HPLC-DAD 测定虎杖苷、白藜芦醇、大黄素的平衡溶解度及表观油水分配系数

严建业[1]， 王元清[2]， 黄 丹[3]， 韩 彬[4*]， 张 陈[5]， 向 荣[2]， 孙 琴[2]， 夏新华[1*]
(1. 湖南中医药大学药学院 中药现代化重点实验室，湖南 长沙 410208；2. 中南林业科技大学生命科学与技术学院 生物技术与工程实验室，湖南 长沙 410004；3. 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地，湖南 长沙 410208；4. 广东药学院，广东 广州 510006；5. 暨南大学药学院 2014 级研究生，广东 广州 510632)

摘要：目的 测定虎杖苷、白藜芦醇、大黄素的平衡溶解度及表观油水分配系数（lgP_{app}）。**方法** 采用高效液相色谱法测定虎杖苷、白藜芦醇、大黄素在不同 pH 缓冲溶液中的平衡溶解度；采用摇瓶法结合高效液相色谱法测定其在正辛醇-水及缓冲盐溶液中的表观油水分配系数。**结果** 虎杖苷、白藜芦醇均在 pH 为 6.8 的磷酸盐缓冲液中溶解度最大，大黄素在 pH 为 6.5 的磷酸盐缓冲液中溶解度最大；虎杖苷、白藜芦醇、大黄素在正辛醇饱和的水中 lgP_{app}值分别为 0.98、2.69、0.99，在不同 pH 的磷酸盐缓冲液中，虎杖苷、白藜芦醇与大黄素的油水分配系数范围分别为0.84 ~ 1.01、2.34 ~ 2.89、0.97 ~ 1.27。**结论** 在胃肠道生理条件下，虎杖苷与大黄素的吸收较好，白黎芦醇的吸收较差；从溶解性能看，大黄素的溶解性能较差，可改善其溶解性能进一步提高其生物利用度。

关键词：虎杖苷；白藜芦醇；大黄素；平衡溶解度；表观油水分配系数；HPLC-DAD
中图分类号：R284.1 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-1528(2015)12-2628-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2015.12.012

Determination of equilibrium solubility and n-octanol/water partition coefficient of polydatin, resveratrol and emodin by HPLC-DAD

YAN Jian-ye[1], WANG Yuan-qing[2], HUANG Dan[3], HAN Bin[4*], ZHANG Chen[5], XIANG Rong[2], SUN Qin[2], XIA Xin-hua[1*]
(*1. Key Lab for Modernization of Materia Medica, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Lab of Biotechnology and Engineering, College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 3. Province & State Key Laboratory Breeding Base for Chinese Powdered Medicine and Medicine Innovation in Hunan, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410028, China; 4. Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou, 510006, China; 5. Graduate Student of Class of 2014, School of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou, 510632, China*)

ABSTRACT: AIM To determine the equilibrium solubility of polydatin, resveratrol and emodin in different solvents and their n-octanol/water partition coefficients. **METHODS** The equilibrium solubilities of polydatin, resveratrol and emodin in solutions were determined through HPLC-DAD analysis, and their n-octanol/water partition coefficients were measured by shaking flask combined with HPLC-DAD. **RESULTS** The equilibrium solubilities of polydatin and resveratrol were found in their maximal values at pH 6.8, while that of emodin was at pH 6.5. the

收稿日期：2015-03-16
基金项目：国家自然科学基金面上项目（81173194）；湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心项目资助（湘科计字［2013］83 号）；湖南省高校“中药新药创制与资源综合持续利用”科技创新团队资助（湘教通［2010］212 号）；湖南省“中药学”重点学科资助（ZY201401）；国家级大学生创新创业训练计划项目（201410538015）；湖南省大学生研究性学习与创新性实验计划项目（2014194）；中南林业科技大学大学生研究性学习与创新性实验计划项目（201457）

作者简介：严建业（1975—），男，博士，副教授，从事中药药剂的教学与科研。Tel：（0731）88458231，E-mail：yanjianye201@126.com
*通信作者：韩 彬，男，教授，硕士生导师。Tel：（0731）39352182，E-mail：hblz99@21cn.com
夏新华，男，教授，博士生导师。Tel：（0731）88458227，E-mail：xiaxinhua001@163.com

scopes of n-octanol/water partition coefficients of polydatin, resveratrol and emodin in different pH buffer solutions were within the ranges of 0.84 – 1.01, 2.34 – 2.89, and 0.97 – 1.27, respectively. And their lgP_{app} in n-octanol/water solvent were shown to be 0.98, 2.69, and 0.99, respectively. **CONCLUSION** Unlike resveratrol, polydatin and emodin have good absorption under physiological conditions in the gastrointestines.

