

[制剂]

马甲子总三萜中2种成分油水分配系数的测定

任娟^{1,2}, 孙兴^{1,2}, 阮佳², 谭镭², 詹雁², 徐超群^{2*}

(1. 成都中医药大学药学院, 四川成都 610075; 2. 四川省中医药科学院, 四川成都 610041)

摘要: **目的** 测定马甲子总三萜中马甲子素、白桦脂酸的油水分配系数。**方法** 饱和法测定2种成分在蒸馏水、40%乙醇、75%乙醇、95%乙醇、无水乙醇、乙腈、乙酸乙酯、正辛醇、0.5%吐温-80、0.5%十二烷基硫酸钠中的溶解度, 摇瓶法测定两者在正辛醇-水、磷酸盐溶液、人工胃液、人工肠液中的油水分配系数(pH值2.5、3、4、5、6、7、8)。**结果** 马甲子素、白桦脂酸在有机溶剂中的溶解度明显高于在蒸馏水中, 吐温-80、十二烷基硫酸钠也可提高两者溶解度。2种成分在不同pH值下的油水分配系数(lgP值)分别为812.83~1412.54(2.91~3.15)、90.45~135.34(1.96~2.13)。**结论** 马甲子总三萜中马甲子素、白桦脂酸为亲脂性成分, 可用于胃肠道药物吸收。

关键词: 马甲子; 总三萜; 马甲子素; 白桦脂酸; 油水分配系数

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)05-0965-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.05.001

Determination of oil-water partition coefficients of two constituents in *Paliurus ramosissimus* total triterpenes

REN Juan^{1,2}, SUN Xing^{1,2}, RUAN Jia², TAN Lei², ZHAN Yan², XU Chao-qun^{2*}

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. Sichuan Provincial Academy of Chinese Medicine Science, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT: **AIM** To determine the oil-water partition coefficients of paliurusene and betulinic acid in *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir total triterpenes. **METHODS** The two constituents' solubilities in distilled water, 40% ethanol, 75% ethanol, 95% ethanol, anhydrous ethanol, acetonitrile, ethyl acetate, *n*-octanol, 0.5% Tween-80 and 0.5% sodium dodecylsulfate were determined by saturation method, after which shake-flask method was applied to determining their oil-water partition coefficients in (*n*-octanol)-water, phosphate solution, artificial gastric juice and artificial intestinal juice (pH values were 2.5, 3, 4, 5, 6, 7 and 8). **RESULTS** Paliurusene and betulinic acid demonstrated much higher solubilities in organic solvents than those in distilled water, whose solubilities could also be elevated by Tween-80 and sodium dodecyl sulfate. The oil-water partition coefficients (lgP values) of two constituents under different pH values were 812.83–1412.54 (2.91–3.15) and 90.45–135.34 (1.96–2.13), respectively. **CONCLUSION** As liposoluble constituents, paliurusene and betulinic acid in *P. ramosissimus* total triterpenes can be used for gastrointestinal drug absorption.

KEY WORDS: *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir; total triterpenes; paliurusene; betulinic acid; oil-water partition coefficients

收稿日期: 2018-07-31

基金项目: 国家重大新药创制(2018ZX09731013); 四川省重大科技专项(2017WZDZX005); 四川省中医药管理局科技专项(2016C004)

作者简介: 任娟(1992—), 女, 硕士生, 研究方向为中药新制剂、新工艺、新技术。Tel: 15208236509, E-mail: 2296542175@qq.com

*通信作者: 徐超群(1964—), 女, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药新药与新型给药系统。Tel: (028) 85213973, E-mail: chaoqun_xu@sina.com

