

熊果酸平衡溶解度和油水分配系数的测定

林杭娟^{1,2}, 钦富华^{1,3}, 高建青^{1*} (1. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 2. 宁波市中医院, 浙江 宁波 315010; 3. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100)

摘要: 目的 测定熊果酸的平衡溶解度及其在正辛醇-水中的表观油水分配系数, 为设计熊果酸新剂型提供基础。方法 采用 HPLC 测定熊果酸在不同 pH 介质、不同溶剂中的溶解度及熊果酸在正辛醇-水中的表观油水分配系数。结果 25 °C 下熊果酸在水中的平衡溶解度为 5.64 mg·L⁻¹, 在 pH 2.0~7.4 的缓冲体系中, 熊果酸的溶解度不受 pH 的影响。熊果酸在油中溶解度不佳, 在表面活性剂及半极性溶剂中溶解度相对较好, 在正辛醇-水体系中的油水分配系数 lgP=2.17。结论 熊果酸为溶解度小的亲脂性药物。

关键词: 熊果酸; 平衡溶解度; 表观油水分配系数

中图分类号: R943.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2012)07-0635-03

Determination of Equilibrium Solubility and Apparent Oil/Water Partition Coefficient of Ursolic Acid

LIN Hangjuan^{1,2}, QIN Fuhua^{1,3}, GAO Jianqing^{1*} (1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Ningbo Municipal Hospital of TCM, Ningbo 315010, China; 3. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the equilibrium solubility of ursolic acid and its partition coefficients in the n-octanol-water system for designing new formulations. **METHODS** High performance liquid chromatography (HPLC) was established to determine the contents of ursolic acid in different pH solutions, different solvents and the partition coefficients for the n-octanol-water systems. **RESULTS** The equilibrium solubility of ursolic acid was 5.64 mg·L⁻¹ in water at 25 °C and was not influenced by the pH of the buffer solution. The solubility of ursolic acid in oils was poor, but was relatively good in surfactants and Semi polar solvents. Partition coefficient of ursolic acid was 2.17 in n-octanol-water system. **CONCLUSION** Ursolic acid is a lipophilic drug with little solubility property.

KEY WORDS: ursolic acid; equilibrium solubility; apparent oil/water partition coefficient

熊果酸(ursolic acid, UA)又名乌索酸、乌苏酸, 属三萜类化合物, 在自然界分布很广, 以游离形式或与糖结合成苷的形式分布于约 7 个科 46 个属 62 种植物, 主要存在于杜鹃花科植物熊果的叶、果实, 玄参植物毛泡桐的叶, 茜草科植物栀子的果实, 龙胆科植物湿生蕾、木樨科植物女贞的叶, 紫葳科植物毛子草的地上部分。UA 具有镇静、抗炎、抗菌、抗糖尿病、抗溃疡、降低血糖等广泛的生物学效应, 其突出作用为抗肿瘤, 而治疗肝炎、抗炎抑菌等多方面的临床药理作用也为人共识, 具有广泛的开发前景^[1-2]。UA 在水中的溶解度极小, 溶出速度很慢, 生物利用度低。平衡溶解度和表观油水分配系数是药物的 2 个重要理化参数, 与药物的吸收密切相关, 是剂型设计的重要参数。目前国内外尚无测定 UA 的平衡溶解度和

油水分配系数的文献报道。本实验对 UA 的平衡溶解度、油水分配系数进行了测定, 为该药物新剂型的研究奠定基础。

1 材料与仪器

Dionex U3000 高效液相色谱仪(美国戴安公司); SHA-B 型数显水浴恒温振荡器(上海金鹏分析仪器有限公司); PHS-3C 酸度计(上海精密科学仪器有限公司); 漩涡混合器(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司); SB25-120 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); METTLER TOLEDO 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); 高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

UA 对照品(上海源叶生物科技有限公司, 批号: YY20100425, 纯度>98%); UA 原药(西安飞达生物技术有限公司, 纯度>98%); Labrafil M

