

# 败酱皂苷H<sub>1</sub>平衡溶解度和表观油水分配系数的测定<sup>Δ</sup>

房启龙\*,刘宏尉,刘江云#,郝丽莉,杨世林(苏州大学医学部药学院,江苏苏州 215123)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0364-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.26

**摘要** 目的:测定败酱皂苷H<sub>1</sub>平衡溶解度和表观油水分配系数(lg P),为败酱皂苷后续的剂型设计和成药性研究提供参考。方法:采用高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)法测定败酱皂苷H<sub>1</sub>在不同有机溶剂和不同pH缓冲液中的平衡溶解度;采用摇瓶法测定败酱皂苷H<sub>1</sub>的lg P。结果:25℃下败酱皂苷H<sub>1</sub>在水、甲醇和乙醇中的平衡溶解度依次为0.09175、96.51、46.89 g/L,在磷酸盐缓冲液pH 7.6~10.0范围内平衡溶解度随着pH升高而明显增大;败酱皂苷H<sub>1</sub>在pH 6.0~8.0缓冲液中其lg P范围为0.695~0.773。结论:败酱皂苷H<sub>1</sub>及该类齐墩果酸型皂苷属于低溶解度、低透过性的成分,因而不适宜作为常规口服制剂开发使用。

**关键词** 败酱皂苷H<sub>1</sub>;高效液相色谱-蒸发光散射检测法;平衡溶解度;表观油水分配系数

## Determination of Solubility and Apparent Oil and Water Partition Coefficient of Saponin H<sub>1</sub>

FANG Qilong, LIU Hongwei, LIU Jiangyun, HAO Lili, YANG Shilin (School of Pharmacy, Medical College of Soochow University, Jiangsu Suzhou 215123, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To determine the solubility and apparent oil and water partition coefficient (lg P) of saponin H<sub>1</sub>, and provide reference for dosage form design and druggability research of saponin. METHODS: HPLC-ELSD was conducted to determine the equilibrium solubility of saponin H<sub>1</sub> in different organic solvents and pH buffer solutions; shaking flask was applied to determine lg P value of saponin H<sub>1</sub>. RESULTS: The equilibrium solubility of saponin H<sub>1</sub> in water, methanol and ethanol at 25℃ was 0.09175 g/L, 96.51 g/L and 46.89 g/L, respectively. The solubility increased apparently at high pH within pH range at 7.6-10.0; the lg P value was between 0.695-0.773 in buffers within pH range at 6.0-8.0. CONCLUSIONS: Saponin H<sub>1</sub> and the oleanolic acid type saponins belong to low solubility, low transmission components, so it is not suitable for use as a conventional oral formulation is developed.

**KEYWORDS** Saponin H<sub>1</sub>; HPLC-ELSD; Equilibrium solubility; Apparent oil and water partition coefficient

败酱科植物黄花败酱 *Patrinia scabiosaeifolia* Fisch. 是我国传统中药,具有清热解毒、排脓破瘀的功效,其中成药制剂败酱片可用于治疗以失眠为主要症状的神经衰弱或精神疾病<sup>[1]</sup>。为进一步研究开发该药材,本课题组对黄花败酱中的化学成分进行了系统分离,鉴定了其中主要的17种皂苷成分<sup>[2]</sup>。药理学筛选实验发现,部分败酱皂苷对多种癌细胞株均有抗

肿瘤活性<sup>[3]</sup>。本研究以败酱皂苷H<sub>1</sub>为对象,首次对其平衡溶解度和表观油水分配系数(lg P)进行测定,以期对败酱皂苷后续的剂型设计和成药性研究提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱(HPLC)仪(日本Shimadzu公

- [8] 罗静,沈昱翔,周浓,等.HPLC法测定14个不同产地滇重楼中薯蓣皂苷元的含量[J].中国药房,2015,26(21):2965.  
[9] 闫森森,许真,徐蝉,等.大蒜功能成分研究进展[J].食品科学,2010,31(5):312.  
[10] 柏冬,王瑞海,刘丽梅.大蒜皂苷对照品制备及比色法测

定大蒜皂苷提取物中总皂苷含量[J].中国中医药信息杂志,2012,19(9):55.

