

青蒿素在不同溶剂中平衡溶解度和表观油水分配系数的测定

高伟祺, 栾淑伟, 王锐利, 张淑秋*

山西医科大学, 山西 太原 030001

摘要: 目的 测定青蒿素在不同 pH 缓冲液和 7 种非极性溶剂中的平衡溶解度以及在正辛醇-水中的表观油水分配系数, 为青蒿素新剂型的研究与开发提供实验基础。方法 采用高效液相-柱后衍生化-紫外检测法测定青蒿素在不同 pH 缓冲溶液及 7 种非极性溶剂中的平衡溶解度; 采用摇瓶法测定青蒿素的表观油水分配系数。结果 37 °C 时青蒿素在纯水中的平衡溶解度为 82.4 $\mu\text{g/mL}$, 随着 pH 的增大平衡溶解度呈先增大 (pH 5.0~6.8) 后减小 (pH 6.8~8.0) 的趋势; 37 °C 时青蒿素在肉豆蔻酸异丙酯 (IPM)、油酸乙酯 (EO) 和中链甘油酸三酯 (MCT) 中平衡溶解度较大, 分别为 10.34、9.28、8.46 mg/mL, 青蒿素的正辛醇-水表观油水分配系数 P 为 12.2 ($\lg P=1.09$)。结论 青蒿素水溶性差, 在非极性溶剂 IPM、EO、MCT 中平衡溶解度较大。

关键词: 青蒿素; 平衡溶解度; 表观油水分配系数; 高效液相色谱; 柱后衍生化

中图分类号: R94 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)01-0035-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.01.009

Determination of equilibrium solubility and apparent octanol/water partition coefficient of artemisinin in different solvents

GAO Wei-qi, LUAN Shu-wei, WANG Rui-li, ZHANG Shu-qiu

Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: Objective To determine the equilibrium solubility of artemisinin in buffer with different pH values and seven kinds of nonpolar solvents as well as its apparent octanol/water partition coefficient in octanol-water/buffer solution, thus to provide the experimental basis for the research and development of new preparation of artemisinin. **Methods** The equilibrium solubility of artemisinin in buffer with different pH values and seven kinds of nonpolar solvents was measured by HPLC with post-column derivatization and UV detection. Shaking flask method was adopted to determine the apparent octanol/water partition coefficient of artemisinin. **Results** The equilibrium solubility of artemisinin in water was 82.4 $\mu\text{g/mL}$ at 37 °C, and as the pH value increased, it increased first (pH values from 5.0 to 6.8) and decreased afterwards (pH values from 6.8 to 8.0). At 37 °C, the equilibrium solubility values of artemisinin in isopropyl myristate (IPM), ethyl oleate (EO), and medium-chain triglycerides (MCT) were 10.34, 9.28, and 8.46 mg/mL, respectively. The apparent octanol-water partition coefficient of artemisinin was 12.2 ($\lg P = 1.09$). **Conclusion** Artemisinin has poor water solubility, while its equilibrium solubility is higher in IPM, EO, and MCT.

Key words: artemisinin; equilibrium solubility; apparent oil-water distribution coefficient; high performance liquid chromatography; post-column derivatization

青蒿素 (artemisinin) 是从植物青蒿 *Artemisia carvifolia* Buch.-Ham. ex Roxb. 中提取分离得到的具有过氧化基团的倍半萜内酯类化合物, 是新型抗疟药。近年来研究发现, 青蒿素还具有抗血吸虫、免疫调节、抗心律失常、抗病毒和抗肿瘤等作用。在抗肿瘤方面青蒿素类药物不仅可以选择性抑制和 (或) 杀灭多种肿瘤细胞, 而且具有很好的耐受性,

不良反应也很少^[1]。尤其重要的是, 它对多耐药的肿瘤细胞具有活性^[2-3], 但是青蒿素分子的过氧键在体内易被破坏, 影响药物的作用时间。青蒿素口服后, 吸收迅速, 但不完全, 首关效应较强, 主要在肝脏代谢转化为去氧、氢化及羟基化等无内过氧桥结构的无活性代谢物, 生物半衰期为 2~3 h^[4]。我国生产的青蒿素原料药约占世界总供应量的 80%,

