

透皮给药首先需要克服皮肤屏障,目前主要采用加入促渗剂的方法来增加药物的皮肤渗透速率。冰片是一种有效的透皮促进剂^[4],其促渗的作用部位可能是在角质层^[5]。氮酮是目前使用较多的促渗剂,常用体积分数 1%~10%,它主要作用于细胞类脂双分子层,增加双分子层流动性而促进药物通过细胞间扩散^[6]。氮酮为不溶性水的强亲脂性化合物,水性氮酮是由氮酮与一定的乳化剂配制而成。本实验观察冰片和水性氮酮对 β -细辛醚 24 h 累积渗透量和稳态渗透速率的影响。结果表明 0.1% 冰片对 β -细辛醚没有促透皮效果;1%、3%、5% 水性氮酮加 0.1% 冰片对 β -细辛醚不仅无促渗作用,反而明显降低了 β -细辛醚的渗透速率,分别降低了 56.8%、77.7%、78.6%,影响十分明显。这两种促渗剂对 β -细辛醚都未能产生促透皮效果,可能与 β -细辛醚特殊理化性质有密切关系。

References

- [1] Wei G, Fang Y Q, Wu Q D, *et al.* Research on establishing the quality standard of middle production of Xingnao Dibiye by GC-MS [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23(9): 638-641.
- [2] Hu J G, Gu J, Wang Z W. Observation of *Acorus tatarinowii* Schott and its validity composition on CNS [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1999, 15(3): 19-20.
- [3] Fang Y Q, Li L, Wu Q D, *et al.* Effects of β -asarone and borneol on protecting rat from ischemia/reperfusion cerebral injury [J]. *Mod Geriatr Health Care* (现代老年医学与保健), 2002, 11(2): 15-18.
- [4] Zhu J P, Wang Z R, Wu S X. Research on promoting penetrate skin of drug by borneol [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1999, 34(2): 104-106.
- [5] Xu B L, Wang H, Xu W M. Research on promoting penetrate of ligustrazine [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23(12): 864-866.
- [6] Lu B. *New Techniques and New Dosage Forms of Drugs* (药物新剂型与新技术) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1998.

二苯乙烯苷的稳定性研究

班 翊, 刘其礼, 金 悠, 王嘉陵*

(华中科技大学同济医学院 药理系植物化学室, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 考察影响二苯乙烯苷(THSG)溶液稳定性的因素,并计算室温下其晶体粉末的 $t_{0.9}$ 值。方法 采用 HPLC 法和 HPLC-MS 联用法。结果 以 Lichrospher 5-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 为固定相, 甲醇-水(4:6) 为流动相, 检测波长为 310 nm。THSG 进样量在 0.14~2.80 μ g 与峰面积线性关系良好, 自制 THSG 纯度高达 99.94%, pH 5.8 时, THSG 与水分子发生加成反应。强酸促使 THSG 水解为葡萄糖和苷元, 并进一步降解为酚类化合物。强碱性条件下, THSG 氧化为醌类化合物。在中性及弱碱性水溶液中较稳定, 30 d 内含量无明显变化。THSG 晶体粉末室温下放置 240 d 含量无明显变化, $t_{0.9}$ 值为 1 098 d。结论 二苯乙烯苷在一定条件下是稳定的。
关键词: 二苯乙烯苷; 稳定性; 高效液相色谱
中图分类号: R 286.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2004)11-1235-03

Determination of stilbene-glucoside and investigation on its stability

BAN Yi, LU Qi-li, JIN You, WANG Jia-ling

(Phytochemistry Laboratory, Department of Pharmacology, Tongji Medical College, Huazhong Scientific and Technological University, Wuhan 430030, China)