- [11] Mochizuki E, Yamamoto T, Mimaki Y, et al. Ultraviolet derivatization of steroidal saponin in garlic and commercial garlic products as p-nitrobenzoate for liquid chromatographic determination[J]. *JAOAC Int*, 2004, 87(5):1063.  
[12] 彭缨,骆昉,王淑君,等.柱前衍生高效液相色谱法测定知母中菝葜皂苷元的含量[J].沈阳药科大学学报,2008,25(5):372.

(收稿日期:2015-01-13 修回日期:2015-08-09)

(编辑:张静)

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81274190);江苏省重大科技支撑与资助创新专项项目(No.BE2012649)

\* 硕士研究生。研究方向:中药新药研发。E-mail:yunlongfang@163.com

# 通信作者:副教授。研究方向:天然产物化学与新药研发。电话:0512-65884301。E-mail:liujiangyun@suda.edu.cn

司);2000型蒸发光散射检测(ELSD)器(美国Alltech公司);MP-2002型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);SB-5200型超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司);KA-1000型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);HZQ-X100型摇床(太仓市华利达实验设备公司)。

## 1.2 试剂

败酱皂苷H<sub>1</sub>样品[齐墩果酸-3-O-β-D-吡喃木糖基-(1→3)-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-β-D-吡喃木糖苷,分子式:C<sub>46</sub>H<sub>74</sub>O<sub>15</sub>,分子量:864,批号:PSH1-20130226,纯度:85.1%],败酱皂苷H<sub>1</sub>对照品(批号:PSH1-201201,经氢谱、碳谱确定其结构,经HPLC法测定纯度为98.6%)均为本课题组自制<sup>[9]</sup>;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Cosmosil AR-II C<sub>18</sub>(50 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.5%甲酸(B),梯度洗脱(0~30 min, 70% → 100% A);漂移管温度:40 ℃,载气流量:2.5 L/min;流速:1.0 ml/min;柱温:35 ℃;进样量:20 μl。在上述色谱条件下,理论板数以败酱皂苷H<sub>1</sub>峰计不少于10 000,分离度>1.5,各成分基线分离良好。色谱见图1。

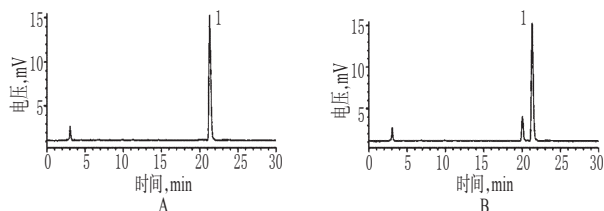


图1 高效液相色谱-蒸发光散射检测色谱图

A.对照品;B.供试品;1.败酱皂苷H<sub>1</sub>

Fig 1 HPLC-ELSD chromatograms

A.reference substance; B. test sample; 1. saponin H<sub>1</sub>

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取败酱皂苷H<sub>1</sub>对照品13.61 mg,置于25 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取10 mg败酱皂苷H<sub>1</sub>样品,置于20 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容,即得。

2.1.4 线性关系考察 精密称取败酱皂苷H<sub>1</sub>对照品适量,分别以甲醇溶解并稀释制成质量浓度为0.009 984、0.024 96、0.049 92、0.099 84、0.249 6、0.499 2、0.998 4 mg/ml的系列对照品溶液。精密吸取上述系列对照品溶液各20 μl,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以败酱皂苷H<sub>1</sub>质量浓度(x, mg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=1.623 5x+4.827 5$ ( $r=0.999 2$ )。结果表明,败酱皂苷H<sub>1</sub>检测质量浓度线性范围为0.009 984~0.998 4 mg/ml。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.2”项下对照品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,败酱皂苷H<sub>1</sub>峰面积的RSD=0.64%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液适量,分别于放置0、2、4、8、12、24 h时进样测定,记录峰面积。结果,败酱皂苷H<sub>1</sub>峰面积的RSD=1.05%( $n=6$ ),表明供试品溶液在24 h

内基本稳定。

2.1.7 重复性试验 精密称取同一批样品适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,败酱皂苷H<sub>1</sub>峰面积的RSD=0.43%( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取已知含量样品适量,每份5 mg,共6份,分别加入一定质量的败酱皂苷H<sub>1</sub>对照品,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,计算败酱皂苷H<sub>1</sub>含量并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 1 Results of recovery tests( $n=6$ )

