

芒果苷的离解常数和脂水分配系数的测定方法研究^{*}

董知旭, 张 伟

(昆药集团股份有限公司药物研究院, 云南 昆明 650100)

摘要: 目的 建立芒果苷离解常数和脂水分配系数的测定方法。方法 采用紫外分光光度法和 pH-HPLC 色谱法测定了芒果苷离解常数, 并对两种方法进行比较; 用摇瓶法—高效液相色谱(HPLC)法测定了芒果苷在正辛醇—不同 pH 缓冲溶液中的脂水分配系数。结果 通过高效液相色谱(HPLC)法和紫外分光光度法对芒果苷离解常数进行测定方法研究。紫外分光光度法中, 测定了芒果苷的离解常数为 6.52, 在高效液相色谱法中, 测定了芒果苷的离解常数为 6.1。采用摇瓶法—HPLC 法测定了芒果苷在正辛醇—不同 pH 缓冲溶液中的脂水分配系数。当 pH2.0~5.0 时, 芒果苷在正辛醇—缓冲溶液中的脂水分配系数受溶液的 pH 值影响不大, 当 pH6.70~8.18 时, 芒果苷的脂水分配系数大幅度减小, 说明在酸性条件下, 芒果苷的脂溶性增加, 水溶性下降, 而在碱性条件下, 芒果苷的脂溶性下降, 水溶性增加。结论 用所建立的方法分别测定了芒果苷的离解常数和脂水分配系数, HPLC 法准确度高, 重现性好, 方便简单, 分析快速、准确。

关键词: 芒果苷; 紫外分光光度法; 高效液相色谱法; 解离常数; 脂水分配系数

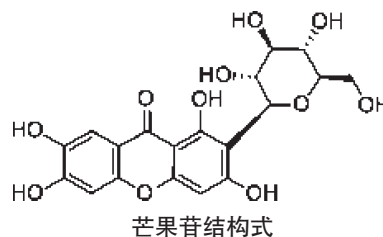
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)05-0018-07

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.05.005

芒果苷(Mangiferin)又称芒果素, 莞知母宁, 为淡灰黄色针状结晶(50%乙醇。熔点 267~272℃(分解)。旋光度+43.3°(c=0.9, 吡啶), 32°(乙醇)。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。是一种氧杂蒽酮类化合物, 化学名为氧杂蒽酮 C2 葡萄糖苷, 系统名为 22C2β2D2 吡喃葡萄糖 21,3,6,7,2 四羟基氧杂蒽酮^[1]。存在于漆树科植物芒果(*Mangifera indica* L.)的果实、叶、树皮, 百合科植物知母(*Anemarrhena asphodeloides* Bge.)的根茎、地上部分, 鸢尾科植物射干(*Belamcanda chinensis* (L.)DC.)的花、叶等植物中。本品具有平喘止咳祛痰作用免疫^[1-2]、抗病毒作用^[3-4]、抗炎、镇痛作用、保肝利胆作用、抗脂质过氧化作用、抗肿瘤作用^[5-7]、对中枢神经系统作用、对心血管系统的作用、抗菌作用^[8]等。最新药理研究表明, 芒果苷具有显著的降血清尿酸作用^[9]。

化合物脂水分配系数和离解常数是药物在生产、制剂、分析、储存及药物在体内吸收、分布、代谢等研究中的一个重要理化参数。且与药物溶解度和

pH 值有关的理化常数, 药物离解常数和脂水分配系数的测定可为在分子水平上研究药物的吸收与受体结合提供重要的信息, 同时也在药物新剂型和新配方的研制中具有重要的指导意义。离解常数的测定有电位滴定法^[10]、分光光度法^[11]、薄层色谱 pH 法^[12]、反高效液相色谱法。本文针对芒果苷基本理化性质, 拟采用 UV 和 pH-HPLC 法测定离解常数, 并对这 2 种方法进行比较。采用摇瓶法—HPLC 法测定了芒果苷在正辛醇—不同 pH 缓冲溶液中的脂水分配系数。



1 仪器与试药

芒果苷(20090723 由昆明制药药物研究院提供)、芒果苷对照品(98.4% 111607-201503 中国食

^{*} 基金项目: 云南省重点新产品开发计划项目(2012BC008)

