

蒙花苷溶解度及油水分配系数的研究

韩越¹, 许浚², 张铁军^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 测定蒙花苷的溶解度及油水分配系数, 为药物成药性评价及剂型设计提供依据。方法 采用 HPLC 法测定蒙花苷在不同有机溶剂及不同 pH 值缓冲盐溶液中的平衡溶解度, 并测定蒙花苷在表面活性剂中的溶解度; 利用 Molinspiration 软件对蒙花苷的油水分分配系数进行预测, 并采用摇瓶-HPLC 法测定药物在正辛醇-水、正辛醇-缓冲液体系中的表观油水分配系数。结果 蒙花苷在水中的平衡溶解度为 0.059 $\mu\text{g/mL}$, 在碱性溶液中的溶解度有所增加; 高分子材料和表面活性剂均可增加蒙花苷的溶解度, 其中 HP- β -CD 的增溶作用最强, 可增加 214.6 倍; 1 g 蒙花苷在正辛醇-水、正辛醇-缓冲盐溶液中的 P 值在 0.50~1.04, 与计算机预测值 0.513 一致。结论 蒙花苷不溶于水, 脂溶性差, 通过添加辅料, 其溶解性有所提高。

关键词: 蒙花苷; 溶解度; 油水分配系数

中图分类号: R94

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2012)02-0120-04

Determination of solubility and oil-water partition coefficient of linarin

HAN Yue¹, XU Jun², ZHANG Tie-jun²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193 China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193 China

Abstract: Objective To establish a method for determination of solubility and oil-water partition coefficient of linarin, and to provide the basis for drug evaluation and dosage form design. **Methods** Equilibrium solubilities were determined by HPLC method in different organic solvents and different pH buffer solution systems; Also the solubilities of linarin in certain macromolecules and surfactant were measured; Molinspiration software was used to forecast the oil-water partition coefficient of linarin, and the partition coefficients of linarin in *n*-octanol-water/buffer solution systems were measured by shake flask-HPLC method. **Results** The equilibrium solubility of linarin in water was 0.059 $\mu\text{g/mL}$, which was lower than that in alkaline solution; Certain macromolecules and surfactant could increase the solubility of linarin, especially HP- β -CD with 214.6-fold increase; The octanol-water partition coefficient of linarin was between 0.50 and 1.04, consistent with the computer predicted 0.513. **Conclusion** Linarin is insoluble in water, and poor fat-soluble, but its solubility could be improved by adding accessories.

Key words: linarin; equilibrium solubility; oil-water partition coefficient

蒙花苷 (linarin) 又名刺槐苷, 是一种广泛存在于菊科野菊花、密蒙花等植物中的天然黄酮苷类成分, 结构式见图 1。现代药理学研究表明, 蒙花苷有抗炎镇痛的作用^[1], 能抑制炎症介导素类如肿瘤坏死因子 (TNF)、白细胞介素 (IL) 的表达^[2], 并且对大鼠晶状体的醛糖还原酶 (AR) 有抑制活性^[3]。本实验采用平衡溶解度法及摇瓶法, 首次测定了蒙花苷在不同消化道生理 pH 条件下的表观溶解度及油水分配系数, 并通过以上方法考察了不同辅料对

蒙花苷溶解度的影响, 为今后药物的成药性和剂型设计提供数据参考。

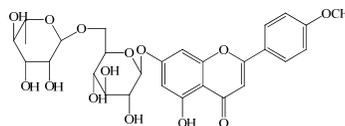


图 1 蒙花苷的结构图

Fig. 1 Chemical structure of linarin

收稿日期: 2012-02-16

作者简介: 韩越, 硕士研究生。Tel: 13672024743 E-mail: hanyuetj@126.com

*通讯作者 张铁军, 研究员。Tel: (022)23006848 E-mail: tiezheng4@sina.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪, AB204—N 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司), SYC—L 立式摇床(上海联环生物工程设备有限公司), 离心机(江苏龙冈医疗器械厂)。

1.2 试剂

蒙花苷对照品(质量分数>97%, 成都曼斯特生物科技有限公司), PEG6000(辽宁华兴集团化工股份公司), PVP-K30(天津天泰精细化学品有限公司), HP- β -CD(西安德立生物化工有限公司), SLS(化学纯, 国药集团化学试剂有限公司), poloxamer188(北京风礼精求商贸有限责任公司), 聚山梨酯 80(天津市光复精细化工研究所), 盐酸、磷酸、冰乙酸溶液(天津市凯信化学工业有限公司), 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾(天津市天河化学试剂厂), 色谱甲醇(天津市康科德科技有限公司), 娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[4]

Accurasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-水-冰醋酸(45:54.5:0.5), 体积流量 0.8 mL/min, 检测波长 326 nm, 进样量 100 μ L, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 结果见图 2。

2.2 标准曲线的制备

精密称取蒙花苷对照品 5.73 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 称定质量, 超声处理 10 min,

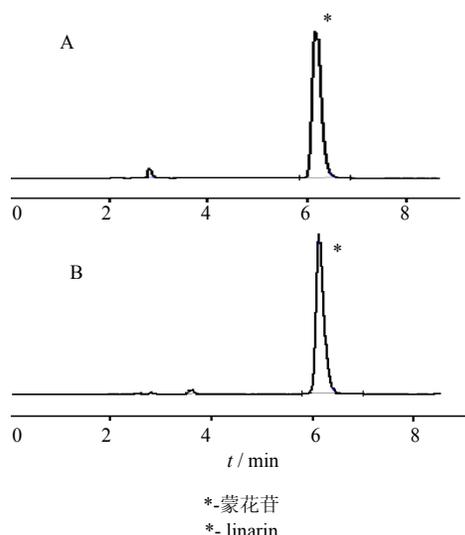


图 2 蒙花苷对照品(A)和样品(B)色谱图

Fig. 2 Chromatogram of reference substance of linarin (A) and sample (B)

补足质量后配制成质量浓度为 57.3 μ g/mL 的储备液, 采用逐级稀释法配置成不同浓度的对照品溶液。按照“2.1”项下色谱条件测定。以溶液质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程 $Y=285.15X+9.1951$ ($r=0.9995$), 线性范围 0.03~2.87 μ g/mL。

2.3 精密度试验

分别精密吸取蒙花苷对照品溶液, 参照“2.1”项下色谱条件, 重复进样 6 次, 记录峰面积。计算蒙花苷 RSD 值为 0.95%, 表明此方法精密度良好。

2.4 蒙花苷溶解性的考察

2.4.1 考察不同 pH 缓冲液下的平衡溶解度^[5-7] 取 pH 值 1~8 的缓冲液 4 mL 置于 10 mL 定量试管中, 加入过量的蒙花苷细粉, 于 (37 \pm 1) $^{\circ}$ C 恒温摇床中, 100 r/min 条件下平衡 72 h, 所得混悬液过 0.45 μ m 微孔滤膜, 取续滤液, 按照“2.1”项下方法测定, 计算溶解度, 结果见图 3。

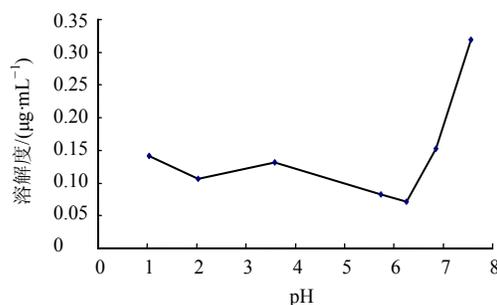


图 3 蒙花苷在不同 pH 缓冲液中的溶解度

Fig. 3 Equilibrium solubility of linarin in different pH buffer solution systems

2.4.2 在不同溶剂中溶解度的考察 按表 1 精密量取 2 mL 溶剂置于 10 mL 定量试管中, 加入过量蒙花苷细粉, 在不同温度下加热 1 h, 所得混悬液过 0.45 μ m 微孔滤膜, 取续滤液, 按照“2.1”项下方法测定, 计算溶解度, 结果见表 1。

2.5 蒙花苷油水分配系数的考察

2.5.1 计算机预测^[8-12] Molinspiration 软件是依据基团贡献的计算方式, 通过对 12 202 个类药性比较好的化合物进行回归分析, 其 $r^2=0.944$, 基于样本估算标准偏差 $\text{stdev}=0.428$, 模型稳定, 可预测几乎全部的有机分子和大多数的有机金属分子。本实验通过此软件计算蒙花苷油水分配系数的对数值 ($\log P$)、相对分子质量 (M_w)、拓扑极性表面积 (TPSA)、氢键给体数 (n_{ON})、氢键受体数 (n_{OHNH}) 与旋转键数 (n_{rotb}), 并根据 Lipinski 五规则对其吸

表1 蒙花苷在不同溶剂、温度下的溶解度

Table 1 Equilibrium solubilities of linarin in different organic solvents and temperatures