收稿日期: 2012-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973589); 山西省回国留学人员科研项目 (2009-47)

作者简介: 高伟祺 (1986—), 男, 硕士研究生, 专业方向为药剂学。Tel: 015135103365 E-mail: gaoyang0518@163.com

*通信作者 张淑秋 (1962—), 女, 博士, 教授, 从事药剂学和药代动力学的教学与研究。Tel: (0351)4690140 E-mail: shuqiu.zhang@sohu.com

目前常用的剂型有复方口服制剂和栓剂^[5]。作为疗效确切的药物青蒿素具有水溶性差、口服吸收不完全的特点^[6]，因此测定青蒿素的表观油水分配系数及平衡溶解度对研究其在体内过程和指导新剂型研究具有重要意义。本实验对青蒿素在不同 pH 缓冲溶液和 7 种非极性溶剂中的平衡溶解度以及在正辛醇-水中的表观油水分配系数进行测定，为研制可以改善青蒿素生物利用度和药效的新剂型及体内外评价提供依据和基础。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国); TU—1901 双光束紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司); HY—2 调速多用振荡器 (江苏中大仪器厂); PHS—3E 数字式 pH 计 (上海雷磁仪器厂); 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); FA1104N 电子天平 (上海民桥精密科学仪器有限公司); SYC—15B 超级恒温水浴 (南京桑力电子仪器有限公司); 聚醚醚酮 (peek) 管 (北京迪科马科技有限公司, 内径 0.5 mm, 长 6 m); 青蒿素原料药 (天津太平洋制药有限公司, 质量分数 99.0%, 批号 20100609); 青蒿素对照品 (中国食品药品检定研究院); 乙腈、甲醇 (色谱纯, 山东禹王试剂有限公司); 冰醋酸 (分析纯, 天津市北辰方正试剂厂); 无水乙酸钠 (分析纯, 天津市风船化学试剂科技有限公司); 氢氧化钾 (分析纯, 天津市北辰方正试剂厂); 肉豆蔻酸异丙酯 (IPM)、中链甘油酸三酯 (MCT) (太原倍贝科贸有限公司); 氢氧化钠、油酸乙酯 (EO) (天津市光复精细化工研究所); 磷酸二氢钾 (分析纯, 北京精球化工有限责任公司); 磷酸氢二钾 (分析纯, 天津市北辰方正试剂厂); 纯化水 (Heal Force)。

2 方法与结果

2.1 青蒿素高效液相-柱后衍生化紫外检测定量方法的建立

2.1.1 柱后衍生化原理^[7] 青蒿素分子结构内无共轭基团, 仅在紫外区 203 nm 处有较弱的末端吸收。与碱反应后, 分子内的过氧桥结构被破坏, 重排形成共轭结构。产物在 289 nm 处有最大吸收。由于反应有碱存在, 损坏色谱柱, 不宜直接进样, 因此选用柱后衍生化法进行测定。

2.1.2 溶液的配制 (1) 0.1 mol/L 醋酸盐缓冲溶液 (pH 4.0) 的配制 称取无水乙酸钠 4.1 g, 用 500 mL 蒸馏水溶解; 量取 10 mL 冰醋酸于 500 mL 蒸馏

水中搅拌均匀; 将二者混合均匀, 用冰醋酸调节 pH 值至 4.0 即得。(2) 柱后衍生化试剂的配制 称取 KOH 56 g, 用 900 mL 无水乙醇溶解, 加水至 1 000 mL, 抽滤, 摇匀得 1 mol/L KOH 乙醇 (90%) 溶液。

2.1.3 检测波长的选择 配制一定浓度的青蒿素溶液, 与衍生试剂在 70 °C 反应 10 min 后摇匀, 以不含药物的溶剂与等量的衍生试剂反应相同时间作为空白, 流动相稀释并定容后在 200~400 nm 进行紫外扫描, 结果表明, 青蒿素在碱性衍生化后于 289 nm 处有最大吸收。