收稿日期: 2016-07-12

作者简介: 董知旭(1986-), 男, 云南墨江人, 助理工程师, 主要从事新药开发质量研究工作。E-mail: dongzhixu668@163.com

品药品检定研究院)、正辛醇(分析纯 20010205 中国五联化工厂 上海)甲醇(分析纯 20100627 云南杨林工业开发区汕滇药业有限公司)、磷酸(分析纯 20091220 云南杨林工业开发区汕滇药业有限公司)、磷酸氢二钾(分析纯 20020815 汕头市达濠精细化学品有限公司)、氨水(分析纯 20080716 汕头市达濠精细化学品有限公司)、PE20 pH 计(美国梅特勒公司)、UV-2450 紫外分光光度计(日本岛津公司)、美国 Agilent 1200 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)、Agilent ZORBAX SB-C10 5 μ m 4.6 $\times$ 150mm 色谱柱。

2 实验原理

紫外分光光度法测离解常数的原理^[13]:其原理基于在强酸性溶液中全部为分子型[HA],而在强碱性溶液中全部解离为离子型[A⁻],因而可在强酸强碱性缓冲液中强酸在某波长 λ 时的完全分子型和完全离子型的吸收度 A_M 和 A_I ,在其他适宜 pH 缓冲液中,在相同波长处测出相同浓度弱酸溶液的吸收度 A 值为分子型和离子型的混合吸收度,即:

$$A = A_I' + A_M'$$

由下式即可求出解离常数:

$$\text{当 } A_M > A_I, pK_a = \text{pH} + \lg \frac{A - A_I}{A_M - A} \quad (1)$$

$$\text{当 } A > A_M, pK_a = \text{pH} + \lg \frac{A_I - A}{A - A_M} \quad (2)$$

pH 高效液相色谱法测离解常数的原理^[14]: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 κ 值与 t_R 值的关系求出 κ 值。然后用 κ 值和对应的 pH(pOH)值作图,就可得到该物质的 κ -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 0 所对应 pH,就可求得该物质的离解常数。

$$\text{因为色谱中分配系数 } K = \frac{C_s}{C_m} \quad (3)$$

分配系数与保留时间的关系:

$$t_R = t_0 \left[1 + k \left(\frac{V_s}{V_m} \right) \right] \quad (4)$$

分配系数与保留体积关系:

$$V_R = V_0 [1 + K \left(\frac{V_s}{V_m} \right)] \quad (5)$$

容量因子与保留时间关系:

$$T_R = T_0 (1 + \kappa) \quad (6)$$

$$\kappa\text{-pH 关系式 } \kappa = a \frac{K_a}{K_a + C_{H^+}} \quad (7)$$

振荡—高效液相色谱法测脂水分配系数原理^[15]: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。正辛醇—水体系是研究药物在角质层—水中分配的良好模型。药物表观脂水分配系数(P)的数学表达式为:

$$P = \frac{C_o}{C_w} \quad (8)$$

C_o 为油相中药物的浓度; C_w 为水相中药物的浓度。实验中,因为水相和油相的体积相等,故在药物分配达到平衡时 $C_o = C_{w\text{初}} - C_w$,即油相中药物的浓度等于初始水相中药物的浓度与水相中药物的浓度测定后的差值。

$$P = \frac{C_{o\text{初}} - C_w}{C_w} \quad (9)$$

本实验用公式(2)计算芒果苷的脂水分配系数^[16]。

而水相的药物浓度 C_w 又可以根据外标法求出,公式如下:

$$\frac{A_{\text{对}}}{A_{\text{标}}} = \frac{C_{\text{对}}}{C_{\text{标}}} \quad (10)$$

3 实验部分

3.1 离解常数测定

3.1.1 紫外分光光度法测芒果苷的 pK_a

3.1.1.1 缓冲液的配制

缓冲溶液用 0.1 mol/L 的磷酸氢二钾和 0.1% 磷酸混合配制^[17]成 pH 为 1.53、2.19、3.09、4.67、5.62、6.38、7.28、8.01、9.29 的缓冲液,用氨水—氯化铵配制 pH 为 10.34 的缓冲液。

3.1.1.2 供试液的制备

称取芒果苷 10mg 用甲醇溶于 100mL 容量瓶中并用甲醇超声 10min 溶解然后定容制成储备液。把 25mL 容量瓶编号 1~10,用移液管分别从储备液中移取 5mL 到各个容量瓶中,分别用不同的缓冲液超声 5min 溶解然后室温条件下定容,得到不同 pH 的芒果苷供试液。