KEY WORDS: polydatin; resveratrol; emodin; equilibrium solubility; n-octanol/water partition coefficient; HPLC-DAD

虎杖苷、白藜芦醇、大黄素为虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 中主要药效成分，具有抗炎、抗氧化[1-2]、抗癌、抗肿瘤[3-4]、抑制血小板凝聚[5-6]、调节脂蛋白代谢[7]等功效，其结构见图 1。

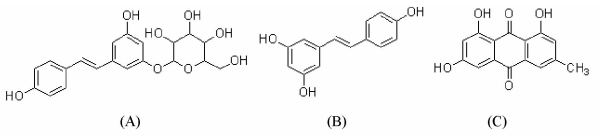


图 1 虎杖苷（A）、白藜芦醇（B）和大黄素（C）的结构式

Fig. 1 Structures of polydatin (A), resveratrol (B), and emodin (C)

一直以来，虎杖中的化学成分、药理作用、临床疗效等方面研究都是国内外许多学者研究的重点，而且目前关于这 3 种成分的药动学及其理化性质方面均有相关研究报道[8-10]，但虎杖苷、白藜芦醇、大黄素这 3 种成分的油水分配系数等理化常数暂无相关报道。由于药物的理化参数与其在生物体内膜渗透性密切相关，影响药物代谢动力学特征与指导剂型设计，故为进一步开发虎杖的药用价值，指导其合理用药，本实验测定虎杖苷、白藜芦醇、大黄素的表观油水分配系数及平衡溶解度，以期为虎杖中这 3 种成分的吸收代谢与新剂型的开发应用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1260 型高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；KQ5200DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；SHY-2S 旋转水浴恒温振荡器（江苏省金坛市大地自动化仪器厂）；T-214 电子分析天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司）。

1.2 药品与试剂

虎杖苷（批号 131121，纯度 >98%）、白藜芦醇（批号 131021，纯度 >98%）、大黄素（批号 130410，纯度 >98%）均购于成都普菲德生物科技有限公司；乙腈（色谱纯，美国 Tedia 公司）；甲醇（色谱纯，美国 Tedia 公司）；水为重蒸水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 不同 pH 磷酸缓冲溶液的配制 按《中国药典》2010 年版附录[11]配制 pH 分别为 2.0、2.5、5.0、5.8、6.5、6.8、7.8 系列的磷酸盐缓冲液；另取氯化钠 1 g，量取浓盐酸 3.5 mL 置于 500 mL 量瓶中，加蒸馏水稀释至刻度，摇匀配制成 pH 1.2 的缓冲液。

2.1.2 对照品溶液的制备 取虎杖苷、白藜芦醇、大黄素对照品适量，精密称定置于棕色量瓶中，分别加甲醇超声溶解并稀释成质量浓度为 61、1.17、10.3 μg/mL 的对照品溶液，备用。

