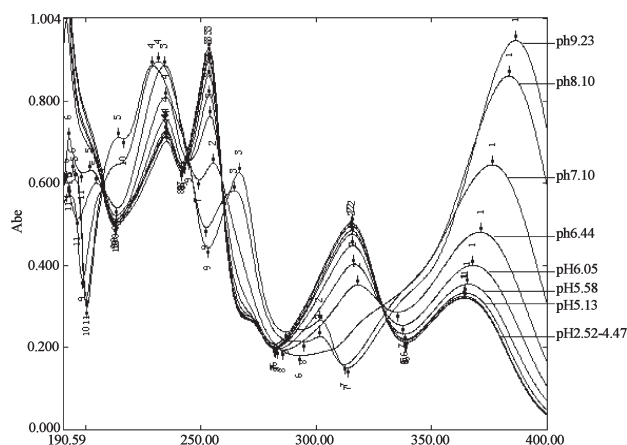


图2 芒果苷元在不同 pH 缓冲溶液中的紫外吸收光谱

3 结果

3.1 测定波长的选定

图 1 为不同 pH 值芒果苷元溶液的紫外吸收光谱图, 可以看出 pH2.52~4.47 的缓冲溶液的紫外吸收光谱基本重合, 可以认为在 pH4.47 以下, 药物基本上以分子形式存在; pH8.10~9.23 的缓冲溶液的紫外吸收光谱基本重合, 可以认为在 pH8.10~9.23, 药物基本上以离子形式存在; pH4.47~8.10, 药物一部分以分子状态存在, 一部分以离子状态存在。

芒果苷元为有机弱酸, 具有 4 个酚羟基, 其解离能力不同, 在不同 pH 值的缓冲溶液中分子型和离子型的摩尔比不同, 从而导致紫外吸收曲线的差异, 由图 1 可看出, 药物在波长 253nm, 315nm 出随 pH 值的变化, 曲线呈现规律性变化, 因此可以选择这两个波长作为测定波长。在测定波长处测定不同 pH 值芒果苷元溶液的吸光度, 结果见表 1。

3.2 芒果苷元解离常数的测定

利用 Origin7.5 作图软件做图法可求芒果苷元的 pK_a 值。Origin7.5 是美国 OriginLab 公司推出的基于 Windows 平台的数据分析和科技绘图软件, 被公认为是最快、最灵活、使用最容易的数据分析和绘图软件, 可以用于一般用户的制图, 也可以用于高级用户数据分析和函数拟合。用其绘制出的图形科学规范, 广泛应用于学术论文中^[15]。

表 1 不同 pH 值芒果苷元溶液的吸光度

编号	pH 值	吸光度 A	
		253nm	315nm
1	2.52	0.929	0.503
2	3.47	0.919	0.497
3	4.47	0.902	0.485
4	5.13	0.895	0.477
5	5.58	0.863	0.448
6	6.05	0.815	0.401
7	6.44	0.758	0.345
8	7.10	0.635	0.237
9	8.10	0.494	0.166
10	9.23	0.442	0.153