3.1.1.3 供试液的测定

分别将不同 PH 的芒果苷溶液置 1cm 吸收池中,以对应的 pH 缓冲液做空白,在 190~400 波长范围内扫描,得到不同 pH 值的芒果苷溶液的紫外吸收光谱(图 1)。

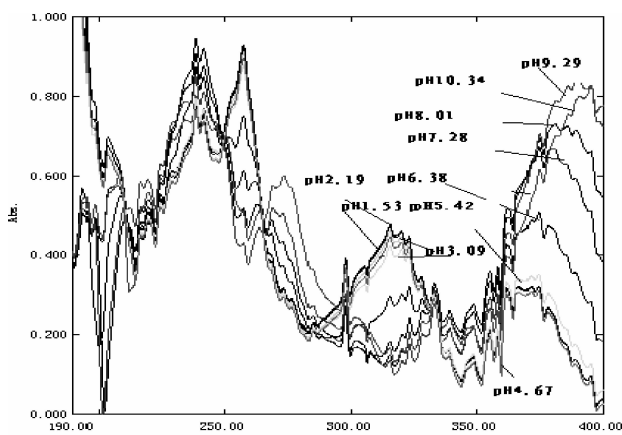


图 1 芒果苷在不同 pH 的紫外吸收光谱

3.1.1.4 数据计算

根据芒果苷的分子型和离子型的紫外吸收光谱不同(因为随着 pH 值的改变溶液中分子型、离子型药物浓度的比值发生改变,所以产生不同的紫外吸收光谱)。从图 1 判断出芒果苷分子型和离子型时的吸光度,然后把所得数据代入上面公式(2)求出 pK_a 的值。

3.1.1.5 数据处理与结果

(1) 从图 2 可以看出 pH 为 1.53 和 pH 为 2.19 时芒果苷溶液的紫外吸收光谱重合,所以此时为光度为 A' ,当 pH 为 8.01~9.29 时,光谱几乎重合,所以选 pH 为 9.29 时应该都为分子型此时的 A 为 A_M' 。

(2) 为了使测定结果更准确,可在多个波长进行检测。从图中可以看出,在 258nm、320nm 波长处,吸收度随 pH 值有明显变化,所以选以上两个波长为测定波长。

在选定波长处,分别测定以上溶液的吸光度,结果见表 1。

选取波长为 258nm、320nm 的吸光度按(2)式计算 pK_a 值,结果见表 2.不同 PH 值溶液在不同波长处测得 pK_a 值应该是一致的,其差异是由测量误差引起的。

(3) 利用 Origin75 作图软件做图法求芒果苷的 pK_a 值,如图 2。

利用 Sigmoidal 数理模型拟合曲线方程 $Y=A_2+$

表 1 不同 pH 值芒果苷溶液的吸光度

编号	pH 值	吸光度	
		258nm	320nm
1	1.53	0.921	0.461
2	2.19	0.913	0.458
3	3.09	0.911	0.456
4	4.67	0.905	0.452
5	5.42	0.870	0.414
6	6.38	0.741	0.323
7	7.28	0.602	0.198
8	8.01	0.504	0.159
9	9.29	0.414	0.132
10	10.34	0.490	0.163

表 2 芒果苷 pK_a 值的测定结果

编号	pH	pK_a 值	
		258nm	320nm
4	4.67	6.19	6.27
5	5.42	6.38	6.20
6	6.38	6.64	6.52
pK_a		6.37±0.06	

