

紫外分光光度法测定毛蕊花糖苷浓度 及其油水分配系数

张伦宁^{1,2}, 付桂明^{1,2,3}, 万茵^{1,2,*}

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047; 2. 南昌大学生命科学与食品工程学院食品系, 南昌 330031; 3. 南昌大学中德食品工程中心, 南昌 330047)

摘要: **目的** 测定毛蕊花糖苷的油水分配系数。**方法** 采用紫外分光光度法测定毛蕊花糖苷的浓度, 结合摇瓶法, 正辛醇-水系统测定毛蕊花糖苷的油水分配系数。**结果** 在 0~30 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 毛蕊花糖苷的浓度与吸光值成线性关系, 相关系数为 0.999; 平均回收率为 $(102.16 \pm 0.703)\%$, RSD 为 0.688% ($n=3$); 油水分配系数为 0.273, $\log P = -0.566$ ($n=3$), 说明毛蕊花糖苷易溶于水。**结论** 紫外分光光度法测定毛蕊花糖苷浓度操作简便, 准确性好, 可作为毛蕊花糖苷油水分配系数测定的方法。

关键词: 紫外; 毛蕊花糖苷; 油水分配系数

Determination of verbascoside and its oil-water partition coefficient by ultraviolet spectrophotometry

ZHANG Lun-Ning^{1,2}, FU Gui-Ming^{1,2,3}, WAN Yin^{1,2,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Food Engineering Department of Life Science and Food Engineering College, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 3. Sino-German Food Engineering Center, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

ABSTRACT: Objective To determine the oil-water partition coefficient of verbascoside. **Method** Ultraviolet spectrophotometry (UV) was used to determine the content of verbascoside. Shake-flash method, octanol-water system was employed to determine the oil-water partition coefficient of verbascoside. **Results** The content of verbascoside was linearly related to its absorbance values when the content was in the range of 0~30 $\mu\text{g/mL}$, and the correlation coefficient was 0.999. The average recovery was $(102.16 \pm 0.703)\%$, with RSD of 0.688% ($n=3$). And the oil-water partition coefficient was 0.273, $\log P = -0.566$ ($n=3$), which indicated that verbascoside could be freely dissolved in water. **Conclusion** The method for determination of verbascoside is simple and has good correctness in this study. It can be used to determine the oil-water partition coefficient of verbascoside.

KEY WORDS: ultraviolet spectrophotometry; verbascoside; oil-water partition coefficient

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31160316)

Fund: Supported by National Natural Science Foundation of China (31160316)

*通讯作者: 万茵, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然产物活性成分研究与开发, 食品化学。E-mail: yinwan@ncu.edu.cn

*Corresponding author: WAN Yin, Associate professor, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China. E-mail: yinwan@ncu.edu.cn

1 引言

毛蕊花糖苷(verbascoside),又名麦角甾苷、类叶升麻苷,是苯乙醇苷类中最早被发现的一种物质,也是分布于自然界中最为广泛的苯乙醇苷类物质之一,广泛存在于双子叶植物中。毛蕊花糖苷在大粒车前子(约 8.65 mg/g)^[1]、密蒙花(6.2~23 mg/g)^[2]、肉苁蓉(5.4~32.2 mg/g)^[3]中含量较高,是这些传统中药材的主要药效成分。它由一个酯键和两个糖苷键将 3,4-二羟基苯乙醇、苯丙素、鼠李糖和葡萄糖等四个结构单元连接而成,前二者都是典型的天然产物的活性单元,见图 1。研究表明毛蕊花糖苷具抗氧化^[4]、抗炎^[5]、保肝^[6]和降低尿酸水平^[7]等多种生理功能。

毛蕊花糖苷浓度的测定多用高效液相色谱法^[8,9],高效液相色谱法具有选择性好、检测灵敏度高和应用范围广等优点,但是操作复杂、成本高。紫外分光光度法具有仪器简单、操作方便、灵敏度高、相对误差小、有一定选择性等特点,目前,利用紫外分光光度法测定毛蕊花糖苷浓度的方法还未见报道,本文依据毛蕊花糖苷在紫外光谱下的吸收特征,用紫外分光光度法测定其浓度。