2.1.4 色谱条件^[7] 色谱柱为 C₁₈ 液相色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1 mol/L 醋酸盐缓冲液 (70:30); 体积流量: 流动相 0.7 mL/min, 柱后衍生试剂 0.2 mL/min; 柱温 30 °C; 柱后反应温度 70 °C; 进样量 20 μL; 检测波长 289 nm。

配制一定质量浓度的青蒿素溶液, 以不含青蒿素的溶剂为空白, 在色谱条件下进样, 记录色谱图观察保留时间, 计算理论塔板数为 3 628, 保留时间为 6.37 min, peek 管中反应时间为 1.31 min, 色谱图见图 3。

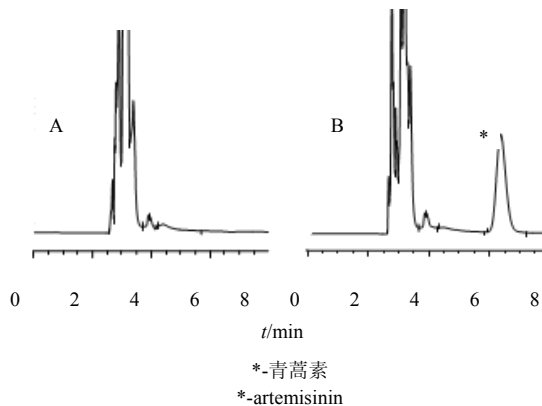


图3 溶剂(A)和青蒿素溶液(B)色谱图

Fig. 3 Chromatograms of blank solution (A) and artemisinin solution (B)

2.1.5 标准曲线的制备 精密称取青蒿素对照品 6.0 mg 置于 50 mL 量瓶, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得青蒿素储备液 (120 μg/mL)。精密量取该储备液 0.3、0.9、1.5、2.0、3.0 mL 置于 20 mL 量瓶中用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得质量浓度为 1.8、5.4、9.0、12、18 μg/mL 的青蒿素溶液。取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录峰面积 (A), 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标绘制标准曲线。结果表明, 青蒿素在 1.8~18 μg/mL 线性关系良好, 回归方程为 $A = 70.022 C - 9.5009$, $r^2 = 0.9996$ 。

2.1.6 精密度实验 取青蒿素适量, 配制成高、中、低3种浓度的青蒿素溶液, 分别在1d内测定5次, 得日内精密度, 3种溶液每天测定一次, 连续测定3d, 得日间精密度。结果表明, 日内、日间精密度 RSD < 2%, 见表1。

表1 精密度实验结果
Table 1 Results of precision

C/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	日内 RSD/%	日间 RSD/%
	n=5	n=3
2.14	1.60	0.47
9.32	0.42	0.67
16.0	0.72	0.36

2.1.7 回收率实验 精密称取青蒿素5、18、30 mg 置于20 mL量瓶中, 分别用4 mL乙腈溶解后甲醇稀释, 定容至刻度, 摇匀。各精密量取1 mL置于100 mL量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀即得质量浓度分别为2.5、9.0、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液, 取20 μL 注入液相色谱仪, 带入回归方程计算回收率, 结果平均回收率为99.6%, 表明该方法准确。

2.1.8 最低定量限及检测限 配制一定浓度青蒿素溶液, 取20 μL 注入液相色谱仪, 继续稀释, 使青蒿素峰高为噪音的10倍时, 该浓度为最低定量限, 经测定最低定量限为1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。继续稀释使青蒿素峰高为噪音的3倍时, 该浓度为检测限, 经测定检测限为0.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 青蒿素平衡溶解度的测定

2.2.1 青蒿素在纯水中的平衡溶解度^[8] 取过量的青蒿素于10 mL蒸馏水中在37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡平衡72 h, 5 000 r/min离心5 min后用水润湿的微孔滤膜滤过, 取续滤液500 μL 至10 mL量瓶, 甲醇稀释至刻度, 取20 μL HPLC测定, 平行做3组。带入回归方程得青蒿素在水中的平均平衡溶解度为82.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。上述各质量浓度的RSD均<2%, 说明加入一定体积(500 μL) pH值缓冲液对青蒿素的量无影响。