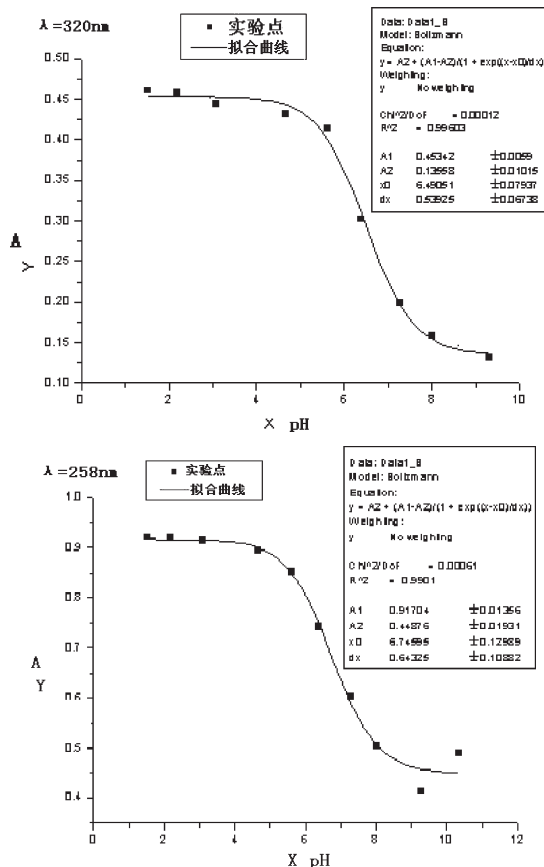


图 2 Sigmoidal 数理模型拟合 A-pH 图

$(A_1 - A_2) / (1 + \exp((x - x_0)/dx))$ 进行二阶求导, 其中 A_1 、 A_2 、 x_0 都在图中可知。 x_0 就为所求的值。

即可求出 258nm 和 320nm 时的值。

$\lambda = 320\text{nm}$ 时, $pK_{a1} = 6.491$ 相关系数: $R^2 = 0.99613$; $\lambda = 258\text{nm}$ 时 $pK_{a2} = 6.546$ 相关系数: $R^2 = 0.9901$, 所以所得的 pK_a 值比较可靠。即求平均值: $\overline{pK_a} = 6.519$

比较计算得的 $\overline{pK_a}$ 值与作图得到的 $\overline{pK_a}$ 值相差不大。

3.1.2 pH-高效液相色谱法测芒果苷的 pK_a

3.1.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C10 $5\mu\text{m}$ $4.6 \times 150\text{mm}$; 流动相: 甲醇—不同 pH 值的缓冲溶液 (23:77); 检测波长: 258nm; 流速: 1.0ml/min ; 柱温: 30°C ; 色谱时间: 20min。

3.1.2.2 样品处理

称取尿嘧啶对照品 25mg 用 80% 甲醇溶解并在 25mL 容量超声 10min, 然后定容作为储备液, 又称取 5mg 芒果苷用一定量的 80% 甲醇溶解转入 50mL 容量瓶中, 然后用 2mL 移液管移取尿嘧啶对照品溶液 2mL 加入 50mL 容量瓶并用 80% 甲醇定容, 制备成芒果苷尿嘧啶待测液。

3.1.2.3 不同 pH 条件流动相的制备

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 0.1mol/L 的磷酸氢二钾和 0.1% 磷酸混合配制, 其中加入一定量的氯化钠作为离子强度调节剂 (氯化钠的加入量为 0.01mol/L), 然后用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤。然后配制成 pH 为 2.44、3.21、4.47、5.33、6.25、6.70、7.25、8.18 的缓冲液。每一种缓冲溶液的 pH 值用酸度计检测, 准确度为 $\pm 0.02\text{pH}$ 单位。

3.1.2.4 pH-HPLC 测定过程

按照规定的色谱条件, 精密吸取芒果苷尿嘧啶待测液 $5\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪用不同 pH 值缓冲液—甲醇 (77:23) 作为流动相测定, 即得芒果苷的保留时间即 t_R , 和尿嘧啶的保留时间即死时间 t_0 (如图 3), 从而根据公式 (4) 求得容量因子 κ , 随得到 κ -pH 图, 再利用数理模型用 Origin75 作图软件作图法求得芒果苷的离解常数, 结果见表 3, 图 4。

3.1.2.5 实验结果与数据处理

下面图 4 是利用 Origin75 作图软件根据 Sigmoidal 数理模型^[8]拟合的 κ -pH 图。

表 3 κ -pH 表

编号	pH	$t_R(\text{min})$	$t_0(\text{min})$	κ_1
1	2.44	12.903	1.643	6.853
2	3.21	12.478	1.645	6.585
3	4.47	9.044	1.472	5.144
4	5.33	8.489	1.476	4.750
5	6.25	5.596	1.484	2.771
6	6.70	3.966	1.486	1.669
7	7.25	2.547	1.482	0.721
8	8.18	1.396	1.466	-0.048

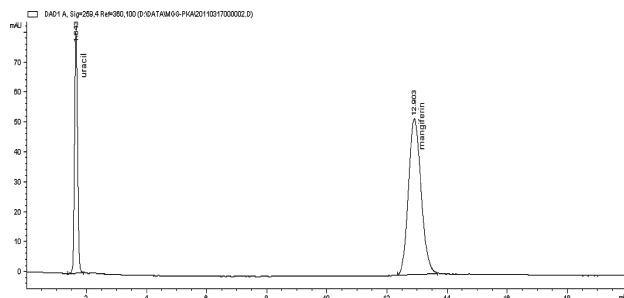


图 3 尿嘧啶和芒果苷的 HPLC 色谱图

表 4 利用 Origin75 作图软件拟合的 Sigmoidal 数理模型拟合曲线方程

拟合曲线名称	组数	拟合曲线方程	R^2
Sigmoidalfit	组一	$Y = -1.14295 + (6.98783 + 1.14295) / (1 + \exp((x - 6.1196) / 1.03775))$	0.99125

