

# 大黄酸平衡溶解度和油水分配系数的测定<sup>\*</sup>

钦富华<sup>1</sup>, 蔡雁<sup>2</sup>, 俞佳丹<sup>1</sup>

(1. 浙江医药高等专科学校制药工程学院, 宁波 315100; 2. 宁波市第九医院药剂科, 宁波 315020)

**摘要** 目的 测定大黄酸在不同溶剂中的平衡溶解度及表观油水分配系数, 为大黄酸新剂型的设计提供参考依据。**方法** 采用高效液相色谱法测定大黄酸在水、不同 pH 值缓冲液、不同溶剂中的溶解度; 采用经典摇瓶法测定大黄酸在正辛醇缓冲液中的表观油水分配系数。**结果** 37 ℃ 时大黄酸在水中的平衡溶解度为  $3.89 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 表观油水分配系数 ( $\lg P$ ) 为 2.79; 大黄酸的溶解度在随着 pH 值的升高呈现增加的趋势, 在 pH 值 6.8 和 7.4 的磷酸盐缓冲液中分别达 362.20 和  $431.65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。大黄酸在半极性溶剂中溶解度相对较好, 特别是在聚乙二醇 400 中的溶解度可达  $2\,971.74 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。大黄酸的油水分配系数随 pH 值的升高而下降, 在 pH 值 6.8 和 7.4 的磷酸盐缓冲液中分别为 0.83 和 0.54。**结论** 大黄酸水溶性差, 增大 pH 值可增加其溶解度, 但油水分配系数随之降低。

**关键词** 大黄酸; 平衡溶解度; 表观油水分配系数; 色谱法, 高效液相

中图分类号 R282.71; R283

文献标识码 B

文章编号 1004-0781(2018)01-0088-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2018.01.023

## Determination of Equilibrium Solubility and Apparent Oil/water Partition Coefficients of Rhein

QIN Fuhua<sup>1</sup>, CAI Yan<sup>2</sup>, YU Jiadan<sup>1</sup> (1. College of Pharmaceutical Engineering, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China; 2. Department of Pharmacy, the Ninth Hospital of Ningbo City, Ningbo 315020, China)

**ABSTRACT Objective** To determine the solubility of rhein in different vehicles and its partition coefficients in the *n*-octanol-water system for designing new formulations. **Methods** High performance liquid chromatography (HPLC) method was established to determine the concentration of rhein in water, different pH solutions and different solvents; the partition coefficients for the *n*-octanol- buffer solution systems were determined by shaking flask method. **Results** The equilibrium solubility of Rhein was  $3.89 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  and the  $\lg P$  was 2.79 in water at 37 ℃. The solubility of rhein was increased with the raise of pH, which could reach 362.20 and  $431.65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  in phosphate buffer solution at pH 6.8 and 7.4, respectively. Solubility of rhein in the semi polar solvent was relatively good, which can up to  $2\,971.74 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  in PEG400. The oil-water partition coefficients of rhein were decreased with the increase of pH, and were 0.83 and 0.54 in phosphate buffer solution at pH 6.8 and 7.4, respectively.

**Conclusion** Rhein is almost not soluble in water. With the raise of pH, the solubility is increased but the oil-water partition coefficient is decreased.

**KEY WORDS** Rhein; Equilibrium solubility; Apparent oil/water partition coefficients; Chromatography, high performance liquid

大黄酸是中药大黄的有效成分之一, 为一种蒽醌单体衍生物, 具有广泛的药理作用。研究表明大黄酸具有抗菌、抗病毒、抗炎、降血脂、保肝等多种作用<sup>[1]</sup>, 近年来发现其在防治糖尿病肾病和抗肿瘤方面表现突出, 被认为是新型潜在的抗肿瘤药物<sup>[2]</sup>。但是大黄酸在水中溶解度小, 半衰期短, 生物利用度低, 临床应用受到限制<sup>[3]</sup>。溶解度和渗透性是影响药物吸收的两个重要理化性质, 是判定药物生物药剂学分类的依据, 对制剂新剂型的设计具有重要的参考意义。笔者目前

尚未见大黄酸平衡溶解度和油水分配系数的文献报道。笔者参考文献[4-6], 采用摇瓶-高效液相色谱(HPLC)法测定了大黄酸在不同介质中的溶解度及不同 pH 值缓冲液中的油水分配系数, 以期为该药物新剂型的研究开发提供参考依据。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** Agilent1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); Millipore 超纯水机(美国密理博公司); HZQ-C 空气浴振荡器(哈尔滨东明医疗仪器厂); pH-3C pH 计(上海仪电科学仪器有限公司); WH-2 微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司); KQ-500DE 超声波清洗机(宁波新艺超声设备有限公司); 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司, 感量: 0.01 mg); TGL-16B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

