

青蒿琥酯平衡溶解度和表观油水分配系数的测定

沈硕, 刘淑芝*, 杜茂波, 葛克亚, 宋立华, 叶祖光*

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:测定青蒿琥酯的平衡溶解度及表观油水分配系数。方法:采用 HPLC 测定青蒿琥酯在各类溶媒中平衡溶解度,色谱条件为 Diamonsil C₁₈ (2) 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-磷酸盐缓冲液 (60:40), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 210 nm, 柱温 30 ℃。采用摇瓶法测定青蒿琥酯在正辛醇-水/磷酸缓冲盐中油水分配系数。结果:32.0 ℃ 时青蒿琥酯在纯水、三氯甲烷、丙酮、无水乙醇中溶解度分别为 (0.36 ± 0.016), (598.74 ± 13.11), (284.63 ± 7.96), (186.03 ± 8.27) g·L⁻¹。32.0 ℃ 时青蒿琥酯在正辛醇-水体系中油水分配系数 (249.03 ± 3.76), log P_{app} = (2.40 ± 0.006 5)。结论:青蒿琥酯脂溶性强, pH 对其溶解度和油水分配系数均具有较大影响。在磷酸盐缓冲体系中, 青蒿琥酯在 pH 5.50 ~ 7.43 时溶解度随 pH 的增大而增加, 油水分配系数随 pH 的增大而减小, 但 log P_{app} 保持 > 2.0, 说明青蒿琥酯在体内、外环境下均具有较强的生物膜通透能力。

[关键词] 青蒿琥酯; 平衡溶解度; 油水分配系数; 高效液相色谱; 摇瓶法

[中图分类号] R283.6; R284.1; R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0009-04

[doi] 10.11653/syfy2013190009

Determination of Equilibrium Solubility and Apparent Oil/Water Partition Coefficient of Artesunate

SHEN Shuo, LIU Shu-zhi*, DU Mao-bo, GE Ke-ya, SONG Li-hua, YE Zu-guang*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To determine equilibrium solubility and apparent oil/water partition coefficient of artesunate. **Method:** Equilibrium solubility of artesunate in water, different organic solvents and some mixed solvent systems were determined by HPLC, chromatographic conditions were as follows: Diamonsil C₁₈ (2) column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of acetonitrile-phosphate buffer (60:40), flow rate 1.0 mL·min⁻¹, detection wavelength at 210 nm, column temperature 30 ℃. Oil/water partition coefficient of artesunate in n-octanol-water/phosphate buffer solution system was established by shake-flask method. **Result:** Equilibrium solubility of artesunate in water and other organic solvents (chloroform, acetone and absolute ethyl alcohol) was (0.36 ± 0.016), (598.74 ± 13.11), (284.63 ± 7.96), (186.03 ± 8.27) g·L⁻¹ at 32.0 ℃. Oil/water partition coefficient of artesunate in n-octanol-water system was (249.03 ± 3.76) with log P_{app} = (2.40 ± 0.006 5). **Conclusion:** Artesunate had strong fat-soluble, pH value had a greater impact for its equilibrium solubility and apparent oil/water partition coefficient. Equilibrium solubility of artesunate increased when increasing pH value within 5.50-7.43, apparent oil/water partition coefficient of artesunate decreased when pH value increased, but log P_{app} remained > 2.0, indicating that artesunate had strong membrane permeability in *in vitro* and *in vivo* circumstances.

[收稿日期] 20130513(011)

[基金项目] 中国中医科学院自主选题重点项目 (ZZ0608)

[第一作者] 沈硕, 博士, 从事经皮给药系统研究, Tel: 18610351110, E-mail: shenshuo2007@163.com

[通讯作者] * 刘淑芝, 博士生导师, 研究员, 从事经皮给药系统研究, Tel: 010-84043227, E-mail: liushuzhi2004@sina.com;

叶祖光, 博士生导师, 研究员, 从事中药药理毒理学研究, E-mail: yezuguang@vip.sina.com

[Key words] artesunate; equilibrium solubility; apparent oil/water partition coefficient; HPLC; shake-flask method