样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
4.341	4.355	8.683	99.7	99.7	1.07
4.323	4.355	8.622	98.9		
4.272	4.355	8.554	98.3		
4.287	4.355	8.643	100.6		
4.328	4.355	8.651	99.4		
4.296	4.355	8.706	101.3		

### 2.2 败酱皂苷H<sub>1</sub>平衡溶解度和lg P测定

2.2.1 不同溶剂中的平衡溶解度考察<sup>[4]</sup> 取过量的败酱皂苷H<sub>1</sub>,分别置于不同10 ml具塞试管中,分别精密加入5 ml 乙醚、乙腈、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇、甲醇、水,25 ℃下100 r/min振摇48 h使达到溶解平衡,以半径为12.5 cm、14 000 r/min离心10 min,制成不同溶剂的上清饱和液。精密吸取上述上清饱和液各10 μl,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算败酱皂苷H<sub>1</sub>在各溶剂中的平衡溶解度,结果见表2。

表2 不同溶剂中败酱皂苷H<sub>1</sub>的平衡溶解度(g/L)

Tab 2 Results of equilibrium solubility of saponin H<sub>1</sub> in different solvent

溶剂	平衡溶解度, g/L
乙醚	未测出
乙腈	0.032 85
乙酸乙酯	0.044 98
正丁醇	0.827 9
乙醇	46.89
甲醇	96.51
水	0.091 75

2.2.2 不同pH缓冲液中的平衡溶解度考察 按2010年版《中国药典》(二部)附录XVD缓冲液的制备方法,分别制备pH为4.0、5.8、6.8、7.6、8.8、10.0的磷酸盐缓冲液(PBS)。分别精密吸取不同pH的PBS 5 ml,置于10 ml离心管中,加入过量败酱皂苷H<sub>1</sub>,25 ℃下100 r/min振摇48 h使达到溶解平衡,以半径为12.5 cm、14 000 r/min离心10 min,制成不同pH的PBS的上清饱和液。精密吸取上述上清饱和液各20 μl,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算败酱皂苷H<sub>1</sub>在不同pH的PBS中的平衡溶解度。结果表明,败酱皂苷H<sub>1</sub>的平衡溶解度在pH 4.0~6.8范围内很小,在pH 7.6~10.0范围内随着pH的升高而明显增大,详见图2。

### 2.3 lg P的测定<sup>[4-5]</sup>

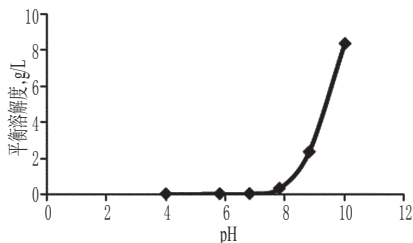


图2 不同pH的PBS中败酱皂苷H<sub>1</sub>的平衡溶解度

Fig 2 Results of equilibrium solubility of saponin H<sub>1</sub> in PBS of different pH

精密称取9.868 mg的败酱皂苷H<sub>1</sub>,置于25 ml量瓶中,用水饱和正辛醇溶解并定容,分别精密吸取2.5 ml,置于具塞锥形瓶中,分别精密加入25 ml pH为6.0、6.8、7.0、7.6、8.0的PBS,25℃下100 r/min振荡24 h使分配达到平衡。精密吸取分配前和分配后的败酱皂苷H<sub>1</sub>正辛醇溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算分配前和分配后水相中药物质量浓度。按下式计算败酱皂苷H<sub>1</sub>在不同pH的正辛醇-水中lg P的P值:

$$P = c_0/c_w = (m - c_w V_w)/c_w V_0$$

式中:m为败酱皂苷H<sub>1</sub>质量;c<sub>w</sub>为败酱皂苷H<sub>1</sub>在水相中的质量浓度;c<sub>0</sub>为正常醇相质量浓度;V<sub>w</sub>为水相体积;V<sub>0</sub>为正辛醇相体积。

结果表明,pH在6.0~8.0范围时败酱皂苷H<sub>1</sub>的lg P范围为0.695~0.773,详见表3。

表3 不同pH的PBS中败酱皂苷H<sub>1</sub>的lg P测定结果

Tab 3 Results of lg P of saponin H<sub>1</sub> in different pH buffer solutions

pH	P	lg P
6.0	4.96	0.695
6.8	5.13	0.710
7.0	5.93	0.773
7.6	5.41	0.733
8.0	5.08	0.706