溶剂	蒙花苷溶解度/(mg·mL ⁻¹)		
	25 °C	40 °C	60 °C
甲醇	0.223 7	0.435 6	0.662 7
乙醇	0.035 8	0.081 1	0.140 3
醋酸乙酯	0.002 6	0.005 4	0.010 4
三氯甲烷	0.002 0	0.001 0	0.000 5
正己醇	0.001 0	0.005 0	0.010 0
吡啶	6.505 0	7.008 0	7.505 0

收进行预测。Lipinski 五规则是药物开发过程中常用的经验性规律。符合以下规则：(1) $n_{\text{ON}} \leq 5$ ；(2) $n_{\text{OHNH}} \leq 10$ ；(3) $M_{\text{W}} < 500$ ；(4) $\log P$ 在 $-2 \sim 5$ ；(5) $n_{\text{rotb}} \leq 10$ 的化合物会有更好的药动学性质，在生物体内代谢过程中也会有更高的生物利用度。但如果化合物不满足以上五规则中的任意两项，则可认为其吸收不好，该预测的准确率可达 90% 以上；若同时不满足以上五规则的任意三项，结果会相当可靠。预测结果蒙花苷的 n_{ON} 为 14， n_{OHNH} 为 7，MW 为 592.55， $\log P$ 为 0.513， n_{rotb} 为 7，TPSA 为 217.98。

2.5.2 测定正辛醇-水系统中油水分配系数^[13] 取适量蒙花苷细粉溶解于 25 mL 水饱和正辛醇中，制成药物的正辛醇溶液，精密量取上述溶液 1 mL 置于具塞试管中，再分别加入被正辛醇饱和的水，以及被正辛醇饱和的缓冲溶液 1 mL，(37±1) °C、140 r/min 恒温振动 24 h 直至平衡，以 3 000 r/min 离心 10 min，取下层水溶液，过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液按照“2.1”项下方法测定，按照公式 $P_{\text{app}} = C_{\text{油相}}/C_{\text{水相}}$ 计算油水分配系数，结果见图 4。

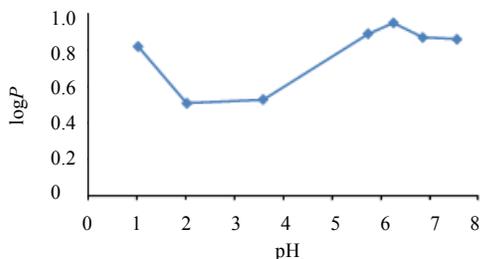


图4 蒙花苷在不同 pH 正辛醇缓冲液中的油水分配系数
Fig. 4 Oil-water partition coefficient of linarin in different pH buffer solution systems

2.6 辅料对蒙花苷溶解度的影响

分别配制 3%、6%、9%、12% PEG6000、PVP-K30、HP-β-CD 溶液，以及 0.5%、1.0% poloxamer 188、SLS、聚山梨酯 80 溶液。在上述溶液及蒸馏水中分别加入过量蒙花苷细粉，置 (37±1) °C 恒温摇床中，100 r/min 平衡 48 h，所得混悬液过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液，按照“2.1”项下方法测定，计算其溶解度，结果见图 5。

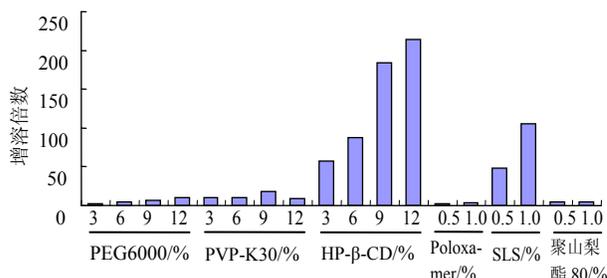


图5 不同辅料对蒙花苷的增溶作用

Fig. 5 Influence on solubility of linarin in certain macromolecules and surfactant

3 讨论

本实验首次测定蒙花苷的表现溶解度及油水分配系数。由于胃肠道的生理 pH 值在 1~8 之间，因此选用此区间的缓冲液作为溶剂。正辛醇溶液的溶解度参数与生物膜的溶解度参数一致，均为 21.07 MPa^{1/2}，固选用正辛醇模拟生物膜，对药物透过性有一定参考依据^[8]。