收稿日期 2016-10-21 修回日期 2016-11-23

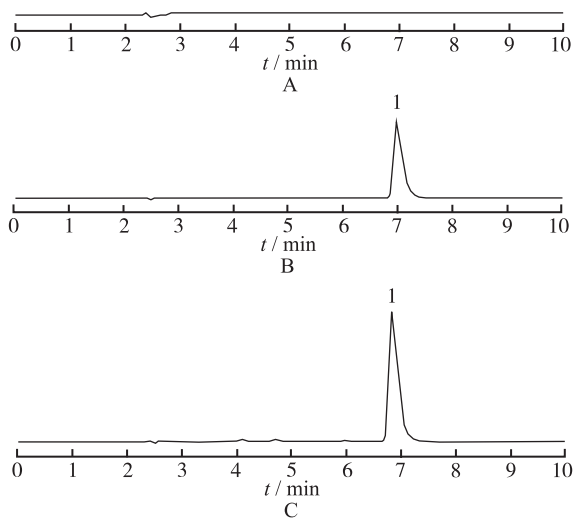
**基金项目** \* 宁波市科技创新团队(2015C110027); 2016 浙江省大学生科技创新活动计划(2016R435001)

**作者简介** 钦富华(1981-), 男, 浙江长兴人, 副教授, 硕士, 主要从事药物新剂型研究。电话: 0574-88225752, E-mail: qinfh@mail.zjpc.net.cn。

**1.2 试药** 大黄酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110757-200206);大黄酸原料(陕西物产经贸有限公司,含量>98%);蓖麻油聚氧乙烯醚(cremophor EL,德国巴斯夫公司);油酸聚乙二醇甘油酯(labrafil M 1944CS)、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(labrasol)、二乙二醇单乙基醚(transcutol P)均由法国佳法赛公司提供,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸(80:20);流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长:254 nm;柱温:25℃;进样量:20 μL<sup>[7]</sup>。在上述色谱条件下,大黄酸分离良好,出峰时间约为 7 min,各溶剂对检测无影响,见图 1。



A.空白溶剂;B.标准品;C.样品;1.大黄酸

图 1 大黄酸 HPLC 色谱图

A.blank solution;B.standard;C.sample;1.rhein

Fig.1 HPLC chromatograms of rhein

**2.2 标准曲线的制备** 精密称取干燥至恒重的大黄酸对照品 14.5 mg,置 200 mL 量瓶中,加入甲醇超声溶解并定容,得浓度为 72.5 μg·mL<sup>-1</sup>的贮备液。精密移取贮备液,加甲醇稀释得浓度分别为 3.6, 7.2, 14.5, 29.0, 43.5, 58.0, 72.5 μg·mL<sup>-1</sup>的对照品溶液,作为高浓度范围的标准液。另取浓度为 3.625 μg·mL<sup>-1</sup>的对照品溶液,用甲醇稀释得浓度分别为 0.108 8, 0.217 5, 0.435, 0.652 5, 0.870 0, 1.087 5 μg·mL<sup>-1</sup>的对照品溶液,作为低浓度范围的标准液。分别进样 20 μL,记录峰面积。以大黄酸峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归,得高、低浓度范围的回归方程,分别为: $A = 79.201C - 1.025$ ,  $r = 0.999\ 9$ ;  $A = 69.631C + 5.322$ ,

$r = 0.999\ 4$ 。结果表明大黄酸浓度在 3.6~72.5 μg·mL<sup>-1</sup>和 0.108 8~1.087 5 μg·mL<sup>-1</sup>的范围内与峰面积呈良好的线性关系。

**2.3 精密实验** 在高、低浓度范围内,取贮备液稀释后分别制成高、中、低质量浓度(58.0, 29.0, 7.2 μg·mL<sup>-1</sup>)和(0.870 0, 0.435 0, 0.217 5 μg·mL<sup>-1</sup>)的大黄酸对照品溶液,按“2.1”项色谱条件连续进样 5 次,记录峰面积,计算日内 RSD,连续测定 5 d,计算日间 RSD。高质量浓度范围内,大黄酸高、中、低浓度的日内 RSD 分别为 0.68%, 0.21% 和 0.38%, 日间 RSD 分别为 0.71%, 0.83% 和 0.66%;低质量浓度范围内,大黄酸高、中、低浓度的日内 RSD 分别为 0.84%, 0.55% 和 0.78%, 日间 RSD 分别为 0.99%, 0.83% 和 1.06%。日内和日间 RSD 均小于 2%,方法精密良好。