油水分配系数,又称脂水分分配系数,是同一种物质在有机相和水相中浓度的比值。天然产物的生物利用情况与物质进入生物机体后的溶解、吸收、分布、转运等一系列体内过程密切相关,而物质在体内的溶解、吸收、分布、转运都与其水溶性和脂溶性有关,即和油水分配系数有关,所以,测定物质的油水分配系数对研究物质在体内的过程有着重要的意义。实验证明,毛蕊花糖苷于静脉注射后,半衰期仅为 28 min^[10],很快地被清除。因此,对毛蕊花糖苷的理化性质进行研究能对其在体内的进一步研究提供理论基础。本试验采用经典的摇瓶法^[11],以正辛醇-水为系统测定毛蕊花糖苷的油水分分配系数^[12]。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

毛蕊花糖苷(本实验室利用柱层析、制备色谱技术从车前子原料中提取纯化, HPLC 纯度为 97.6%)、甲醇(分析纯,天津永大化学试剂公司)、正辛醇(分析纯,天津永大化学试剂公司)、蒸馏水(实验室自制)。

电子天平 FA1604(上海精密科学仪器有限公司);

紫外分光光度仪 UV-7504(上海精密科技仪器厂); UV-2450 型紫外分光光度计(日本岛津);离心机 5810R(德国 Eppendorf); 恒温振荡器 ZD-88(苏州威尔实验用品有限公司)。

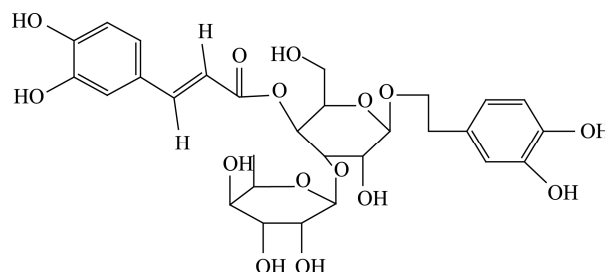


图 1 毛蕊花糖苷的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of verbascoside

2.2 方法

2.2.1 储备液的配制

准确称取毛蕊花糖苷 10.0 mg, 用甲醇溶解定容至 50 mL, 作为储备液。

2.2.2 水饱和正辛醇和正辛醇水饱和溶液的制备

用量筒量取 50 mL 正辛醇和 150 mL 蒸馏水于具塞三角瓶中。恒温振荡 24 h, 使其混合均匀, 相互饱和。置于分液漏斗, 静置过夜分层, 分离两相, 将两相界面附近的溶液弃去, 其余保存备用。上层为水饱和和正辛醇溶液, 下层为正辛醇饱和和水溶液^[13]。

2.2.3 紫外最大吸收波长的确定

取适量毛蕊花糖苷储备液, 稀释至适当浓度, 在 200~450 nm 波长下扫描最大吸收波长。

2.2.4 标准曲线的绘制

取储备液分别稀释至 30、20、15、10、5 μg/mL, 于最大吸收波长处测定其吸光度值 A, 以吸光度 A 与毛蕊花糖苷浓度建立标准曲线。

2.2.5 精密度的测定

准确移取储备液 0.4、0.8、1.2 mL 至 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容。于最大吸收波长处测定其吸光度值, 每天测 3 次, 每次间隔 7 h, 连续测 5 天, 根据标准曲线算出相应的浓度, 计算其相应的日内、日间精密度。

2.2.6 回收率的测定

准确移取储备液 0.4、0.8、1.2 至 10 mL 容量瓶中, 再分别准确移取水饱和正辛醇 0.1 mL, 甲醇定容至刻度, 在最大吸收波长处测定吸光度, 计算实测质

量浓度, 每组平行测定 3 次。根据实测值与理论值的比值, 计算回收率。

2.2.7 油水分配系数的测定^[14]

精密称量 5.0 mg 毛蕊花糖苷至 10 mL 容量瓶中, 水饱和正辛醇定容。将上述溶液与等体积的正辛醇水饱和溶液混合于具塞三角瓶中。平行 3 组。恒温振荡 48 h, 4000 r/min, 离心 30 min, 分离上下层。分别取上、下层溶液 0.5 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 以甲醇定容, 在最大吸收波长处分别测定上层吸光值 A_1 和下层吸光值 A_2 。计算出上、下层毛蕊花糖苷的相应浓度 C_1 、 C_2 。其中 C_1 为毛蕊花糖苷在水饱和正辛醇溶液中的浓度, C_2 为毛蕊花糖苷在正辛醇饱和水溶液中的浓度。按公式 $P = C_1 / C_2$ 计算油水分配系数 P 值。

3 结 果

3.1 紫外最大吸收波长

取适量毛蕊花糖苷储备液, 稀释至适当浓度, 在 200~400 nm 波长下扫描最大吸收波长。由图 2 可知, 毛蕊花糖苷的最大吸收波长为 332 nm, 因此选择 332 nm 作为毛蕊花糖苷的检测波长。