Abstract: Object To study the factors which influenced the stability of stilbene glucoside (tetrahydroxystilbene-glucoside, THSG) solution, investigate and calculate the value of $t_{0.9}$ of THSG crystal powder at room temperature. **Methods** HPLC and HPLC-MS methods were used. **Results** The best chromatographic conditions were to employ Lichrospher 5-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) as the stable phase, methanol-water (4:6) as mobile phase, 310 nm as the detective wavelength. Within the range from 0.14 to 2.80 μ g, there was a good linearity. The content of self-prepared THSG was up to 99.94%. Stability test showed that when pH was 5.8, an additional reaction occurred between THSG and H₂O. Strong acids precipitated the hydrolyzation of THSG into glucose and aglycone, which then degraded into phenol compound. When strong bases existed, THSG was easily oxidized into quinone compound. Whereas it was sta-

* 收稿日期: 2004-01-07
* 通讯作者

ble in a neutral or weak basic condition, the content of THSG had not changed in 30 d. So was the THSG's crystal powder stored at room temperature for 240 d. The value of $t_{0.9}$ was 1 098 d. **Conclusion** THSG is stable in some certain conditions.

Key words: stilbene glucoside (tetrahydroxystilbene glucoside THSG); stability; HPLC

何首乌系蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的根与根茎, 具有乌须发、悦颜色、补肝肾、抗衰老之良效^[1]。现代药理研究表明其水煎液或醇提取液具有抗氧化、提高免疫力、抑制血小板聚集、舒张血管等作用, 并推测这些作用与其所含 2, 3, 5, 4-四羟基二苯乙烯-2-O-βD-葡萄糖苷(二苯乙烯苷, tetrahydroxystilbene glucoside, THSG) 有关。本课题组证实 THSG 单体有抗氧化、舒张血管作用, 且优于白藜芦醇, 值得深入研究。本实验的目的在于考察其稳定性并鉴定化学变化产物, 为 THSG 单体新药开发奠定基础。

1 材料与仪器

Waters 600 高效液相色谱仪(包括 600 泵, PDA 2966 检测器), 液-质联用仪(LCQ Deca Xp plus), 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, THSG 对照品购于中国药品生物制品检定所(批号 0844-200003); 何首乌生药购于广东省德庆县中药材收购站, 经湖北省药品检验所王晓敏副主任药师鉴定。

2 方法与结果

2.1 THSG 的提取分离: 何首乌粗粉, 95% 乙醇回流, 回收乙醇得何首乌流浸膏; 用适量蒸馏水稀释后以等量乙醚萃取 3 次, 分离出水层; 水层用两倍的醋酸乙酯热回流 5~ 6 h, 收集醋酸乙酯层, 减压浓缩至原体积的 1/10, 室温下静置析晶, 滤过, 得粗品。粗品于适量热水或热醋酸乙酯中溶解, 趁热滤过, 放冷析晶, 如此反复结晶, 得精品, 为灰色无定型结晶粉末, mp 162~ 163, 易溶于水、甲醇、乙醇、醋酸乙酯。

2.2 THSG 的测定

2.2.1 色谱条件: 色谱柱: Lichrospher 5-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(4:6, 每 500 mL 加 2~ 3 滴冰醋酸); 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 310 nm; 柱温: 24。在此色谱条件下, THSG 峰形好, 不受杂质峰干扰, 见图 1。

2.2.2 标准曲线的建立: 精密称取 1.4 mg THSG 对照品, 用流动相配制成 0.028 及 0.14 mg/mL 对照品溶液。依次取上述两种对照品溶液各 5.0、10.0、15.0、20.0 μL 进样, 按上述色谱条件测定。以峰面积值为横坐标, THSG 的进样量为纵坐标绘制标准

