

和厚朴酚在缓冲溶液 HBSS 中的溶解性和稳定性

吴安国¹, 曾宝^{1,2}, 王春玲¹, 李生梅¹, 陈建南¹, 赖小平^{1,2*}

(1. 广州中医药大学新药开发研究中心, 广州 510006;

2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

[摘要] 目的: 考察和厚朴酚在 HBSS 溶液中的溶解性和稳定性, 为和厚朴酚在体内的吸收与代谢研究提供依据。方法: 采用 RP-HPLC 法, 分别考察了 pH、温度、光照对和厚朴酚溶解性和稳定性的影响。结果: 和厚朴酚在甲醇的标准曲线为 $Y = 4764.5X - 10955$ ($r = 0.999$), 在 $4 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系, 检测限为 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 精密度和稳定性符合要求。和厚朴酚在含有 1% 甲醇和 0.1% 的吐温-80 的 HBSS 中的溶解性较好, 和厚朴酚在酸性中的稳定性优于碱性环境, 在 pH 7.4 的 HBSS 中的稳定性比较理想, 光照对和厚朴酚的稳定性没有影响。结论: 和厚朴酚在 pH 7.4 的 HBSS 中的溶解性和稳定性比较理想, 当其达到溶解平衡之后于 -20°C 储存。

[关键词] 和厚朴酚; 溶解性; 稳定性; RP-HPLC

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0090-04

Study on Solubility and Stability of Honokiol in Buffer Solution of HBSS

WU An-guo¹, ZENG Bao^{1,2}, WANG Chun-ling¹, LI Sheng-mei¹,
CHEN Jian-nan¹, LAI Xiao-ping^{1,2*}

(1. Research Center of New Drug Development, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Research Institute of Mathematical Engineering of Guangzhou University of Chinese Medicine in Dongguan, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the solubility and stability of honokiol in HBSS, Establish the basis of the drug metabolism research. **Method:** The concentration of honokiol was determined by RP-HPLC method, pH, temperatures and light were investigated on the solubility and stability of honokiol. **Result:** The linear calibration curve of Honokiol in methanol in the concentration range of $4\text{-}200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with a detection limit of $0.2 \mu\text{mol/L}$, The equation was calculated to be $Y = 4764.5X - 10955$ ($r = 0.999$), The precision and stability accorded with the requirements of methodology. The solubility of honokiol is good in HBSS containing 1% methanol and 0.1% Tween-80, the stability of honokiol in HBSS of acidic is more better than HBSS of alkaline, . light on the stability of honokiol has no influence. **Conclusion:** Tthe solubility and stability of honokiol in HBSS of pH 7.4 is rather ideal, when it reached the dissolution equilibrium it should be storied at -20°C .

[Key words] honokiol; solubility; stability; RP-HPLC

[收稿日期] 2010-06-16

[基金项目] 国家科技支撑计划项目子课题(2006BAI11B08-04)

[第一作者] 吴安国, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药新药与药代动力学, Tel: 020-39358103, E-mail: wag114@foxmail.com

[通讯作者] * 赖小平, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药新药研发, Tel: 020-39358045, E-mail: lxp88@gzhtcm.edu.cn

厚朴来源于木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehdet Wils 的干燥干皮、根皮及枝皮,其主要成分为厚朴酚 (magnolol)、和厚朴酚 (honokiol)^[1]。和厚朴酚是从中药厚朴中提取的一种含有酚羟基的生物活性物质^[2],具有抗氧化、镇静中枢神经、肌肉松弛、抗溃疡等广泛的药理作用。和厚朴酚在心肌缺血和在灌注时有良好的保护作用^[3-4]。和厚朴酚属于难溶性化合物,目前对于药物吸收与药代动力学的研究没有系统考察药物的真实溶解性和稳定性。本实验考察了和厚朴酚在不同 pH 的 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 中的溶解性和稳定性,以及温度和光照对其稳定性的影响。

1 材料

1.1 试剂 和厚朴酚对照品 (批号 110730-200609, 购于中国药品生物制品检定所), HBSS 缓冲液 (8 g·L⁻¹ NaCl, 0.4 g·L⁻¹ KCl, 1 g·L⁻¹ 葡萄糖, 60 mg·L⁻¹ KH₂PO₄, 47.5 mg·L⁻¹ Na₂HPO₄, 调 pH 至 7.4), 甲醇 (色谱醇, 德国默克), 吐温-80 (药用级), 超纯水。不同 pH 的 HBSS 缓冲液的配置: 将 pH 7.4 的 HBSS 缓冲液分别用氨水和盐酸调节 pH 使其为 1.2, 3, 5, 7.4, 9, 11.5。取每个不同 pH 的 HBSS 缓冲液适量。