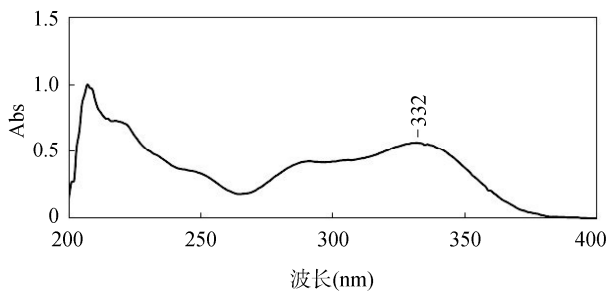


图 2 毛蕊花糖苷的紫外扫描曲线
Fig. 2 UV scanning spectrum of verbascoside

3.2 标准曲线

取储备液分别稀释至 30、20、15、10、5 $\mu\text{g/mL}$, 于 332 nm 处测定其吸光度值 A , 以吸光值 A 与毛蕊花糖苷浓度建立标准曲线, 线性回归方程: $Y = 0.0261X + 0.0126$, 相关系数为 0.999, 如图 3 所示。说明毛蕊花糖苷的浓度在 0~30 $\mu\text{g/mL}$ 时与其吸光值线性关系良好, 该方法可用于毛蕊花糖苷浓度的测定。

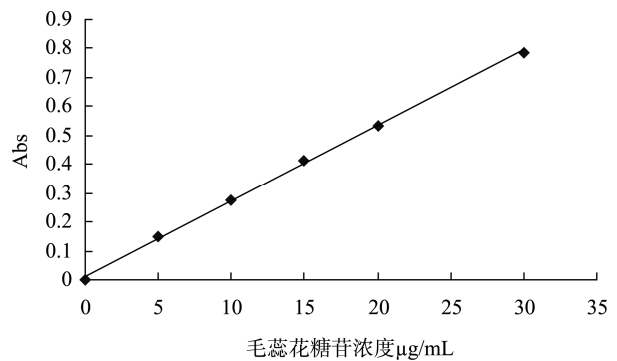


图 3 毛蕊花糖苷的标准曲线
Fig. 3 The standard curve of verbascoside

3.3 精密度的测定结果

精密度结果如表 1 所示。结果显示, 日内、日间精密度的 RSD 均小于 2%, 表明检测方法可靠, 稳定性好。

3.4 回收率的测定结果

回收率结果如表 2 所示, 平均回收率为 $(102.16 \pm 0.703)\%$, RSD 为 0.688%。回收率略微高于中国药典中的要求 98%-102%。结果表明: 该方法回收率高, 可用于毛蕊花糖苷油水分配系数的测定。

表 1 精密度测定结果($n=3$)
Table 1 The results of precision ($n=3$)

添加浓度($\mu\text{g/mL}$)	日内精密度($\mu\text{g/mL}$)	RSD(%)	日间精密度($\mu\text{g/mL}$)	RSD(%)
7.78	7.75 $\pm$ 0.032	0.413	7.95 $\pm$ 0.136	1.708
15.76	15.86 $\pm$ 0.026	0.161	16.00 $\pm$ 0.165	1.034
23.37	22.94 $\pm$ 0.066	0.289	23.35 $\pm$ 0.293	1.256

表 2 回收率试验结果($n=3$)
Table 2 The results of recovery ($n=3$)

添加浓度($\mu\text{g/mL}$)	回收率%	平均回收率%	RSD%
7.78	102.96 $\pm$ 0.017	102.16 $\pm$ 0.703	0.688
15.76	101.62 $\pm$ 0.007		
23.37	101.91 $\pm$ 0.004		

表 3 油水分分配系数计算结果($n=3$)
Table 3 The oil-water partition coefficient of verbascoside ($n=3$)

	A_1	C_1	A_2	C_2	P	$\log P$
1	0.132	4.57	0.455	16.95	0.270	-0.569
2	0.131	4.54	0.468	17.45	0.260	-0.585
3	0.137	4.77	0.448	16.68	0.286	-0.544

3.5 油水分分配系数

油水分分配系数测定结果如表 3 所示。按公式计算得, 油水分分配系数 $P=0.273\pm0.013$, $\log P=-0.566\pm0.021$ 。说明毛蕊花糖苷易溶于水。