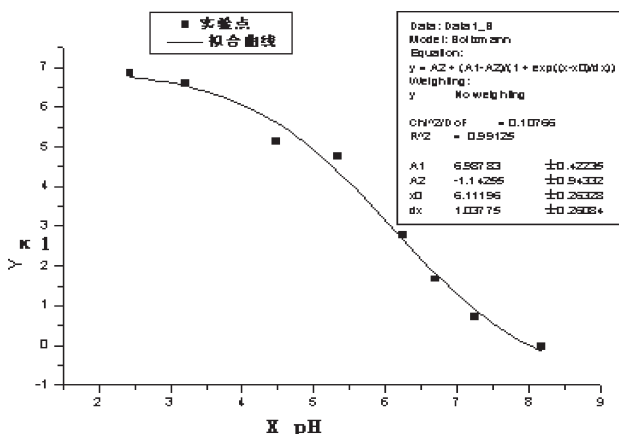


图 4 组一的 Sigmoidal 数理模型拟合 κ -pH 图

结合以上图表根据 Origin75 作图 [软件做出的 Sigmoidal 数理模型拟合曲线方程, 再利用拟合曲线方程进行二阶求导, 可求出 pK_a 。所求就为图 5 中的 X_0 。即 $pK_{a1} = 6.120$ 。

在实验测定过程中, 每一个缓冲液流动相都是双针进样, 最后用 Origin75 作图软件做出的 Sig-

modal 数理模型拟合曲线方程,得出的结果基本一致,且相关系数 $R^2 > 0.99$,所以结果比较准确。

3.1.3 芒果苷脂水分分配系数的测定

3.1.3.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C10 $5\mu\text{m}$ $4.6 \times 150\text{mm}$;流动相:甲醇— $0.2\%\text{H}_3\text{PO}_4$ (30:70);检测波长:258nm;流速:1.0ml/min;柱温: 30°C ;色谱时间:20min。

3.1.3.2 不同 pH 缓冲液的制备

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 0.1mol/L 的磷酸氢二钾和 0.1% 磷酸混合配制。然后配制成 pH 为 2.44、3.21、4.47、5.33、6.25、6.70、7.25、8.18 的缓冲液。每一种缓冲溶液的 pH 值用酸度计检测,准确度为 $\pm 0.02\text{pH}$ 单位。

3.1.3.3 饱和缓冲溶液与饱和正辛醇的制备

将已配制好的不同 pH 值的缓冲液与正辛醇按 1:1 的比例混匀(50mL),分别在恒温振荡器(25°C)饱和 24h^[9],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。

3.1.3.4 供试液与对照液的制备

称取芒果苷 0.100g,用甲醇溶于 100mL 容量瓶中并用甲醇定容后超声 10min 制成储备液。把 10mL 容量瓶编号 1~8,用移液管分别从储备液中移取 1mL 到各个容量瓶中,分别用正辛醇饱和过的不同的缓冲液超声 5min 然后定容,得到不同 pH 的芒果苷供试液。精确称取芒果苷对照品 0.0101g 用甲醇溶于 100mL 容量瓶中并用甲醇定容制成对照液。

3.1.3.5 试验方法

3.1.3.5.1 标准曲线的制备

精密称吸取对照品溶液 1、2、4、5、6、8 μL ,注入液相色谱仪,在 258nm 波长下测定,记录峰面积。以含量(μg)为横坐标,吸光度值 A 为纵坐标,进行线性回归得回归方程。