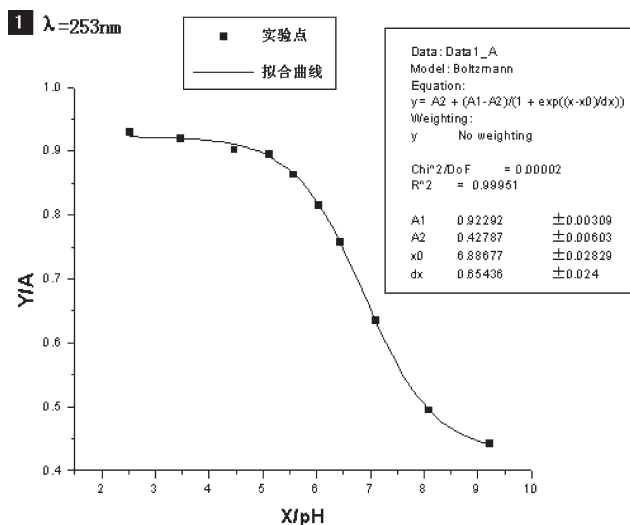


图 3 Sigmoidal 数理模型拟合 A-pH 曲线

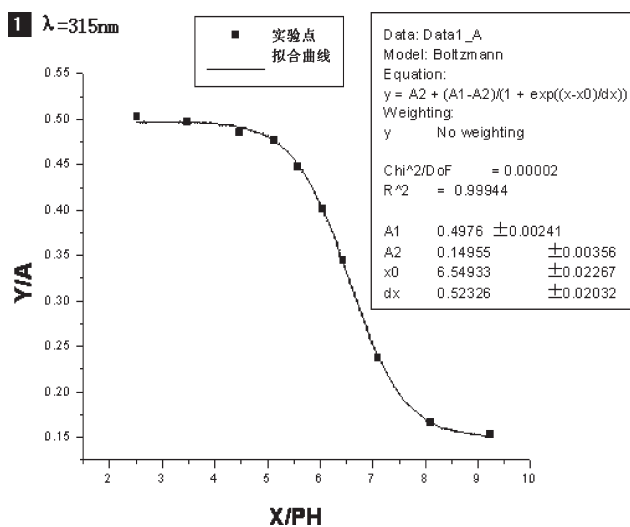


图 4 Sigmoidal 数理模型拟合 A-pH 曲线

如图 3、4, 利用 Origin7.5 作图软件以 pH 值为横坐标, 以不同 pH 值对应的吸光度值 A 为纵坐标, 以 Sigmoidal 数理模型拟合曲线方程 $Y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + \exp((x - x_0)/dx))$ 进行二阶求导, 其中 A_1 、 A_2 、 x_0 都在图中可知, 拐点 x_0 就为所求的芒果苷元的解离常数 pK_a 值。即可求出 253nm 和 315nm 时的 pK_a 值。 $\lambda = 253\text{nm}$ 时, $pK_{a1} = 6.88677$ 相关系数: $R^2 = 0.99951$, $\lambda = 315\text{nm}$, $pK_{a2} = 6.54933$, 相关系数: $R^2 = 0.99944$; 所以所得的 pK_a 值比较可靠。求得芒果苷元解离常数的平均值: $pK_a = 6.72$ 。

4 讨论

①用紫外分光光度法测定 pK_a 值, 待测药物的酸碱性强弱以 pK_a 值在 2~9 之间为宜^[16]。药物的 pK_a 值过大或过小, 都不利于测定。

②紫外分光光度法测定待测物质解离常数, 容易受温度、湿度、操作者等因素的影响, 有一定的误差。所以本实验是在恒温 (20 ± 1) °C 的条件下配样并测定, 误差较小。

③本实验选取两个测定波长, 分别计算在不同测定波长下芒果苷元的解离常数, 且这两个波长处的吸收曲线比较平坦, 呈规律性变化,

④本实验用紫外分光光度法测定了芒果苷元的解离常数为 6.72, 该方法操作简单易行, 进一步研究芒果苷元的提取分离、制剂研究及其在生物体内的吸收、分布和代谢过程具有重要的参考意义。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 1040.
- [2] 黄海滨, 戴航, 李学坚, 等. RP-HPLC 测定不同产地扁桃叶中芒果苷的含量[J]. 广西中医, 2004, 27(2): 51-52.
- [3] 郑子敏, 韦健全, 罗莹, 等. 芒果苷对行为绝望小鼠的抗抑郁作用研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4): 978-979.
- [4] 王超, 王国贤. 芒果苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(9): 697-700.
- [5] 韦健全, 郑子敏, 潘勇, 等. 芒果苷对异丙肾上腺素诱发小鼠心肌缺血的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(2): 16-18.
- [6] 牛艳芬, 高丽辉, 刘旭, 等. 芒果苷对氧嗪酸钾所致慢性高尿酸血症大鼠尿酸及肝功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(11): 1578-1581.
- [7] Han D, Chen C, Zhang C, et al. Determination of norathyriol in rat plasma by liquid-liquid extraction with UPLC-MS/MS[J]. J Pharm Biomed Anal. 2010, 51(1): 260-263.