**2.4 准确度实验** 在高、低浓度范围内,取贮备液稀释后分别制成高、中、低质量浓度(58.0, 29.0, 7.2 μg·mL<sup>-1</sup>)和(0.87, 0.435, 0.217 5 μg·mL<sup>-1</sup>)的大黄酸对照品溶液进样测定,根据标准曲线计算对应的浓度,按公式:准确度=测定浓度值/真实浓度值×100%,求出高、中、低浓度的准确度。结果显示高、低浓度范围内,大黄酸高、中、低浓度的准确度分别为 99.4%, 98.9%, 101.1% 和 99.1%, 101.3%, 100.6%,表明该方法的准确度良好。

**2.5 稳定性实验** 精密吸取同一浓度大黄酸样品溶液,分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 进样测定,大黄酸峰面积的 RSD=0.43%,表明样品溶液在 12 h 内稳定性良好。

## 2.6 平衡溶解度的测定

**2.6.1 水及不同 pH 值缓冲液中的平衡溶解度测定** 配制 pH 值 1.0 的盐酸溶液, pH 值 2.5, 3.6, 4.5, 5.8, 6.8, 7.4 的缓冲液。取过量的大黄酸置具塞锥形瓶中,分别加入 10 mL 纯化水和不同 pH 值缓冲液,置恒温摇床中,于(37±1)℃下振摇 48 h 使其充分溶解。将饱和混悬液在 10 000 r·min<sup>-1</sup>条件下离心 10 min( $r = 5\text{ cm}$ ),上清液经孔径 0.45 μm 微孔滤膜滤过后 HPLC 法测定。测得大黄酸在水中的平衡溶解度为 3.89 μg·mL<sup>-1</sup>,在不同 pH 值缓冲液中平衡溶解度见图 2。结果显示大黄酸的溶解度随着 pH 值的升高呈增加的趋势,但在较低 pH 值条件下变化不明显(均小于 10 μg·mL<sup>-1</sup>),在 pH 值约为 6 发生突跃,在 pH 值 6.8 和 7.4 的磷酸盐缓冲液中的溶解度分别达 362.20 和 431.65 μg·mL<sup>-1</sup>。

**2.6.2 不同介质中溶解度考察** 考察大黄酸在不同种类的油相、表面活性剂以及溶剂中溶解度。取介质约 2 mL 置玻璃离心管中,加入过量的大黄酸,涡旋分

散后在(37±1)℃空气浴摇床中振摇平衡48 h,样品在10 000 r·min<sup>-1</sup>条件下离心10 min(*r*=5 cm),上清液经孔径0.45 μm的微孔滤膜滤过,精密移取续滤液适量,用甲醇稀释适当倍数后用HPLC法测定。结果见表1。大黄酸在油相中溶解度也很低,相对而言在表面活性剂及半极性溶剂中相对较好,特别是在聚乙二醇(PEG)400中的溶解度可达2 971.74 μg·mL<sup>-1</sup>,为水中溶解度的764倍。

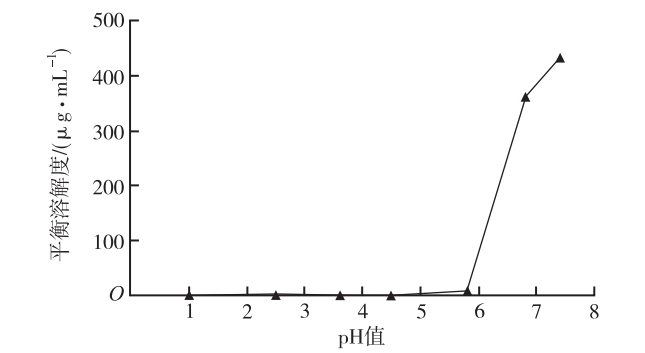


图2 大黄酸在不同pH值缓冲液中的平衡溶解度  
Fig.2 Equilibrium solubility of rhein in buffer solutions with different pH value

