

灯盏花素的理化性质研究

钟海军^{1*}, 邓英杰², 徐春莲¹, 谢宝刚¹(1.南昌大学药学系, 南昌 330006; 2.沈阳药科大学, 沈阳 110016)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)07-0608-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.07.12

摘要 目的:为灯盏花素二次开发提供依据。方法:采用高效液相色谱法测定灯盏花素在不同溶剂以及不同pH值水溶液中的溶解度;采用溶解度法测定电离常数(pK_a);采用摇瓶法测定油/水分配系数;对灯盏花素水溶液在25、37℃时的稳定性以及乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)和NaHSO₃对灯盏花素水溶液稳定性的影响进行研究。结果:灯盏花素是一个弱酸性物质, pK_a 为3.29,在水中的溶解度受pH值的影响很大,油/水分配系数为0.27,在各种有机溶剂中的溶解度较小。在25℃时,灯盏花素在pH值为2~5的水溶液中较稳定;在37℃时,在pH值为3~5的水溶液中较稳定,在水中存在专属性酸碱催化降解机制。EDTA-2Na和NaHSO₃可明显提高灯盏花素在水中的稳定性。结论:理化性质的研究为灯盏花素的二次开发提供了有价值的信息,并证实了提高灯盏花素在水溶液中稳定性的方法。

关键词 灯盏花素;电离常数;油/水分配系数;溶解度

Studies on Physicochemical Properties of Breviscapine

ZHONG Hai-jun¹, DENG Ying-jie², XU Chun-lian¹, XIE Bao-gang¹(1.Dept. of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2.Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide experimental evidence for the secondary development of breviscapine. METHODS: The solubility of breviscapine in various solvent and aqueous media at various pH were determined by HPLC. The ionization constant (pK_a) were determined by solubility method. The oil/water partition coefficient was determined by shaking bottle method. The stability of breviscapine solution at 25 and 37 °C and the effects of EDTA-2Na and NaHSO₃ on it were investigated. RESULTS: Scutellarin belonged to weak acid constituent, and its pK_a was 3.29; its solubility was markedly affected by the pH of the environment; oil/water partition coefficient of it was 0.27; the solubility of scutellarin was in low level in various organic solvents. At 25 °C, scutellarin was stable relatively in solution with pH 2-5 at 25 °C; at 37 °C, scutellarin was stable relatively in solution with pH 3-5, and the degradation mechanism of scutellarin can be explained by specific acid/base catalysis. The addition of EDTA-2Na or/and NaHSO₃ could improve the stability of scutellarin in water significantly. CONCLUSION: This study provides instructive information for secondary development of breviscapine and confirms the method for improving the stability of breviscapine in aqueous solution.

KEY WORDS Breviscapine; Ionization constant; Oil/water partition coefficient; Solubility

灯盏花素是从灯盏花(*Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz.) 中提取分离得到的黄酮类生物活性成分,以灯盏乙素为主,含有少量灯盏甲素。其在临床上广泛用于治疗脑血管、冠心病等心脑血管疾病^[1-2]。近年来,国内对灯盏花素的二次研发已经成为一个热点,从2001年至今,国家知识产权局公开了170多项与灯盏花素相关的专利,其中许多项是与灯盏花素的剂型创新有关^[3]。笔者也对灯盏花素普通脂质体、多囊脂质体进行了研究^[4]。在对药物进行剂型设计和剂型创新前,为了给处方设计、工艺设计、体内外评价和质量控制提供依据,必须了解药物的理化性质。因此,在进行灯盏花素脂质体新剂型研究前,笔者对灯盏花素的理化性质进行研究,并证实了提高灯盏花素在水溶液中稳定性的方法。

1 材料

1.1 仪器

UV-9100紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器公司); 2RS-8G智能型溶出仪(天津大学无线电厂);pHS-2C精密酸度

计(上海雷磁仪器厂)。

1.2 药品与试剂

灯盏花素(云南玉溪万方药业有限公司,纯度:95.5%);灯盏乙素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:842200102);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 灯盏花素含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil ODS柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 2.5)-乙腈(20:63:17, V/V/V);流速:0.8 ml/min;检测波长:335 nm;进样量:20 μl。