- [8] 黄慧学,谭珍媛,邓家刚,等. 人类肠道细菌群对芒果苷体外代谢转化的研究. 中国中药杂志, 2011, 36 (4): 443-444.
- [9] 李菲,丁忠涛,曹秋娥. 5 中大黄蒽醌类衍生物解离常数的测定[J]. 中国中药杂志, 2007, 3(2): 166-168.
- [10] 范晓燕,于媛,徐嫔. 酸碱指示剂解离常数的测定[J]. 实验室科学, 2007, 3(2): 89-90.
- [11] 徐雅贞,杨兆祥,张伟. 紫外分光光度法测定曲札芪苷的解离常数[J]. 云南中医学院学报, 2012, 35(3): 43-46.
- [12] 张伟,严娟娟,杨兆祥. pH 色谱法测定灯盏花乙素解离常数[J]. 云南大学学报, 2010, 32(2): 196-200.
- [13] 董国胜. 几种解离常数测定方法的比较与评价 [J]. 试验研究, 2010, 10(10): 42-44.
- [14] 晁若冰,伍朝贯,贺晓英. 弱酸弱碱性药物 pKa 值得分光光度测定法[J]. 华西药学杂志, 1990, 5(2): 104-106.
- [15] 朱海涛,陈少秀,蔡 华,等. Origin 软件在药学研究数据作图中的应用[J]. 医药导报, 2008, 27(9): 1089-1091.
- [16] 何冀川,李松,罗英. 紫外分光光度法测定莽草酸的解离常数[J]. 绵阳师范学院学报, 2006, 25(5): 40-42.

(编辑: 杨阳)

Determination of Dissociation Constants of Norathyriol by UV Spectrophotometry

SONG Ya-lin¹, PU Jun-xue³, ZHANG Wei³, SONG Li-ming³, GAO Xiao-hui²

(1. Dali University, Kunming 671003, China; 2. Institute for Drug Research and Development of Kunming Pharmaceutical Corporation, Kunming 650100, China; 3. Yunnan Mangtai Hyperuricemia and Gout Research Center, Kunming 650100, China)

ABSTRACT: **Objective** To determine dissociation constants of norathyriol by UV spectrophotometry. **Methods** Norathyriol was dissolved in phosphate buffer solution of different pH values, and the pKa values were calculated according to the measured absorbance of the solutions. **Results** The pKa value was found to be 6.72 which the point of inflection using mapping software fitting curves using wavelengths 253 and 315 nm for the determination respectively. **Conclusion** The dissociation constant of norathyriol was determined using ultraviolet spectrometry. It has important reference significance for the investigations of absorption, distribution, metabolism and excretion of the drug. This method is simple, rapid, accurate and reliable.

KEY WORDS: Norathyriol; dissociation constant; UV spectrophotometry

(上接第 19 页)

- [J]. 实用中西医结合临床, 2010, 10(2): 29-30.
- [4] 罗庆东,姜德友. 鳖甲煎丸的临床研究与进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2012, 33(6): 764-766.
- [5] 李宝明,何丽一. 高效液相色谱法测定鳖甲煎胶囊中厚朴酚与和厚朴酚的含量 [J]. 药物分析杂志, 1999(2): 117-119.
- [6] 张庆,马骏,辛俐华. 高效液相色谱法测定鳖甲煎丸中芍药苷和黄芩苷的含量 [J]. 医药导报, 2013, 32(3): 356-359.
- [7] 邵进明,雷战霞,王道平,等. 清胃散不同汤剂和颗粒剂中丹皮酚的含量变化分析 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2014, 12(5): 156-158.
- [8] 李芳,戴跃玲,廖克俭. 微波辅助乙醇回流法提取黄芩苷 [J]. 辽宁化工, 2010, 39(1): 8-11.
- [9] 付起凤,孟凡佳,苗青,等. 牡丹皮中丹皮酚提取工艺的研究进展[J]. 中医药信息, 2010, 27(6): 108-109.
- [10] 牛鹏飞,仇农学. RP-HPLC 同时检测苹果汁中乳酸、富马酸、5-HMF 和展青霉素 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(4): 1158-1164.

(编辑: 杨阳)

Detection of Multi-wavelength Determination in the Extract of Biejiajian Pills

SHENG Yun-jie, FU Ling-zhu, ZHeng Ting, QIN Lei, ZHANG Yong-sheng

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a HPLC method for the determinations of paeoniflorin, baicalin and paeonol in Biejiajian pills. **Methods** Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 column (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm), mobile phase of acetonitrile (A) and 0.1% phosphoric acid (B). Gradient elution, flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength of 240nm and 274nm, the column temperature was 35 $^{\circ}$ C. **Results** The linearity ranges of paeoniflorin, baicalin and paeonol was 1.41 ~ 14.11 μ g/mL ($r^2=0.9999$), 7.03 ~ 70.32 μ g/mL ($r^2=0.9999$), 1.23 ~ 12.32 μ g/mL ($r^2=0.9997$) respectively. The average recoveries ($n=9$) were 100.84%, 99.07%, 99.08%. **Conclusion** The results showed that the method can be used to control quality of Biejiajian pills.

KEY WORDS: HPLC; Biejiajian pills; Paeoniflorin; Baicalin; Paeonol