

芍药苷-6-O'-苯磺酸酯理化性质研究

王 春* 袁 君* 魏 伟

摘要 目的 考察芍药苷-6-O'-苯磺酸酯(代号 CP-25)的理化性质。方法 CP-25 理化性质以外观性状、Lieberman-Burchard 反应、薄层色谱图、紫外吸收光谱、溶解度和稳定性进行评价; CP-25 含量采用高效液相色谱法进行测定。结果 CP-25 具有萜类化合物特征颜色反应; 其最大紫外吸收波长为 220 nm; CP-25 在水和石油醚中均微溶; 影响其稳定性的主要因素是湿度。结论 当前考察的 CP-25 理化性质为其质量标准制定和制剂设计提供一定实验依据。

关键词 芍药苷-6-O'-苯磺酸酯; 理化性质; 薄层色谱; 高效液相色谱法

中图分类号 R 917; R 927; R 914.1; O 433

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)02-0202-04

白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP)^[1] 主要活性成分为芍药苷(Paeoniflorin, Pae)。研究^[2-5]表明 TGP 和 Pae 均具有良好抗炎免疫调节活性。临床资料^[6-7]表明 TGP 治疗类风湿关节炎效果肯定, 不良反应少, 但起效较慢。已有研究^[8]显示 Pae 口服吸收差是 TGP 起效较慢主要原因之一, 而 Pae 脂溶性较差与其吸收较差有密切关系^[9]。故课题组前期对 Pae 进行酯化修饰并获得芍药苷-6-O'-苯磺酸酯(代号 CP-25), 前期研究表明 CP-25 吸收明显高于 Pae, 其抗炎起效时间和作用强度均明显优于 TGP 和 Pae。该研究主要考察 CP-25 理化性质, 包括外观性状、紫外吸收、颜色反应、薄层色谱图、溶解度和稳定性影响因素试验, 旨在为其质量标准制定、剂型设计和储存条件提供一定实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂 CP-25: 自制, 纯度 > 98%; 浓硫酸: 上海振企化学试剂有限公司, 批号 20090701; 香

草醛: 中国医药集团上海化学试剂公司, 批号 20060512; 氯仿: 国药集团化学试剂公司, 批号 10006818; 二氯甲烷: 杭州护宝有限公司, 批号 20100803; 丙酮: 国药集团化学试剂公司, 批号 10000418; 乙腈和甲醇: 色谱纯, 购自德国 MERCK 公司; 硅胶板 G: 青岛海洋化工, 批号 20110413; 其他试剂均购自上海试剂一厂和上海试剂四厂。

1.2 实验仪器 8455 型双波长紫外分光光度计: 美国安捷伦公司; Agilent1200 高效液相色谱仪: 美国安捷伦公司; FE20K 型 pH 计: 瑞士梅特勒-托利多公司。

1.3 CP-25 颜色鉴别反应 在洁净玻璃试管中加入 CP-25 3~5 mg, 依次向试管加入 1 ml 醋酐和 4~5 滴硫酸^[10], 轻轻摇晃直至颜色出现。

1.4 CP-25 薄层色谱图 常温下, 取 1 mg CP-25 溶解在适量氯仿溶液中, 用毛细管在薄层板基线点样。将薄层板置于已经预饱和的层析缸中展开(展开剂, 氯仿: 甲醇 = 8:1), 待展开结束, 晾干薄层板, 用 5% 硫酸香草醛溶液喷雾并置于高温烤箱中烘烤直至显色, 计算 CP-25 比移值(基线与 CP-25 斑点中心距离和基线与展开剂前沿距离的比值)。

1.5 CP-25 紫外光谱图 称定 25 mg CP-25, 用流动相(甲醇: 水 = 53:47)稀释成 0.3 g/L 的供试液。以流动相为空白对照, 在 200~480 nm 范围内扫描 CP-25 的紫外吸收波长。

1.6 CP-25 稳定性影响因素实验及溶解度

1.6.1 色谱条件确定及流动相的筛选 Agilent1200 高效液相色谱仪包括 G1322A 真空脱气机、G1311A 四元梯度泵、G1316A 柱温箱、G1365A 多波长检测器、Chemstation 化学工作站; 色谱柱为 Agilent HC-C18(4.6 mm × 250.0 mm, 粒径 5 μm); 流速为 0.8 ml/min; 检测波长为 230 nm; 柱温为 30 °C; 进样量为 20 μl; 采用甲醇-水作流动相, 考察其不同比例作为流动相时, 空白液和 CP-25 标准品的色谱行为, 结果当甲醇: 水 = 53:47 (V:V) 时, CP-25 的色谱峰与相邻峰基线分离, 峰形对称, 保留时间适中。