4 讨 论

相比于液相色谱法, 紫外分光光度法存在对样品纯度要求较高、易受杂质干扰和应用范围较窄等缺点; 但是, 此法具有仪器简单、操作方便、成本低等优点, 本文用于测定油水分分配系数的样品也符合紫外测定的要求。根据毛蕊花糖苷在紫外光谱内有特征吸收峰, 本文建立了紫外分光光度法测定毛蕊花糖苷的浓度, 结果表明: 毛蕊花糖苷的浓度在 0~30 $\mu\text{g/mL}$ 时与其吸光值线性关系良好, 该方法可用于毛蕊花糖苷浓度的测定。

油水分分配系数是用于表示化合物亲脂性和透过生物膜能力的重要参数, 以正辛醇-水系统测出的油水分分配系数对预测药物的定量结构-吸收等有重要意义。一般将药物分为 3 类: $\log P<-0.3$ 的水溶性药物为第一类, $\log P$ 在 $-0.3\sim4.5$ 的为第二类, $\log P>4.5$ 的脂溶性药物为第三类^[15]。本试验测得的毛蕊花糖苷的 $\log P$ 值为 -0.566 , 属于第一类水溶性物质, 这与苯乙醇苷类属于天然水溶性糖苷^[16]相符。

有研究^[17]表明, 毛蕊花糖苷的口服生物利用度很低, 仅为 0.12%。另一种苯乙醇苷类物质连翘酯苷, 它的生物利用度也很低, 仅为 0.5%^[18]。通常, 造成化合物生物利用度较低的主要原因有: 水溶性差或脂溶性差、稳定性不好、膜通透性差及高首过作用^[19]。毛蕊花苷水溶性高、脂溶性差, 不容易通过脂质双分子层而被吸收, 这可能使得毛蕊花糖苷较难穿透生物膜被吸收。若要提高其生物利用度, 可以通过修饰结构增加其在油脂中的溶解度, 或者制成酯类化合物增加其脂溶性。如化合物依那普利拉(enalaprilat), 其口服生物利用度仅为 3%, 但是, 将其酯化后得到

的化合物依那普利(enalapril), 脂溶性提高了, 口服生物利用度也提高到 36%~44%^[20]。

毛蕊花糖苷的油水分分配系数试验采用经典的摇瓶法, 正辛醇-水为系统, 紫外分光光度法测定。建立的紫外分光光度法操作简便, 准确性好。

参考文献

[1] 万茵, 谢明勇, 何彦林. 反相高效液相色谱法同时测定车前子中的毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 474-476.
Wan Y, Xie MY, He YL. Determination of Verbascoside and Iso-verbascoside in Semen plantaginis by RP-HPLC [J]. Nat Prod Res Dev, 2008, 20: 474-476.

[2] 韩澎, 崔亚君, 郭洪祝, 等. RP-HPLC 法测定密蒙花中毛蕊花苷的含量[J]. 中草药, 2003, 34(12): 1082-1084.
Han P, Cui YJ, Guo HZ, et al. Quantitative determination of verbascoside in buddleja officinalis by RP-HPLC[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2003, 34(12): 1082-1084.

[3] 赵琳, 郭志刚, 刘瑞芝, 等. 肉苁蓉药材与盐生肉苁蓉培养细胞的主要成分对比研究[J]. 中草药, 2004, 35(7): 814-817.
Zhao L, Guo ZG, Liu RZ, et al. Comparison of main constituents of Herba Cistanche and cultured cells of Cistanche salsa [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2004, 35(7): 814-817.

[4] Chiou WF, Lin LC, Chen CF, Chieh Fu Chen. Acteoside protects endothelial cells against free radical-induced oxidative stress [J]. Pharm pharmacol, 2004, 56: 743-748.

[5] Ana Mari'a Di'aza, Mari'a Jose' Abadb, Lidia Fern'andez, et al. Phenylpropanoid glycosides from Scrophularia scorodonia: In vitro anti-inflammatory activity [J]. Life Sci, 2004, 74(20): 2515-2526.

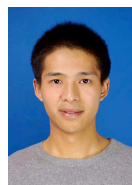
[6] Zhao J, Liu T, Ma L, et al. Protective effect of acteoside on immunological liver injury induced by bacillus calmette-guerin plus lipopolysaccharide [J]. Planta Med, 2009, 75(14): 1463-1469.

