

杠柳毒苷在模拟消化液中的稳定性研究*

王 焱,任晓亮,潘桂湘,戚爱棣,高秀梅

摘要: [目的] 考察杠柳毒苷在模拟人体消化道液中的稳定性。[方法] 配制不同 pH 值的模拟消化液,采用高效液相色谱法,检测杠柳毒苷在各种模拟消化液中的含量变化,并利用薄层鉴别、高效液相色谱-质谱联用法对水解产物进行定性分析。[结果] 杠柳毒苷在模拟空腹胃液 (pH=1.2) 中 1 h 含量降低 22.2%,其水解产物为脱去两分子糖的杠柳苷元,在模拟进食胃液、小肠液、大肠液中 0~6 h 含量均无变化。[结论] 杠柳毒苷在不同 pH 值的模拟消化液中的稳定性不同,在模拟进食胃液、小肠液、大肠液中稳定,在模拟空腹胃液中不稳定,可被水解为杠柳苷元。模拟消化液的 pH 值是影响杠柳毒苷稳定性的重要因素,模拟消化液中的胃蛋白酶、胰蛋白酶不影响杠柳毒苷的稳定性。

关键词: 杠柳毒苷,杠柳苷元,模拟消化液,稳定性

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1673-9043(2007)02-0074-03

Stability of periplocin in the mimetic digestive fluid

WANG Yan, REN Xiao-liang, PAN Gui-xiang, et al

(Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To investigate the stability of Periplocin in mimetic gastrointestinal fluids. [Methods] Different pH values of mimetic gastrointestinal fluids were prepared. High performance liquid chromatography (HPLC) method was used to detect the variation of Periplocin in mimetic gastrointestinal fluids and the hydrolysate was qualified by thin layer chromatography (TLC) and HPLC coupled with mass spectrometry (LC-MS). [Results] The content of Periplocin decreased to 22.2% in an hour in mimetic gastric fluid in fasting state (pH=1.2), the hydrolysate was periplogenin. However, there wasn't evident variation up to 6 hours in mimetic gastric fluid, small intestinal fluid and large intestinal fluid in feeding state. [Conclusions] The stability of Periplocin is different in different pH values of mimetic gastrointestinal fluids. It was stable in mimetic gastric fluid, small intestinal fluid and large intestinal fluid in feeding state but not in gastric fluid in fasting state and can be hydrolyzed into periplogenin. The stability of Periplocin in mimetic gastrointestinal fluids was pH-dependent and wasn't influenced by pepsin and trypsin.

Key words: periplocin; periplogenin; mimetic gastrointestinal fluids; stability

杠柳毒苷 (Periplocin) 是中药香加皮 (Cortex Periplocae) 的主要强心成分,其结构式含杠柳苷元-D-(加拿大麻糖)-D-(葡萄糖)。现代药理研究表明,杠柳毒苷强心作用具有速度快,持续时间短,无蓄积作用等特点。目前香加皮作为传统中药多用于治疗心力衰竭的复方中,以口服方式给药^[1-2],国内外对其在机体内的代谢转化尚无研究。对于口服给药方式,药物在消化道内的稳定性是其在机体内吸

收、代谢和起效的一个重要环节,因此笔者对杠柳毒苷在体外模拟消化液中的稳定性及转化情况进行考察,以便进一步对其体内代谢进行研究,为指导合理用药提供科学依据。

1 实验部分

1.1 实验材料 Waters 515 高效液相色谱系统, Waters 2487 紫外检测器;液相色谱-质谱联用系统 HP1100 高效液相色谱系统 (配二极管阵列检测器) Finnigan 离子阱质谱仪 (LCQ Advantage Max, USA, ESI 离子源); AX205 分析天平、DELTA 320 pH 计,恒温水浴、台式离心机;杠柳毒苷对照品 (本所自制),胃蛋白酶和胰蛋白酶 (北京鼎国生物技术有限责任公司),乙腈 (色谱纯),超纯水,其他试剂

* 基金项目:天津市科技发展计划项目(05YFJZJC01102),天津市科委应用基础研究计划项目(07JCYBJC01800)

