

秋水仙碱油水分配系数和平衡溶解度的测定

吴玉强^{1,2}, 王志萍¹, 熊万娜^{3*}, 梁健钦¹, 罗宇东^{1,2}, 叶美麟¹

(1. 广西中医药大学, 中药制剂共性技术研发重点实验室, 南宁 530001;
2. 广西中医药大学制药厂, 南宁 530023; 3. 广西卫生职业技术学院, 南宁 530023)

[摘要] 目的:测定秋水仙碱在正辛醇-水系统中的油水分配系数及其在不同 pH 水溶液中的平衡溶解度,为该成分的制剂开发提供参考。方法:采用摇瓶法和高效液相色谱法(HPLC)测定秋水仙碱在正辛醇-水中的油水分配系数及其在不同 pH 水溶液中的平衡溶解度,色谱条件为 C₁₈ 色谱柱,流动相甲醇-水(40:60),检测波长 254 nm。结果:秋水仙碱在水及 pH 为 1.2, 2.0, 4.0, 6.8, 7.4 缓冲液中的平衡溶解度分别为 12.99, 14.77, 15.32, 23.99, 12.28, 12.36 g·L⁻¹, 油水分配系数分别为 4.05, 6.62, 6.31, 5.34, 8.88, 7.13。结论:秋水仙碱的油水分配系数和平衡溶解度均与 pH 无相关性,秋水仙碱属于高溶解性、低渗透性药物,可能存在除油水分配系数以外的因素限制秋水仙碱的渗透性。

[关键词] 秋水仙碱; 油水分配系数; 平衡溶解度; P-糖蛋白

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0064-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050064

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160120.1452.012.html>

[网络出版时间] 2016-01-20 14:52

Determination of Oil-water Partition Coefficient and Equilibrium Solubility of Colchicine

WU Yu-qiang^{1,2}, WANG Zhi-ping¹, XIONG Wan-na^{3*}, LIANG Jian-qin¹, LUO Yu-dong^{1,2}, YE Mei-lin¹

(1. Key Laboratory of Common Technology of Traditional Chinese Medicine Preparation,
Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2. Pharmaceutical Factory, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China;

3. Guangxi Medical College, Nanning 530023, China)

[Abstract] **Objective:** To determine oil-water partition coefficient and equilibrium solubility of colchicine in water system with different pH. **Method:** The content of colchicine was determined by HPLC, apparent octanol-water partition coefficient and equilibrium solubility of colchicine was measured by shake-flask method. Chromatographic conditions were C₁₈ column, methanol-water (40:60) as mobile phase and detection wavelength at 254 nm. **Result:** In solutions of water, pH 1.2, 2.0, 4.0, 6.8 and 7.4 buffer, equilibrium solubilities of colchicine were 12.99, 14.77, 15.32, 23.99, 12.28, 12.36 g·L⁻¹, partition coefficients were 4.05, 6.62, 6.31, 5.34, 8.88 and 7.13, respectively. **Conclusion:** There is no correlation between colchicine oil-water partition coefficient, solubility and pH. Colchicine has characteristics of high solubility and low permeability. There may be some factors that restrict colchicine's permeability except oil-water partition coefficient.

[Key words] colchicine; oil-water partition coefficient; equilibrium solubility; P-glycoprotein

秋水仙碱亦称秋水仙素,系一种从百合科植物 秋水仙提取得到的生物碱类成分,临床上多用于痛

[收稿日期] 20150713(009)

[基金项目] 广西中药制剂共性技术研发重点实验室专项(70-ZJGX201401001); 广西自然科学基金项目(2012GXNSFAA053118, 2014GXNSFAA118198)

[第一作者] 吴玉强, 硕士, 教授级高级工程师, 从事新药开发研究, Tel:0771-4953042, E-mail:409444015@qq.com

[通讯作者] *熊万娜, 硕士, 讲师, 从事药物成分分析和新药研发, Tel:0771-3804417, E-mail:188848168@qq.com

风和各种恶性肿瘤的治疗,效果显著,但其毒性明显,尤其对肾脏、心脏、骨髓等毒性较严重,使其应用受到限制。早在 2010 年, FDA 已宣布在美国境内停止对单一成分口服秋水仙碱药品的销售;中国已取消秋水仙碱注射剂的批准文号,只剩下秋水仙碱原料药和用于治疗痛风的片剂。亟需开发一种新制剂,以降低秋水仙碱毒性。生物药剂学分类系统理论认为,药物的脂溶性和溶解度是反映药物穿透细胞膜能力的 2 个重要理化参数,测定秋水仙碱在正辛醇-水系统中的油水分配系数及其在不同 pH 缓冲溶解中的平衡溶解度,对研究秋水仙碱在体内过程和指导秋水仙碱新制剂开发具有重要意义^[1-2]。

