

10-甲氧基喜树碱平衡溶解度和表观油水分配系数的测定

康传哲¹, 张明珠², 陈岩¹, 马满玲^{1*}, 王洋^{2*}

(1. 哈尔滨医科大学附属第一医院, 哈尔滨 150001; 2. 东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心, 东北油田盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:测定 10-甲氧基喜树碱在不同溶剂中的平衡溶解度以及在正辛醇-水和正辛醇-缓冲液体系中的表观油水分配系数,为新型制剂的设计和制备提供参考。**方法:**采用高效液相色谱法(HPLC)测定 10-甲氧基喜树碱在不同溶剂和缓冲溶液中的平衡溶解度;采用摇瓶法测定 10-甲氧基喜树碱在正辛醇-水/缓冲液体系中的表观油水分配系数。**结果:**确定了 10-甲氧基喜树碱在 10 种溶剂和 8 种 pH 的缓冲溶液中的溶解度,25 ℃时 10-甲氧基喜树碱在水中的平衡溶解度为 1.01 mg·L⁻¹,在三氯甲烷-甲醇(1:1)、三氯甲烷及甲醇有机溶剂中溶解性较好;在酸性缓冲溶液中的平衡溶解度较水中略有增加;在碱性缓冲溶液中的平衡溶解度随 pH 增强而增加;25 ℃时 10-甲氧基喜树碱的正辛醇/水的表观分配系数为 29.15(lg P = 1.46),在正辛醇/pH 1.0 的磷酸盐缓冲液中表观油水分配系数较大[57.29(lg P = 1.76)]。**结论:**10-甲氧基喜树碱难溶于水而微溶于甲醇等有机溶剂。增大 pH 可增加 10-甲氧基喜树碱的溶解度,在强酸性条件下 10-甲氧基喜树碱有较大的油水分配系数。

[关键词] 10-甲氧基喜树碱;平衡溶解度;表观油水分配系数;高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)09-0133-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014090133

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfx.000042.html>

[网络出版时间] 2014-02-25 11:19

Determination of Equilibrium Solubility and Apparent Oil/Water Partition Coefficient of 10-methoxycamptothecin

KANG Chuan-zhe¹, ZHANG Ming-zhu², CHEN Yan¹, MA Man-ling^{1*}, WANG Yang^{2*}

(1. The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China;

2. Alkali Soil Natural En-vironmental Science Center, Northeast Forestry University/Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration in Oil Field, Ministry of Education, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To determine equilibrium solubility of 10-methoxycamptothecin (10-MCPT) in various media and its partition coefficients for the *n*-octanol-water/buffer solution systems which would settle fundament for the design and manufacture of a new dosage form. **Method:** HPLC was used to determine equilibrium solubilities of 10-MCPT. Using shake flask method determination of 10-MCPT in octanol-water/buffer liquid apparent oil-water partition coefficient of system. **Result:** For the first time 10-MCPT in 10 kinds of solvents and pH buffer solution of solubility were identified, at 25 ℃ when the 10-MCPT equilibrium solubility in water of 1.01 mg·L⁻¹, the chloroform-methanol 1:1, chloroform and methanol had good solubility in organic solvents. The equilibrium solubility in acid buffer solution was a slight increase in water; in alkaline buffer solution of the equilibrium solubility increases with pH increased; at 25 ℃ 10-MCPT was octanol/water apparent partition

[收稿日期] 20130506(003)

[基金项目] 引进国际先进林业科学技术项目(2012-4-04)

[第一作者] 康传哲, 硕士, 从事药物制剂新技术的开发研究, E-mail: 543839478@qq.com

[通讯作者] * 马满玲, 副教授, 硕士研究生导师, 主任药师, 从事药物制剂新技术的开发研究, E-mail: mamanling@126.com;

* 王洋, 教授, 博士研究生导师, 从事植物次生代谢产物及林源活性物质研究, E-mail: wangyang0815@126.com

coefficient of 29.15 lg ($P = 1.46$), are in octanol/pH 1.0 apparent oil-water partition coefficient is larger in the phosphate buffer [57.29] lg ($P = 1.76$). **Conclusion:** 10-MCPT poorly soluble in water and slightly soluble in methanol and other organic solvents. Increases of the pH can increase the solubility of 10-MCPT, under the condition of strong acid 10-MCPT have larger oil-water partition coefficient.

