

4.3 检测波长选定 UV 360 nm 为大多数黄酮苷类化合物的特征波长,也是芦丁的长波最大吸收波长。

参考文献:

[1] 游松,姚新生,崔承彬,等.银杏叶中银杏内酯的分离与结构

测定[J].中国药物化学杂志,1995,5(4):258-265.

[2] 游松,姚新生,崔承彬,等.银杏叶中金松双黄酮的核磁共振谱分析[J].沈阳药学院学报,1991,8(2):124-128.

[3] Sticher O. Quality of *Ginkgo* preparations[J]. *Planta Medica*, 1993, 59: 2.

黄芩苷稳定性研究

于波涛,张志荣*,刘文胜,王平**,杨婷***

(四川大学华西药学院,四川 成都 610041)

摘要:目的 研究黄芩苷在不同条件下的稳定性 方法 采用经典恒温法考察黄芩苷在不同 pH 值水溶液、甲醇、乙醇和氯仿以及小鼠肺匀浆、小鼠肝匀浆、小鼠血浆和小牛血清中的稳定性 结果 黄芩苷在酸性环境中稳定,在碱性环境中不稳定,在上述有机溶剂中稳定,而在上述生物样品中不稳定 结论 黄芩苷在不同条件下稳定性不同,在实际应用中应加以考虑

关键词:黄芩苷;稳定性;反相高效液相色谱法;经典恒温法

中图分类号: R286.01 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)03-0218-03

Studies on stability of Baicalin

YU Bo-tao, ZHANG Zhi-tong, LIU Wen-sheng, WANG Ping, YANG Ting

(Huaxi School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu Sichuan 610041, China)

Abstract **Object** To investigate the stability of baicalin in different conditions. **Methods** The stability of baicalin in water with different pH values, methanol, ethanol, chloroform and in the mouse lung homogenate, mouse liver homogenate, mouse plasma and bovine serum was investigated by the classical isothermal method. **Results** The experiments showed the baicalin was stable in acidic water and these organic solutions, but unstable in basic water and these biological media. **Conclusion** The stability of baicalin in different media was different, which should be considered in practice.

Key words baicalin; stability; RP-HPLC; classical isothermal method

黄芩苷(baicalin)为黄酮类化合物,主要来源于唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi,具有抗菌、抗病毒、抗炎和抗过敏的药理作用。根据黄芩苷的性质^[1],本研究设计并考察其在水溶液、有机溶剂和生物样品中的稳定性,希望能为原料药的提取、制剂的生产和体内外实验条件的筛选提供科学依据。目前尚未见这方面的报道。

1 实验材料与色谱条件

1.1 仪器: Shimadzu 10ATVP型高效液相色谱仪, CLASS-V P 5.0色谱数据处理工作站,日本岛津; Sartorius BP211D型电子分析天平,德国赛多利斯; TGL-16G型台式高速离心机,上海医用分析仪器厂; QL-901型旋涡混合器,江苏海门麒麟医用仪器厂; pH-25型 pH计,上海精科雷磁

1.2 样品:黄芩苷原料(成都华福来制药厂提供);黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号为0175-9909)。

1.3 试剂:甲醇、乙醇、氯仿均为色谱纯;磷酸盐缓冲液(A液:取磷酸 8.3 mL加水至 500 mL; B液:取 Na₂HPO₄ 71.63 g,加水使溶解成 1 000 mL;取 A、B不同体积精确配制成 pH值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、7.4、8.0的溶液);磷酸二氢钠缓冲液(PBS)(用磷酸调 pH值为 4.0)。

1.4 材料:昆明种小鼠(华西医科大学动物实验中心提供)肺、肝匀浆(取健康小鼠肺、肝组织,置匀浆器中,加 2倍重量的 pH=4.0的 PBS匀浆即得);昆明种小鼠血浆(取健康小鼠血液于肝素管中,振荡,10 000 r/min离心 10 min,取上清液即得);新生小

* 收稿日期: 2001-08-20

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目 (39925039)

