

Nodosin 在水中的平衡溶解度和稳定性研究[△]

尚校军^{1*}, 马素英¹, 邵 芃², 闫福林^{1#}(1.新乡医学院药学院, 河南新乡 453003; 2.新乡医学院基础医学院, 河南新乡 453003)

中图分类号 R284.2; R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)07-0603-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.07.10

摘要 目的:测定 nodosin 在水中的平衡溶解度,考察其水溶液的稳定性,为药物剂型的研发奠定基础。方法:采用高效液相色谱法测定 nodosin 的含量,测定 25 ℃ 水溶液中 nodosin 平衡溶解度;采用经典恒温法预测 nodosin 水溶液在室温(25 ℃)和 4 ℃ 条件下的稳定性;在室温下,考察 pH 值对 nodosin 水溶液稳定性的影响。结果:25 ℃ 下 nodosin 在水中的平衡溶解度为 38.33 mg/L, nodosin 水溶液在室温下有效期(t_{90})为 190.22 h;在 4 ℃ 下 t_{90} 为 2 299.37 h。nodosin 降解的 pH-速率曲线呈 V 型, pH 值在 5~7 范围内,药物比较稳定。结论:nodosin 的水溶性较差,水溶液不稳定,其降解反应速度受溶液的 pH 值影响,属于酸碱专属催化反应。

关键词 Nodosin; 溶解度; 稳定性; 降解

Study on Equilibrium Solubility and Stability of Nodosin in Water

SHANG Xiao-jun¹, MA Su-ying¹, SHAO Peng², YAN Fu-lin¹(1.School of Pharmacy, Xinxiang Medical College, Henan Xinxiang 453003, China; 2. School of Basic Medicine, Xinxiang Medical College, Henan Xinxiang 453003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the equilibrium solubility of nodosin in water and investigate the stability of the nodosin solution to lay a foundation for dosage forms R&D. METHODS: HPLC was adopted to determine the content and the equilibrium solubility of nodosin at 25 ℃; the stability of nodosin solution was evaluated by the constant temperature method at room temperature (25 ℃) and 4 ℃; the effect of pH on the stability of nodosin solution was investigated at room temperature. RESULTS: The equilibrium solubility of nodosin in water was 38.33 mg/L at 25 ℃. The t_{90} of nodosin solution was 190.22 h and 2299.37 h at room temperature and 4 ℃. The pH-rate profile of nodosin was V-shaped, nodosin was stable when the pH of solution was between 5 and 7. CONCLUSION: The water-solubility of nodosin is poor and it is not stable in aqueous solution. The pH-dependent degradation of nodosin solution confirms to specific acid-base catalysis reaction.

KEY WORDS Nodosin; Solubility; Stability; Degradation

Nodosin 是从香茶菜属植物溪黄草中分离出的一种二萜类化合物,体外活性研究显示其具有明显的抗癌活性^[1-3]。但对 nodosin 在水中的溶解度以及在水溶液中稳定性的研究很少,为此,笔者进行了上述内容的研究,为 nodosin 药物剂型研发提供试验数据。

1 材料

1.1 仪器

LC-6AD 高效液相色谱(HPLC)仪(日本岛津公司); pHs-3TC 数显 pH 计(上海天达仪器有限公司); BS224S 电子分析天平(德国赛多利斯公司); SHA-C 水浴恒温振荡器(江苏金坛佳美仪器有限公司); CH1015 超级恒温水槽(上海衡平仪器仪表厂)。

1.2 试剂

nodosin 对照品(新乡医学院药学院天然药物化学教研室

自制,纯度>98.0%); 甲醇为色谱纯,水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 nodosin 含量测定方法^[4]

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Sion Chrom ODS-bp(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(60:40, V/V); 检测波长: 231 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 38 ℃。在此色谱条件下, nodosin 的保留时间约为 5.45 min。色谱见图 1A。

2.1.2 标准曲线的制备 精密称定用五氧化二磷干燥至恒质量的 nodosin 对照品 19.8 mg, 置于 25 ml 量瓶中, 加流动相溶解并定容, 制成 nodosin 质量浓度为 792 μg/ml 的贮备液。分别精密量取此贮备液 50、100、500、1 000、1 500、2 000 μL, 置于 10 ml 量瓶中, 加流动相制成 nodosin 质量浓度分别为 3.96、7.92、39.60、79.20、118.80、158.40 μg/ml 的溶液, 分别取上述溶液 20 μL, 按上述色谱条件测定。以药物质量浓度(c)对峰面积积分值(A)进行线性回归, 得回归方程为 $c=0.0519A+0.0599$ ($r=0.9998, n=6$)。结果表明, nodosin 质量浓度在 3.96~158.40 μg/ml 范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.2 平衡溶解度的测定