2.2 虎杖苷、白藜芦醇与大黄素的测定

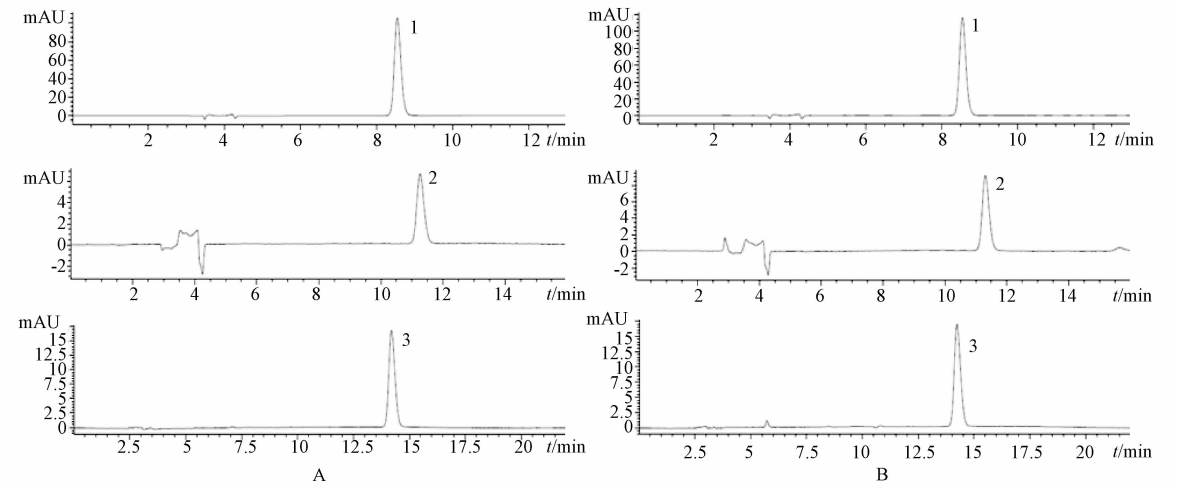
2.2.1 色谱条件与系统适应性试验[12] Agligent TC-C_{18} 色谱柱（5 μm，250 mm ×4.6mm）；体积流量 0.9 mL/min；进样量 10 μL；柱温 30℃；流动相与检测波长见表 1。色谱图见图 2。

表 1 各化合物色谱条件

Tab. 1 HPLC conditions for the components

化合物	流动相	检测波长
虎杖苷	乙腈(A)-0.1% 磷酸(23∶77)	306 nm
白藜芦醇	乙腈(A)-0.1% 磷酸(30∶70)	306 nm
大黄素	乙腈(A)-0.1% 磷酸(46∶54)	280 nm

2.2.2 线性关系的考察 取虎杖苷对照品（61 μg/mL）、白藜芦醇对照品（1.17 μg/mL）、大黄素对照品（10.3 μg/mL）溶液均进样 2、4、6、8、10、12 μL，按“2.1”项下的色谱条件测定峰面积，以各成分峰面积为纵坐标，对照品的进样量（μg）为横坐标绘制标准曲线，得虎杖苷的回归方程为 $Y = 3.7595X + 747.27$，$r = 0.9997$；白藜芦醇的回归方程为 $Y = 9.235X + 0.84$，$r = 0.9996$；大黄素的回归方程为 $Y = 3.9155X - 1.98$，$r = 0.9981$。结果表明，虎杖苷、白藜芦醇、大黄素分别在 122 ~ 732 ng、2.34 ~ 14.04 ng、20.6 ~ 123.6 ng 范围内有良好的线性关系。



1. 虎杖苷 2. 白藜芦醇 3. 大黄素

1. polydatin 2. resveratrol 3. emodin

图 2 对照品（A）与样品（B）的色谱图

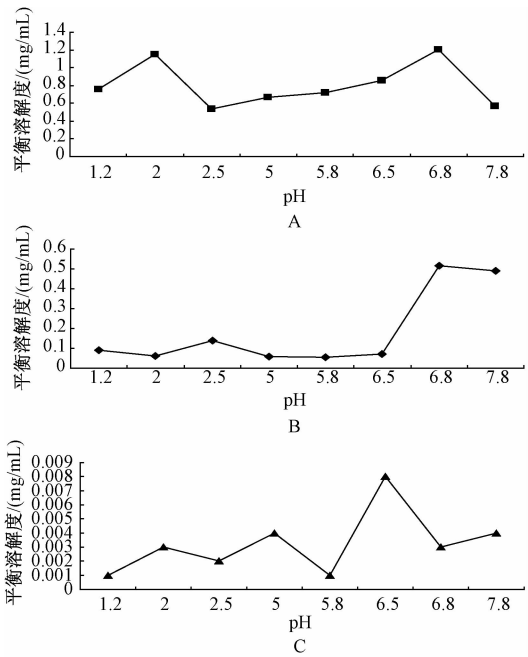
Fig. 2 HPLC chromatograms of reference substances (A) and samples (B)

2.2.3 精密度试验 精密吸取虎杖苷、白藜芦醇、大黄素对照品溶液（质量浓度分别为 61、1.17、10.3 μg/mL）各 10μL，按照“2.2.1”项的色谱条件重复进样 6 次，测定其峰面积，计算 RSD，其 RSD 分别为 1.63%、1.85%、1.79%，表明仪器的精密度良好。