表1 大黄酸在不同介质中溶解度

Tab.1 Solubility of rhein in different solvents			
		μg·mL <sup>-1</sup> , $\bar{x} \pm s$	
介质	溶解度	介质	溶解度
大豆油	19.04±1.62	Labrafil M 1944 CS	122.03±7.24
辛癸酸甘油酯	38.23±2.52	Labrasol	710.54±9.88
油酸乙酯	22.23±1.87	Cremophor EL	651.45±23.07
肉豆蔻酸异丙酯	20.90±2.01	聚山梨酯 80	954.69±19.15
甲醇	206.31±4.62	聚山梨酯 85	839.42±13.25
乙醇	98.49±4.73	聚山梨酯 20	851.29±11.82
丙二醇	148.92±6.05	PEG400	2 971.74±21.36
丙三醇	99.69±7.85	Transcutol P	997.76±10.54

2.7 表观油水分配系数测定 取适量大黄酸加入水饱和的正辛醇中,超声溶解,经孔径0.45 μm的微孔滤膜滤过得大黄酸正辛醇溶液。精密移取该溶液5 mL置具塞锥形瓶中,分别加入同体积的经正辛醇饱和的水、pH值1.0的盐酸溶液和不同pH值的缓冲液中,在(37±1)℃条件下振摇48 h,静置后分离上下两相,分别经10 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(*r*=5 cm),经孔径0.45 μm的微孔滤膜滤过,甲醇稀释适当倍数后进样,分别测定正辛醇及水相中大黄酸的浓度ρ<sub>o</sub>和ρ<sub>w</sub>,根据公式lgP=lg(ρ<sub>o</sub>/ρ<sub>w</sub>)计算得到油水分配系数。经测

定,大黄酸在水中的lgP为2.79,在不同的pH值条件下,其油水分配系数随着pH值的升高呈现下降趋势,在pH值6.8和7.4的磷酸缓冲液中分别为0.83和0.54,见图3。

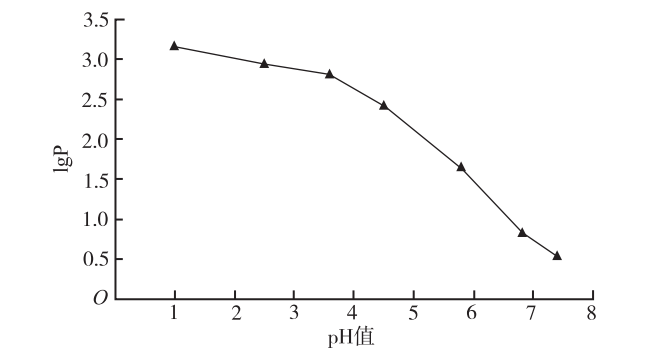


图3 大黄酸在不同pH值缓冲液中的油水分配系数  
Fig.3 Oil/water partition coefficient of rhein in buffer solution with different pH value

3 讨论

油水分配系数是评价药物的渗透性进而预测药物吸收的重要参数。油水分配系数的测定方法有很多,如摇瓶法、HPLC法和产生柱法等,其中以经典的摇瓶法最为常用。测定过程中通常采用正辛醇作为模拟生物膜相的溶剂,因其溶解度参数与生物膜的溶解度参数一致<sup>[8]</sup>。油水分配系数的测定受pH值、温度等因素影响,测定结果在特定的条件下才有意义<sup>[5]</sup>。本研究采用了模拟人体温度和胃肠道pH值范围的条件,测定了大黄酸在37℃、pH值1.0~7.4的不同缓冲液中油水分配系数。结果显示随着pH值的升高,油水分配系数下降,这与药物溶解度的增大有关,同时对吸收来讲两者构成了矛盾,溶解度低时渗透性高,溶解度高时渗透性低,药物的生物学性质随着pH值的改变而发生变化。

溶解度测定过程中发现,当pH值达到6.8和7.4时,大黄酸的峰形变差,呈现双峰叠加现象,分析原因可能是其结构中蒽醌环上含有2个羟基和1个羧基,在高pH值条件下发生解离,大黄酸同时以分子和离子状态存在,将样品经甲醇适当稀释后,峰形良好。此外,大豆油不能完全溶于甲醇,本研究采取了甲醇提取的方法,将少量大豆油与甲醇涡旋混合、离心取上清液后进行测定,测定结果可能存在一定误差。