目前,关于秋水仙碱的溶解度表述不一,研究资料很少,有文献报道秋水仙碱溶解度随 pH 的升高呈现降低趋势,但在中性至微碱性环境中则无明显变化^[3],本文测定结果与该报道有显著区别,该报道需改进测定秋水仙碱溶解度的方法,以便获得准确的数据;而未见秋水仙碱油水分配系数的报道。本实验拟测定秋水仙碱的油水分配系数和平衡溶解度,为秋水仙碱的生物药剂学研究和新制剂开发提供参考。

1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪(LC-20AT 型泵, SPD-20A 型紫外检测器,日本岛津公司), PHS-25 型 pH 计(上海精科雷磁仪器厂), EL204 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司), LG16-W 型离心机(北京医用离心机厂)。秋水仙碱对照品(湖北艾丹医药化工有限公司,批号 20140223,纯度 99.95%,使用前经 P₂O₅ 干燥),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 秋水仙碱的含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验^[4] Diamonsil C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Welch XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Hanbon Lichrospher C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(40:60), 检测波长 254 nm。理论板数按秋水仙碱峰计算不低于 5 000。在该色谱条件下,秋水仙碱峰分离效果很好。结果显示秋水仙碱色谱峰型、分离度均符合 2010 年版《中国药典》的要求,无其他杂质峰干扰。

2.1.2 溶液的制备 取样品溶液适量,经 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,加水稀释一定倍数,得供试品溶液。精密称取秋水仙碱对照品适量,加水溶解并

定容至刻度,得 20 mg·L⁻¹ 对照品溶液。水作为空白样品溶液。

2.1.3 专属性检查 在 2.1.1 项下色谱条件下,秋水仙碱色谱峰分离效果很好。色谱峰峰型、分离度均符合 2010 年版《中国药典》的要求,无其他杂质峰干扰。

2.1.4 重复性试验 精密称取秋水仙碱适量,共 6 份,分别置于 50 mL 量瓶中,加水溶解并定容至刻度,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,精密量取续滤液 10 μL 按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算秋水仙碱质量分数 99.97%, RSD 0.9%,表明该方法重复性良好。

2.1.5 线性范围考察 精密称取秋水仙碱 2.30 mg,置 25 mL 量瓶中,加水溶解并定容至刻度,得 92.00 mg·L⁻¹ 储备液。精密吸取储备液适量,稀释成质量浓度分别为 4.6, 9.2, 23.0, 46.0, 69.0 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液,分别精密吸取 10 μL 按 2.1.1 项下色谱条件测定。以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 39\ 323X + 1\ 016.6$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围 4.60 ~ 69.00 mg·L⁻¹。

2.1.6 准确度 精密称取秋水仙碱 22.00 mg,置 100 mL 量瓶中,加水溶解并定容至刻度,得 0.22 g·L⁻¹ 样品溶液。精密吸取样品溶液 6 mL,共 9 份,等分成 3 组,每组分别加入 0.46 g·L⁻¹ 秋水仙碱储备液 2, 3, 4 mL,混匀,稀释一定倍数,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,精密量取续滤液 10 μL 按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算平均加样回收率 99.84%, RSD 1.5%,表明该方法准确度良好。

2.1.7 耐用性 选择不同的色谱柱、检测波长及流动相,考察系统耐用性,结果 RSD 均 < 2.0% ($n = 3$),说明色谱柱、波长、流动相的变动微小,不影响测定结果,说明分析方法耐用性符合要求,见表 1。

2.2 平衡溶解度的测定 按 2010 年版《中国药典》二部附录 XV D 缓冲溶液的配制和普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则^[5] 的要求,配制 pH 分别为 1.2, 2.0, 4.0, 6.8, 7.4 的缓冲溶液。分别吸取不同 pH 溶液和水溶液 5 mL,置 20 mL 具塞刻度试管,加入过量的秋水仙碱,置水浴摇床中,在 (37 ± 0.5) °C 条件下振摇 48 h,经 0.45 μm 滤膜滤过,吸取续滤液,加水稀释 100 倍,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算秋水仙碱在水及不同 pH 缓冲液中平衡溶解度分别为 12.99, 14.77, 15.32, 23.99, 12.28, 12.36 g·L⁻¹。

表 1 秋水仙碱色谱条件的耐用性试验

Table 1 Durability test of chromatographic conditions of colchicine

因素	条件参数	分离度	秋水仙碱 /mg·L ⁻¹	RSD /%
色谱柱	Hanbon Lichrospher C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	3.6	24.54	0.5
	Welch XB-C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	4.2	24.54	
	Dimonsil C ₁₈ (2) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	3.9	24.76	
波长	252 nm	3.8	25.03	1.0
	254 nm	3.9	24.76	
	256 nm	3.8	24.53	
流动相	甲醇-水(38:62)	4.1	24.73	0.1
	甲醇-水(40:60)	3.9	24.76	
	甲醇-水(42:58)	5.2	24.73	