1.6.2 CP-25 HPLC 方法学建立 标准曲线: 用流动相制备质量浓度依次为 0.005、0.01、0.02、0.04、

2013-09-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81330081、81302845、81173075)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所 抗炎免疫药物教育部重点实验室 合肥 230032

作者简介: 王 春, 男, 讲师;

魏 伟, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

* 对本文具有同等贡献

0.08 g/L 的 CP-25 标准溶液,按照 1.6.1 项操作,记录峰面积,以峰面积(A)对质量浓度(X, g/L)进行线性回归;精密度实验:取线性范围内低、中、高 3 个浓度样品,即 0.01、0.02、0.04 g/L,按照 1.6.1 项下操作,每个浓度样品制备 3 份。日内变异:1 d 之内重复检测 3 次;日间变异:连续检测 3 d;回收率实验:以流动相制备线性范围内低、中、高 3 个浓度 CP-25 样品,即质量浓度分别为 0.01、0.02、0.04 g/L,按照 1.6.1 项下操作,记录样品峰面积,由标准曲线计算浓度,该浓度与加入的浓度之比即为相对回收率。每个浓度样品重复 6 次,求均值并计算相对回收率。

1.6.3 稳定性影响因素试验 强光照照射试验^[11]:取适量 CP-25 置于开口扁形称量瓶中,以(4 500 ± 500) Lx 光照强度照射 10 d,分别在第 0、5、10 天从称量瓶中取出 2 mg CP-25,用流动相稀释成浓度为 0.02 g/L 的溶液,按照 1.6.1 项下操作,记录峰面积并计算其含量;同时另取一份 CP-25 按照中国药典 2010 版附录 VIC 熔点测定第一法测定 CP-25 的熔点。高温试验^[11]:取适量 CP-25 置于开口扁形称量瓶中,厚度为 2 mm,放在(60 ± 1) °C 恒温箱中 10 d,分别在第 0、5、10 天取样测定 CP-25 的含量及其熔点。高湿度试验^[11]:取适量 CP-25 分别置于 2 个开口扁形称量瓶中,其中一个置于含有饱和氯化钠溶液的密闭容器[25 °C,相对湿度(75 ± 1) %],另一个称量瓶置于含有饱和硝酸钾溶液的密闭容器(25 °C 相对湿度 92.5%),分别在 0、5、10 d 取样测定 CP-25 的含量及其熔点。

1.6.4 CP-25 在不同介质中溶解度测定 pH 水溶液按照 2010 版《中国药典》配制。将过量 CP-25 分别置于石油醚、蒸馏水和不同 pH 值水溶液中。在 25 °C 恒温水浴中震荡保持 72 h,吸取 1 ml 上清液经过 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,以流动相进行稀释,按照 1.6.1 项操作,记录峰面积,并计算 CP-25 溶解度。