2.2.2 青蒿素在不同pH值缓冲溶液中的平衡溶解度^[9] 根据《中国药典》2010年版附录配制pH值分别为5.0、6.8、7.4、8.0的磷酸盐缓冲溶液并用pH计进行校正, 取过量的青蒿素置于10 mL各不同pH值缓冲溶液中在37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡平衡72 h后, 5 000 r/min离心5 min, 用润湿的微孔滤膜滤过, 取续滤液500 μL 至10 mL量瓶, 甲醇稀释至刻度, 取20 μL 进高效液相, 每组平行做3份。带入回归

方程得青蒿素在pH 5.0、6.8、7.4、8.0的缓冲溶液中的平均平衡溶解度分别为63.5、70.6、60.0、40.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2.3 青蒿素在各种非极性溶剂中的平衡溶解度 备选油相有橄榄油、注射用大豆油、肉豆蔻酸异丙酯(IPM)、蓖麻油、中链甘油酸三酯(MCT)、油酸乙酯(EO)和油酸。取2 mL各油相加入过量青蒿素原料药在37 $^{\circ}\text{C}$ 下分别振荡72 h, 在5 000 r/min离心5 min, 滤膜滤过, 将续滤液移至EP管中, 取含饱和药物的各油相100 μL 至2 mL EP管中, 加入1 mL氯仿摇匀后取150 μL 至10 mL量瓶用无水乙醇定容至刻度得样品溶液, 每组平行做3份。取20 μL 进高效液相并记录峰面积, 计算浓度。结果见表2。

表2 青蒿素在不同溶剂中的平衡溶解度
Table 2 Equilibrium solubility of artemisinin in different solvents

溶 剂	平衡溶解度/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
IPM	10.34
MCT	8.46
大豆油	4.75
油酸	6.12
橄榄油	2.30
蓖麻油	1.40
EO	9.28

2.3 青蒿素表观油水分配系数的测定

分别取一定量纯化水、pH 5.0、6.8、7.4、8.0的缓冲溶液与等量正辛醇溶液混合在三角锥瓶中, 超声30 min后置于恒温37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡仪上振荡72 h, 使水相与正辛醇相充分饱和, 72 h后用分液漏斗分离, 得正辛醇饱和的水相与水饱和的正辛醇相。取一定量的青蒿素加入到10 mL各正辛醇相中, 充分溶解后将含药的各正辛醇相溶液等分为2份, 一份与正辛醇饱和的各水相溶液按1:4混合, 超声30 min后置于振荡仪上振荡72 h(此正辛醇相作为 C_{after}), 另外一份在相同条件下进行振荡(此正辛醇相作为 C_{before})。平衡72 h后对前者进行5 000 r/min离心5 min, 分离正辛醇相待用。分别取与各水相进行平衡(C_{after})和未与水相进行平衡(C_{before})的各正辛醇相溶液30 μL 至10 mL量瓶, 用甲醇稀释至刻度。取20 μL 注入高效液相色谱仪进行测定, 记录青蒿素的峰面积。后者的质量浓度减去前者即为分配到水相中的青蒿素的量, 带入公式 $\lg K_{\text{o/w}} =$

$\lg 4C_{\text{after}} / (C_{\text{before}} - C_{\text{after}})$ 计算青蒿素在正辛醇/水相中的油水分配系数 $\lg P$ 值^[10] (C_{before} 为平衡前正辛醇中青蒿素的质量浓度, C_{after} 为平衡后正辛醇中青蒿素的质量浓度)。

青蒿素在正辛醇-纯化水中的分配系数 $\lg P$ 值为 1.09; 在 pH 5.0、6.8、7.4、8.0 的缓冲溶液中的表观油水分配系数 $\lg P$ 值分别为 1.39、1.29、1.58、1.92。

3 讨论

本实验通过建立高效液相-柱后衍生化-紫外检测法测定青蒿素在水中和 7 种非极性溶剂中的平衡溶解度以及不同 pH 值缓冲液中的平衡溶解度, 同时测定青蒿素在正辛醇-水中的表观油水分配系数, 为青蒿素新剂型的研究提供实验基础。