△ 基金项目: 河南省科技发展计划项目资助(No.102102310011)

* 副主任药师。研究方向: 药物制剂与质量分析。电话: 0373-3831982。E-mail: october24th@163.com

通信作者: 教授, 硕士研究生导师, 博士。研究方向: 天然药物活性成分及新药。E-mail: yanfulin03@xxmu.edu.cn

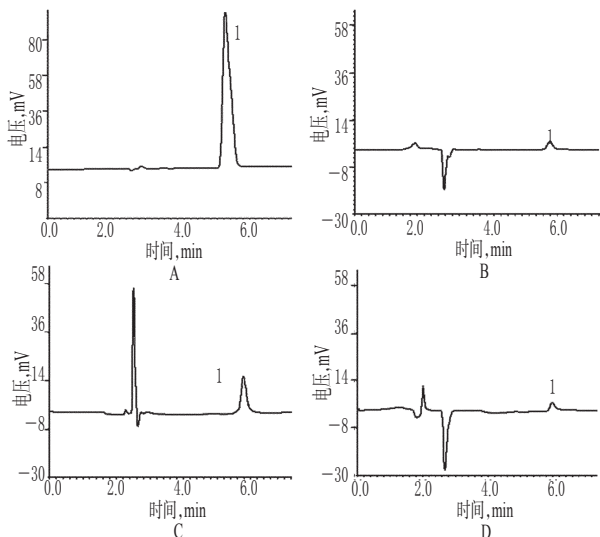


图1 高效液相色谱图

A. 对照品 (79.2 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); B. 30 h, 80 °C 水溶液; C. 30 h, pH 1.0 溶液; D. 12 h, pH 11.0 溶液; 1. nodosin

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control (79.2 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); B. 30 h, 80 °C aqueous solution; C. 30 h, solution pH 1.0; D. 12 h, solution pH 11.01. nodosin

称取过量 nodosin, 置于 10 ml 具塞玻璃试管中, 精密加入蒸馏水 3 ml, 将试管放在 (25 ± 0.5) °C 恒温水浴振荡器中振摇 12 h, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取滤液经适当稀释后, 取样 20 μL , 按上述色谱条件测定 nodosin 的质量浓度, 并计算溶液中 nodosin 的平衡溶解度。结果, 25 °C 下, nodosin 在水中平衡溶解度为 38.33 mg/L。根据《中国药典》规定, nodosin 属于不溶性药物。

2.3 nodosin 水溶液稳定性考察

2.3.1 样品溶液的制备 精密称取 nodosin 6.5 mg, 置于 200 ml 量瓶中, 用蒸馏水溶解并稀释至刻度, 得 32.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 nodosin 样品溶液。

2.3.2 经典恒温法预测药物水溶液在室温下的稳定性 精密量取样品溶液 15 ml, 置于具塞玻璃试管中, 密封。分别在 40、50、60、70、80 °C 恒温水浴中避光保存 30 h, 分别于 0、2、6、12、24、30 h 各取样 0.5 ml, 取样 20 μL , 按上述色谱条件测定 nodosin 的质量浓度, 并绘制药物降解曲线。30 h, 80 °C nodosin 水溶液的 HPLC 见图 1B; 不同温度下 nodosin 水溶液的降解曲线见图 2。