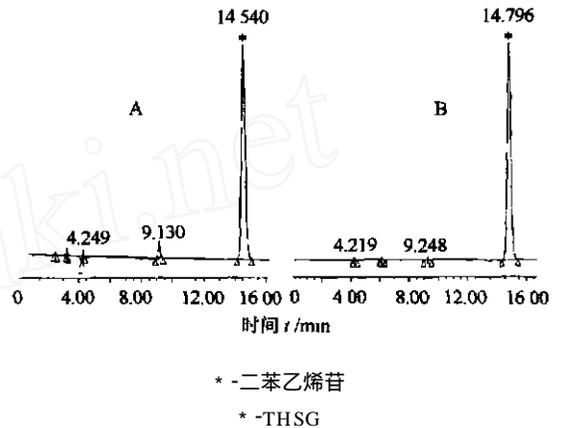


图 1 二苯乙烯苷对照品(A)和自提二苯乙烯苷(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of THSG reference substance (A) and self-prepared THSG (B)

曲线, 结果 THSG 在 0.14~ 2.80 μg 与峰面积线性关系良好, 回归方程为: $Y = 2.84 \times 10^{-7} X + 0.0123$, $r = 0.9995$ 。

2.2.3 自制样品的测定: 分别称取 THSG 精品 4.20、4.18、4.21 mg, 粗品 5.0、5.1、5.1 mg 于 100 mL 量瓶中, 以流动相溶解并稀释至刻度。分别取各溶液 20 μL 进样, 记录峰面积。将样品峰面积值带入回归方程, 计算 THSG 晶体粉末的纯度, 结果粗品为 68.74%, 精品为 99.94%, 故可认为精品达到单体的质量要求。

3 THSG 的稳定性研究

3.1 pH 值对 THSG 溶液稳定性的影响: 精密称取 THSG 样品, 分别用 1% 醋酸、4% 硫酸、1% Na₂HPO₄ 和 4% NaOH 溶液配制成 0.1 mg/mL THSG 溶液, pH 值依次为 5.8 < 1, 7.8 > 14, 依次编号为 I、II、III、IV, 密闭, 室温下不避光放置。I、III、IV 于第 1、3、5、7 天, II 于第 5、12、24 小时取 10 μL 溶液进行 HPLC 或 HPLC-MS 测定。

另取 II 2 份, 2 mL/份, 1 份蒸干后加 2 mL 甲醇, 取上清液 1 mL 再加 1 mL 浓硫酸, 再沿管壁徐徐加入 10% α-萘酚溶液数滴(Molish 反应)。第二份加 1% 溴水 1 mL。取 IV 2 mL 加苯胍试剂数滴。
3.1.1 弱酸性条件下(pH 5.8), 1 d 内在 THSG 峰($t_R = 10.62$ min)前出现一个新的单峰($t_R = 6.23$ min), 此峰最大吸收波长为 284 nm, 与 THSG 的吸

收波长(308 nm)相比发生蓝移,且随时间推移,THSG 峰峰面积减小,新单峰峰面积增加(图 2)。HPLC-MS 结果表明,两峰相对分子质量分别为 424 和 406。提示 THSG 在弱酸性条件下不稳定,分子中的乙烯双键与水分子发生加成反应。实验中还观察到避光条件下加成反应明显减慢,故光可催化此反应。此外,质谱图中还发现一相对分子质量为 830 的分子离子峰,推测此物可能是由一分子加成后 THSG 与一分子未加成的 THSG 发生聚合,生成的二聚体二苯乙烯苷。

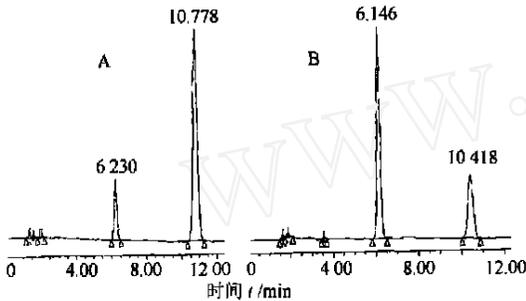


图 2 弱酸性条件下 THSG 在第 1 天(A) 和第 7 天(B)的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of THSG in first day (A) and seventh day (B) in weak acid condition