2 结果

2.1 CP-25 性状 CP-25 是白色结晶状粉末,味苦、酸、涩,有轻微引湿性,见图 1。



图 1 CP-25 性状

2.2 CP-25 颜色鉴别反应 Lieberman-Burchard 反应是萜类化合物特征颜色反应,CP-25 与醋酐和浓硫酸混合震荡后,反应呈阳性,颜色表现为红色至紫红色,见图 2。

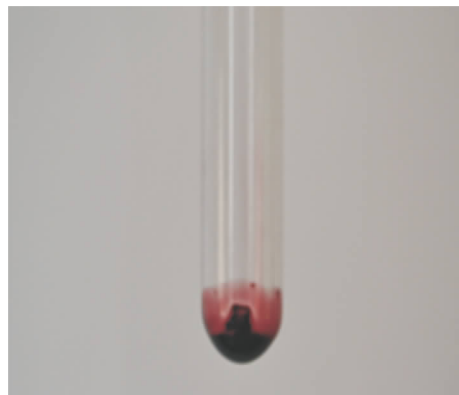


图 2 CP-25 的 Lieberman-Burchard 反应

2.3 CP-25 薄层色谱图 在常温下,以氯仿:甲醇 = 8:1 为展开剂,CP-25 比移值为 0.488,大小适中,见图 3。



图 3 CP-25 薄层色谱图
展开剂:氯仿:甲醇 = 8:1

2.4 CP-25 紫外光谱图 由图 4 可知,在 200 ~ 290 nm,CP-25 均具有一定的紫外吸收,其中最大吸收波长为 220 nm,其吸光度值为 3.625。

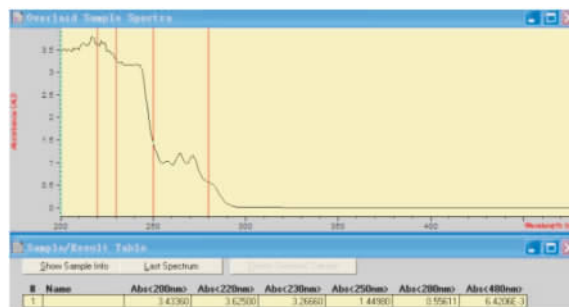


图 4 CP-25 紫外吸收光谱图

2.5 CP-25 色谱条件专属性 如图 5 所示,以甲醇:水(53:47; V:V)为流动相时,CP-25 色谱峰与相邻峰基线分离,无杂质干扰,峰形对称,保留时间适中,约为 8.7 min。

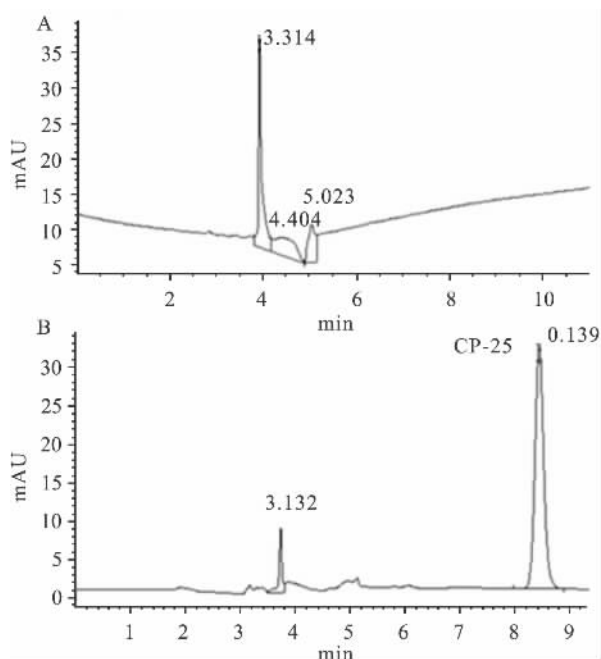


图 5 CP-25 专属性 HPLC 图谱

A: 流动相; B: 流动相 + CP-25

2.6 HPLC 方法学小结 由表 1 可知,CP-25 在 0.005 ~ 0.080 g/L 范围内线性关系良好,其回归方程为: $Y = 281.28X - 8.9333$ ($R^2 = 0.9992$); 由表 2 和表 3 可知,CP-25 相对回收率较高,日内、日间测量值变异均小于 2.17%; 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 均小于 15%,符合样品分析条件,因此当前建立的方法学符合 CP-25 定量分析要求。

表 1 CP-25 标准曲线 ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

浓度 (g/L)	峰面积				4 个样本 平均峰面积	RSD (%)
	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4		
0.005	152.0	132.0	129.6	129.0	135.7 ± 8.2	6.0
0.010	216.1	276.6	241.2	234.8	242.2 ± 17.2	7.1
0.020	539.8	573.5	676.3	570.2	590.0 ± 43.2	7.3
0.040	1 034.1	1 057.0	1 249.4	1 088.0	1 107.1 ± 71.1	6.4
0.080	2 072.8	2 256.5	2 314.5	2 317.4	2 240.3 ± 83.8	3.7