马甲子 *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir 为鼠李科植物, 在《中药大辞典》和一些地方习用志上多有记载, 其性味苦、平、无毒, 具有清热解毒、止痛活血之功效, 可治疗跌打损伤、脓肿溃脓等症, 化学成分主要是三萜、总黄酮、环肽等^[1], 具有镇咳祛痰、抗溃疡、抗肿瘤等作用^[2-4]。课题组前期对马甲子总三萜进行纯化分离, 得到2个单体化合物, 分别为2 α , 27-二反式对羟基肉桂酰氧基-白桦脂酸和白桦脂酸, 其中前者为新化合物, 命名马甲子素^[5]; 后者具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗 HIV 等多种活性, 有很好的发展前景^[6], 由于前者是以后者为母核的五环三萜类化合物, 故推测它可能具有抗肿瘤活性, 并发现其抗肿瘤活性更强^[7]。为了将马甲子总三萜制成安全、有效、质量可控的药物, 本实验测定该成分中马甲子素、白桦脂酸的油水分配系数, 为相关制剂开发奠定基础。

1 材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); THZ-103B 恒温培养摇床 (上海一恒科学仪器有限公司); BSA224S 分析天平 (德国赛多利斯公司); 3K15 低温高速离心机 (美国 Sigma 公司); SB5200D 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

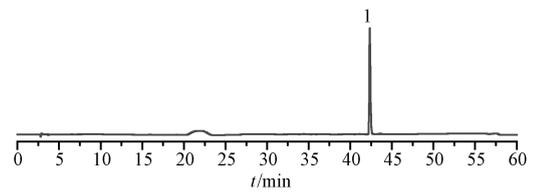
马甲子素对照品 (自制, 含有量 $\geq 98\%$, 批号 20150801); 白桦脂酸对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 111802-201402); 马甲子总三萜 (自制, 批号 20171008)。马甲子 (多年生) 于 2017 年 7 月采自四川省双流县牧马山, 经四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定为鼠李科马甲子属植物马甲子 *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir。乙腈为色谱纯 (美国 Sigma 公司); 十二烷基硫酸钠 (德国 Clariant 公司, 批号 DEA4004255); 正辛醇、无水乙醇、甲醇、乙酸乙酯均为分析纯。

2 方法

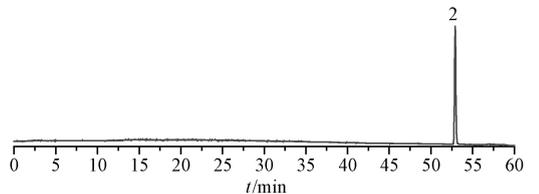
2.1 马甲子素、白桦脂酸含有量测定

2.1.1 色谱条件 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相 0.1% 甲酸 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 98% A; 5~55 min, 98%~0A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长 320 nm; ELSD 漂移管温度 45 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L; 马甲子素、白桦脂酸分别用 DAD、ELSD 检测器检测, 色谱图见图 1。由图可知, 该色谱条件下各成分分离度良好。

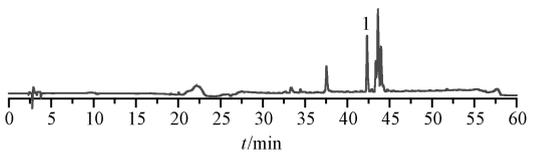
2.1.2 对照品溶液制备 精密称取马甲子素、白桦



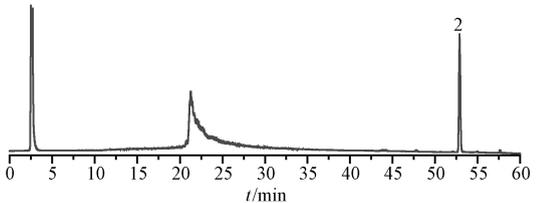
A. 马甲子素对照品



B. 白桦脂酸对照品



C. 供试品 (含马甲子素)



D. 供试品 (含白桦脂酸)

1. 马甲子素 2. 白桦脂酸

1. paliurusene 2. betulinic acid

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

脂酸对照品适量, 置于 50 mL 量瓶中, 甲醇超声溶解定容, 制得质量浓度分别为 0.502 0、0.935 0 mg/mL 的贮备液, 再分别将其稀释成 0.050 2、0.025 1、0.012 6、0.006 3、0.003 1、0.001 6 mg/mL, 以及 0.935 0、0.467 5、0.233 8、0.116 9、0.058 4、0.029 2 mg/mL, 即得。