3.1.2 强酸性条件下(pH < 1), THSG 极不稳定, 5 h 后其质量分数降至 39.6%, 24 h 后已检测不到此物质。24 h 后的酸解物不能使溴水退色, 甲醇上清液的 Molish 反应为阴性, 但与 FeCl₃ 显色。提示强酸性条件下 THSG 的苷键迅速水解, 且苷元中的乙烯双键可能与硫酸发生加成反应, 再进一步降解为酚类化合物。

3.1.3 弱碱性条件下(pH 7.8), THSG 较稳定, 7 d 后, 质量分数为 98.12%。

3.1.4 强碱性条件下(pH > 14), THSG 水溶液颜色逐渐加深, 48 h 后已检测不到 THSG 峰, 且此溶液与苯肼反应生成棕色沉淀, 提示在强碱性条件下, THSG 易氧化为醌类化合物。

3.2 THSG 在不同溶剂中的稳定性: 精密称取 THSG 样品, 分别用双蒸水或甲醇配制成 0.1 mg/mL 溶液, 密闭, 室温下非避光放置。THSG 水溶液于第 1、5、10、20、30 天, 甲醇溶液于第 1、2、3、4、5 天, 取 10 μL, 进行测定。结果表明: THSG 水溶液稳

定, 室温(15~ 20)下放置 30 d, 质量分数仍高达 97.8%。而 THSG 甲醇溶液不稳定, 24 h 后质量分数逐渐下降, 第 7 天时, 质量分数降至 30.2%。

3.3 THSG 粉末稳定性: THSG 单体无定型粉末置于棕色瓶中, 密闭, 室温下放置。于第 10、30、60、120、240 天, 进样测定。结果表明: 室温下密闭避光放置的 THSG 粉末含量变化很小, 结果见表 1。经推算其 $t_{0.9}$ 为 1 098 d, 提示 THSG 结晶性粉末较稳定。

表 1 二苯乙烯苷粉末的稳定性 (n= 3)

Table 1 Stability of THSG powder (n= 3)

批号	10 d	30 d	60 d	120 d	240 d
20020903	99.91	99.54	99.50	99.01	98.19
20021109	99.93	99.65	99.55	98.91	98.09
20021211	99.95	99.87	99.71	99.10	98.49

4 讨论

4.1 本实验采用毒性小, 价格低的甲醇-水作流动相, 优于文献^[2- 4]中所采用流动相乙腈-水。在流动相中加入冰醋酸(2~ 3 滴/500 mL), 抑制 THSG 中酚羟基的解离, 可获得峰形好、无拖尾现象的谱形, 其分离效果不亚于乙腈-水。

4.2 结果证明酸性、强碱性和光线或甲醇等是促使 THSG 发生化学变化的因素, 所以 THSG 溶液制备与储存过程中应避免与这些影响因素接触。另还证实 THSG 的中性或弱碱性水溶液稳定, 提示在剂型选择上可考虑注射液, 但应注意其最稳定 pH 值。

4.3 报道用酸解法获取何首乌有效成分的苷元^[5], 本实验证实酸可促 THSG 发生加成、聚合、降解等反应, 因此酸解法获得 THSG 苷元是不可行的。

References

- [1] Ryu G, Ju J H, Park Y J, et al. The radical scavenging effects of stilbene glucosides from *Polygonum Multiflorum* [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25(5): 636-639.
- [2] Yan X Z. Extraction and authentication of stilbene glucoside from *Polygonum multiflorum* [J]. *Acta Acad Med Shanghai* (上海医科大学学报), 1981, 8(2): 123-126.
- [3] Yang D H, Wei L X, Zhou H L, et al. Determination of stilbene glucoside in *Polygonum multiflorum* Thunb. and Fufang-Chong-Cao capsule by HPLC [J]. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报), 2000, 32(3): 280-282.
- [4] Zhang C, Yang S L, Yuan H L, et al. Determination of stilbene in *Radix Polygoni Multiflori* by HPLC and its stability [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(6): 357-359.
- [5] Zhao B, Hu W H, Song C W, et al. Investigation on *Polygonum multiflorum* for preparation [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1984 (10): 6.