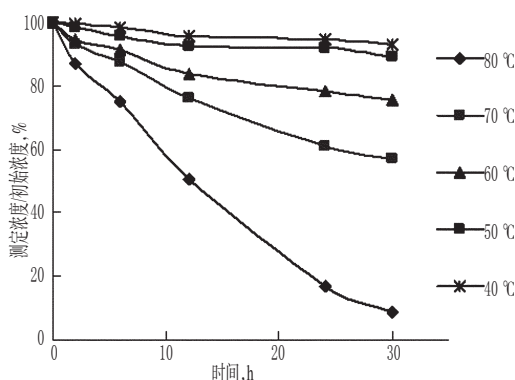


图2 不同温度下 nodosin 水溶液的降解曲线

Fig 2 Degradation curves of nodosin solution at different temperatures

由图 2 可知, nodosin 在水中的降解随着温度的升高而加快。将其在不同温度下的降解数据分别代入零级、一级和二级反应方程进行拟合, 详见表 1。

表 1 不同温度下 nodosin 的降解拟合方程

Tab 1 Fitted equation of nodosin degradation at different temperatures

温度, °C	零级反应	一级反应	二级反应
40	$c = -0.0639t + 27.902$, $r = 0.9828$	$\lg c = -0.001t + 1.4457$, $r = 0.9840$	$1/c = 9 \times 10^{-5}t + 0.0358$, $r = 0.9850$
50	$c = -0.0901t + 27.564$, $r = 0.9371$	$\lg c = -0.0034t + 3.3167$, $r = 0.9403$	$1/c = 0.0001t + 0.0363$, $r = 0.9433$
60	$c = -0.2113t + 27.036$, $r = 0.9671$	$\lg c = -0.0088t + 3.2987$, $r = 0.9751$	$1/c = 0.0004t + 0.0369$, $r = 0.9819$
70	$c = -0.3948t + 27.029$, $r = 0.9889$	$\lg c = -0.0187t + 3.3078$, $r = 0.9960$	$1/c = 0.0009t + 0.036$, $r = 0.9986$
80	$c = -0.853t + 26.287$, $r = 0.9904$	$\lg c = -0.0353t + 1.4949$, $r = 0.9921$	$1/c = 0.0115t - 0.0051$, $r = 0.9327$

由表 1 可知, 零级、一级、二级反应方程拟合结果都可接受。综合评价, 一级反应方程拟合效果最好, 并且一级反应的速率常数 (K) 与药物质量浓度无关, 适用范围广, 因此选用一级反应方程计算 nodosin 水溶液降解的 K 。

根据 Arrhenius 方程 ($\lg K = -\frac{E}{2.303R} \times \frac{1}{T} + \lg A$ 。式中, E 为降解活化能, A 为频率因子, R 为摩尔气体常量, T 为热力学温度)。利用各温度下的降解 K 和 T , 可得 Arrhenius 图 (见图 3) 和回归方程 [$\lg K = -4258.9 \times 1/T + 11.028$ ($r = 0.9953$)]。根据回归方程, 可求出 nodosin 的 E 、 A 值, 25、4 °C 下降解 K , 并计算其在 25、4 °C 下的有效期 (t_{90}), 结果见表 2。

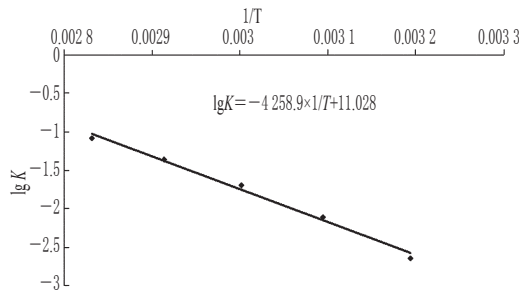


图3 nodosin 水溶液的 Arrhenius 图

Fig 3 Arrhenius map of nodosin solution

表 2 nodosin 水溶液在 25、4 °C 下反应速率相关参数

Tab 2 Related parameter of reaction rate of nodosin solution at 25、4 °C

温度, °C	E , J/mol	A	K , h^{-1}	t_{90} , h
25	81 550.67	1.07×10^{11}	5.54×10^{-4}	190.22
4	81 550.67	1.07×10^{11}	4.58×10^{-5}	2 299.37

由表 2 可知, nodosin 水溶液在 25 °C 下的 t_{90} 为 190.22 h, 在 4 °C 下 t_{90} 为 2 299.37 h。

2.3.3 pH 值对 nodosin 水溶液稳定性的影响 精密量取“2.3.1”项下样品溶液 8 ml, 分别用 1 mol/L 的 HCl 或 1 mol/L 的 NaOH 溶液调样品溶液 pH 值分别为 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、11.0, 再用同样 pH 值的空白溶液定容至 10 ml, 摇匀密封, 在室温下避光放置 30 h, 分别于 0、2、6、12、24、30 h 各取样 0.5 ml, 经过适当稀释, 取样 20 μL , 按上述色谱条件测定 nodosin 质量浓度。根据一级反应方程, 分别计算各 pH 值下 nodosin 的降解 K , 以 $\lg K$ 对 pH 值作图, 绘制 pH-速率曲线, 考察 pH 值对药物稳定性的影响。结果, nodosin 水溶液降解的 pH-速率曲线呈 V 型, 根据曲线的走向趋势, nodosin 在酸性条件下比在碱性条件下稳定, 当 pH 值在 5~7 范围内时, 溶液最稳定。故可以判断,

人参皂苷 Rg₁ 的提取纯化及其含量测定^Δ

王乐乐*,董志#,刘媛,程玉洁,唐红(重庆医科大学药学院,重庆 400016)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)07-0605-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.07.11

摘要 目的:提取和纯化人参皂苷 Rg₁,并测定其含量。方法:采用超声法提取人参总皂苷,使用硅胶柱层析法分离、纯化人参皂苷 Rg₁,采用高效液相色谱法测定人参皂苷 Rg₁ 含量。结果:采用硅胶柱层析法分离 50 g 人参,可得到人参皂苷 Rg₁ 9.91 g,其纯度为 89.63%。结论:此提取方法简单、准确,成本较低,所获产品纯度较高,可作为获得人参皂苷 Rg₁ 的有效方法。