2.2.4 加样回收率试验 取已知含有量的虎杖苷样品、白藜芦醇样品、大黄素样品溶液 2.0 mL，各 6 份，分别精密加入与样品中成分含有量相当的对照品，制成供试品溶液，按照“2.2.1”项的色谱条件进行测定，计算其平均回收率分别为 99.3%、98.1%、98.2%，RSD 分别为 1.4%、1.3%、1.3%，表明方法准确可靠。

2.3 平衡溶解度的测定 分别取过量的虎杖苷、白藜芦醇、大黄素对照品置于 10 mL 试管中，加 pH 为 7.8、6.8、6.5、5.8、5.0、2.5、2.0、1.2 的磷酸盐缓冲液各 2 mL，将试管放入恒温振荡器中，控制温度 37 ℃，100 r/min 振摇 24 h，4 000 r/min离心 10 min。取上清液分别适当稀释后，按上述色谱条件进样分析，测定虎杖苷、白藜芦醇、大黄素在不同 pH 的缓冲溶液中的量，并计算其在不同缓冲溶液介质中的平衡溶解度。结果见图 3。

由图 3 可知，虎杖苷、白藜芦醇均在 pH 为 6.8 的磷酸盐缓冲液中溶解度最大，随着 pH 增大，其溶解度的整体变化趋势是先增大再减小，然后又增大再减小。大黄素在 pH 为 6.5 的磷酸盐缓冲液中溶解度最大，该成分的溶解度受 pH 敏感，在



A. 虎杖苷 B. 白藜芦醇 C. 大黄素

A. polydatin B. resveratrol C. emodin

图 3 虎杖苷、白藜芦醇与大黄素在不同 pH 的磷酸盐缓冲液中的平衡溶解度

Fig. 3 Equilibrium solubilities of polydatin, resveratrol and emodin in phosphate buffer solutions of different pH values

pH 5.0 与 pH 7.8 时的溶解度接近，在 pH 5.8 与 pH 1.2 时的溶解度接近。从溶解度绝对数值来看，虎杖苷 > 白藜芦醇 > 大黄素，表明虎杖苷在各缓冲溶液中的溶解性能强于白藜芦醇，白藜芦醇强于大

黄素。

2.4 油水分配系数的测定 取虎杖苷、白藜芦醇、大黄素对照品适量，精密称定，分别置于25 mL 棕色量瓶中，加水饱和的正辛醇溶液超声溶解，定容至刻度，摇匀，分别制成质量浓度为 0.58、0.424、0.252 mg/mL 的供试品贮备液，备用。分别精密吸取虎杖苷、白藜芦醇、大黄素的水饱和正辛醇溶液 2 mL，分别置于具塞试管中，分别加入 2 mL 正辛醇饱和水及不同 pH 的磷酸盐缓冲液，将试管放入恒温振荡器中，控制温度 37 ℃，100 r/min振摇 24 h。取下层水相 4 000 r/min 离心 10 min，进样进行测定，记录峰面积，计算虎杖苷、白藜芦醇、大黄素质量浓度，并按下式计算其表观油水分配系数。

$P_{app} = (C_1 - C_w)/C_w$ 或 $P_{app} = C_0/(C_1 - C_0)$。

其中 P_{app} 为表观油水分配系数，C_1 为药物的总质量浓度（μg/mL），C_0 为药物分配平衡后在油相中所测得的质量浓度，C_w 为药物分配平衡时在水相中测得的质量浓度。测定结果见表 2。

表 2 虎杖苷、白藜芦醇与大黄素的油水分配系数测定结果

Tab. 2 N-octanol/water partition coefficients of polydatin, resveratrol and emodin in different solutions

pH	虎杖苷		白藜芦醇		大黄素	
	P_{app}	$\lg P_{app}$	P_{app}	$\lg P_{app}$	P_{app}	$\lg P_{app}$
1.2	8.96	0.95	220.76	2.34	17.32	1.24
2.0	10.02	1.00	570.43	2.76	18.81	1.27
2.5	10.12	1.01	778.41	2.89	11.88	1.07
5.0	9.36	0.97	277.40	2.44	12.83	1.11
5.8	7.94	0.90	683.98	2.84	11.96	1.08
6.5	8.36	0.92	560.59	2.75	17.23	1.24
6.8	8.00	0.90	629.01	2.80	9.43	0.97
7.8	6.85	0.84	383.75	2.58	9.92	1.00
正辛醇-水	9.59	0.98	492.60	2.69	9.75	0.99