青蒿琥酯为菊科一年生草本植物黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 的抗疟化学成分, 化学名为二氢青蒿素-1, 2- α -琥珀酸单酯, 是倍半萜类抗疟药青蒿素的衍生物^[1, 2]。药理研究表明青蒿琥酯作为抗疟药具有有效价高、不易产生耐药性的特点, 青蒿琥酯还具有平喘、免疫调节、抗肿瘤、抗血管生成等作用^[3-6]。本实验通过测定青蒿琥酯的溶解度和油水分配系数, 明确其理化性质, 有利于预测青蒿琥酯的生物膜通透性和药物动力学性质^[7-11], 为青蒿琥酯新剂型的开发提供实验依据。

1 材料

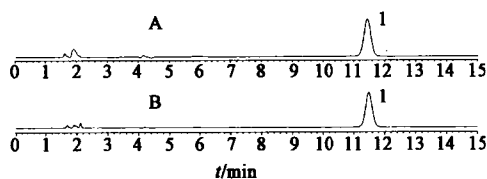
2487 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), SKY-100C 型摇床 (上海苏坤实业有限公司), BP-211D 型电子分析天平 (德国赛多利斯公司), BSA224S CW 型电子分析天平 (德国赛多利斯公司)。

青蒿琥酯原料药 (重庆华方武陵山制药有限公司, 批号 C00420121107), 青蒿琥酯对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 100200-201003), 乙腈为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 青蒿琥酯含量测定

2.1.1 色谱条件 Diamonsil C_{18} (2) 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m), 流动相乙腈-磷酸盐缓冲液 (磷酸二氢钾 1.36 g, 加水 1 L 溶解, 磷酸调节 pH 3.0) (60:40), 流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长 210 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 青蒿琥酯
图 1 青蒿琥酯原料药 HPLC

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取青蒿琥酯对照品 5.10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用乙腈定容, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取适量供试品溶液 (制备方法见平衡溶解度和油水分配系数测定), 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 标准曲线的绘制 吸取青蒿琥酯对照品溶液 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 μ L, 按上述色谱条件测定, 以

峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 得回归方程 $Y = 42\,150X - 2\,136.2$ ($r = 0.999\,9$), 线性范围 0.51 ~ 32.64 μ g。

2.1.5 精密度试验 精密吸取同一份对照品溶液 10 μ L, 连续进样 6 次, 结果青蒿琥酯峰面积的 RSD 0.71%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液 10 μ L, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 结果峰面积的 RSD 1.87%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 精密吸取 6 份供试品溶液, 每份 10 μ L, 进样, 测定青蒿琥酯含量, 结果 RSD 0.42%, 表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 分别精密称取已知含量的青蒿琥酯原料药 51.20 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并定容至刻度, 得原料药溶液, 精密吸取 3 份, 分别加入低、中、高 3 种剂量的对照品, 每个剂量组平行 3 份样品, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 结果低、中、高质量浓度的平均回收率分别为 101.0%, 102.8%, 99.7%, RSD 分别为 1.22%, 0.63%, 1.45%, 表明该方法准确度良好。

2.2 平衡溶解度的测定 将过量的青蒿琥酯原料药置于 10 mL 具塞西林瓶中, 分别加入适量生理盐水、水、不同 pH (4.0, 5.0, 5.8, 6.8, 7.4, 8.0) 磷酸缓冲液、无水乙醇、丙酮、乙酸乙酯、三氯甲烷、正辛醇、聚乙二醇 400、丙二醇等有机溶剂及相应水溶液 ($n=3$), 超声 15 min 后放入摇床于 32 $^{\circ}$ C 下震荡 24 h。将各饱和的青蒿琥酯溶液过微孔滤膜, 进样 (部分样品需要进行适当的稀释), 记录峰面积, 计算青蒿琥酯在各种溶剂中溶解度, 结果见表 1, 表明青蒿琥酯在水相中溶解度受 pH 的影响较大, 随 pH 增大, 溶解度迅速增大。