[**Key words**] 10-methoxycamptothecin; equilibrium solubility; apparent oil-water partition coefficient; HPLC

10-甲氧基喜树碱(10-methoxycamptothecin, 10-MCPT)是我国特有珙桐科植物喜树中含有的一种生物碱。1966 年 Wall 等^[1]首先从喜树中分离出具有抗肿瘤活性的喜树碱(camptothecin, CPT), 但因其水溶性差及伴有严重的细胞毒性限制了它的进一步应用。1969 年他们又从喜树中分离得到了具有抗肿瘤活性的 10-羟基喜树碱(10-hydroxycamptothecin, 10-HCPT)和 10-MCPT。喜树碱类药物的抗肿瘤活性主要通过选择性的抑制 DNA 拓扑异构酶(TOPOI), 抑制 DNA 的复制和转录进而使细胞出现程序性凋亡和死亡^[2-3]。由于 10-MCPT 水溶性差、体内半衰期短、结构不稳定及伴有严重的细胞毒性, 限制了其进一步的研究。最近, Zheng 等^[4]研究发现, 10-MCPT 对 2774 卵巢癌细胞系的活性比 10-HCPT 更强, 而且 HCPT 是 10-MCPT 在血浆中的代谢产物之一, 具有成为新型的抗肿瘤药物的潜力。

本文对 10-MCPT 的平衡溶解度、表观油水分配系数等理化参数进行测定, 为 10-MCPT 体内吸收代谢研究、新剂型的设计与开发以及其他药学研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪(1525 型二元泵、717 型自动进样器、2996 型紫外检测器, 美国 Waters 公司), BL-310 1/10 万型电子分析天平(德国 Sartorius 公司), pH S-25 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司), QYC2102C 型水浴恒温振荡器(上海福玛实验设备有限公司), Sorvall Legend Micro 17 型离心机(美国 Thermo 公司), KQ-50 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 10-甲氧基喜树碱(自制, 批号 20110925, 经 HPLC 测定其纯度 > 99%), 甲醇(色谱纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司, 纯度 ≥ 99.9%), 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 10-MCPT 体外分析方法的建立

2.1.1 检测波长的确定 取适量 10-MCPT 置于

10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 以相同溶剂为空白, 于 190 ~ 450 nm 扫描, 根据扫描图谱选择最适检测波长。结果可知, 10-MCPT 在 221, 266, 328, 380 nm 波长处有最大吸收。笔者选择 266 nm 作为检测波长。

2.1.2 色谱条件 Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(60:40), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 进样量 20 μL, 检测波长 266 nm, 柱温 30 °C。

2.1.3 溶液的配制 取 10-MCPT 1 mg 精密称定, 置 10 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释定容至刻度, 得 100 mg · L⁻¹ 的 10-MCPT 标准储备液, 置于 -20 °C 冰箱低温避光保存备用。

2.1.4 系统适用性实验 精密量取 100 mg · L⁻¹ 10-MCPT 标准储备液 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 取 20 μL 按 2.1.2 项下的色谱条件进样, 记录色谱峰, 见图 1。结果表明在上述色谱条件下 10-MCPT 峰形对称, 保留时间为 8.20 min。

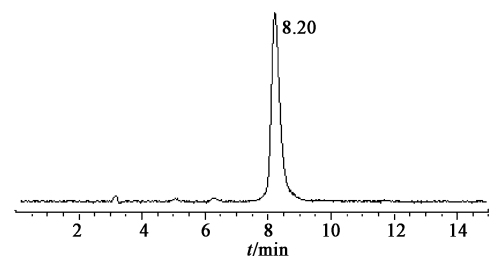
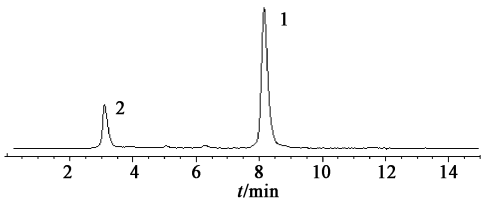


图 1 10-MCPT 的 HPLC

2.1.5 10-MCPT 内酯型和羧酸盐型色谱峰分离 精密量取 100 mg · L⁻¹ 10-MCPT 标准储备液 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中, 用 pH 5.5 的磷酸盐缓冲液稀释至刻度, 取 20 μL 按 2.1.2 项下的色谱条件进样, 记录色谱峰。见图 2, 可见 10-MCPT 内酯型和羧酸盐型的两种形式可以通过 HPLC 有效分离。

2.1.6 10-MCPT 标准曲线的制备 精密量取质量浓度 100 mg · L⁻¹ 的 10-MCPT 标准储备液, 分别用甲醇稀释成 0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 20 mg · L⁻¹ 等一系列标准溶液。取 20 μL 按 2.1.2 项下色谱条件进样, 记录色谱峰。以 10-MCPT 质量浓度 X (mg · L⁻¹) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归, 得 10-