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取灯盏乙素对照品适量,用甲醇稀释得质量浓度分别为0.50、1.00、2.50、10.00、25.00、50.00 μg/ml的灯盏乙素对照品溶液,按上述色谱条件进样测定。以峰面积积分值(A)为纵坐标,质量浓度(c)为横坐标,进行线性回归,得回归性方程为 $A=1.344 \times 10^5 c - 1124$ ($r=0.9999$)。结果表明,灯盏乙素质量浓度在0.50~50.00 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

* 副教授,硕士研究生导师。研究方向:药物新剂型与制剂新技术。E-mail: zhonghj@ncu.edu.cn

2.2 灯盏花素在不同溶剂中的溶解度测定

分别加入100 ml 甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿、乙醚,于250 ml 具塞三角锥形瓶中,各加入过量的灯盏花素粉末,密塞,然后置于25 ℃ 恒温水浴中,磁力搅拌,作为样品溶液,备用。每2 h 取样5 ml,按“2.1”项下方法测定,直至各溶液中灯盏花素质量浓度不变化为止。各样品溶液经0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,备用。对于灯盏花素的甲醇、乙醇续滤液,直接用流动相稀释适当倍数后,按“2.1”项下方法测定;对于灯盏花素丙酮、乙酸乙酯、氯仿、乙醚续滤液,分别取2 ml, N₂吹干后,用适量的流动相溶解,按“2.1”项下方法测定。结果,灯盏花素在甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿、乙醚中的溶解度分别为5.634、3.550、1.099、 1.82×10^{-2} 、 1.27×10^{-3} 、 2.80×10^{-4} mg/ml,表明灯盏花素在不同有机溶剂中的溶解度均较低,仅在甲醇、乙醇中稍大,而且随着溶剂极性减小,溶解度有降低的趋势。

2.3 灯盏花素在不同pH值的水溶液中的溶解度测定

参照文献方法^[5],配制不同pH值的Britton-Robinson缓冲液。分别取0.1 mol/L HCl和上述不同pH值的缓冲液250 ml,置于溶出仪的溶出杯中,分别加入过量的灯盏花素粉末,于25 ℃、100 r/min 搅拌,每1 h 取样5 ml,过滤,按“2.1”项下方法测定,直至各溶液中灯盏花素质量浓度不变化为止,再用酸度计分别测定各溶液pH值,得出灯盏花素在不同pH值的水溶液中的溶解度。结果,在pH值低的水溶液中,灯盏花素的溶解度较小,其在pH为1的盐酸中溶解度只有2.20 μg/ml。随着pH值的增大,溶解度逐渐增加。25 ℃下灯盏花素在不同pH值的水溶液中的溶解度见图1。

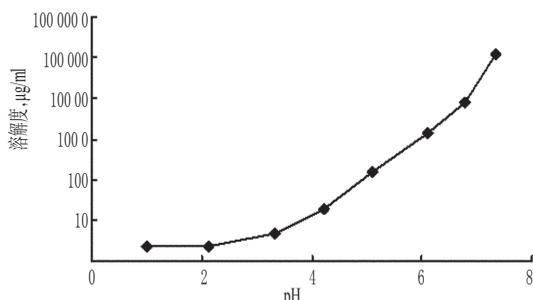


图1 25 ℃下灯盏花素在不同pH值的水溶液中的溶解度 ($n=3$)

Fig 1 The solubility of breviscapine in aqueous solution at 25 ℃ ($n=3$)

2.4 灯盏花素电离常数(pK_a)的测定

在“2.3”项下所得试验结果的基础上,参考文献方法^[6],采用溶解度法测定灯盏花素的 pK_a : $pK_a = \text{pH} - \lg(S/S_0 - 1)$ 。式中, S_0 为药物中性分子的固有溶解度, S_i 为不同pH饱和溶液的溶解度。该方法需要以下几个步骤:(1)固有溶解度的测定。本文以灯盏花素在0.1 mol/L HCl中的溶解度作为其固有溶解度 S_0 。(2) pK_a 的近似测定。由于试验前无法估计灯盏花素 pK_a 具体数值,笔者根据“2.3”项下所测得的不同pH值的水溶液中灯盏花素溶解度数据,计算 pK_a 近似值,pH值为2.2、3.35、4.21和5.12时,计算所得 pK_a 近似值分别为3.44、3.30、3.32和3.29。(3) pK_a 的准确测定。根据 pK_a 近似值,选择5种缓冲液,pH值分别为 pK_a 、 $pK_a \pm 0.2$ 、 $pK_a \pm 0.5$,测定药物溶解度,再用酸度计分别测定平衡后各药物饱和溶液的pH值,求得灯盏花