2.3 油水分配系数的测定 分别取纯水、不同 pH (4.0, 5.0, 5.8, 6.8, 7.4, 8.0) 磷酸缓冲液各 20 mL 与正辛醇 20 mL 混合于具塞锥形瓶中, 置于摇床上于 32 $^{\circ}$ C 震荡 24 h, 得系列水相饱和的正辛醇和正辛醇饱和的水相溶液。取适量青蒿琥酯原料药和系列水饱和正辛醇配制成 1 g $\cdot$ L⁻¹ 的系列正辛醇溶液, 将其与相应的水相混合, 置于摇床上于 32 $^{\circ}$ C 震荡 24 h, 每组平行配制 3 份样品, 取水相注入高效液相色谱仪, 记录青蒿琥酯峰面积, 用外标一点法计算青蒿琥酯质量浓度, 计算油水分配系数 (P_{app}), 见表 1。

表 1 青蒿琥酯在各类溶剂中溶解度及在正辛醇-缓冲液中油水分配系数的测定($\bar{x} \pm s, n = 3$)

溶剂	溶解度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	油水分配系数(P_{app})	$\log P_{\text{app}}$
正辛醇	47.26 ± 0.78		
丙二醇	54.35 ± 1.64		
聚乙二醇 400	104.48 ± 3.73		
乙酸乙酯	137.08 ± 0.41		
无水乙醇	186.03 ± 8.27		
丙酮	284.63 ± 7.96		
三氯甲烷	598.74 ± 13.11		
10% 乙醇	0.93 ± 0.014		
20% 乙醇	4.76 ± 0.14		
30% 乙醇	29.2 ± 0.34		
30% 丙二醇-70% 水	1.08 ± 0.028		
30% 聚乙二醇 400-70% 水	1.26 ± 0.044		
10% 聚乙二醇-10% 乙醇-80% 水	2.21 ± 0.043		
10% 聚乙二醇-20% 乙醇-70% 水	12.50 ± 0.13		
10% 聚乙二醇-30% 乙醇-60% 水	80.40 ± 3.80		
生理盐水	0.34 ± 0.014		
水	0.36 ± 0.016	249.03 ± 3.76	2.40 ± 0.0065
pH 4.0	0.40 ± 0.0087	2312.27 ± 71.71	3.36 ± 0.013
pH 5.0	0.59 ± 0.030	689.467 ± 5.11	2.84 ± 0.0032
pH 5.8	0.69 ± 0.056	216.30 ± 52.07	2.33 ± 0.11
pH 6.8	2.67 ± 0.044	163.08 ± 0.53	2.21 ± 0.0014
pH 7.4	3.92 ± 0.027	178.47 ± 1.15	2.25 ± 0.0028
pH 8.0	3.81 ± 0.030	171.60 ± 0.66	2.23 ± 0.0017

$P_{\text{app}} = C_o / C_w$

C_o 为平衡时青蒿琥酯在正辛醇中质量浓度, C_w 为平衡时青蒿琥酯在水相中质量浓度。

3 讨论

结果表明青蒿琥酯在各类非极性溶剂中溶解度明显高于极性溶剂系统,并随溶剂系统极性的降低,溶解度增大。加入聚乙二醇 400 会显著增加青蒿琥酯在乙醇-水溶剂系统中溶解度。

32℃下青蒿琥酯在不同 pH 磷酸缓冲盐体系中溶解度随 pH 的增大而增加($5.50 > \text{pH} > 7.43$),这主要由于其化学结构所决定。在青蒿琥酯结构中存在于一个-COOH 基团,在碱性条件下随羧基的解离青蒿琥酯在水溶液中溶解度会增大;但当 $\text{pH} > 8$ 时,继续增大 pH,青蒿琥酯的溶解度却有所降低;当 $\text{pH} > 10$,在对相应样品进行 HPLC 测定时,青蒿琥酯色谱峰基本消失,原因是青蒿琥酯在 $\text{pH} > 8$ 条件下发生水解,且随 pH 的增加,水解速度加快。