1. 内酯型; 2. 羧酸盐型

图 2 10-MCPT 内酯型和羧酸盐型的 HPLC

MCPT 的线性回归方程 $Y = 31\,235X - 5\,380.5$ ($R^2 = 0.999\,9$),表明在 $0.5 \sim 20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 10-MCPT 质量浓度和峰面积呈良好的线性相关性。

2.1.7 精密度试验 选择质量浓度为 $0.5, 4.0, 20.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 10-MCPT 标准溶液作为低、中、高 3 种浓度,1 d 内连续测定 6 次,考察其日内精密度;另每天各浓度测定 1 次,连续测定 6 d,考察其日间精密度^[4],结果见表 1。

表 1 10-MCPT 的精密度试验 ($n = 6$)

质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	日内		日间	
	$\bar{x}$	RSD/%	$\bar{x}$	RSD/%
0.5	0.503	0.99	0.496	1.14
4.0	4.011	0.34	4.013	0.53
20.0	20.03	0.27	20.02	0.32

2.2 10-MCPT 在不同溶剂中的平衡溶解度测定 分别取各种溶剂 5 mL 置于 10 mL 具塞碘量瓶中,然后加入过量的 10-MCPT,超声使药物不再溶解,置水浴恒温振荡器中,在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 次/min 的条件下振荡 48 h,经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,弃去初滤液,取续滤液 1 mL,用甲醇稀释至适当浓度,取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 按 2.1.2 项下的色谱条件进样,记录色谱峰面积^[5]。按外标法按峰面积计算 10-MCPT 在不同溶剂中的溶解度,结果见表 2。

2.3 10-MCPT 在不同 pH 缓冲溶液中的平衡溶解度 分别取各种不同 pH 的磷酸盐缓冲溶液 5 mL 置于 10 mL 具塞碘量瓶中,然后加入过量的 10-MCPT,超声使药物不再溶解,置水浴恒温振荡器中,在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 次/min 的条件下振荡 48 h,经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,弃去初滤液,取续滤液 1 mL,用甲醇稀释至适当浓度,以 2.1.2 项下的色谱条件,取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 进样,记录色谱峰面积^[6],按外标法按峰面积计算 10-MCPT 在不同 pH 缓冲溶液中的总含量和内酯型的含量,分别计算各内酯型和羧酸盐型 10-MCPT 所占百分比,并计算饱和溶解度和内酯型 10-MCPT 溶解度,结果见表 3。

表 2 10-MCPT 在不同溶剂中的平衡溶解度

溶剂	平衡溶解度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	溶剂	平衡溶解度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
蒸馏水	1.01	三氯甲烷	596.33
甲醇	205.29	三氯甲烷-甲醇(1:1)	996.99
乙醇	129.48	乙酸乙酯	240.96
正丁醇	112.53	乙腈	161.56
正辛醇	181.34	二甲基亚砜	792.98

表 3 10-MCPT 在不同 pH 缓冲溶液中的平衡溶解度

pH	内酯型比率 /%	平衡溶解度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
		总溶解度	内酯型溶解度
1.0	100	18.19	18.19
2.0	100	0.92	0.92
3.0	100	0.47	0.47
4.0	81	0.69	0.56
5.5	65	0.78	0.51
6.5	53	0.98	0.52
7.4	23	2.91	0.66
8.0	9.7	8.68	0.84

2.4 10-MCPT 在正辛醇/水/磷酸盐缓冲液中表观油水分配系数的测定 取 10-MCPT 1 mg 精密称定,置于 25 mL 量瓶中,用水饱和的正辛醇溶液溶解并定容至刻度,得 $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的正辛醇溶液^[7],取该溶液 2 mL,置 10 mL 具塞碘量瓶中,分别加入正辛醇饱和的水、pH 1.0,3.0,4.0,5.0,6.0,6.5,7.0,7.4,8.0 的磷酸盐缓冲溶液各 2 mL^[8-9],密塞避光,置水浴恒温振荡器中,在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 次/min 的条件下振荡 48 h,静置分层后,离心 ($13\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min),精密量取上层油相 0.1 mL ,用甲醇稀释至适当浓度,以 2.1.2 项下的色谱条件,取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 进样,记录峰面积,按外标法以峰面积计算油相 10-MCPT 的浓度 C_1 。按公式计算表观油水分配系数。

$$P = \frac{C_1 V_1}{C_0 V_0 - C_1 V_1}$$

P 为 10-MCPT 的表观油水分配系数, C_0 为 10-MCPT 在正辛醇中的初始质量浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), V_0 为被水饱和的正辛醇体积, C_1 为药物分配平衡时在油相中的质量浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), V_1 为油相体积。10-MCPT 在正辛醇/水体系中的表观油水分配系数 P 为 29.15 ($\lg P = 1.46$),10-MCPT 在正辛醇/不同 pH 磷酸盐缓冲液体系中的表观油水分配系数结果见图 3。