2.1.3 线性关系考察 将马甲子素对照品溶液在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得方程为 $Y=2.6846 \times 10^3 X + 1.0977$ ($r=0.9998$), 线性范围 1.6~50.2 μ g/mL。将白桦脂酸对照品溶液在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 以质量浓度的对数值为纵坐标 ($\lg Y$), 峰面积的对数值为横坐标 ($\lg A$) 进行回归, 得方程为 $\lg M=1.3207 \lg A + 2.4207$ ($r=0.9995$), 线性范围 29.2~935.0 μ g/mL。

2.1.4 精密度试验 取 0.006 3、0.42 mg/mL 马甲子素、白桦脂酸对照品溶液各 10 μ L, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得两者

峰面积 RSD 分别为 1.80%、2.42%，表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取同一批供试品溶液，在“2.1.1”色谱条件下于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样 10 μL 测定，测得马甲子素、白桦脂酸峰面积 RSD 分别为 1.24%、1.08%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.6 加样回收率试验 精密称取含有量已知的马甲子总三萜 0.005 8 g（相当于马甲子素 0.040 6 mg、白桦脂酸 3.350 2 mg）6 份，精密加入对照品溶液（马甲子素 0.020 7 mg/mL、白桦脂酸 1.68 mg/mL）各 2 mL，按“2.1.3”项下方法制备溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，马甲子素、白桦脂酸平均加样回收率分别为 101.32%、98.47%，RSD 分别为 2.85%、3.01%。

2.2 溶解度测定 精密称取马甲子总三萜 0.1 g，共 11 份，置于 11 个 10 mL 具塞试管中，精密加入蒸馏水、40% 乙醇、75% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇、甲醇、乙腈、乙酸乙酯、正辛醇、0.5% 吐温-80、0.5% 十二烷基硫酸钠各 5 mL，置于恒温振荡器中，(37±0.5) °C 下 120 r/min 振摇 24 h 以充分溶解，其间始终保持具塞试管中有固体药物。然后，将药物转移至离心管中，10 000 r/min 离心 10 min，取上清液过滤，在“2.1.1”项色谱条件下测定溶解度，结果见表 1。由表可知，白桦脂酸、马甲子素在蒸馏水中的溶解度较低，以至于无法测定；随着乙醇体积分数增加，两者溶解度逐渐增大；加入表面活性剂（吐温-80、十二烷基硫酸钠）后，也可改善其溶解度。

表 1 马甲子素、白桦脂酸溶解度测定结果

Tab. 1 Results of solubility determination of paliurusene and betulinic acid

溶剂	溶解度	
	马甲子素/ (mg·mL ⁻¹)	白桦脂酸/ (μg·mL ⁻¹)
蒸馏水	—	—
40% 乙醇	0.081	5.886
75% 乙醇	0.083	7.040
95% 乙醇	0.085	11.717
无水乙醇	0.090	12.857
甲醇	0.081	5.886
乙腈	0.088	7.040
乙酸乙酯	0.085	11.717
正辛醇	0.085	12.857
0.5% 吐温-80	0.073	9.725
0.5% 十二烷基硫酸钠	0.069	7.040

注：—表示未检测出

2.3 油水分配系数测定

2.3.1 正辛醇饱和的磷酸盐溶液（水相）、水饱和的正辛醇溶液（油相）制备 根据 2015 年版《中国药典》附录中的配制方法，分别制备 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液、人工胃液、人工肠液、0.1 mol/L 氢氧化钠溶液，再取适量磷酸盐缓冲液，稀释后的 0.1 mol/L 磷酸调节 pH 至 2.5、3、4、5、6，0.1 mol/L 氢氧化钠溶液再调节其至 7、8。然后，取 100 mL 不同 pH 的磷酸盐溶液、人工胃液、人工肠液、蒸馏水，置于 500 mL 锥形瓶中，加入 100 mL 正辛醇，室温下振摇 24 h，静置过夜，分取上层（油相）和下层（水相）。