由表 2 可知，虎杖苷、白藜芦醇、大黄素在正辛醇饱和的水溶液中 $\lg P_{app}$ 值分别为 0.98、2.69、0.99；虎杖苷与白藜芦醇在 pH 1.2 ~ 2.5 的缓冲溶液范围内 $\lg P_{app}$ 值随 pH 的增大而增加，在 pH 5.8 ~ 6.8 时 $\lg P_{app}$ 值变化不明显；虎杖苷在各溶液中的 $\lg P_{app}$ 值为 1 左右，白藜芦醇在各溶液中的 $\lg P_{app}$ 值均大于 2；大黄素在各溶液中的 $\lg P_{app}$ 值小于 1.5。

3 讨论

胃肠道不同部位具有不同的 pH，如胃的 pH 为 1.0 ~ 3.0，十二指肠的 pH 为 4.0 ~ 6.0，空肠的 pH 为 6.0 ~ 7.0，回肠的 pH 为 7.0，结肠的 pH 为 8.0[12]。本研究所设计的缓冲溶液 pH 涵盖了胃肠道的所有 pH 范围，因而可模拟体内环境研究其理化性质。从平衡溶解度结果可知，虎杖苷在 pH 2.0 与 pH 6.8 时具有较高的溶解度，可能是这两个酸性条件不利于虎杖苷的水解而提高了其溶解度；同时也表明虎杖苷在胃肠道中有较好的溶解度，有利于吸收。白藜芦醇在 pH 为 6.8、大黄素在 pH 为 6.5 的磷酸盐缓冲液中溶解度最大，表明这两个化合物在空肠中的溶解度较大。从总的平衡溶解度测定结果来看，虎杖苷的溶解性大于白藜芦醇，是由于白藜芦醇为虎杖苷的苷元，因而脂溶性较虎杖苷强。大黄素在各缓冲溶液中的平衡溶解度均较小，表明大黄素具有较强的脂溶性；另外，大黄素为多羟基的蒽醌类化合物，具有一定的酸性，因而在强酸性溶液中不易成盐而溶解度较低。

药物油水分配系数的测定，可模拟其在生物体内水相和生物相之间的分配情况，从而预测其在体内不同部位的吸收性能。表观油水分配系数（P）值较大或具有一定脂溶性的药物，其生物膜渗透性较高，有利于体内药物的吸收[13]。药物的 $\lg P$ 对于药物在胃肠道吸收速度和程度有较大的影响，其最佳 $\log P$ 值在 $-1 < \log P < 2$，过低时（$\log < -2$）的化合物未能穿过脂质膜；过高时（$\log P > 3$）则因脂溶性过强而很难从细胞另一侧的膜释放出来进入附近的血管或淋巴管[13]。虎杖苷的油水分配系数在 0.84 ~ 1.01 之间，$\lg P_{app}$ 均大于 0，可预测在此 pH 条件下虎杖苷在胃肠道各部位均有较好的吸收；白藜芦醇的油水分配系数在 2.34 ~ 2.89 之间，$\lg P_{app}$ 均大于 2，可知白藜芦醇的亲脂性过强，进而预示其很难从细胞的另一侧释放出来而生物利用度较低，这与文献报道其具有较低的生物利用度一致[14]；大黄素的油水分配系数在 0.97 ~ 1.27 之间，均小于 2，可见大黄素在胃肠道有较大的吸收，与文献报道相同[15]。

本实验通过测定虎杖苷、白藜芦醇、大黄素在不同 pH 磷酸盐缓冲液中表观油水分配系数及平衡溶解度，为预测这 3 种成分在胃肠道不同 pH 梯度的吸收情况提供参考，同时也可为虎杖的新剂型开发及虎杖苷、白藜芦醇、大黄素的开发应用提供理论参考价值。

参考文献：

[1] Lanzilli G, Cottarelli A, Nicotera G, *et al.* Anti-inflammatory effect of resveratrol and polydatin by *in vitro* IL-17 modulation