由于正辛醇与生物膜的脂溶性相似,因此测定

青蒿琥酯油水分配系数时选取正辛醇作为溶剂。文献报道 $\log P_{\text{app}} > 1$ 的化合物能较好地透过生物酯膜结构^[12]。结果显示青蒿琥酯的 $\log P_{\text{app}} = (2.40 \pm 0.0065)$ (ChemDraw 预测 $\log P_{\text{app}} = 2.63$),随 pH 的增大,青蒿琥酯的解离, $\log P_{\text{app}}$ 逐渐降低;但当 $\text{pH} > 6$ 时, $\log P_{\text{app}}$ 基本保持不变,维持在 2.2 左右。试验数据表明青蒿琥酯在体内、外酸碱条件下将始终保持较高的生物膜通透潜力,同时可推测青蒿琥酯在体外经皮渗透中会借助皮肤的脂溶性通道大量进入体内。

[参考文献]

[1] 侯海霞,周莉玲,李锐. 青蒿琥酯研究进展[J]. 广东药学,2000,10(2):5.
[2] 霍继曾,夏文江,薛明,等. 青蒿琥酯在奶牛体内的药代动力学与代谢[J]. 药学报,1991,26(3):225.
[3] 蒋江红. 青蒿琥酯的药理研究摘要[J]. 中医药学刊,2003,21(9):1502.

ZnCl₂ 沉淀法纯化丹酚酸 B 的工艺优选

段文强, 万鹏, 高鹏, 代龙*

(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 优选 Zn²⁺ 沉淀法纯化丹酚酸 B 的工艺条件。方法: 采用 HPLC 测定丹酚酸 B 含量, 色谱条件为流动相乙腈-0.05% 磷酸溶液梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 检测波长 286 nm, 进样量 10 μL。以丹酚酸 B 提取率为指标, 通过单因素试验优选提取工艺; 以丹酚酸 B 转移率为指标, 通过单因素试验考察碱液种类、ZnCl₂ 用量、盐酸摩尔浓度及 pH 对 Zn²⁺ 沉淀法纯化工艺的影响。结果: 优选的丹酚酸 B 提取、纯化工艺为加 6 倍量 pH 2~3 盐酸溶液温浸 3 次, 每次 1 h, 加 1% Na₂CO₃ 溶液调 pH 6.0~6.5, 加 30% 药材质量的 ZnCl₂, 用 2 mol·L⁻¹ 盐酸溶液溶解, 调 pH 2~3, 加等倍量乙酸乙酯萃取 2 次, 减压低温干燥, 丹酚酸 B 得率 3.47%, 纯度达 80%。结论: 优选的纯化工艺稳定可行, 可避免长时间高温和 pH 对丹酚酸 B 的破坏。

[关键词] 丹酚酸 B; Zn²⁺; 沉淀法; 纯化; 高效液相色谱; 单因素试验

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0012-03

[doi] 10.11653/syfy2013190012

Optimization of Purification Technology of Salvianolic Acid B by ZnCl₂ Precipitation Method

DUAN Wen-qiang, WAN Peng, GAO Peng, DAI Long*

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology of salvianolic acid B by Zn²⁺ precipitation method. **Method:** HPLC was adopted to determine the content of salvianolic acid B, chromatographic conditions were as follows: mobile phase of acetonitrile-0.05% phosphoric acid gradient elution, column temperature 30 ℃,

[收稿日期] 20130306(017)

[基金项目] 国家“十二五”重大新药创制专项(2013ZX09103002-021)

[第一作者] 段文强, 硕士, 从事中药制剂工艺及质量标准研究, Tel: 13793102075, E-mail: duanwenqiang1227@163.com

[通讯作者] * 代龙, 教授, 从事中药新药开发及新剂型研究, Tel: 0531-82960689, E-mail: dailongdailong@263.net