2.3.2 油水分配系数-时间曲线绘制 采用经典摇瓶法。精密称取马甲子总三萜适量于量瓶中，“2.3.1”项下油相溶解稀释，移取 10 mL 稀释后油相和 1 mL 水相于具塞试管中，恒温摇床上振摇（室温，120 次/min），于 2、4、6、8、10、12、24 h 取样，10 000 r/min 离心 10 min，过滤，取续滤液适量，在“2.1.1”项色谱条件下测定马甲子素、白桦脂酸含有量 C_1 ，计算油水分配系数 P ，公式为 $P=10 \times C_1 / (C_0 - C_1)$ （ C_0 为药物在油相中的初始浓度， C_1 为平衡后药物在油相中的浓度），绘制油水分配系数-时间曲线，结果见表 2~3、图 2~3。由此可知，pH 为 2.5、6、7 时，白桦脂酸油水分配平衡时间为 8 h；pH 为 2.5、4、5、8 时，蒸馏水、人工胃液、人工肠液中白桦脂酸油水分配平衡时间为 10 h；pH 为 5、6 时，蒸馏水、人工胃液中马甲子素油水分配平衡时间为 8 h；pH 为 2.4、3、4、7、8 时，人工肠液中马甲子素油水分配平衡时间为 10 h，表明振摇时间应大于 10 h 以保证药物在充分分配平衡。

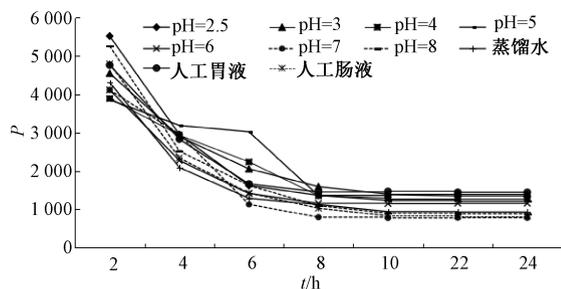


图 2 白桦脂酸油水分配系数-时间曲线

Fig. 2 Oil-water partition coefficient-time curves for betulinic acid

2.4 不同 pH 下油水分配系数测定^[8-10] 精密称取马甲子总三萜适量，置于量瓶中，用“2.3.1”项

表2 时间对白桦脂酸油水分配系数的影响 (n=3)

Tab. 2 Effect of time on oil-water partition coefficient of betulinic acid (n=3)

时间/h	pH							蒸馏水	人工胃液	人工肠液
	2.5	3	4	5	6	7	8			
2	5 521	4 550	3 894	3 858	4 116	4 116	5 260	4 310	4 764	4 800
4	2 951	2 901	2 938	3 192	2 275	2 960	2 523	2 094	2 831	2 339
6	1 622	2 057	2 239	3 021	1 413	1 130	1 622	1 288	1 664	1 426
8	1 363	1 593	1 357	1 361	1 160	796	1 096	1 125	1 456	1 029
10	1 381	1 397	1 292	1 236	1 148	777	899	942	1 470	832
22	1 351	1 413	1 289	1 218	1 157	783	883	931	1 447	822
24	1 349	1 398	1 284	1 216	1 156	780	881	942	1 446	822

表3 时间对马甲子素油水分配系数的影响 (n=3)

Tab. 3 Effect of time on oil-water partition coefficient of paliurusene (n=3)

时间/h	pH							蒸馏水	人工胃液	人工肠液
	2.5	3	4	5	6	7	8			
2	407	427	495	204	253	244	222	359	355	275
4	282	234	143	132	170	150	200	164	201	186
6	166	112	107	109	143	136	187	136	107	161
8	120	102	103	92	129	126	170	127	94	149
10	107	92	96	91	130	125	135	127	94	133
22	107	92	96	92	130	124	133	127	93	133
24	108	91	96	90	129	125	135	127	93	132