大黄酸的溶解度测定结果显示大黄酸难溶于水,溶解度随pH值的升高而增加,但即使在pH值7.4的条件下也只能达到极微溶解,提示大黄酸在胃肠液中

的溶解度极低,可能是导致其生物利用度低的主要原因之一。因此,开发大黄酸口服制剂的关键在于增加其溶解度和溶出度。已有文献报道通过将大黄酸制成固体分散体<sup>[9]</sup>、纳米粒<sup>[3]</sup>等剂型提高其溶出和生物利用度。此外,研究结果显示大黄酸在聚山梨酯类表面活性及半极性溶剂 PEG400 中溶解度相对较好,提示或可通过制成微乳及自微乳等方法来增加大黄酸的口服吸收。

#### 参考文献

- [1] 李晓红,李蒙,陶艳蓉.大黄酸及其衍生物药理作用研究新进展[J].现代药物与临床,2010,25(6):417-421.
- [2] YU L,YAO G,MA W.Rhein:a novel potential antitumor drug[J].Chin Pharm Sci,2016,25(5):321-328.
- [3] 尚小广,李颖,徐陆忠,等.大黄酸聚乳酸纳米粒的制备及大鼠体内药动学研究[J].中国药理学杂志,2012,47(7):524-528.
- [4] 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,2008,23(9):777-779.
- [5] 米楠,苏慕君,臧可昕.阿齐沙坦油水分配系数的测定[J].药学评价研究,2013,36(6):452-454.
- [6] 戚志华,郭淑云,唐秀玲,等.反相高效液相色谱法测定根皮苷平衡溶解度与油水分配系数[J].医药导报,2015,34(10):1329-1332.
- [7] 封玲,丁美红,沈勤,等.大黄酸神阙穴给药经皮渗透性的影响因素研究与初步机制探讨[J].中国中药杂志,2016,41(8):1546-1552.
- [8] 顾杰,李媛,秦昆明,等.HPLC 法测定甘草素的平衡溶解度和表观油水分配系数[J].药物分析杂志,2013,33(8):1293-1297.
- [9] 韩刚,王传胜,索炜,等.大黄酸固体分散体的制备[J].中国医院药学杂志,2011,31(13):1090-1093.

## 高效液相色谱法测定伊提日非力 3 种剂型中没食子酸和鞣花酸的含量\*

李建梅,吐鲁洪·卡地尔,希尔艾力·吐尔逊

(新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所维吾尔医方剂学重点实验室,乌鲁木齐 830049)

**摘要** 目的 建立维吾尔药伊提日非力蜜膏 3 种剂型中没食子酸和鞣花酸的含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法,色谱柱:Waters XBridge C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:甲醇-乙腈-0.2% 甲酸水溶液,梯度洗脱;流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温:25℃;检测波长 254 nm。结果 没食子酸在 0.132~0.792 μg、鞣花酸在 0.108~0.648 μg 范围内均线性关系良好,相关系数均为 0.999 9。平均加样回收率分别为 98.11%(n=9),99.32%(n=9);RSD 分别为 1.39%,2.48%。结论 该方法分离效果好,专属性强、准确,可用于伊提日非力系列制剂的质量控制。

**关键词** 伊提日非力制剂;没食子酸;鞣花酸;色谱法;高效液相

中图分类号 R286;R927.2

文献标识码 B

文章编号 1004-0781(2018)01-0091-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2018.01.024

### Determination of Gallic Acid and Ellagic Acid in Three Kinds of *Yitirifeili* Preparation by RP-HPLC

LI Jianmei, KADIER Tuerhong, TURSUN Xirali (Key Laboratory of Traditional Uyghur Medicine Prescription, Institute of Xinjiang Traditional Uyghur Medicine, Urumqi 830049, China)

**ABSTRACT Objective** To develop a method for determination of gallic acid and ellagic acid in three kinds of *Yitirifeili* preparation. **Methods** HPLC method was used to determine the content of gallic acid and ellagic acid. The analysis was performed on Waters XBridge ShieldRP C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-0.2% phosphoric acid in gradient elution manner. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the column temperature was 25℃, and the detection wavelength was 254 nm. **Results** The linear ranges of gallic acid and ellagic acid were 0.132–0.792 μg, 0.108–0.648 μg, respectively. Both correlation coefficient were more than 0.999 9. The average recovery of gallic acid and ellagic acid were 98.11% (n=9), RSD=1.39%; 99.32% (n=9), RSD=2.48%. **Conclusion** The method is accurate and reliable. It can be used as the quality control of *Yitirifeili* preparations.

**KEY WORDS** *Yitirifeili* preparations; Gallic acid; Ellagic acid; Chromatography, high performance liquid