作者简介: 于波涛 (1965-),男,江苏涟水人,博士,主要从事靶向制剂的研究,近年来在核心期刊上发表论文 10余篇。

Tel (028)5503808 E-mail yub@263.net

* 联系人 ** 成都中医药大学药学院 2001届毕业生 *** 本校 2001届毕业生

牛血清(成都哈里生物工程有限公司,批号: 010210)。

1.5 色谱条件: 参照文献^[2]确定色谱条件如下: 分析柱: Shim-pack CLC-ODS C₁₈(5 μ m, 150 mm $\times$ 6.0 mm); 预柱: YWG-C₁₈色谱柱(10 μ m, 10 mm $\times$ 6.0 mm); 流动相: 磷酸盐缓冲液(pH= 3.0): 甲醇(50: 50); 流速: 1 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C, 检测波长: 278 nm

2 实验方法

2.1 黄芩苷标准曲线的制备: 精密称量黄芩苷对照品 2.5 mg, 适量甲醇溶解, 并定容至 25 mL 容量瓶中, 制得 100 μ g/mL 的黄芩苷贮备溶液。精密吸取黄芩苷贮备溶液 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.60, 3.20, 6.40 mL 分别置于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 配成一系列对照品溶液。取上述黄芩苷对照品溶液各 10 μ L, 按上述色谱条件进样分析, 测定峰面积。以峰面积(A)与黄芩苷浓度(C)进行回归处理, 得直线方程: $A = 10\,740 + 32\,303\,C$ ($r = 0.999\,4$), 线性范围为 0.5~100 μ g/mL。

2.2 精密度考察: 取不同浓度黄芩苷对照品溶液 32.0, 8.0, 2.0 μ g/mL 于日内及日间重复进样分析, 结果见表 1。

2.3 黄芩苷水溶液在不同 pH 值、不同温度下稳定性实验: 称取黄芩苷样品 8 mg 8 份, 分别加入不同 pH 值的磷酸盐缓冲液 100 mL, 溶解后, 用微孔滤膜过滤, 取续滤液灌装于 2 mL 安瓿中, 熔封。取不同 pH 值安瓿一支按标准曲线项下测定方法测定峰面

表 2 黄芩苷水溶液水解一级动力学方程的反应常数 k

温 度($^{\circ}$ C)	pH							
	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	7.4	8.0
50	0.006 2	0.002 1	0.002 2	0.005 7	0.022 7	0.031 1	0.511 7	0.743 0
60	0.015 7	0.003 9	0.005 6	0.018 7	0.073 3	0.170 2	1.405 3	0.885 9
70	0.037 5	0.006 9	0.013 6	0.057 5	0.220 9	0.842 1	3.638 5	1.045 4
80	0.085 3	0.011 8	0.031 6	0.165 6	0.625 8	3.806 3	8.926 1	1.222 1

根据 Arrhenius 公式, 求得同一 pH 值下直线方程及 $t_{0.9}$, 结果见表 3。

表 3 黄芩苷水溶液水解 Arrhenius 方程及 $t_{0.9}$

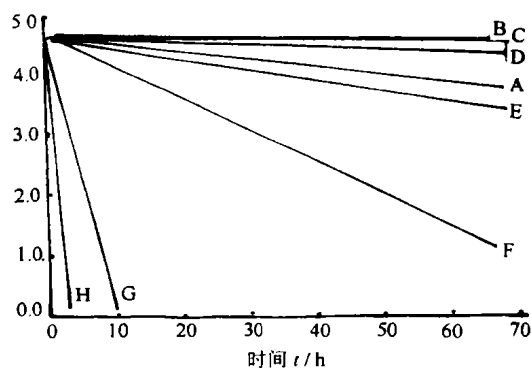
pH	Arrhenius 方程	r	$k \times 10^4$ ($T = 298\text{ K}$)	$t_{0.9}(\text{h})$
2.0	$\ln k = 25.73 - 9941.4/T$	0.993 5	4.84	1 122.5
3.0	$\ln k = 13.93 - 6473.8/T$	0.999 8	4.13	1 316.2
4.0	$\ln k = 25.48 - 10\,213.9/T$	0.996 8	1.52	3 576.7
5.0	$\ln k = 34.51 - 12\,816.5/T$	0.994 1	2.03	2 680.6
6.0	$\ln k = 35.24 - 12\,605.2/T$	0.992 9	7.40	734.3
7.0	$\ln k = 53.80 - 18\,265.4/T$	0.994 6	5.58	973.1
7.4	$\ln k = 32.97 - 10\,865.7/T$	0.998 2	304.46	17.8
8.0	$\ln k = 5.55 - 1\,891.2/T$	0.995 0	4 546.50	1.2