作者简介: 林杭娟, 女, 硕士生, 副主任药师 Tel: (0574)87089061
教授 Tel: (0571)88208437 E-mail: gaojianqing@zju.edu.cn

E-mail: 643691580@qq.com

*通信作者: 高建青, 男, 博士,

1944CS、Labrasol、Transcutol P 均由法国佳法赛公司提供, 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他药品、试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 测定方法学研究

2.1.1 色谱条件^[3] 色谱柱: Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.3%磷酸(85:15); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 210 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μL。在上述色谱条件下, UA 色谱峰理论塔板数>13 000, 采用外标法计算质量浓度。色谱图见图 1。

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取 UA 对照品 10.0 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加入适量甲醇将药物溶解, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得质量浓度为 400 mg·L⁻¹ 的贮备液。精密量取贮备液适量, 加甲醇稀释得到质量浓度为 2.5, 5.0, 10, 20, 40, 80, 120 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液。分别精密吸取各系列对照品溶液 20 μL 注入高效液相色谱仪, 记录峰面积。以 UA 质量浓度(ρ , mg·L⁻¹)为横坐标, 峰面积(A)为纵坐标进行线性回归, 得 UA 的线性回归方程: $A=0.085\ 2\rho+0.003\ 3$, $r=0.999\ 9$ 。结果表明 UA 质量浓度在 2.5~120 mg·L⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系。

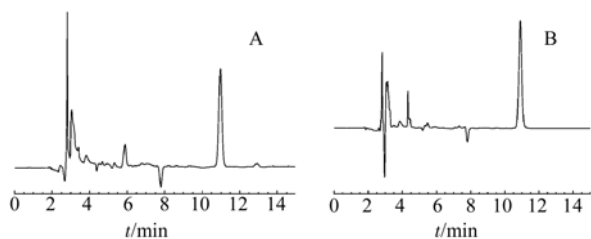


图 1 UA 高效液相色谱图

A-标准品; B-样品

Fig 1 Chromatography of UA

A-standard; B-sample(UA in n-octanol)

2.1.3 精密度试验 取高、中、低质量浓度(120, 20, 2.5 mg·L⁻¹)的 UA 对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 5 次, 计算日内 RSD, 连续测定 5 d, 计算日间 RSD, 结果见表 1。

表 1 精密度试验结果($n=5$)

Tab 1 The results of precision($n=5$)

日间			日内		
$\rho_T/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$\rho_D/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	$\rho_T/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$\rho_D/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%
2.5	2.50	1.35	2.5	2.48	2.00
20.0	20.27	0.40	20.0	20.06	0.64
120.0	121.49	1.12	120.0	121.68	0.60

注: ρ_T -实际浓度; ρ_D -测定浓度

Note: ρ_T -True concentration; ρ_D -Determined concentration

2.1.4 回收率试验 精密称取标准品配制已知高、中、低质量浓度(100, 25, 5 mg·L⁻¹)的 UA 溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 依据标准曲线得到对应的质量浓度, 按公式: 回收率=测定浓度值/真实浓度值×100%, 求出高、中、低质量浓度的回收率。结果见表 2。

表 2 回收率试验结果($n=5$)

Tab 2 The recovery of ursolic acid($n=5$)

$\rho_T/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$\rho_D/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
5	5.10	101.9	1.59
25	25.42	101.7	1.11
100	101.33	101.3	0.15

2.2 平衡溶解度的测定

2.2.1 磷酸盐缓冲液中的平衡溶解度测定 配制 pH 1.2 的盐酸溶液, pH 2.0, 5.0, 6.0, 6.8, 7.4 的磷酸盐缓冲液。取过量的 UA 原料药置具塞锥形瓶中, 分别加入 50 mL 蒸馏水或不同 pH 的磷酸盐缓冲液, 超声使药物不再溶解, 放入恒温摇床中, 于 25 ℃下振摇 48 h。将饱和 UA 溶液以 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后, 将上清液用 0.22 μm 过滤后 HPLC 测定。在 25 ℃下, 不同 pH 缓冲液中 UA 的平衡溶解度见图 2。