- [4] 茹炜炜, 梁幼生, 戴建荣, 等. 青蒿琥酯对日本血吸虫作用的研究 I 小鼠体内不同发育阶段虫体对青蒿琥酯的敏感性[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2006, 18(3): 161.
- [5] 林芳, 钱之玉, 薛红卫, 等. 青蒿素和青蒿琥酯对人乳腺癌 MCF-7 细胞的体外抑制作用比较研究[J]. 中草药, 2003, 34(4): 347.
- [6] 陈欢欢, 周慧君. 青蒿琥酯的抗血管生成作用[J]. 药理学学报, 2004, 39(1): 29.
- [7] 熊耀坤, 梁爽, 杜焰, 等. HPLC 法测定洋川芎内酯 I 的平衡溶解度和表观油水分配系数[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1644.
- [8] 刘冰, 吕佳. HPLC 测定苦参碱平衡溶解度和表观油水分配系数[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 43.
- [9] 熊璐琪, 李国锋, 苏碧雅, 等. 醋酸地塞米松和地塞米松磷酸钠的油水分分配系数与其经皮渗透行为之间的相关性研究[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(6): 439.
- [10] 孙启文, 陈军, 陈明磊, 等. 高车前苷油水分分配系数的测定及大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 193.
- [11] 陆慧, 贾晓斌, 韦英杰, 等. 灵芝三萜表观油水分分配系数的测定及其在体肠吸收[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 12.
- [12] 姚媛, 廖琼峰, 曾丽英, 等. 新穿心莲内酯表观油水分分配系数的测定及 pH 值对其的影响[J]. 今日药学, 2009, 19(10): 8.

[责任编辑 全燕]

青蒿琥酯平衡溶解度和表观油水分配系数的测定

作者：

沈硕，[刘淑芝](#)，[杜茂波](#)，[葛克亚](#)，[宋立华](#)，[叶祖光](#)，[SHEN Shuo](#)，[LIU Shu-zhi](#)，[DU Mao-bo](#)，[GE Ke-ya](#)，[SONG Li-hua](#)，[YE Zu-guang](#)

作者单位：

[中国中医科学院中药研究所](#)，北京，100700

刊名：

[中国实验方剂学杂志](#)[ISTIC](#)[PKU](#)

英文刊名：

[Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae](#)

年，卷(期)：

2013, 19(19)

参考文献(12条)

1. [侯海霞](#); [周莉玲](#); [李锐](#) [青蒿琥酯研究进展](#)[期刊论文]-[广东药学](#) 2000 (02)

2. [霍继曾](#); [夏文江](#); [薛明](#) [青蒿琥酯在奶牛体内的药代动力学与代谢](#) 1991 (03)

3. [蒋江红](#) [青蒿琥酯的药理研究摘要](#)[期刊论文]-[中医药学刊](#) 2003 (09)

4. [茹炜炜](#); [梁幼生](#); [戴建荣](#) [青蒿琥酯对日本血吸虫作用的研究 I 小鼠体内不同发育阶段虫体对青蒿琥酯的敏感性](#)[期刊论文]-[中国血吸虫病防治杂志](#) 2006 (03)

5. [林芳](#); [钱之玉](#); [薛红卫](#) [青蒿素和青蒿琥酯对人乳腺癌MCF-7细胞的体外抑制作用比较研究](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2003 (04)

6. [陈欢欢](#); [周慧君](#) [青蒿琥酯的抗血管生成作用](#)[期刊论文]-[药学报](#) 2004 (01)

7. [熊耀坤](#); [梁爽](#); [杜焰](#) [HPLC法测定洋川芎内酯 I 的平衡溶解度和表观油水分配系数](#)[期刊论文]-[药物分析杂志](#) 2012 (09)

8. [刘冰](#); [吕佳](#) [HPLC测定苦参碱平衡溶解度和表观油水分配系数](#)[期刊论文]-[中国实验方剂学杂志](#) 2012 (20)

9. [熊璐琪](#); [李国锋](#); [苏碧雅](#) [醋酸地塞米松和地塞米松磷酸钠的油水分配系数与其经皮渗透行为之间的相关性研究](#)[期刊论文]-[中国药](#)
[学杂志](#) 2011 (06)

10. [孙启文](#); [陈军](#); [陈明磊](#) [高车前苷油水分配系数的测定及大鼠在体肠吸收动力学研究](#) 2012 (22)

11. [陆慧](#); [贾晓斌](#); [韦英杰](#) [灵芝三萜表观油水分配系数的测定及其在体肠吸收](#)[期刊论文]-[中国实验方剂学杂志](#) 2011 (21)

12. [姚媛](#); [廖琼峰](#); [曾丽英](#) [新穿心莲内酯表观油水分配系数的测定及pH值对其的影响](#)[期刊论文]-[今日药学](#) 2009 (10)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgsyfxjzz201319003.aspx