作者单位:300193 天津中医药大学

作者简介:王 焱 (1977-) 女,硕士,主要从事中药药物分析的研究工作。

为分析纯。

1.2 测定条件

1.2.1 含量测定 Agilent Zorbax C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm 5 μm Agilent USA) 流动相为乙腈水(29:71), 流速为 1 mL/min, 柱温为室温, 检测波长 220 nm。

1.2.2 液质条件 Agilent Zorbax C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm 5 μm Agilent USA) 流动相为甲醇水(40:60), 流速为 0.2 mL/min, 柱温为 25 °C, 检测波长 220 nm。质谱参数: 喷雾电压 4.5 kV, 毛细管温度 300 °C, 毛细管电压 37 V, 壳气流速 40 arb, 辅助气流速 5 arb, 正离子模式, MS 监测 m/z=190~900 总离子流信号, MS/MS 模式, 碰撞能量 20%, 监测 m/z=100~900 总离子流信号。

1.3 含量测定的方法学考查

1.3.1 标准曲线的制备 精密称取 10 mg 杠柳毒苷对照品, 置于 100 mL 容量瓶中, 用水溶解定容至刻度, 摇匀, 即得杠柳毒对照品贮备液, 浓度为 0.10 mg/L。

精密吸取杠柳毒苷对照品贮备液适量, 用水配制成浓度分别为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10、20 mg/L 的杠柳毒苷对照品溶液, 进样 10 μL, 每个浓度平行操作 3 份, 以峰面积(Y)平均值为纵坐标, 进样量(X)为横坐标作图, 得回归方程为 $Y=1.47 \times 10^4 X - 8.20 \times 10^2$, $r=0.9999$, 线性范围为 0.002~0.2 μg。

1.3.2 精密度考察 精密吸取杠柳毒苷对照品贮备液适量, 用水配制成浓度分别为 0.6、3、15 mg/L 的杠柳毒苷对照品溶液, 每个浓度重复进样 5 次, 测得低、中、高浓度杠柳毒苷峰面积(RSD)分别为 2.9%、1.9%、1.7%。

1.3.3 准确度考察 考察与模拟胃液离子强度相当的溶液和模拟小肠液中测定的准确度。精密吸取杠柳毒苷对照品贮备液适量, 分别用与模拟胃液离子强度相当的溶液[0.05 mol/L 氯化钠(NaCl)溶液]和模拟小肠液(pH=6.8 磷酸盐缓冲液)配制成浓度分别为 0.6、3、15 mg/L 杠柳毒苷对照品溶液, 进样 10 μL, 将测得的峰面积带入标准曲线求得杠柳毒苷的含量, 每个浓度平行操作 5 份。测得模拟胃液低、中、高浓度杠柳毒苷的回收率分别为 103.4%、102.7%、101.3%, RSD 分别为 1.3%、1.9%、1.6%。模拟肠液低、中、高浓度杠柳毒苷的回收率分别为 100.5%、101.9%、102.8%, RSD 分别为 2.7%、2.2%、0.9%。

1.4 模拟消化液中的稳定性考察

1.4.1 模拟消化液的配制 胃液的主要成分是胃酸(盐酸), 空腹时胃液的 pH 值为 0.9~1.5, 饮水或

进食后 pH 值可上升为 3.0~5.0; 小肠液的 pH 值为 5.0~7.4, 大肠液的 pH 值为 8.0~9.0。本实验依据《中国药典》2005 版, 配制模拟空腹胃液和模拟小肠液, 在此基础上采用碳酸钠(Na₂CO₃) 溶液和氢氧化钠(NaOH) 溶液调节 pH 值配制模拟进食胃液和大肠液。每 100 mL 模拟空腹胃液加 1 g 胃蛋白酶, 每 100 mL 模拟小肠液加 1 g 胰蛋白酶, 作为含酶模拟消化液。配制的 6 种模拟消化液包括: 空腹胃液(含酶、无酶) pH 值为 1.2, 进食胃液(无酶) pH 值为 4.9, 小肠液(含酶、无酶) pH 值为 6.8, 大肠液(无酶) pH 值为 8.7。

1.4.2 样品溶液的配制 精密吸取杠柳毒苷对照品贮备液 0.3 mL, 分别用以上 6 种模拟消化液稀释至 2 mL, 涡旋混匀, 样品溶液浓度为含杠柳毒苷 15 mg/L。