[J]. *Inflammation*, 2012, 35(1): 240-248.
[2] Xiao M, Zhu T, Zhang W, *et al*. Emodin ameliorates LPS-induced acute lung injury, involving the inactivation of NF-κB in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11): 19355-10368.
[3] Mitani T, Harada N, Tanimori S, *et al*. Resveratrol inhibits hypoxia-inducible factor-1α-mediated androgen receptor signaling and represses tumor progression in castration-resistant prostate cancer [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2014, 60(4): 276-282.
[4] Pooja T, Karunagaran D. Emodin suppresses Wnt signaling in human colorectal cancer cells SW480 and SW620 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 742C: 55-64.
[5] Nabavi SF, Huige L, Daglia M, *et al*. Resveratrol and stroke: from chemistry to medicine [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2014, 11(4): 390-370.
[6] 王 君, 方 芳. 虎杖苷在心脑血管系统的药理研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(13): 2105-2107.
[7] Zhang Q, Tan Y, Zhang N, *et al*. Polydatin supplementation ameliorates diet-induced development of insulin resistance and hepatic steatosis in rats [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 2708.
[8] 吕春艳, 张兰桐, 袁志芳, 等. 虎杖苷在大鼠体内的药动学特点和组织分布研究[J]. 中草药, 2007(2): 235-238.
[9] 姚树坤, 蒋 晔, 郝晓花, 等. 虎杖及其复方中大黄素在大鼠体内的药代学研究[J]. 中国中药杂志, 2005(6): 463-465.
[10] 叶肖栗, 宋 莉, 任国飞, 等. HPLC-MS 法测定虎杖活性成分在大鼠体内的药代动力学[J]. 药物分析杂志, 2013, 05(31): 749-754.
[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 111.
[12] 张 煜, 于树宏, 李 倩, 等. RP-HPLC 法同时测定虎杖中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚的含量[J]. 河北医科大学学报, 2009, 30(10): 1049-1051.
[13] 孙 进. 现代药物制剂技术丛书: 口服药物吸收与转运[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
[14] Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49(5): 472-481.
[15] 彭 娟. 虎杖药材质量及其大鼠药代动力学与肝脏分布的研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.

复方薄荷脑微乳原位凝胶剂的评价

刘 晨[1,2], 任宗芬[1], 李建理[1], 胡 进[2], 王文苹[2,3,4*]
(1. 宁夏医科大学总医院, 宁夏 银川 750004; 2. 宁夏医科大学药学院, 宁夏 银川 750004; 3. 宁夏回药现代化工程技术研究中心, 宁夏 银川 750004; 4. 回医药现代化省部共建教育部重点实验室, 宁夏 银川 750004)

摘要: 目的 对载复方薄荷脑微乳的原位凝胶滴鼻液(薄荷脑、樟脑、液状石蜡)进行评价。**方法** 薄荷脑和樟脑的低共熔特性制备微乳再将其载入原位凝胶中制得载药微乳凝胶液, 从制剂的外观、pH、流变学性质、体外释放度、离体黏膜透过性及对大鼠鼻黏膜形态进行考察。**结果** 体外释放行为符合 Higuchi 方程, 10 h 累积释放 33.6%, 显著优于原制剂的 7.6%; 10 h 离体黏膜累积透过性率 11.8%, 约为原制剂的 5 倍; 对大鼠鼻黏膜的刺激性较小且可逆。**结论** 复方薄荷脑微乳的原位凝胶滴鼻液具有良好的缓释性能且适合临床使用。

关键词: 复方薄荷脑; 微乳; 原位凝胶; 滴鼻液; 体外释放度
中图分类号: R944 **文献标志码**: A **文章编号**: 1001-1528(2015)12-2632-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2015.12.013

Evaluation of compound microemulsion based *in situ* gel containing menthol

LIU Chen[1,2], REN Zong-fen[1], LI Jian-li[1], HU Jin[2], WANG Wen-ping[2,3,4*]
(*1. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 3. Ningxia Engineering & Technology Research Center for Modernization of Islamic Medicine, Yinchuan 750004, China; 4. Key Lab for Islamic*

收稿日期: 2015-05-22
基金项目: 2012 年宁夏回族自治区自然科学基金项目(NZ1226)
作者简介: 刘 晨(1975—), 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向为药物制剂与医院药学。Tel:(0951)6743516, E-mail: lch6767@163.com
*通信作者: 王文苹(1977—), 女, 博士, 教授, 研究方向为新型递药系统及载药材料。Tel:(0951)6880581, E-mail: wangwenpingg@sina.com