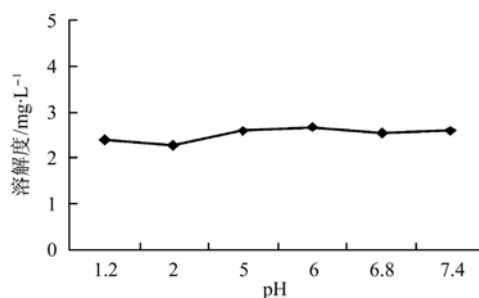


图 2 UA 在不同 pH 缓冲液中的平衡溶解度

Fig 2 Equilibrium solubility of UA in different pH solutions at 25 °C

2.2.2 不同溶剂中的溶解度考察 本实验考察了 UA 在不同种类的油相、表面活性剂以及常用溶剂中的溶解度。各取约 2 g 的油相、表面活性剂及溶剂, 加入过量的 UA, 于 60 ℃水浴中涡旋搅拌以利溶解, 然后在 25 ℃水浴中平衡 48 h, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 上清液用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 续滤液用甲醇稀释适宜倍数后用 HPLC 测定, 结果见表 3。溶解度实验结果显示, UA 在油相中溶解度也不甚理想, 相对而言在表面活性剂及溶剂中较好, 特别是 Cremophor EL、Tween80、乙醇、PEG400 以及 Transcutol P 中的溶解度较高。

表 3 UA 在不同溶剂中溶解度

Tab 3 Solubility of UA in different vehicles

油 相	溶解度/ mg·g ⁻¹	表面活性剂 及溶剂	溶解度/ mg·g ⁻¹
植物油	0.48±0.04	Labrasol	4.88±0.55
橄榄油	0.80±0.41	Cremophor EL	10.80±1.58
色拉油	0.90±0.91	Tween80	6.93±0.37
辛酸酸甘油酯(GTCC)	0.74±0.01	Tween85	4.92±0.66
油酸乙酯(OE)	1.41±0.07	Tween20	2.51±0.76
肉豆蔻酸异丙酯(IPM)	0.70±0.12	乙醇	5.71±0.04
Labrafil M 1944 CS	2.35±0.26	丙二醇	5.08±0.43
		甘油	2.11±0.63
		PEG400	4.12±0.95
		Transcutol P	10.76±1.21

2.3 表观油水分配系数测定

表观油水分配系数测定方法及计算公式参考文献[6]。精密称取 UA 10.1 mg，加入已被水相饱和的正辛醇溶解，定容至 25 mL，配制成浓度为 404 mg·L⁻¹ 的溶液，精密移取 1 mL 置于 50 mL 的磨口具塞锥形瓶中，分别准确加入正辛醇饱和过的 pH 1.2 的盐酸溶液、pH 7.4 的磷酸盐缓冲液、双蒸水 10 mL，密闭，置恒温水浴振荡器(25 °C)中振摇 48 h，10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，取有机相适量，用甲醇稀释后进样，测定有机相中 UA 的含量。其色谱图见图 1B。水相中 UA 的量以有机相中 UA 减少量表示，根据公式 $\rho_w = (\rho - \rho_o) \times 1/10$ 进行计算。最后计算得到油水分配系数 $\lg P = \lg(\rho_o / \rho_w)$ 。其中 P 为 UA 的表观油水分配系数， ρ 为水饱和正辛醇中初始药物的浓度， ρ_o 为平衡后有机相中药物的浓度， ρ_w 为平衡后水相中药物的浓度。结果见表 4。实验结果显示，pH(1.2~7.4)对 UA 的溶解度和油水分配系数没有显著的影响。