关键词 超声法;硅胶柱层析法;高效液相色谱法;人参皂苷 Rg₁;提取

Extraction and Purification of Ginsenoside Rg₁ and Content Determination

WANG Le-le, DONG Zhi, LIU Yuan, CHENG Yu-jie, TANG Hong (School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To extract and purification ginsenoside Rg₁ and to determine the content of it. METHODS: Ultrasonic extraction was used to extract total saponin of *Panax ginseng*. Ginsenoside Rg₁ was separated and purified with silica gel column chromatography. HPLC method was used to determine the content of ginsenoside Rg₁. RESULTS: 9.91 g ginsenoside Rg₁ was obtained with the purity of 89.63% in 50 g *P. ginseng*. CONCLUSION: The method is simple, accurate and low cost, and the purity is satisfied. So, this technology is suitable to prepare ginsenoside Rg₁.

KEY WORDS Ultrasonic extraction; Silica gel column chromatography; HPLC; Ginsenoside Rg₁; Extract

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)为五加科人参属多年生草本植物,喜阴凉、湿润的气候,多生长于昼夜温差小的海拔

500~1 100 m 山地缓坡或斜坡地的针阔混交林或杂木林中。人参有益智安神、大补元气、补脾益肺的功效,其主要有效成

nodosin 水溶液的降解受溶液 pH 值影响,属于酸碱催化反应。nodosin 在 30 h, pH 1.0 溶液和 12 h, pH 11.0 溶液中的 HPLC 分别见图 1 中 C、D; nodosin 水溶液降解的 pH-速率曲线见图 4。

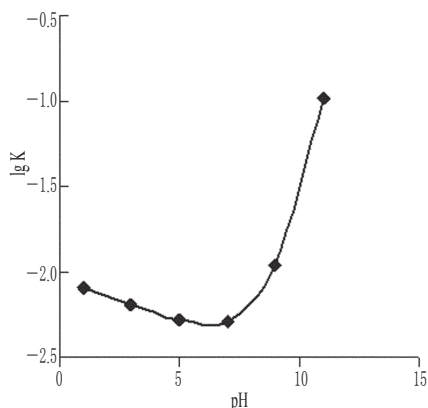


图4 nodosin 水溶液降解的 pH-速率曲线

Fig 4 pH-degradation rate curves of nodosin solution

3 讨论

^Δ 基金项目:重庆市科技计划项目资助(No.CSTC, 2009BA5086)

* 硕士研究生。研究方向:神经药理学及新药开发。电话: 023-86979425。E-mail: cappuccino5206@163.com

通信作者:教授,博士研究生导师,博士。研究方向:神经递质与受体药理以及新药研发。电话: 023-68486678。E-mail: zhidong073@hotmail.com

药物稳定性考察是处方前研究的重要组成部分,对选择合理剂型和制剂工艺具有重要指导意义。

本试验研究显示, nodosin 在水中溶解度较小,水溶液也不稳定,而且随着温度升高,降解加速。25℃室温下, nodosin 的有效期 t_{90} 仅为 190.22 h, 4℃下 t_{90} 为 2 299.37 h。

nodosin 的稳定性还受环境中酸、碱性的影响,属于酸碱催化的降解反应,尤其在碱性环境中,降解速度比酸性环境快,在 pH 5~7 范围内的中性偏酸环境中,较为稳定。因此,对于 nodosin 的血管外给药制剂适宜选择固体剂型,静脉给药制剂适宜制成注射用无菌粉末,并且制备过程中还要注意溶液受 pH 值和温度的影响。

参考文献

- [1] Yan FL, Wang CM, Guo LQ, et al. A new ent-kaurane diterpenoid from *Isodon nervosus*[J]. *J Chem Research*, 2008, 2008(9):522.
- [2] 海广范, 闫琰, 刘巨源, 等. Enmein、serrinB、nodosin 和 lasiodonin 对 HL60 细胞株和 lovo 细胞株的增殖抑制作用[J]. *新乡医学院学报*, 2008, 25(6):564.
- [3] He F, Xiao WL, Pu JX, et al. Cytotoxic ent-kaurane diterpenoids from *Isodon sinuolata*[J]. *Phytochemistry*, 2009, 70:1 462.
- [4] 倪林, 李树华, 卢海啸, 等. HPLC 法测定显脉香茶菜中 Nodosin 的含量[J]. *广东药学院学报*, 2010, 26(6):605.

(收稿日期:2012-02-06 修回日期:2012-04-22)