2.4 黄芩苷在甲醇、乙醇及氯仿中的稳定性: 取适量黄芩苷样品分别溶于甲醇、乙醇及氯仿, 封装于西

积, 即得初始浓度, 同时将各个 pH 值安瓿分别置于 (80 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, (70 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, (60 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, (50 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 恒温水浴中, 于不同时间点取样, HPLC 法测定, 得色谱峰峰面积, 以内标法计算药物含量。以药物残留百分比自然对数值对时间作图, 见图 1。按一级动力学方程求得同一温度、同一 pH 值的反应常数 k , 结果见表 2。

表 1 黄芩苷精密度测定结果 ($n = 5$)

浓 度 (μ g/mL)	日 内		日 间	
	测定值(μ g/mL)	RSD(%)	测定值(μ g/mL)	RSD(%)
2.0	1.97	5.17	1.94	5.34
8.0	8.01	2.30	8.06	3.26
32.0	31.02	2.46	30.34	2.27



A-pH 2.0 B-pH 3.0 C-pH 4.0 D-pH 5.0
E-pH 6.0 F-pH 7.0 G-pH 7.4 H-pH 8.0

图 1 黄芩苷在 50 $^{\circ}$ C 下不同 pH 值水溶液中的降解曲线

林瓶中, 置 (70 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 恒温水浴中, 分别于 0, 1, 3, 5 h 取样, 按标准曲线项下测定, 各时间点残存黄芩苷百分比见表 4。

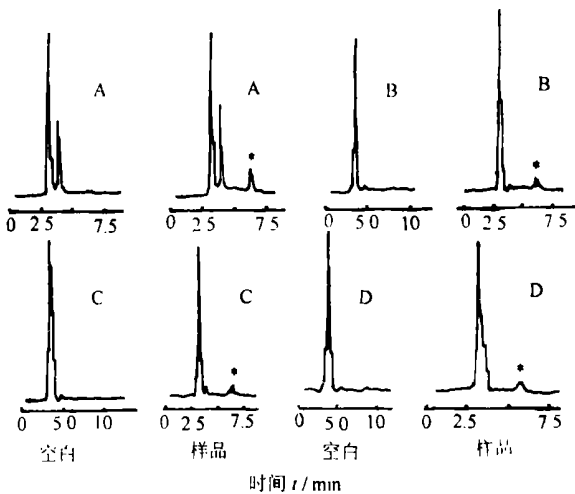
表 4 70 $^{\circ}$ C 下甲醇、乙醇及氯仿中黄芩苷降解残存百分比 (%)

溶 剂	取样时间 (h)			
	0	1	3	5
甲 醇	100	99.8	98.5	97.6
乙 醇	100	99.3	98.7	95.8
氯 仿	100	100.1	99.1	99.1

2.5 黄芩苷在鼠肺、肝匀浆、血浆及小牛血清中稳定性实验

2.5.1 空白实验: 取小鼠肺、肝匀浆、血浆及小牛血清各 1 mL 加甲醇 5 mL, 混匀振荡 15 min, 10 000

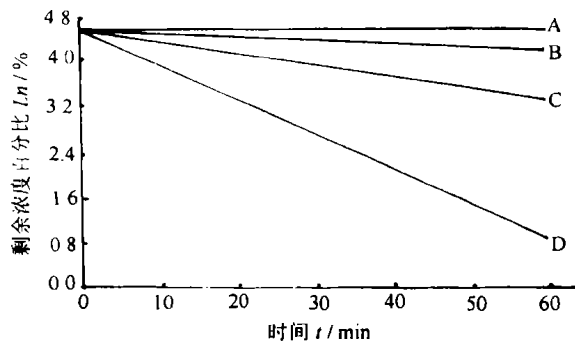
r/min离心 10 min 取上清液 10 μ L 进样, HPLC 图谱见图 2 结果表明: 空白小鼠肺匀浆、肝匀浆、血浆及小牛血清均无干扰 采用本法可将黄芩苷与组织杂质完全分离。



A-小鼠肝匀浆 B-小鼠肺匀浆 C-小鼠血浆
D-小牛血清 * 黄芩苷

图 2 黄芩苷在不同生物样品中的 HPLC 图

2.5.2 稳定性实验: 称取黄芩苷约 1 mg 5 份, 分别加入小鼠肺、肝匀浆、血浆及小牛血清 2 mL, 振荡 2 min, 封装于西林瓶中, 置 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温水浴中。于各时间点精密吸取 0.2 mL, 加甲醇 1.0 mL, 振荡 10 min, 10 000 r/min 离心 15 min 取上清液 10 μ L 进样, HPLC 测定峰面积, 以残留药物百分比自然对数值对时间做图, 结果见图 3