青蒿素分子结构内无共轭基团, 仅在紫外区 203 nm 处有较弱的末端吸收。与碱反应后, 分子内的过氧桥结构被破坏, 重排形成共轭结构。产物在 289 nm 处有最大吸收。由于反应有碱存在, 损坏色谱柱, 不宜直接进样, 因此本课题组选用柱后衍生化法进行测定, 与紫外法相比, 本方法的衍生化反应排除了杂质的干扰, 专属性较强。

青蒿素在纯水中的平衡溶解度为 82.4 $\mu\text{g/mL}$, 在各 pH 缓冲溶液中随着 pH 值的增大平衡溶解度呈先增大 (pH 5.0~6.8) 后减小 (pH 6.8~8.0) 的趋势, 且青蒿素在各 pH 缓冲溶液中的溶解度均小于纯水中的溶解度, 说明青蒿素为难溶性药物, 其他离子的存在影响青蒿素的溶解性。青蒿素在 IPM、EO 和 MCT 中溶解度较大, 这是因为青蒿素脂溶性较强, 可溶于非极性的溶剂中且这些溶剂为生物相容性溶剂, 在新剂型开发中可以考虑引入这些非极性的溶剂作为载体溶剂。

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^[11], 过低的 $K_{\text{o/w}}$ 值 ($\lg K_{\text{o/w}} < -2$) 化合物不能穿过脂质膜; 相反, 过高的 $K_{\text{o/w}}$ 值 ($\lg K_{\text{o/w}} > 3$) 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, 因为它们的水溶性太低, 而且水溶性极低的固体药物不能像液体那样与脂质膜充分接触, 所以吸收更加困难, 因此药物的最佳 $K_{\text{o/w}}$ 值在 $-1 < \lg P < 2$ ^[12]。青蒿素在正辛醇-水中的表观油水分配系数 $\lg P$ 为 1.09; 随着 pH 值的增大其表观油水分配系数呈先减小后

增大的趋势。掌握青蒿素的表观油水分配系数对开发合理的给药剂型, 提高青蒿素的生物利用度具有重要意义。一般认为在胃肠道有较好吸收的药物 $\lg P > 1$ ^[13], 本实验的结果也印证了青蒿素口服易吸收的特点, 同时青蒿素在纯水及各 pH 值磷酸盐缓冲液中的 $\lg P$ 值均 > 1 , 表明其脂溶性较高, 因此建议对青蒿素进行剂型的改革以提高生物利用度。

参考文献

- [1] 樊 嵘, 谢 红, 杨 磊, 等. 青蒿素及其衍生物抑制 K562 细胞生长作用比较 [J]. 武警医学院学报, 2006, 15(3): 199-201.
- [2] Beekman A C, Woerdenbag H J, van Uden W, et al. Stability of artemisinin in aqueous environments: Impact on its cytotoxic action to Ehrlich ascites tumour cells [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1997, 49(12): 1254-1257.
- [3] Singh N P, Lai H C. Synergistic cytotoxicity of artemisinin and sodium butyrate on human cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(6B): 4325-4329.
- [4] Gordi T, Huong D X, Hai T N, et al. Artemisinin pharmacokinetics and efficacy in uncomplicated-malaria patients treated with two different dosage regimens [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46 (4): 1026-1031.
- [5] 刘天伟, 屈凌波. 影响青蒿素类药物战略发展因素分析 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15(13): 1035-1039.
- [6] 中国药典 [S]. 二部. 2010.
- [7] 申薇薇, 王锐利, 胡 爽, 等. 高效液相-柱后衍生化法测定青蒿素含量 [J]. 中国药物与临床, 2007, 7(9): 657-659.
- [8] 徐 文, 孙 进, 张婷婷, 等. HPLC 法测定冬凌草甲素的平衡溶解度和表观油水分配系数 [J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(4): 220-222.
- [9] 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.
- [10] 卢秀霞, 何 琳, 陈 莉, 等. 灯盏花素的溶解度与油水分配系数的测定 [J]. 广东药学院学报, 2011, 27(1): 1-4.
- [11] 钱桂英, 耿留庆, 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): 52-53.
- [12] Abraham D J. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. Vol 2: Drug Discovery and Drug Development* [M]. 6th ed, New York: John Wiley sons Inc, 2003.
- [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.