素的平均 pK_a 为3.29。25 ℃下灯盏花素在不同pH值的水溶液中的溶解度以及 pK_a 值见表1。

表1 25 ℃下灯盏花素在不同pH值的水溶液中的溶解度以及 pK_a ($n=3$)

Tab 1 The solubility and pK_a of breviscapine in aqueous solution at 25 ℃ ($n=3$)

测定项目	pH值				
	2.67	2.93	3.27	3.64	4.32
溶解度(g/ml)	2.68	3.24	4.41	7.223	24.76
pK_a	3.33	3.26	3.27	3.28	3.31

2.5 灯盏花素油/水分配系数的测定

油/水分配系数常用正辛醇/水分配系数表示。本试验采用摇瓶法,通过在互不相溶的正辛醇/水系统中,测定两相中的药物浓度,油相药物浓度通过加入油相前水相的药物浓度和饱和平衡后水相的药物浓度求得。

用0.1 mol/L的HCl 50 ml,加50 ml正辛醇,振荡几分钟后在分液漏斗中放置过夜,分别取出水层和正辛醇层。用所得的水层配制质量浓度约1~2 μg/ml的灯盏花素溶液25 ml,过滤,加入以上用水饱和的正辛醇层25 ml,涡旋振荡几分钟,于25 ℃恒温水浴中放置24 h,使药物在两相中分配平衡,分出水层。分别按“2.1”项下方法测定正辛醇层加入前水相以及平衡后灯盏花素的浓度,计算油/水分配系数。结果,以0.1 mol/L HCl为水相时,灯盏花素的油/水分配系数为0.27,由于在0.1 mol/L HCl溶液中,灯盏花素基本以分子形式存在,该分配系数可以认为是灯盏花素的真实油/水分配系数。

2.6 灯盏花素水溶液的稳定性研究

2.6.1 制备溶液 (1)pH 7.0、质量浓度为1 mg/ml的灯盏花素水溶液(精密称取灯盏花素100 mg,加水约20 ml,用NaOH水溶液调pH值为7.0,蒸馏水定容100 ml);(2)不同pH的Britton-Robinson缓冲液,作为介质1;(3)pH 6.8的Britton-Robinson缓冲液(含0.1% EDTA-2Na),作为介质2;(4)pH 6.8的Britton-Robinson缓冲液(含5% NaHSO₃),作为介质3;(5)pH 6.8的Britton-Robinson缓冲液(含0.1% EDTA-2Na和5% NaHSO₃),作为介质4。

2.6.2 试验方法 取0.1 mol/L HCl和pH 2.09、3.29、4.10的Britton-Robinson缓冲液100 ml,加pH 7.0灯盏花素水溶液(1 mg/ml)0.1 ml;取pH 5.02、6.80、7.24、7.54、7.96、8.36的Britton-Robinson缓冲液100 ml,加pH 7.0灯盏花素水溶液(1 mg/ml)1 ml,平行2份,重新测定各溶液的pH值,再分别置于25、37 ℃水浴中,于放置后0、2、4、8、12、24、36、48、60、72、84 h取样;取pH 6.80的Britton-Robinson缓冲液,含0.1% EDTA-2Na、5% NaHSO₃、0.1% EDTA-2Na + 5% NaHSO₃的pH 6.8的Britton-Robinson缓冲液,加pH 7.0灯盏花素水溶液(1 mg/ml)1 ml,重新测定各溶液的pH值,再分别置于60 ℃水浴中,于放置后0、1、3、5、8、12、24、36、48、60 h取样。按“2.1”项下方法测定灯盏花素质量浓度,根据零级、一级、二级、三级反应特点研究灯盏花素降解反应动力学。以未降解的灯盏花素百分率的对数($y = \ln c_0/c$)对加热时间(x)进行线性回归,得不同温度、不同pH值、不同介质下的灯盏花素降解速率回归方程和降解速率常数(K),并以 $\lg K$ 对pH值作图。结果,灯盏花素降解反应动力学较符合伪一级动力学规律^[7]。灯盏花素在不同条件下的降解速率方程和 K 值见表2;灯盏花素水溶液的 $\lg K$ -pH图见图2。

表2 灯盏花素在不同条件下的降解速率方程和K值

Tab 2 Degradation kinetics equations and rate constants of breviscapine at different condition (n=3)