1.4.3 样品的测定 将 1.4.2 项下的每种消化液样品分别分装至 6 支具塞试管中放置于 37 °C 水浴中, 于 0、0.5、1、1.5、2、4、6 h 取样进行含量测定, 含酶的样品用乙腈稀释 1 倍后 4000 r/min 离心 5 min 取上清液测定, 进样量 10 μL, 实验在不同天重复 3 次。

2 结果

2.1 模拟消化液中杠柳毒苷的含量变化 杠柳毒苷在不同模拟消化液中的稳定性有所差异, 在空腹胃液中随时间含量逐渐降低, 1 h 含量降低 22.3%, 6 h 降低 79.4%, 在色谱图中约在 10.9 min 处有一新峰产生, 见图 1。在无酶的空腹胃液、进食胃液、小肠液、大肠液中 0~6 h 含量无变化, 结果见表 1。另外, 分别对无酶和含酶的空腹胃液见图 2、小肠液见图 3 进行比较, 结果说明加入胃蛋白酶、胰蛋白酶对其含量变化没有明显影响。

2.2 模拟空腹胃液中杠柳毒苷水解产物定性研究 对杠柳毒苷在模拟空腹胃液中出现的水解产物进行定性分析。该物质经薄层板分析用 3,5-二硝基苯甲酸和 NaOH 交替显色后呈紫红色, 证明其可能有强心苷母核, 对其进行 ESI-MS 一级和二级质谱分析, 正离子模式全谱中显最强峰 m/z391, 符合杠柳毒元[M+H]⁺离子, 见图 4。以 20% 的能量对该离子进行二

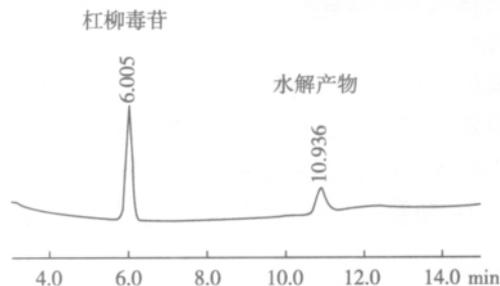


图 1 杠柳毒苷模拟空腹胃液 37 °C 1 h 的色谱图

表 1 杠柳毒苷在不同 pH 模拟消化液(无酶)中的含量变化($\bar{x} \pm s, n=3$) μg

取样时间 (h)	杠柳毒苷的平均含量			
	空腹胃液	进食胃液	小肠液	大肠液
0	0.170 \pm 0.028	0.159 \pm 0.006	0.164 \pm 0.014	0.161 \pm 0.004
0.5	0.153 \pm 0.019	0.160 \pm 0.006	0.157 \pm 0.017	0.162 \pm 0.004
1	0.132 \pm 0.023	0.161 \pm 0.006	0.159 \pm 0.015	0.161 \pm 0.005
1.5	0.117 \pm 0.019	0.161 \pm 0.007	0.163 \pm 0.011	0.161 \pm 0.004
2	0.103 \pm 0.015	0.157 \pm 0.008	0.165 \pm 0.010	0.161 \pm 0.003
4	0.059 \pm 0.009	0.163 \pm 0.006	0.166 \pm 0.009	0.162 \pm 0.003
6	0.035 \pm 0.007	0.162 \pm 0.006	0.169 \pm 0.013	0.161 \pm 0.004