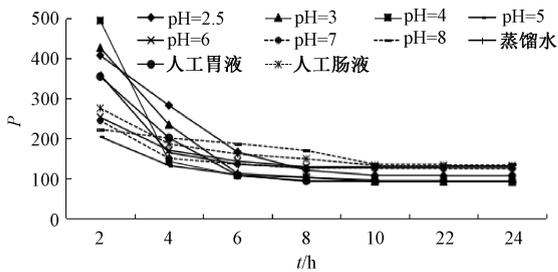


图3 马甲子素油水分配系数-时间曲线

Fig. 3 Oil-water partition coefficient-time curves for paliurusene

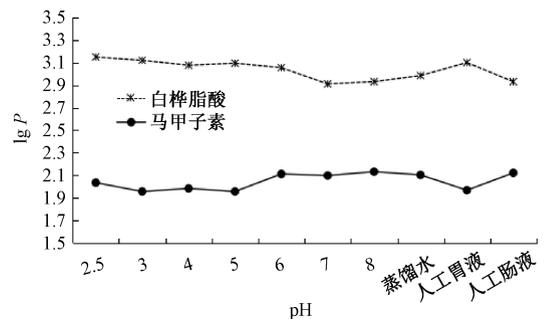


图4 pH值对白桦脂酸、马甲子素油水分配系数的影响
Fig. 4 Effects of pH values on oil-water partition coefficients of betulinic acid and paliurusene

下不同 pH 油相溶解稀释, 移取 10 mL 稀释后的各油相和 1 mL 各水相于具塞试管中, 置于恒温摇床上振摇 10 h (室温, 120 次/min), 10 000 r/min 离心 10 min, 过滤, 取续滤液适量, 在“2.1.1”项色谱条件下测定马甲子素、白桦脂酸含量, 计算两者油水分配系数, 结果见图 4、表 4。

3 讨论

大部分药物的溶解度参数 (δ) 范围为 8~12, 而正辛醇为 10.24, 恰好处在中值附近, 并与细胞膜溶解度参数 (10.3) 非常接近, 这使得药物在该溶剂中可形成近似理想的溶液。另外, 正辛醇相较于其他惰性溶剂具有更好的极性和溶解性, 药物在分配过程中更容易进入其中, 从而更加便于测定, 故选择该溶剂作为油相。课题组前期测定了马甲子素三萜在水、磷酸盐缓冲液中的饱和溶解度,

表4 pH值对白桦脂酸、马甲子素油水分配系数的影响 (n=3)

Tab. 4 Effects of pH values on oil-water partition coefficients of betulinic acid and paliurusene (n=3)

pH	白桦脂酸		马甲子素	
	P	lgP	P	lgP
2.5	1 412.54	3.15	108.27	2.03
3	1 318.26	3.12	90.45	1.96
4	1 191.52	3.08	96.25	1.98
5	1 242.51	3.09	90.45	1.96
6	1 133.21	3.05	129.26	2.11
7	812.83	2.91	125.12	2.10
8	851.43	2.93	135.34	2.13
蒸馏水	964.94	2.98	126.81	2.10
人工胃液	1 258.93	3.10	92.87	1.97
人工肠液	851.14	2.93	132.13	2.12

发现马甲子素、白桦脂酸溶解度较低, HPLC 法无法测定其含有量, 再将油相、水相等体积混合, 发现由于两者水溶性均较差, 导致测定结果误差大, 最终确定油相、水相比比例为 10 : 1, 此时稳定性大大提高。