1.2 仪器 高效液相色谱仪 (岛津紫外-可见 LC-20A), 紫外检测器 (SPD-20A/Prominence UV-Vis DETECTOR), 自动进样器 (SIL-20A/Prominence AUTO SAMPLER), 柱温箱 (DIONEX. SH585), 分析软件 (LC Solution Ver1.22. SPI 英文版), 超声波清洗机 (HN1006, 广州华南超声波设备有限公司), 电热恒温鼓风干燥箱 (DHG-9140A, 上海齐欣科学仪器有限公司), 电子天平 (十万分之一) (D2251, 广州市正一科技有限公司), 电热恒温水浴锅 (型号 HHS21.25, 上海跃进医用光学仪器厂)。

2 方法

2.1 分析方法建立 和厚朴酚难溶于水, 本实验首先建立了和厚朴酚溶解于甲醇中的含量测定方法, 用此建立的方法测定和厚朴酚在 HBSS 中的含量, 考察溶解性和稳定性的变化情况。

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil 100 - 5 C₁₈ (4.5 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 乙腈-水 (80/20), 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 25℃, 检测波长 294 nm, 进样体积为 10 μL, 和厚朴酚的保留时间为 4.3 min。

2.1.2 标准曲线的建立 精密称取和厚朴酚 26.7

mg, 置于 5 mL 的棕色量瓶中, 加甲醇溶解制成摩尔浓度为 2 万 μmol·L⁻¹ 的对照品贮备液, 精密吸取储备液适量, 用甲醇稀释成 200, 100, 80, 40, 20, 4 μmol·L⁻¹, 分别进样 10 μL, 在上述色谱条件下测定, 记录峰面积, 以摩尔浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 和厚朴酚的标准曲线为 $Y = 4764.5X - 10955$ ($r = 0.999$), 在 4 ~ 200 μmol·L⁻¹ 线性良好, 检测限为 0.2 μmol·L⁻¹。

2.1.3 精密度和稳定性 考察和厚朴酚 200, 100, 40 μmol·L⁻¹ 高、中、低 3 个浓度的精密度和稳定性, 结果 3 个浓度的精密度的 RSD 分别为 0.04%, 0.08%, 0.25%, 稳定性的 RSD 分别为 0.27%, 0.61%, 0.91%, 表明此方法适合于和厚朴酚的含量测定。

2.2 助溶剂和增溶剂的选择 和厚朴酚难溶于水, 本实验直接用 HBSS 溶解, 结果和厚朴酚的溶解性很不理想, 其饱和摩尔浓度只有 27 μmol·L⁻¹, 为了提高和厚朴酚在 HBSS 中的溶解度, 需在 HBSS 中加入一定量的助溶剂或增溶剂改善其溶解性。

以甲醇作为考察对象, 精密称取和厚朴酚适量, 用甲醇溶解, 摩尔浓度为 2 万 μmol·L⁻¹, 用 HBSS 稀释至 200 μmol·L⁻¹, 测定其峰面积, 计算摩尔浓度为 78 μmol·L⁻¹, 溶解性仍理想, 在此基础上再加入 0.1% 的 TW-80 改善其溶解性, 结果其摩尔浓度达到了 183 μmol·L⁻¹, 很大程度上提高了和厚朴酚在 HBSS 中的溶解性。

2.3 溶解性和稳定性实验

2.3.1 样品配制 精密称取和厚朴酚适量, 置于 5 mL 的量瓶中, 加甲醇溶解定容至刻度, 摩尔浓度为 2 万 μmol·L⁻¹, 摇匀放置, 作为母液, 精密吸取 0.1 mL 的母液至 10 mL 的量瓶中, 加入 TW-80 适量, 吐温-80 在 HBSS 中的终浓度为 0.1%, 用 HBSS 溶液定容至刻度即得。

2.3.2 和厚朴酚在 37℃ 的不同 pH 的 HBSS 中的溶解性和稳定性的变化 按照 2.3.1 项下的样品配置方法用不同 pH 的 HBSS 稀释定容, 置于 37℃ 的电热恒温水浴锅中, 不定时的摇动量瓶, 在 2, 4, 8, 12, 16, 24, 72, 168 h 时间点取样, 进行 HPLC 分析, 考察和厚朴酚在 37℃ 下不同 pH 的 HBSS 中溶解性和稳定性随的变化情况。