3.1.3.5.2 精密度试验

精密吸取 0.1mg/mL 芒果苷对照品溶液,平行进样 6 次,每次进样量 5 μL ,以测定仪器中进样精密度。

3.1.3.5.3 脂水分分配系数的测定

取不同 pH 值供试液和对照品 5 μL 注入高效液相色谱仪,记录峰面积,代入公式(3)精确计算各个芒果苷供试液浓度。然后精密量取已配制好的供试溶液 5mL 置于具塞塑料管中,再分别加入被不同 pH 的磷酸盐缓冲溶液饱和过的正辛醇各 5mL,放入振荡器中,温度保持(37 ± 1) $^\circ\text{C}$,振摇 4h 直至平衡,以 4000r/min 转速离心 10min,取下层水相清液,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取 5 μL 注入高效液相色谱仪,记录峰面积,代入公式(3)精确计算芒果苷在不同 pH 值缓冲液浓度。按照公式(2),计算表观脂水分分配系数。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,我们可以看到芒果苷的脂水分分配系数随 pH 的变化关系。结果见表 4、图 5。

3.1.3.5.4 数据处理与结果

(1)以含量(μg)为横坐标,吸光度值 A 为纵坐标,进行线性回归得回归方程: $Y = 87529X + 42918$, $r = 0.99958$;所以芒果苷进样量在 0.10~0.80 μg 之间线性关系良好。

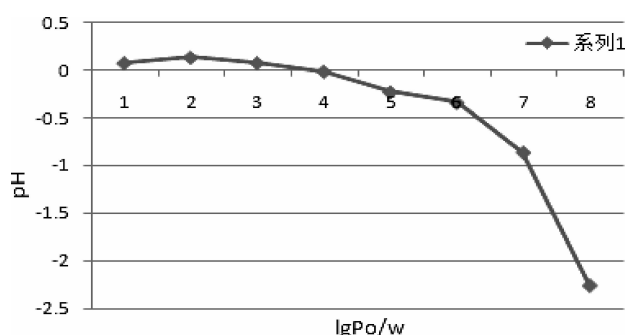
(2)精密度试验中,计算 RSD 为 0.19%。试验表明,仪器的精密度非常良好。

(3)表 5 为 pH- $P_{o/w}$ 表

结果由图 5 可以看出,当 pH2.0~5.0 时,芒果苷在正辛醇—缓冲溶液中的脂水分分配系数受溶液的 pH 值影响不大。pH 不同芒果苷的脂水分分配系数不同。随 pH 值增大,芒果苷脂水分分配系数总体减小。当 pH6.70 到 8.18 时,芒果苷的脂水分分配系数大幅度减小,说明碱性时芒果苷的脂溶性特别差。

表 5 pH - $P_{o/w}$ 表

编号	pH	$C_{w初}$ (mg/ml)	C_w (mg/ml)	C_o (mg/ml)	$P_{o/w}$	$\lg P_{o/w}$
1	2.44	0.0845	0.0386	0.0459	1.1906	0.0758
2	3.21	0.0838	0.0354	0.0484	1.3668	0.1345
3	4.47	0.0840	0.0383	0.0457	1.1932	0.0767
4	5.33	0.0840	0.0426	0.0413	0.9694	-0.0140
5	6.25	0.0869	0.0547	0.0323	0.5905	-0.2291
6	6.70	0.0999	0.0685	0.0314	0.4584	-0.3386
7	7.25	0.0975	0.0857	0.0118	0.1377	-0.8611
8	8.18	0.0995	0.0989	0.0006	0.0061	-2.2536

图5 pH- P_{ow} 图

4 小结和讨论

(1) 紫外分光光度法与 pH-HPLC 测定芒果苷离解常数是定性试验,通过对两者专属性和耐用性的比较,可知 HPLC 具有较强的专属性和耐用性。pH-HPLC 法因具有较好的仪器重现性,所以测定结果准确可靠。紫外分光光度法对待测物质的离解常数测定随着温度、湿度、操作者等的变化而变化。更容易产生误差。比较用所建立的方法分别测定了芒果苷的离解常数,HPLC 法准确度高,重现性好,方便简单,分析快速、准确。所以优选 pH-HPLC 法测定了芒果苷的离解常数。

(2) 测定出的 pK_a 值的比较,紫外分光光度法测定离解常数 $pK_a=6.50$,pH-HPLC 法测定离解常数 $pK_a=6.104$ 。两者比较所得的值差异不大,表明芒果苷的离解常数 pK_a 在 6.0~7.0 之间,但 pH-HPLC 法重现性好、专属性强,因此选用 HPLC 法测定的离解常数应该更为准确。