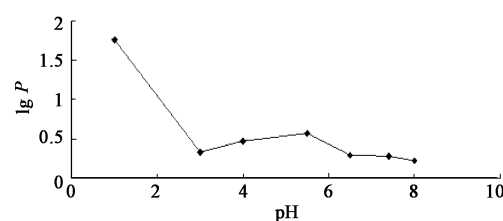


图 3 10-MCPT 在正辛醇/不同 pH 磷酸盐缓冲液体系中的表观油水分配系数

3 讨论

10-MCPT 结构中含有一个内酯环,在水溶液中以闭环的内酯型和开环的羧酸盐型两种形式存在,在碱性的环境下,10-MCPT 迅速开环成盐;在酸性的环境下又可重新闭环。其平衡溶解度随着 pH 的变化而变化,根据不同值缓冲溶液中的平衡溶解度的测定结果可知 10-MCPT 平衡溶解度基本上随着碱性的增强而增加,在 pH 3.0 时平衡溶解度最低,在 pH 1.0 时 10-MCPT 的平衡溶解度比 pH 6.5,7.4 时要高,从这一点可以推测当在胃中达到饱和时进入肠道后可能会因过饱和而沉淀析出^[10],所以不同 pH 缓冲溶液中 10-MCPT 的平衡溶解度的测定结果为设计、开发口服制剂提供了参考^[11]。

药物必须具有一定的水溶性及脂溶性,使其能透过生物膜而被吸收,正辛醇/缓冲溶液分配系数和正辛醇/水分配系数在预测药物定量结构-吸收上具有重要意义^[12-13]。有研究表明,较小的 lg P 化合物吸收差,lg P > 1.0 的化合物吸收较好^[14]。实验结果表明,pH 1.0 时,10-MCPT 的 lg P 为 1.76,pH 3.0~8.0 时,lg P 为 0.23~0.57,均小于 1.0。可见 10-MCPT 在强酸性的环境中会有较好的吸收,而在 pH 3.0~8.0 吸收差。10-MCPT 的正辛醇/水分配系数为 29.15(lg P 1.46),表明其疏水性强不是限制其口服吸收的主要因素。对 10-MCPT 表观油水分配系数的测定,不仅可为 10-MCPT 新剂型的工艺提供基础数据,还为 10-MCPT 的构效关系、吸收代谢研究提供参考。

[参考文献]

[1] Wall M E, Wani M C, Cook C E, et al. Plant antitumor agent I: The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from

Camptotheca acuminata [J]. J Am Chem Soc, 1966, 88:3888.

[2] Hsiang T H, Liu L F. Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an Intracellular target of the anticancer drug camptothecin [J]. Cancer Res, 1988, 48 (7) : 1722.

[3] 张超,胡巍,方芸.雾化吸入羟基喜树碱对小鼠 B16 黑色素瘤实验性肺转移的影响 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (5) : 618.

[4] Zheng Jian, Zhang Rui, Wang Yang, et al. Development and validation of a RP-HPLC method with fluorescence detection for simultaneous determination of 10-methoxycamptothecin and its metabolite 10-hydroxycamptothecin in rat plasma [J]. J Chromatography B, 2012, 903:81.

[5] 郭宏伟,郑健,王洋,等. RP-HPLC 法测定小鼠血浆中 10-羟基喜树碱的浓度 [J]. 中国药房, 2011, 22 (1) : 13.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 XVD.

[7] 刘冰,吕佳. HPLC 测定苦参碱平衡溶解度和表观油水分配系数 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (20) : 43.

[8] 张蕾,李婷婷,陈孝健,等. 氧化槐果碱表观油水分配系数测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (3) : 130.

[9] 陆慧,贾晓斌,韦英杰,等. 灵芝三萜表观油水分配系数的测定及其在体肠吸收 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (21) : 12.

[10] Matteucci M E, Paguio J C, Miller M A, et al. Highly supersaturated solutions from dissolution of amorphous itraconazole microparticles at pH 6.8 [J]. Mol Pharm, 2009, 6 (2) : 375

[11] 蒲晓辉,孙进,何仲贵,等. RP-HPLC 法测定不同溶剂和缓冲溶液中羟基喜树碱的溶解度 [J]. 河南大学学报:医学版, 2012, 31 (1) : 20.

[12] 陆彬. 药物新剂型和新技术 [M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2005:384.

[13] 孙进. 现代药物制剂丛书-口服药物吸收与转运 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2006:322.

[14] 朱慧,耿婷,丁安伟,等. 荆芥内酯平衡溶解度和油水分配系数的测定 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35 (23) : 3144.

[责任编辑 邹晓翠]