温度, °C	介质	pH	降解速率方程	K, h ⁻¹	lg K	
25	水	1.12	y=0.017 5x+0.036 3(r=0.996 2)	1.75 × 10 ⁻³	-1.76	
		2.12	y=0.000 21x-0.018 9(r=0.242 9)	2.11 × 10 ⁻⁴	-3.68	
		3.24	y=0.000 14x+0.007 2(r=0.020 5)	1.40 × 10 ⁻⁴	-3.85	
		4.24	y=0.000 12x+0.044(r=0.034 5)	1.22 × 10 ⁻⁴	-3.92	
		5.12	y=0.000 16x+0.000 8(r=0.242 9)	1.63 × 10 ⁻⁴	-3.80	
		6.72	y=0.005 9x+0.017 5(r=0.993 4)	5.89 × 10 ⁻³	-2.23	
		7.14	y=0.154x-0.036 6(r=0.992 9)	1.54 × 10 ⁻²	-1.81	
		7.36	y=0.029 3x-0.045 6(r=0.996 3)	2.93 × 10 ⁻²	-1.53	
		7.74	y=0.042 8x-0.010 2(r=0.991 3)	4.28 × 10 ⁻²	-1.37	
		8.02	y=0.058 9x-0.051 5(r=0.998 3)	5.89 × 10 ⁻²	-1.23	
37	水	1.20	y=0.071 7x+0.012 3(r=0.994 9)	7.17 × 10 ⁻²	-1.14	
		2.21	y=0.007 3x+0.058 8(r=0.941 7)	7.26 × 10 ⁻³	-2.14	
		3.12	y=0.000 15x+0.031 1(r=0.196 4)	1.54 × 10 ⁻⁴	-3.82	
		4.06	y=0.000 15x+0.009 6(r=0.265 4)	1.53 × 10 ⁻⁴	-3.82	
		5.16	y=0.000 19x+0.042(r=0.342 1)	1.87 × 10 ⁻⁴	-3.72	
		6.74	y=0.020 6x-0.009 7(r=0.993 1)	2.06 × 10 ⁻²	-1.69	
		7.32	y=0.496x-0.012 4(r=0.994 5)	4.96 × 10 ⁻²	-1.30	
		7.46	y=0.069 5x-0.051 2(r=0.991 1)	6.95 × 10 ⁻²	-1.16	
		8.12	y=0.124x-0.046 7(r=0.991 3)	1.24 × 10 ⁻¹	-0.91	
		8.40	y=0.19 2x-0.068 6(r=0.994 2)	1.92 × 10 ⁻¹	-0.72	
60	介质1	6.80	y=0.124 6x-0.316 1(r=0.991 5)	1.246 × 10 ⁻¹	-0.90	
		介质2	6.80	y=0.029 8x-0.063 7(r=0.945 9)	7.30 × 10 ⁻³	-1.53
		介质3	6.80	y=0.012 5x+0.015 8(r=0.991 7)	1.25 × 10 ⁻²	-1.90
		介质4	6.80	y=0.003 1x-0.069 6(r=0.901 1)	3.10 × 10 ⁻³	-2.51

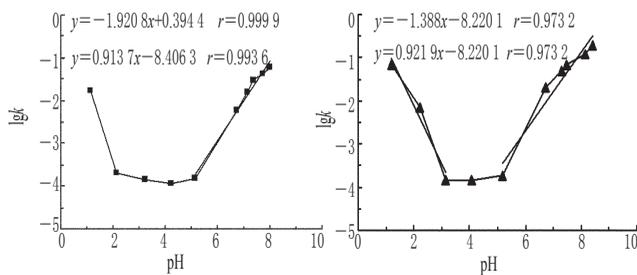


图2 灯盏花素水溶液的lgK-pH图

A. 25 °C; B. 37 °C

Fig 2 lgK-pH plot of breviscapine aqueous solution

A. 25 °C; B. 37 °C

3 讨论

由于灯盏花素中含90%以上的灯盏乙素,所以笔者将灯盏乙素作为灯盏花素的指标成分,所测定的对象均为灯盏乙素。

灯盏花素分子结构中含有一个羧基、多个酚羟基等基团,属于极性分子,其溶解趋势符合相似相溶原理。这一结果可用于指导灯盏花素的新剂型设计。比如,用薄膜分散法制备灯盏花素脂质体时,由于其在氯仿中溶解度低,不适宜将药物与磷脂一起溶于氯仿成膜,而需要将所成的薄膜水化在灯盏花素的水溶液(通过调节pH值使溶解)中。用乙醇注入法制备灯盏花素脂质体时,灯盏花素在乙醇中的溶解度不高,也需要将磷脂的乙醇溶液注入灯盏花素的水溶液中。