[7] 尚雁君, 李医明, 蒋山好. 玄参中苯丙素苷 acteoside 对小鼠高尿酸血症的影响[J]. 解放军药学报, 2006, 22(1): 30-32.
Shang YJ, Li YM, Jiang SH. The Effect of Phenylpropanoid Glycosides Acteoside of Scrophularia ningpoensis on mouse hyperuricemia [J]. Pharm J Chin PLA, 2006, 22(1): 30-32.

- [8] 李才堂, 文萍, 郭琦丽, 等. HPLC 测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 84–86.
- Li CT, Wen P, Guo QL, *et al.* HPLC Determination of Verbasco-side in *Callicarpa nudiflora* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2012, 18(1): 84–86.
- [9] 张思巨, 刘丽, 于江泳. HPLC 同时测定肉苁蓉药材中松果菊普和毛蕊花糖苷的含量[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(10): 740–741.
- Zhang SJ, Liu L, Yu JY. A RP-HPLC method for simultaneous determination of echinacoside and acteoside in *Herbe Cistanches* [J]. *Chin Pharm J*, 2004, 39(10): 740–741.
- [10] Wu YT, Tsai TR, Lin LC, *et al.* Liquid chromatographic method with amperometric detection to determine acteoside in rat blood and brain microdialysates and its application to pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 853: 281–286.
- [11] 张海科, 刘秀峰, 范志金, 等. 摇瓶法结合 HPLC 测定新杀菌剂唑菌酯的正辛醇-水分分配系数[J]. 安全与环境学报, 2008, 8(2): 5–7.
- Zhang HK, Liu XF, Fan ZJ, *et al.* Octanol/water partition coefficient determination of novel fungicide SYP-3343 by flask-shaking method using HPLC [J]. *J Safe Environ*, 2008, 8(2): 5–7.
- [12] 宋桂军, 柳菡, 冯芳. 替米沙坦油水分分配系数的测定及其意义[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(11): 1704–1706.
- Song GJ, Liu H, Feng F. Determination of the partition coefficient and its significance of telmisartan [J]. *J Pharm Anal*, 2007, 27(11): 1704–1706.
- [13] 吴明明, 付明哲, 宋晓平. 紫外分光光度法测定羟甲香豆素的油水分分配系数[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(22): 11985–11986.
- Wu MM, Fu MZ, Song XP. Determination of the Oil-water Partition Coefficient of Hymercromone by UV Spectrophotometry [J]. *J of Anhui Agri Sci*, 2010, 38(22): 11985–11986.
- [14] Poople SK, Poole CF. Separation methods for estimating octanol–water partition coefficients [J]. *J of Chrom B*, 2003, 797(1–2): 3–19.
- [15] 李东芬, 尹蓉莉, 吕懿平, 等. 芍药苷油水分分配系数的测定及 pH 对其的影响与中药与临床[J]. 中药与临床, 2011, 2(4): 21–23.
- Li DF, Yin RL, Lv YP, *et al.* Determination of n-octanol/wanter Partition Coefficient of paeoniflorin and effect of pH on it [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med*, 2011, 2(4): 21–23.
- [16] 吴爱芝, 林朝展, 祝晨蓁. 苯乙醇苷类成分构效研究进展[J]. 天然产物研究与发, 2013, 25: 862–865.
- Wu AZ, Lin CZ, Zhu CC, Progress in Structure-activity Relationship of Phenylethanoid Glycosides [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2013, 25: 862–865.
- [17] Wu YT, Lin LC, Sung JS, *et al.* Determination of acteoside in *Cistanche deserticola* and *Boschniakia rossica* and its pharmacokinetics in freely-moving rats using LC–MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 844: 89–95.
- [18] 王庚南. 连翘酯苷的吸收及代谢研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2010.
- Wang GN. Studies on absorption and metabolism of Forsythiasid [D]. BeiJing: Peking Union Medical College, 2010.
- [19] 梁健钦, 邓家刚. 芒果苷油水分分配系数的测定[J]. 华西药理学杂志, 2011, 26(2): 193–195.
- Liang JQ, Deng JG. Determination of n-octanol/wanter Partition Coefficient of Mangiferin [J]. *J West China Pharm Sci*, 2011, 26(2): 193–195.
- [20] Chakraborty S, Shukla D, Mishra B, *et al.* Lipid-an emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability [J]. *J Europ Pharm Bioph*, 2009, 73(1): 1–15.

(责任编辑: 叶琼娟)

作者简介



张伦宁, 硕士研究生, 主要研究方向为功能食品与营养保健。
E-mail: 86217634@qq.com

万茵, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然产物活性成分研究与开发、食品化学。
E-mail: yinwan@ncu.edu.cn