### 3 讨论

近年来,有文献报道白头翁中的齐墩果酸型皂苷具有良好的抗肿瘤作用<sup>[3]</sup>。败酱中富含该类型皂苷前体,经酸水解后可制备获得败酱皂苷H<sub>1</sub>等3个主要成分<sup>[4]</sup>。经体外抗肿瘤活性测试,该3个成分对人源肝癌细胞7721、肺癌细胞A549、前列腺癌细胞PC-3活性具有良好的抑制作用。为此,本课题组采用HPLC-ELSD法建立了败酱皂苷H<sub>1</sub>的含量测定方法,结果表明本法可用于对其理化性质检测。

药物对细胞膜的渗透性与其亲脂性有关,常用于反映药物脂溶性的两个关键参数是平衡溶解度和lg P。采用HPLC-ELSD法对败酱皂苷H<sub>1</sub>的平衡溶解度进行分析,结果表明,其在低级性溶剂和水中难溶,在甲醇等极性溶剂中溶解度最大。这与皂苷类成分结构有关,皂苷苷元具有亲脂性,与糖基成苷后亲水性增强。败酱皂苷H<sub>1</sub>在pH 7.6~10.0范围时平

衡溶解度随pH的升高而明显增大,推测主要是由于败酱皂苷H<sub>1</sub>含有羧基,在碱性条件下易成盐从而增大溶解度。

lg P广泛用于预测膜的通透性,包括胃肠道吸收、穿过血脑屏障的情况以及与药动学性质的关系。lg P与药物的吸收不成简单的比例关系,一般认为lg P在1~4范围内适合药物的吸收。本研究结果表明,败酱皂苷H<sub>1</sub>水溶性和膜渗透性(lg P<1)均较差。败酱皂苷H<sub>1</sub>的这些理化性质与类似成分白头翁皂苷较为一致<sup>[5-6]</sup>。从分子式分析,败酱皂苷H<sub>1</sub>的分子量大于500,含氧原子数量为15,超出“Lipinski 5规则”范围,因而预测其口服时吸收差或膜渗透性差<sup>[7]</sup>。有文献报道,白头翁皂苷类成分的口服吸收生物利用度较低(<5%)<sup>[8-9]</sup>。按照生物药剂学分类系统(BCS)分类,败酱皂苷H<sub>1</sub>及该类齐墩果酸型皂苷属于低溶解度、低透过性的成分,因而不适宜作为常规口服制剂开发使用。

### 参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 第七册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000: 570.
- [2] 高亮, 黄花败酱化学成分研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2012.
- [3] Xu QM, Shu Z, He WJ, et al. Antitumor activity of Pulsatilla chinensis (Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7402 cells in vitro and in vivo [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(3/4): 293.
- [4] 陆昊, 刘宏尉, 王增尚, 等. 败酱皂苷对照品制备工艺研究[J]. 中国现代中药, 2015, 17(6): 583.
- [5] 饶小勇, 尹姍, 张国松, 等. HPLC测定白头翁皂苷D的油水分系数及平衡溶解度[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9): 1593.
- [6] 刘璐, 崔颖, 张秋燕, 等. 磺胺二甲嘧啶的溶解度及油水分系数研究[J]. 中国药房, 2008, 19(10): 750.
- [7] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2001, 46(1/2/3): 3.
- [8] Liu YL, Song YG, Xu QM, et al. Validated rapid resolution LC-ESI-MS/MS method for simultaneous determination of five pulchinosides from Pulsatilla chinensis (Bunge) Regel in rat plasma: application to pharmacokinetics and bioavailability studies [J]. *J Chromatogr B*, 2013, 942(24): 141.
- [9] Ouyang H, Guo YC, He MZ, et al. A rapid and sensitive LC-MS/MS method for the determination of Pulsatilla saponin D in rat plasma and its application in a rat pharmacokinetic and bioavailability study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2015, 29(3): 373

(收稿日期: 2015-02-02 修回日期: 2015-08-16)

(编辑: 张 静)

《中国药房》杂志——《文摘杂志》(AJ) 收录期刊, 欢迎投稿、订阅