药物在体内的溶解、吸收、分布、转运与其水溶性、脂溶性, 即油水分配系数 (P) 有关^[11], 药物通过细胞膜时需要特定疏水性、亲水性, 而 $\lg P$ 可作为预先判断药物在肠道中吸收情况的重要依据。其中, $\lg P < 0$ 时药物水溶性太强, 肠道中不容易被吸收; $\lg P > 5$ 时, 药物脂溶性太强, 导致很难从细胞膜内侧释放; $0 < \lg P < 5$ 时, 可从胃肠道给药吸收, 而且在 1~3 时药物吸收较为理想^[12-14]。本实验发现, 马甲子总三萜中白桦脂酸、马甲子素的 $\lg P$ 分别为 2.91~3.15、1.96~2.13, 在 0~5 范围内, 表明两者均可用于胃肠道药物吸收, 而且后者胃肠道吸收能力可能更强。

根据前期预实验及相关文献可知, 马甲子总三萜中主要化学成分的溶解度较小, 但本实验发现其中的主要化合物具有良好的胃肠道吸收能力, 是属于低溶解度具有一定渗透性的药物。因此, 将马甲子总三萜制成口服药物时, 应注意提高药物在体内的溶出, 可考虑制成固体分散体^[15]、包合物^[16]、微乳^[17]等。

参考文献:

[1] Lin H Y, Chen C H, Chen Liu K C S, et al. 14-Membered cyclopeptides from *Paliurus ramosissimus* and *P. hemsleyanus* [J]. *Helv Chim Acta*, 2003, 86(1): 127-138.
[2] 韦国锋, 覃道光, 黄志文. 马甲子镇咳祛痰作用的研究 [J]. 数理医药学杂志, 1999, 12(2): 165-166.

[3] 余悦, 白筱璐, 雷玲, 等. 马甲子抗溃疡性结肠炎的实验研究 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(2): 121-124.
[4] 余悦, 白筱璐, 雷玲, 等. 马甲子急性毒性抗肿瘤作用及对免疫功能影响的初步研究 [J]. 四川中医, 2016, 34(8): 53-56.
[5] 武蕊娟, 宋联强, 谭 镭, 等. 马甲子的化学成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(19): 2834-2838.
[6] 徐 军, 王晋萍, 钱辰旭, 等. 白桦脂酸的研究进展 [J]. 生命科学, 2011, 23(5): 503-510.
[7] 武蕊娟. 马甲子抗肿瘤活性部位的筛选及其制剂工艺的研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
[8] 钱 芳, 张 芹. 黄蜀葵花总黄酮中金丝桃苷的平衡溶解度和表观油水分配系数测定 [J]. 中国药师, 2016, 19(12): 2222-2224, 2236.
[9] 曾 诚, 马丽月, 于 宁, 等. 香青兰提取物基本理化性质研究 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3817-3823.
[10] 林杭娟, 狄富华, 高建青. 熊果酸平衡溶解度和油水分配系数的测定 [J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(7): 635-637.
[11] 潘卫三. 新药制剂技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
[12] 林俊芝, 邹 亮, 傅超美, 等. 红景天苷和酪醇油水分配系数的测定及大鼠小肠吸收动力学研究 [J]. 中成药, 2013, 35(3): 483-486.
[13] 薛 璟, 贾晓斌, 谭晓斌, 等. 雷公藤甲素表观油水分配系数的测定及其对吸收预测的研究 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(20): 1560-1563.
[14] 张 琪, 黄 娟, 薛鸿娇, 等. 乙酰天麻素平衡溶解度、油水分配系数及稳定性的测定 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(9): 819-821.
[15] 刘媪媪, 高 署, 柯 学, 等. 难溶性药物固体分散体研究新进展 [J]. 药学进展, 2013, 37(4): 166-173.
[16] 钟 鸣, 林忆龙, 李世杰, 等. 龙血竭 HP- β -环糊精包合物的制备、表征及其抗炎作用研究 [J]. 中药材, 2018, 41(5): 1167-1170.
[17] 章 巍, 董 蔚, 平其能. 依托泊苷固体自微乳的研制及大鼠体内生物利用度研究 [J]. 药学与临床研究, 2011, 19(5): 402-406.