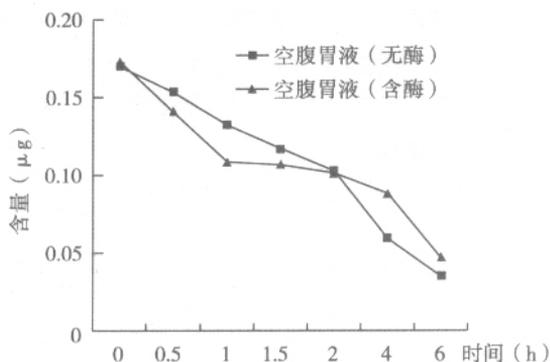


图 2 杠柳毒苷在无酶和含酶模拟空腹胃液中的含量变化趋势比较

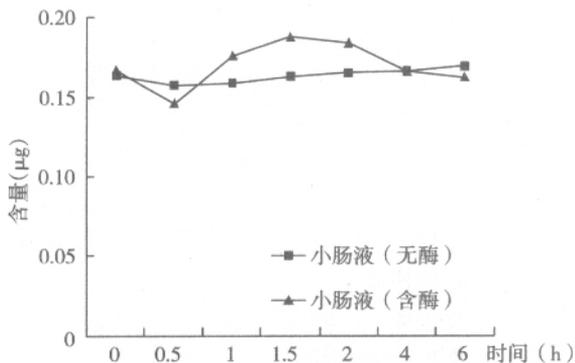


图 3 杠柳毒苷在无酶和含酶模拟小肠液中的含量变化趋势比较

级质谱分析,得到了 m/z 373、355、337 碎片离子,见图 5,应是杠柳苷元上 3 个羟基连续脱去一分子水(H_2O)得到。说明杠柳毒苷在模拟空腹胃液出现的这一新物质为杠柳苷元。

3 讨论

模拟消化液的 pH 值是影响杠柳毒苷稳定性的重要因素。杠柳毒苷在 $\text{pH}=1.2$ 的模拟空腹胃液环境中不稳定,水解产物为脱去糖基部分(D-加拿大麻糖和 D-葡萄糖)的杠柳苷元,在其他模拟消化液

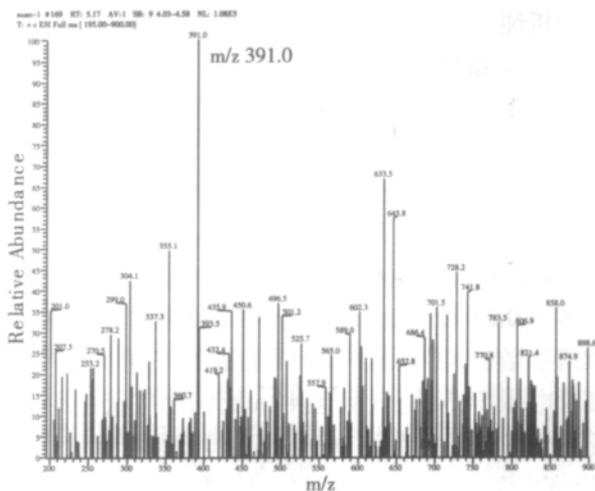


图 4 水解产物一级质谱图

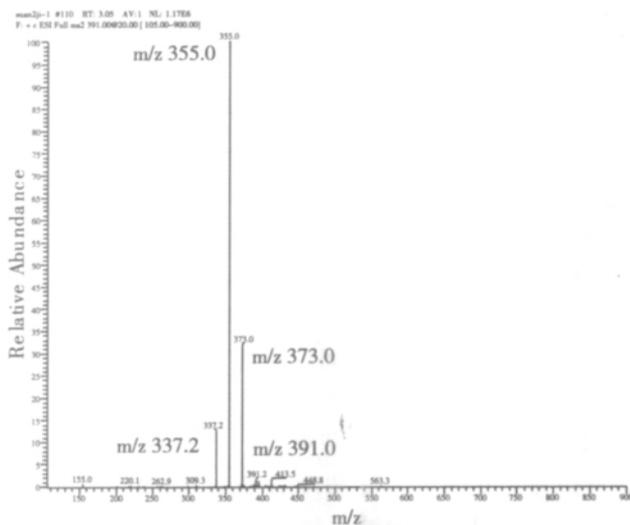


图 5 水解产物二级质谱图

环境中 6 h 内稳定。这主要是由于糖苷键在较强的酸性环境中发生了水解反应。胃蛋白酶与胰蛋白酶对杠柳毒苷的稳定性没有显著影响,这是由于酶具有特异性,蛋白酶只能水解蛋白与多肽中的肽键,而不能水解杠柳毒苷中的糖苷键。杠柳毒苷在不同 pH 值的模拟消化液中的稳定性差异也表明在口服给药时,存在以原形或水解产物吸收入血的可能,需待进一步研究。

参考文献:

[1] 王敏,贾燕平. 抗心衰中药复方参加片的临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2005,32(2):135-136.
[2] 徐利强,卢红治,张雅莉. 北五加皮合剂治疗慢性充血性心力衰竭 147 例临床观察[J]. 云南中医中药杂志, 1998, 19(4):29-30.

(收稿日期 2006-09-04)