2.3.3 和厚朴酚在 pH 7.4 的 HBSS 中在不同温度下溶解度和稳定性的变化 按照 2.3.1 项下的样品

配置方法用 pH 7.4 的 HBSS 稀释定容, 摇匀, 平行 3 份, 将样品分别置于 -20, 4, 37 的环境中, 4, 37 温度下的样品于 2, 4, 8, 12, 16, 24, 72, 168 h 时间点取, -20 下的样品于 2, 72, 168, 720 h 时间点取样, 进行 HPLC 分析, 考察双和厚朴酚在 pH 7.4 的 HBSS 中在不同温度下溶解性和稳定性随时间的变化情况。

2.3.4 光照对和厚朴酚在 HBSS 中的稳定性的影响 按照 2.3.1 项下的样品配置方法用 pH 7.4 的 HBSS 稀释定容, 摇匀, 在常温下 1 份避光保存, 1 份不避光保存, 在 2, 4, 8, 12, 16, 24, 72, 168 h 时间点取样, 进行 HPLC 分析, 考察光照对和厚朴酚的稳定性的影响。

3 结果

3.1 和厚朴酚在 37 的不同 pH 的 HBSS 中的溶解性和稳定性的变化 从图 1 可以看出, 由于和厚朴酚结构式中的酚羟基, 因此其在碱性条件下的溶解性要大于在酸性条件下, 和厚朴酚在酸性和中性的 HBSS 中的稳定性比较理想, 在碱性的 HBSS 中在 24 h 内相对稳定, 随后发生降解, 168 h 后含量降解了约一半。

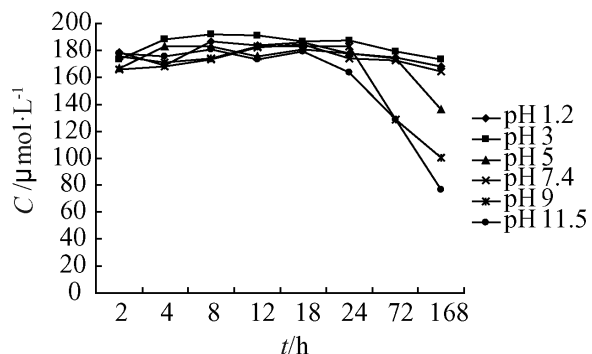


图 1 和厚朴酚在 37 的不同 pH 的 HBSS 中的溶解性和稳定性的变化

3.2 和厚朴酚在 pH 7.4 的 HBSS 中在不同温度下的溶解度和稳定性的变化 从图 2 可以看出, 和厚朴酚在 37 下在第 18 h 达到溶解平衡, 随后少量降解, 稳定性较好; 在 4 和 -20 下当达到溶解平衡之后其稳定性很好, 因此样品需低温保存。

3.3 光照对和厚朴酚在 HBSS 中的稳定性的影响 从图 3 可用看出光照对和厚朴酚的稳定性没有影响。

4 讨论

在药物的吸收和药代动力学研究中, 对于难溶性的样品, 有的加入有机溶剂或者增溶剂, 有的采用固体分散技术^[6]和 β -环糊精包合^[7]等新技术。本实验使用了混合溶剂提高了和厚朴酚的溶解性, 其