(3) 药物吸收需要适宜的水溶性和脂溶性,以能透过生物膜脂质双分子层。正辛醇-水分配系数用于预测药物体内吸收具有重要意义。本实验测定了芒果苷脂水分配系数。结果表明,pH 不同芒果苷脂水分配系数不同。当 pH2.0~pH5.0 时,芒果苷在正辛醇—缓冲溶液中的脂水分配系数受溶液的 pH 值影响不大。pH 不同芒果苷的脂水分配系数不同。随 pH 值增大,芒果苷脂水分配系数总体减小。当 pH6.70 到 8.18 时,芒果苷的脂水分配系数大幅度减小,说明碱性时芒果苷的脂溶性特别差,亲水性增强。

(4) 脂水分配系数是用于表示化合物亲脂性和透过生物膜能力的重要参数。药物在体外的透皮吸收,在体内的溶解、吸收、分布、转运均与脂水分配系数有关。一般认为脂水分配系数 P 值过低($\log P < -2$),化合物不能穿过脂质膜;相反, P 值过高($\log P >$

3),化合物因为脂溶性强而很难从细胞另一侧的膜释放出来,进入附近的血管或淋巴管。研究表明,药物透皮吸收的最佳 $\log P$ 为 2~3^[20]。

参考文献:

- [1] 邓家刚,杨柯,阎莉,等. 芒果苷对免疫抑制小鼠 T 淋巴细胞增殖的影响[J]. 中药药理与临床,2007,23(5):64-65.
- [2] 秦怀洲,王木梁,赵振伟,等. 芒果苷对小鼠免疫功能影响的初步研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学,2007,12(8):931-934.
- [3] 郑作文,邓家刚,杨柯. 芒果苷在 2215 细胞培养中对乙肝病毒 HbsAg、HbeAg 分泌的影响[J]. 中医药学刊,2004,22(9):1645-1646.
- [4] 邓家刚,杨柯,郑作文,等. 芒果苷在鸭体内抑制鸭乙型肝炎病毒感染的实验研究 [J]. 广西中医学院学报,2007,20(1):1-3.
- [5] 农少云,农朝赞,潘莉莉,等. 芒果苷对连环蛋白 P120 磷酸化及肝癌细胞生物学行为的影响 [J]. 广西医科大学学报,2005,22(4):495-497.
- [6] 程鹏,彭志刚,杨杰,等. 芒果苷对白血病 K562 细胞端粒酶活性和凋亡的影响[J]. 中药材,2007,30(3):306-309.
- [7] 彭志刚,罗军,赖永榕,等. 芒果苷对白血病 K562 细胞周期分布及细胞周期素 A、细胞周期素 B1 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2007,22(8):510-513.
- [8] 刘雪萍,蒋伟哲,黄兴振,等. 芒果叶提取物体外抗菌作用研究[J]. 药物研究,2007,16(9):12213.
- [9] 李玲, 陈植和. 芒果苷类化合物的新用途: 中国, 101214254 [P].2008-07-09.
- [10] 刘晓晖,黎源,黄德音. 电位滴定法测量稳定剂的银盐溶度积和酸离解常数[J]. 感光科学与光化学,2001,19(4):274-280.
- [11] 方荣美,廖天玉. 萝卜红色素离解常数的测定[J]. 西南民族大学学报,2005,31(1):32-34.
- [12] 袁波,周采菊,王国清,等. 薄层色谱 pH 法测定槐定碱和拉马宁碱的离解常数[J]. 沈阳药科大学学报,1999,16(1):47-50.
- [13] 晁若冰,伍朝笈,贺晓英. 弱酸弱碱性药物 pK_a 值的分光光度测定法[J]. 华西药学杂志,1990,5(2):104-106.
- [14] 张伟,闫娟娟,杨兆祥. pH 色谱法测定灯盏花乙素离解常数[J]. 云南大学学报(自然科学版),2010,32(2):196-200.
- [15] 张伟,荣娜娜,崔文博,等. 灯盏花乙素苷元离解常数和油水分配系数测定[J]. 云南中医学院学报,2010,33(5):28-32.
- [16] 张庆合,张维冰,李彤,等. 氧化铝固定相反相高效液相色谱法测定碱性化合物的离解常数 [J]. 色谱,2005,23(5):551-554.
- [17] 袁波,王国清,李军,等. 薄层色谱 pH 法测定有机酸的

- 电离常数[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(4): 275-277.
- [18] 程国斌, 张延红, 王康平, 等. 利用 Origin 软件实现化学实验数据的拟合分析[J]. 化学教学, 2005(9): 46-48.
- [19] 张立军, 潘岳峰, 张多婷. 高效液相色谱法测定去氧氟尿苷在不同介质中的平衡溶解度和表观脂水分配系数[J]. 中南药学, 2009, 7(12): 923-926.
- [20] 吴明明, 付明哲, 宋晓平. 紫外分光光度法测定羟甲香豆素的脂水分配系数 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(22): 11985-11986.
- (编辑: 徐建平)