2.7 CP-25 稳定性影响因素试验 影响 CP-25 稳定性主要因素为湿度,见表 4。虽然在相对湿度为 75% 的环境中 CP-25 性状没有明显变化,但其含量已经明显降低,熔点变化也较大;在相对湿度为

92.5% 环境中放置 5 d,其外观表现为淡黄色黏连物质;此外高温和光照对 CP-25 稳定也有一定影响。

表 2 CP-25 相对回收率 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

浓度 (g/L)	峰面积						回收率 (%)
	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6	
0.01	242.3	242.6	240.9	245.0	244.5	248.2	106.0 ± 0.9
0.02	558.4	560.7	593.8	589.0	576.6	576.2	101.4 ± 3.1
0.04	1 161.4	1 156.1	1 191.8	1 159.0	1 171.7	1 228.4	103.9 ± 1.1

表 3 精密度实验 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

浓度 (g/L)	日内精密密度			RSD (%)	日间精密密度			RSD (%)
	峰面积				峰面积			
0.01	237.7	236.5	240.8	0.69	240.7	238.9	241.7	0.43
0.02	573.5	577.8	577.9	0.33	593.5	580.7	587.3	0.73
0.04	1 099.0	1 116.3	1 162.6	2.17	1 148.9	1 168.3	1 116.3	1.64

表 4 CP-25 稳定性的影响因素 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

影响因素	时间 (d)	性状	CP-25 含量 (%)	熔点 (°C)
光照 (4 500 ± 500) Lx	0	白色结晶粉末	100	103 ~ 105
	5	白色结晶粉末	97.68 ± 0.02	102 ~ 105
	10	白色结晶粉末	92.24 ± 0.01	104 ~ 106
25 ~ 30 °C 下湿度 92.5%	0	白色结晶粉末	100	103 ~ 105
	5	吸湿性	81.77 ± 0.03	-
	10	吸湿性	74.73 ± 0.03	-
25 ~ 30 °C 下湿度 (75 ± 1) %	0	白色结晶粉末	100	103 ~ 104
	5	白色结晶粉末	96.74 ± 0.02	104 ~ 106
	10	白色结晶粉末	89.19 ± 0.01	107 ~ 109
温度 (60 ± 5) °C	0	白色结晶粉末	100	104 ~ 105
	5	白色结晶粉末	98.24 ± 0.01	106 ~ 110
	10	白色结晶粉末	94.75 ± 0.03	109 ~ 110

注: - 未测

2.8 CP-25 溶解度实验 常温下,CP-25 在强极性溶剂水以及非极性溶剂石油醚中均微溶 (< 10 g/L),此外溶液 pH 值对 CP-25 影响较小,见表 5。

表 5 常温下 CP-25 在不同溶剂中的溶解度 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

生产日期	溶液	浓度 (g/L)	溶解度 (g/L)
2011-05-21	蒸馏水	4.16	4.49 ± 0.47
2011-06-09	蒸馏水	4.13	
2011-07-23	蒸馏水	5.19	
2011-05-21	pH 1.2 缓冲液	6.45	6.03 ± 0.28
2011-06-09	pH 1.2 缓冲液	5.75	
2011-07-23	pH 1.2 缓冲液	5.89	
2011-05-21	pH 6.8 缓冲液	3.14	2.88 ± 0.18
2011-06-09	pH 6.8 缓冲液	2.71	
2011-07-23	pH 6.8 缓冲液	2.78	
2011-05-21	pH 7.4 缓冲液	3.52	3.74 ± 0.14
2011-06-09	pH 7.4 缓冲液	3.86	
2011-07-23	pH 7.4 缓冲液	3.83	
2011-05-21	石油醚	8.25	8.99 ± 1.27
2011-06-09	石油醚	10.89	
2011-07-23	石油醚	7.81	

3 讨论

本实验通过考察 CP-25 外观、紫外最大吸收波长、颜色反应、薄层色谱图和影响因素稳定性试验初步明确其理化性质。本研究结果表明: CP-25 是白色结晶状粉末。其具有萜类化合物特征性颜色反应,其最大紫外吸收波长为 220 nm; 氯仿-甲醇体系展开剂适合 CP-25 薄层色谱鉴定。这几种方法灵敏度较高,可用于 CP-25 质量标准制定。与光照和高温相比,湿度对 CP-25 稳定性影响更大,在相对湿度为 92.5% 环境中放置 5 d,其含量明显下降,表现为淡黄色黏连物质,这可能与具有轻微吸湿性有关。因此,CP-25 及其制剂储存环境应尽量保持避光、低温和干燥。