表 4 UA 油水分配系数测定结果

Tab 4 The oil-water partion coefficients of UA

介质	lgP
0.1 mol·L ⁻¹ HCl	2.39±0.05
pH 7.4 磷酸缓冲液	2.29±0.17
H ₂ O	2.17±0.15

3 讨论

油水分配系数是指当药物在水相和油相达平衡时，药物在油相中的浓度和在水相中的浓度之比。药物在体内的吸收、分布、转运与药物的油水分配系数有关。油水分配系数的测定方法有很多，如摇瓶法、HPLC 和产生柱法，产生柱法测定步骤较多，达平衡时间过长，而 HPLC 需要用一系列已知表观油水分配系数的同系物来建立标准

曲线，成本较高，而以经典的摇瓶法最为简便。正辛醇极性与多数有机体液的极性相似，其溶解度参数与生物膜的溶解度参数一致，目前文献也都以正辛醇为油相。故本实验中采用正辛醇-水体系。

溶解度测定的过程中，表面活性剂、助表面活性剂和多数油相均能溶于甲醇，但是植物油、色拉油、橄榄油等不能完全溶于甲醇，故本实验采用了甲醇提取的方法，将少量植物油与甲醇涡旋混合、离心取上清液后进行测定。

UA 的 $\lg P=2.17$ ，按照 BCS(biopharmaceutics classification system)分类，UA 属于低溶解度、高渗透性的药物。因此，制备 UA 口服制剂的关键在于增加药物在体内的溶出度。已有文献报道将 UA 制成固体分散体、滴丸、包合物和纳米粒等以期提高其溶出度^[7-10]，此外微乳、自乳化制剂等也有望通过增加药物溶出速度提高其口服给药的生物利用度。

REFERENCES

[1] XIA G H. Study advance of ursolic acid in antitumor activities [J]. Foreign Med Sci (Cancer Sect)(国外医学 肿瘤学分册), 2002, 29(6): 420-422.

[2] CHEN W, XIONG X J, LI K Q, et al. Research on chemistry, pharmacology and clinic about ursolic acid [J]. J Yichun Med Coll(宜春医学学报), 2001, 13(2): 123-125.

[3] LIU W, WU Y Z. Determination of ursolic acid in JianweiXiaoshi tablet [J]. Chin J Mod Drug Appl(中国现代药物应用), 2010, 4(1): 5-6.

[4] GUO B H, CHENG Y, LIN L P, et al. Determination of equilibrium solubility and apparent oil/water partition coefficient of glycyrrhetic acid [J]. J Guangdong Pharm Univ(广东药学院学报), 2011, 27(3): 221-223.

[5] LIU L, CUI Y, ZHANG Q Y, et al. Solubility and apparent oil/water partition coefficient of sulfamethazine [J]. China Pharm(中国药房), 2008, 19(10): 750-751.

[6] SUO X B, DENG Y J, HAO A J, et al. Determination of the ionization constant and partition coefficient of lauroyl indapamide [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2005, 22(9): 335-337.

[7] LAI L, YANG G, YANG X. Preparation of usolic acid solid dispersion systems and study on their dissolution *in vitro* [J]. Her Med(医药导报), 2005, 24(6): 517-518.

[8] CHEN W, ZOU S Q. Preparation of usolic acid dropping pills and study on its dissolution *in vitro* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2007, 18(10): 2358-2359.

[9] QUAN P, LI R, LIU D F, et al. Study on the factors that effected loaded dosage of ursolic acid complex with orthogonal design and gray relation analysis [J]. China Pharm(中国药房), 2008, 19(13): 973-974.

[10] YANG L, SUN Z, ZU Y G, et al. Physicochemical properties and oral bioavailability of ursolic acid nanoparticles using supercritical anti-solvent (SAS) process [J]. Food Chem, 2012, 132(1): 319-325.

收稿日期: 2011-11-02