Study on Dissociation Constant and Oil /water Partition Coefficient of Mangiferin

DONG Zhixu, ZHANG Wei

(Drug Research Institute of Kunming Pharmaceutical Group Co., Ltd., Kunming 650100, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish the method of measuring dissociation constants and oil-water partition coefficients of mangiferin. **Methods** Comparing two measurements for dissociation constants of mangiferin, which are ultraviolet spectrophotometry and pH - HPLC. Measuring oil-water partition coefficients of mangiferin between n-octanol and different pH buffer solution by HPLC and shaking flask method. **Results** Studying on the HPLC and ultraviolet spectrophotometry method for the dissociation constants of mangiferin. They got almost the same results which respectively are 6.5 and 6.1. Studying on the HPLC and shaking flask method for measuring the oil-water partition coefficients of mangiferin. The oil-water partition coefficients of mangiferin were almost the same, while the pH of buffer solution was between 2.0 to 5.0. But they should recede considerably, while the pH was between 6.70 to 8.18. That means the lipid solubility of mangiferin increased and the water solubility of it decreased in acidic conditions. While that was diametrically opposite in alkaline conditions. **Conclusion** The Methods, which were established for measuring dissociation constants and oil-water partition coefficients of mangiferin, HPLC method were accurate, repeatable, convenient and rapid.

KEY WORDS: Mangiferin; dissociation constant; HPLC; UV spectrophotometry; oil/water partition coefficient

(上接第 10 页)

- 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 919-920.
- [11] 陈人萍, 张英华, 刘卫, 等. 牛尾菜乙醇提取物抗类风湿性关节炎作用研究[J]. 特产研究, 2014(2): 47-50.
- [12] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 906-911.
- [13] 胡晓敏. 抗风湿关节炎药物的药效学评价 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14(5): 523-524.
- [14] 张毅, 高青, 李全民, 等. 硫酸氨基葡萄糖对膝关节炎患者血清及关节液基质金属蛋白酶类及前列腺素 E₂ 的影响[J]. 中华骨与关节外科杂, 2015, 8(5): 417-419.
- [15] 张玉军, 丁峰, 王春晓, 等. ^{99m}Tc-MDP 对大鼠佐剂性关节炎 PGE₁ 和 PGE₂ 的影响 [J]. 山东大学学报 (医学版), 2010, 48(8): 50-53.
- [16] 徐逸生, 张秋平, 杨仁轩, 等. 金桂外洗方对完全弗氏佐剂性关节炎小鼠血清及局部组织 PGE₂ 浓度的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(10): 5-7.
- [17] 常艳, 魏伟. 类风湿关节炎中 PGE₂ 与 IL-1 的关系及其药物研究[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(23): 1997-2001.
- (编辑: 徐建平)

Study on the Antalgic and Antirheumatoid Arthritis Effects of Compound Tongbi Capsule

WU Desong, ZHAO Daoqiang, CHAI Xiuying, WEI Di, LI Jinyu, WAN Jinfu

(Yunnan Institute of Materia Medica / Yunnan Bai Yao Group Innovation and R&D Center / Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

ABSTRACT: **Objective** To study the analgesic and anti-rheumatoid arthritis activities of compound Tongbi capsule (CTC) and its mechanism of anti-inflammatory. **Methods** Analgesic effects of CTC were evaluated by models of pain caused by acetic acid and hot plate. Models of auricle edema in mice, hind paw inflammation swelling, cotton pellet granuloma and Adjuvant Arthritis (AA) models in rats were used to detect the anti-rheumatoid arthritis activities. Level of PGE₂ was determined by ELISA assay. **Results** The CTC had significant analgesic effects on the models of pain caused by hot plate and acetic acid. The CTC had an obviously inhibitory activity to hind paw inflammation swelling, granuloma hyperplasia and AA, but its activity on auricle edema wasn't observed. Furthermore, it could also decrease the content of PGE₂ in serum. **Conclusion** The compound Tongbi capsule had significant effects on analgesic and rheumatoid arthritis, which may be related to the inhibition of PGE₂.

KEY WORDS: compound Tongbi capsule; antalgic; rheumatoid arthritis; Prostaglandin E₂ (PGE₂)