溶解度实验结果表明 CP-25 微溶于强极性溶剂水和非极性溶剂石油醚中,且溶液 pH 值对其溶解度影响较小,提示 CP-25 采用胶囊、颗粒剂和片剂等常规制剂口服给药在整个胃肠道溶出度均较差,不利于药物吸收和药效发挥。有文献^[12-14]报道溶解性较低药物可采用乳剂、脂质体和环糊精包合技术等提高药物肠道吸收性能,具体有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王巧,刘荣霞,毕开顺,等. HPLC 法测定白芍总苷胶囊中芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷[J]. 中草药, 2005, 36(11): 1630-2.
- [2] 王春,李传应,袁君,等. 白芍总苷联合强的松治疗豚鼠变态性接触性皮炎[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(11): 1315-9.
- [3] 王晓玉,魏伟,唐丽琴,等. 芍药苷对佐剂性关节炎大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能及其产生细胞因子的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2007, 42(2): 189-91.
- [4] Wang Q T, Zhang L L, Wu H X, et al. The expression change of β -arrestins in fibroblast-like synoviocytes from rats with collagen-induced arthritis and the effect of total glucosides of paeony [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133(2): 511-6.
- [5] Chen J Y, Wu H X, Chen Y, et al. Paeoniflorin inhibits proliferation of fibroblast-like synoviocytes through suppressing G-protein-coupled receptor kinase 2 [J]. *Planta Med*, 2012, 78(7): 665-71.
- [6] 王芬,徐建华,徐胜前,等. 白芍总苷治疗类风湿关节炎 IV 临床试验研究[J]. 安徽医科大学学报, 2001, 36(4): 282-3.
- [7] 王燕,邢华燕. 白芍总苷联合甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎临床分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(9): 839-40.
- [8] Wang C, Yuan J, Yang Z Y, et al. Pharmacokinetics of paeoniflorin microemulsion after repeated dosing in rats with adjuvant arthritis [J]. *Pharmazie*, 2012, 67(12): 997-1001.
- [9] Liu Z Q, Jiang Z H, Liu L, et al. Mechanisms responsible for poor oral bioavailability of paeoniflorin: Role of intestinal disposition and interactions with sinomenine [J]. *Pharm Res*, 2006, 23(12): 2768-80.
- [10] 国家药典委员会. 国家药品标准. 新药转正标准第 38 册[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 106.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 二部. 2010 版. 北京: 中国医药出版社, 2010: 附录, 199.
- [12] Cheng Y, Peng C, Wen F, et al. Pharmacokinetic comparisons of typical constituents in white peony root and sulfur fumigated white peony root after oral administration to mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 129(2): 167-73.
- [13] Astruc-Diaz F, McDaniel S W, Xu J J, et al. *In vivo* efficacy of enabling formulations based on hydroxypropyl- β -cyclodextrins, micellar preparation, and liposomes for the lipophilic cannabinoid CB2 agonist, MDA7 [J]. *J Pharm Sci*, 2013, 102(2): 352-64.
- [14] Khan F, Islam M S, Roni M A, et al. Systematic development of self-emulsifying drug delivery systems of atorvastatin with improved bioavailability potential [J]. *Sci Pharm*, 2012, 80(4): 1027-43.

Study on paeoniflorin-6'-O-benzene sulfonate's physicochemical property

Wang Chun, Yuan Jun, Wei Wei

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine (Anhui Medical University), Ministry of Education, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the physicochemical property of Pae-6'-O-benzene sulfonate (CP-25). **Methods** The CP-25 physicochemical property was evaluated by appearance, Lieberman-Burchard reaction, thin-layer chromatogram, Ultraviolet Spectrophotometry (UV), solubility and stability. The content of CP-25 was assayed by high performance liquid chromatography. **Results** The CP-25 had color response featured by terpenoid, and its maximum UV absorption wavelength was 220 nm. CP-25 was slightly soluble in water and petroleum ether. The main influence factor of CP-25 stability was humidity. **Conclusion** The present study provides experimental basis for quality standard and formulation design of CP-25.

Key words Pae-6'-O-benzene sulfonate; physicochemical property; thin-layer chromatogram; high performance liquid chromatography