2.3 油水分配系数的测定 吸取适量正辛醇溶液, 分别与不同 pH 溶液和水混合, 在恒温水浴 (37 ± 0.5) °C 条件下振摇 24 h, 离心 (12 000 r·min⁻¹, 10 min, 下同), 分取上层和下层, 即得水饱和的正辛醇、正辛醇饱和的水溶液。吸取正辛醇饱和水溶液 10 mL, 置具塞刻度试管, 加入过量的秋水仙碱, 置水浴摇床中, 在 (37 ± 0.5) °C 条件下振摇 48 h, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 吸取续滤液, 加水稀释 500 倍, 精密吸取 10 μL 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算秋水仙碱初始浓度 (C₀)。吸取秋水仙碱饱和溶液 5.0 mL, 分别加入水饱和正辛醇 5.0 mL, 平行操作 2 份, 置恒温水浴摇床中, 在 (37 ± 0.5) °C 条件下振摇 24 h, 离心, 分取水层, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 吸取续滤液, 加水稀释 500 倍, 精密吸取 10 μL 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算秋水仙碱质量浓度 (C)。按 $P = (C_0 - C)/C$ 计算秋水仙碱的油水分配系数 (P)。结果秋水仙碱在水及 pH 分别为 1.2, 2.0, 4.0, 6.8, 7.4 溶液中的 P 分别为 4.05, 6.62, 6.31, 5.34, 8.88, 7.13。

3 讨论

从本文结果可见, 在 pH 1.2 ~ 7.4, 秋水仙碱的平衡溶解度在 12 ~ 24 g·L⁻¹, 在 pH 4 时, 平衡溶解度达最大值, 且溶解度与 pH 无相关性, 这与文献 [3] 报道不一致; 在 pH 1.2 ~ 7.4, 秋水仙碱的油水分配系数 4 ~ 9, 在 pH 6.8 时, 油水分配系数最大, 油水分配系数与 pH 亦无相关性。

生物药剂学分类系统 (BCS) 理论认为, 当药物的最大应用剂量能在 37 °C, pH 1 ~ 7.5, ≤ 250 mL 的水性缓冲液介质中完全溶解, 即具有高溶解性; 在没有证据表明药物在胃肠道不稳定的情况下, 当肠道吸收达 > 90% 的药物 (绝对生物利用度 > 90%),

即具有高渗透性。在渗透性方面, 口服秋水仙碱治疗痛风性关节炎的急性发作 24 h 内不超 6 mg, 预防复发性痛风性关节炎的急性发作的日剂量 1 mg。由本文结果得知, 秋水仙碱平衡溶解度远 > 6 g·L⁻¹, 说明秋水仙碱属于高溶解性药物。在渗透性方面, 文献 [6] 报道秋水仙碱在大鼠各肠段均有不同程度吸收, 在结肠段的通透性最低, 且受到 P-糖蛋白外排的影响, P-糖蛋白可能是导致秋水仙碱生物利用度低 (秋水仙碱生物利用度约 37%) 的原因之一。说明秋水仙碱属于低通透性药物。油水分配系数是衡量药物渗透性体外参数之一, 通常认为药物的油水分配系数在 0.1 ~ 10 有利于透膜吸收 [7-8]。说明秋水仙碱油水分配系数有利于其透膜吸收。

综上所述, 溶解性、油水分配系数可能不是限制秋水仙碱渗透性的主要原因, 存在其他因素影响秋水仙碱的渗透性, 比如酸碱稳定性、肠道菌群代谢稳定性、肝脏首过作用等。提高秋水仙碱的膜渗透性是改善秋水仙碱生物利用度的研究方向之一, 可通过应用磷脂复合物制备技术等进一步改善秋水仙碱的脂溶性、应用纳米技术改善秋水仙碱的稳定性和渗透性等, 以达到提高该成分膜渗透性的目的。

[参考文献]

[1] 何明珍, 梁起栋, 饶小勇, 等. α-常春藤皂苷的平衡溶解度及表观油水分配系数的测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 52-54.

[2] 刘建平. 生物药剂学与药物动力学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 34-52.

[3] 王文萃. 秋水仙碱口服缓控释剂型研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2008.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 564-565.

[5] 国家食品药品监督管理总局. 关于发布普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则和化学药物 (原料药和制剂) 稳定性研究技术指导原则的通告 [EB/OL]. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL1036/114286.html>, 2015-02-05.

[6] 王文萃, 冯耀龙, 宋浩亮, 等. 秋水仙碱大鼠在体肠吸收特性研究 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 737-740.

[7] 宋桂军, 刘菡, 冯芳, 等. 替米沙坦油水分配系数的测定及其意义 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(11): 1704-1706.

[8] 沈硕, 刘淑芝, 杜茂波, 等. 青蒿琥酯平衡溶解度和表观油水分配系数的测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 9-12.

[责任编辑 刘德文]