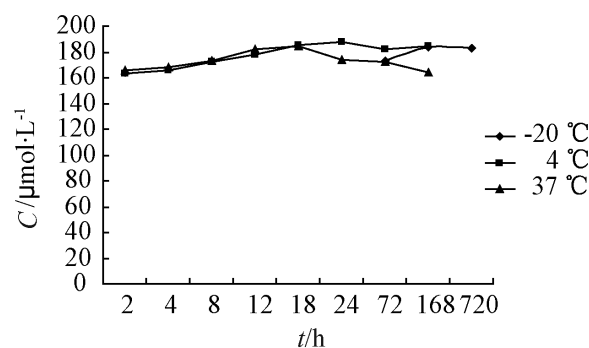


图 2 和厚朴酚在 pH 7.4 的 HBSS 中在不同温度下的溶解度和稳定性的变化

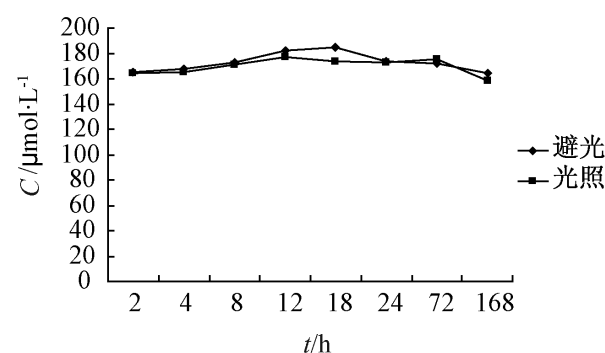


图 3 光照对和厚朴酚在 HBSS 中的稳定性的影响

中的有机溶剂和 TW-80 的浓度均为无毒浓度^[7-8]。

研究药物吸收和药代动力学, 首先必须考虑其溶解性和稳定性, 温度、溶液的 pH、光照是影响药物的溶解性和稳定性的主要因素^[10]。温度的考察, 一般要涉及到样品的处理温度, 测定时的温度, 储存时的温度, 比如冷冻(-20)低温(4)和体温(37), 以便对药物和其制剂的贮存和使用情况做出考虑。实验中和厚朴酚在低温下的稳定性更好, 因此在其达到溶解平衡后, 需低温储存。pH 的考察, 药物口服进入人体内经历不同 pH 的部位, 如人体中胃的 pH 最低达到了 1.2 左右, 而在肠里的 pH 为 7.4 左右, 因此须考察药物在不同 pH 环境中溶解性和稳定性情况, 和厚朴酚在碱性溶液中的溶解性最好, 在 pH 7.4 的 HBSS 中的稳定性最好, 总体看来和厚朴酚的稳定性比较理想。光照的考察, 由于大部分药物在处理, 储存, 运输中都会与光接触, 因此光照也是影响其稳定性的主要因素, 本实验说明了光照对和厚朴酚的稳定性没有影响。

总之, 影响化合物的溶解性和稳定性因素是多方面的, 只有在充分掌握化合物溶解性和稳定性情况下, 才可以进一步阐明化合物的生物活性或药代动力学特性。

[参考文献]

[1] 陈发奎. 常用中草药有效成分含量测定[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 464.

- [2] 罗凤平. 厚朴酚及其衍生物的合成、结构与性质的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [3] 张建和, 符伟玉, 莫丽儿. 中药厚朴及其提取工艺的研究概况[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(5) : 313.
- [4] Teng C M, Yu S M, Chen C C, et al. EDRF2 release and Ca²⁺-channel blockade by honokiol, an antiplatelet agent isolated from Chinese herb *Magnolia officinalis* in rat thoracic aorta[J]. Life Sci, 1990, 47(13) : 1153.
- [5] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 235.
- [6] Te fílo Vasconcelos, Bruno Sarmiento, Paulo Costa. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs [J]. Drug Discovery Today, 2007, 12(23/24) : 1068.
- [7] S Rawat, S K Jain. Rofecoxib- -cyclodextrin inclusion complex for solubility enhancement [J]. Pharmazie, 2003, 58(9) : 639.
- [8] 郑艳, 杨秀伟. 茯苓酸在人源肠 Caco-2 细胞单层模型的吸收和转运[J]. 中西医结合学报, 2008, 6(7) : 704.
- [9] 李莉. 丹参脂溶性成分吸收机理研究[D]. 成都: 四川大学, 2004.
- [10] Xuanqiang Yu, Gail L Zipp, G W Ray Davidson III. The effect of temperature and pH on the solubility of quinolone compounds: estimation of heat of fusion[J]. Pharm Res, 1994, 4(11) : 522.

[责任编辑 邹晓翠]

关于本刊变更为半月刊的重要通知

尊敬的作者、读者:

由于本刊近来投稿量不断增加, 杂志影响力不断扩大, 每月一刊的出版周期已无法满足广大科研工作者的投稿及发表需求。经主办单位中国中医科学院中药研究所及中国中西医结合学会中药专业委员会、主管单位国家中医药管理局及北京市新闻出版管理局的批准, 本刊自 2010 年 7 月变更为半月刊。半月刊后本刊发文量将大大提高, 发表周期将进一步缩短, 为作者和读者的服务水平也将不断提升。欢迎广大作者、读者、审稿专家及编委会专家继续关注和支持本刊发展!

由于刊期变更, 作者已被录用的待发表稿件的原定刊发“月份”维持不变, 但是因每月分为 2 期, 需要明确具体期号的作者请及时与各栏目责任编辑联系, 联系方式见本刊网站“联系我们”, 由此给您带来的不便请您谅解!

栏目/岗位	责任编辑	电话(010)	手机	邮箱	QQ
综述, 专论, 学术探讨, 资源鉴定, 代谢, 毒理, 药事管理	蓝海	84076882	13683362408	178562955@ qq. com	630731124 178562955
制剂	仝燕	84027721	13693506677	791489912@ qq. com	791489912
质量控制、化学成分	顾雪竹	84076882	13601383260	guxuezhu@ gmail. com	14182115
药理	聂淑琴		13520980068	nieshuqin@ sina. com	
临床	小安		13811016479	zou-ak48@ 163. com	65029229
费用查询, 发票, 稿费, 杂志邮寄等	何希荣	84076882		syfjx_2010@ 188. com	840155934