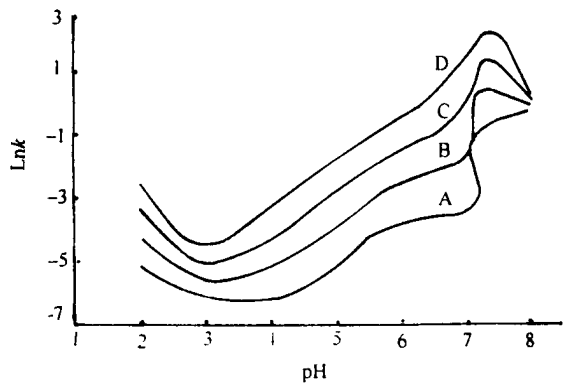
A-小鼠血浆 B-小牛血清 C-小鼠肺匀浆 D-小鼠肝匀浆

图 3 37°C 下黄芩苷在不同生物样品中的稳定性

3 讨论

黄芩苷为一弱酸性化合物, 与酸碱作用具有多位反应点。由图 4 可知在 pH 值为 2.0~3.0, 速度常数 k 值趋小, 可推断其反应机制为酸催化的水解反应, 如图 5 所示:

在 pH 值为 3.0~7.4, 速度常数 k 值显著趋大, 可能为葡萄糖醛酸的羧基与碱的反应, 其机制可能



A- 50°C B- 60°C C- 70°C D- 80°C

图 4 黄芩苷水溶液 pH 速率图

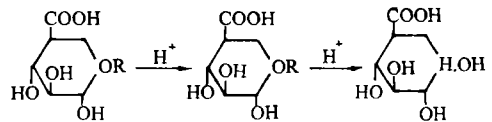


图 5 黄芩苷 pH 值为 2~3 时的反应机制

如图 6 所示:

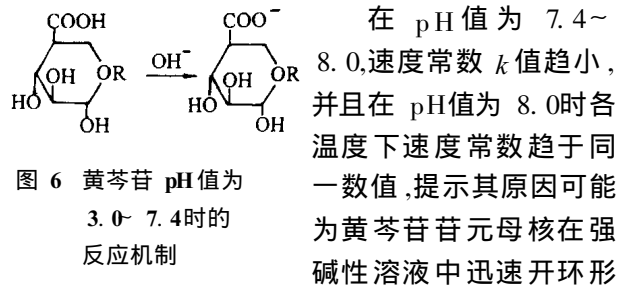


图 6 黄芩苷 pH 值为 3.0~7.4 时的反应机制

在 pH 值为 7.4~8.0, 速度常数 k 值趋小, 并且在 pH 值为 8.0 时各温度下速度常数趋于同一数值, 提示其原因可能为黄芩苷苷元母核在强碱性溶液中迅速开环形成查儿酮, 机制如图 7 所示:

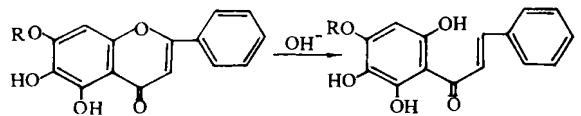


图 7 黄芩苷 pH 值为 7.4~8.0 时的反应机制

因此, 黄芩苷在趋碱性溶液中极不稳定, 在 pH 值大于 3 时稳定性也有所下降, 故在不考虑其他因素作用下在提取和制剂的生产中其 pH 值应控制在 3~4 之间。黄芩苷在有机溶剂中的稳定性较好, 提示体内分析中, 萃取溶剂选择余地较大; 黄芩苷在生物样品中稳定性较差, 尤其在肝匀浆中为最, 似乎与肝组织中含有多种且数量巨大的肝药酶有关, 故在体内分析时应注意酶的影响

参考文献:

- [1] 王 弘, 陈济民, 张清民. 黄芩苷的物化常数测定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(2): 105-106.
- [2] 王 弘, 陈济民, 张清民. 用高效液相色谱法测定人血浆中黄芩苷与血浆蛋白的结合率 [J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(2): 107-109.