药物的油水分配系数是反映药物经生物膜转运的重要物理参数。它不仅应用在 Lipinski 五规则中，反映药物的吸收，还对药物的胃肠道吸收、角膜渗透性、皮肤渗透性等不同部位的渗透吸收也有一定的预测作用。一般认为在胃肠道有较好吸收的药物其 $\log P$ 值 > 1 ^[14]；通过对 11 个甾体激素类药物和 12 个 β-受体抑制剂药物的兔眼离体角膜透过实验得知，透过角膜最合适的 $\log P$ 值为 2.884 和 3.088，角膜吸收理想的药物 $\log P$ 值为 2~3^[15]；通过对 13 个氨基苯甲酸酯同系物透过大鼠腹部皮肤体外透过实验，以及对 18 个苯酚类化合物透过人体离体皮肤实验，均可得出药物经皮渗透系数最大时的 $\log P$ 值在 4.0 左右^[16]。因此，掌握药物的油水分配系数对筛选备选药物，以及合理选择给药剂型，提高生物利用度具有重要意义。本实验利用 Molinspiration Property Calculation Services 软件辅助计算蒙花苷

的油水分配系数,并测定蒙花苷在不同 pH 值下的表观油水分配系数。实验表明,蒙花苷在不同 pH 值缓冲液中的 $\log P$ 值在 0.5~1.0 之间,软件预测值 0.513 在此区间,实测值真实可信。

通过测定蒙花苷在不同溶液中的平衡溶解度可知,蒙花苷溶解性较差,难以被机体吸收,导致生物利用度较差。因此,提高药物溶解度,使难溶性药物实现剂型多样化,是今后研究的重点。近年来,应用环糊精包合、微乳、脂质体、混合胶束、纳米等技术来改善药物溶解度,促进药物吸收的研究逐渐增多,显示出较好的应用前景。本实验采用 SLS、PEG6000、PVP-K30、HP- β -CD、poloxamer 188、和聚山梨酯 80 等用于制备以上给药系统的辅料,通过 HPLC 法,测定了以上辅料对蒙花苷溶解度的影响。结果显示,12% HP- β -CD 溶液增溶效果最好,使蒙花苷的溶解性增加了 214.6 倍,增溶效果显著。HP- β -CD 不仅是常用的增溶辅料,同时在促进药物吸收方面也有良好的效果^[17]。本实验通过对辅料的考察,为今后蒙花苷的制剂研究提供了参考。

参考文献

- [1] Martínez-Vázquez M, Ramírez Apan T O, *et al.* A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activities of pectolinarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and linarin isolated from *Buddleia cordata* [J]. *Planta Med*, 1998, 64(2): 134-137.
- [2] Han S, Sung K H, Yim D, *et al.* The Effect of linarin on LPS-induced cytokine production and nitric oxide inhibition in murine macrophages cell line RAW264.7 [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25(2): 170-177.
- [3] Patel R, Nagueh S F, Tsybouleva N, *et al.* Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2001, 104(3): 317-324.
- [4] 王军宪,李教社,杨广德,等. 高效液相色谱法测定密蒙花中蒙花苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2001, 21(2): 103-104.
- [5] 朱慧,耿婷,张丽,等. 荆芥内酯平衡溶解度和油水分配系数的测定 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(23): 3144-3146.
- [6] 张婷婷,徐文,胡生亮,等. 水飞蓟宾在不同介质中平衡溶解度和表观油水分配系数的测定 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(2): 1569-1571.
- [7] 李素春,刘建平,曾昭征,等. 丹参酮 II A 溶解渗透性以及常用辅料对其增溶促渗的研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 1724-1726.
- [8] 苏笠,杨劲,王友群,等. 化合物脂水分配系数计算软件及比较研究 [J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(2): 178-182.
- [9] Lipinski C A, Lombardo F, Dominy B W, *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting [J]. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001, 46(1-3): 3-26.
- [10] Macias F A, Velasco R F, Galindo J C G, *et al.* Lipinski's rule of five: A pharmacology rule for herbicide studies [J]. *Drug Discov Today*, 2003, 8(1): 12-16.
- [11] 杨二冰,李正明. 药物分子设计中的 Lipinski 规则 [J]. 化学通报, 2006, 1: 16-19.
- [12] 张洁,谭初兵,徐为人. Lipinski 五规则的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(6): 451-455.
- [13] 杨秀丽,孙进,何仲贵. 格列吡嗪油水分配系数和平衡溶解度的测定 [J]. 中国药剂学杂志. 2009, 7(3): 121-126.
- [14] 王亚乐,贾晓斌,陈彦,等. 淫羊藿苷平衡溶解度和表观油水分配系数的测定 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 9(23): 777-779.
- [15] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [16] 傅旭春,梁文权. 预测药物吸收的数学模型 [J]. 中国药学杂志, 2002, 37(9): 650-653.
- [17] 林晓,徐德生,冯怡. 大分子药物肠道吸收促进剂的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(10): 741-744.