从试验结果可看出,灯盏花素是一弱酸。与分子结构中只少一个4'-OH的黄芩苷的pKa(5.047)相比^[8],本试验所测得的灯盏花素pKa(3.29)更小,这可能是由于灯盏花素分子的

4'-OH使其酸性增加的原因。灯盏花素的中性分子由于能形成分子间氢键,因而其在水中溶解性差。在0.1 mol/L的HCl中(此时可以认为灯盏花素全部以分子形式存在),其溶解度只有2.20 μg/ml。随着溶液pH值的增大,灯盏花素逐渐离解成盐,而其盐溶解性好。所以,随着溶液pH值增大,灯盏花素的溶解度迅速增大,在pH 6.8时其溶解度达7.49 mg/ml。

在酸性条件下,灯盏花素易水解。水解后的苷元非常容易氧化;在碱性条件下,灯盏花素开环^[9]。也就是说,灯盏花素在水中的稳定性受pH值的影响较大,但目前为此,尚未见到在不同pH值水溶液中灯盏花素稳定性和降解动力学的具体报道。因此,笔者对灯盏花素在25、37 °C及不同pH值条件下的稳定性进行了较为详尽的研究。钟桂芳等^[10]在研究和确定灯盏花素注射剂处方时,发现EDTA-2Na和Na₂SO₃能提高灯盏花素稳定性,但EDTA-2Na和Na₂SO₃对灯盏花素稳定性和降解动力学的具体影响报道较少,所以笔者对此也进行了研究。

从试验结果可看出,在25 °C时,灯盏花素在pH值为2~5的缓冲液中稳定,放置84 h后浓度基本不发生变化,K很小,接近于零。pH值大于5时,随着pH值增大,灯盏花素变得不稳定,K变大。在37 °C时,灯盏花素在pH值为2的介质中不稳定,而在pH值为3~5的介质中稳定。

从试验结果可知,EDTA-2Na和NaHSO₃有明显提高灯盏花素稳定性的作用,且两者合用效果更好。这为灯盏花素新剂型的体外评价提供了较为有价值的信息,如在进行灯盏花素新剂型体外释放研究时,为保证灯盏花素稳定,最好在释放介质中同时加入EDTA-2Na和NaHSO₃。本试验也可为灯盏花素新剂型体内药理学评价和建立血药浓度的分析测定方法提供参考。

参考文献

- [1] 高晨,刘静,贾颖,等.灯盏细辛、灯盏花素注射剂治疗脑梗死、冠心病心绞痛的应用情况及影响因素分析[J].中国药房,2008,19(27):2156.
- [2] 韩晓文,李芹,阎静,等.注射用灯盏花素对大鼠CYP2D6体内代谢活性的影响[J].中国药房,2011,22(7):584.
- [3] 方睿,杜树山.灯盏花素制剂研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):233.
- [4] Zhong HJ, Deng YJ, Wang XM, et al. Multivesicular liposome formulation for the sustained delivery of breviscapine [J]. *Int J Pharm*, 2005, 301(1/2): 15.
- [5] 杭州大学化学系分析化学教研室.分析化学手册:第1分册[M].2版.北京:化学工业出版社,1997:335.
- [6] 郑俊民.经皮给药新剂型[M].北京:人民卫生出版社,1997:280.
- [7] Carstensen JT. *Drug Stability: Principle and Practices* [M]. 2nd. New York: Marcel Dekker Inc., 1995: 55.
- [8] 王泓,陈济民,张清民.黄芩苷的物化常数测定[J].沈阳药科大学学报,2000,17(2):105.
- [9] 张卫东,张川,苏娟,等.一种稳定的灯盏花素注射液的制备方法:中国,03141614.4[P].2004-02-25.
- [10] 钟桂芳,伊家德.灯盏花素注射液生产处方及工艺的确定[J].黑龙江医药,1999,12(1):6.

(收稿日期:2012-02-10 修回日期:2012-05-09)