

山楂叶总黄酮磷脂复合物的稳定性影响因素研究

童丽姣¹, 高敏², 侯桂兰³, 王鑫波¹, 石森林^{2*}

1. 临安市中医院, 浙江 临安 311300

2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

3. 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022

摘要: 目的 考察山楂叶总黄酮磷脂复合物的稳定性, 为其剂型选择、工艺设计与贮存条件的确定提供实验依据。方法 对山楂叶总黄酮磷脂复合物进行强光照射、高温、高湿试验, 考察其对复合物的质量、总黄酮和牡荆素鼠李糖苷质量分数的影响; 以 10 h 后的复合物中总黄酮质量分数变化率为指标考察介质、温度、pH 值对其稳定性的影响。结果 山楂叶总黄酮磷脂复合物具有一定的抗光照、热稳定性, 但高湿条件下复合物吸湿明显; 介质种类对其影响较小, 其水溶液在高温与高 pH 值条件下稳定性较差。结论 山楂叶总黄酮磷脂复合物以固体形式保存, 稳定性较好, 因具有吸湿性, 应在干燥条件下保存。**关键词:** 山楂叶总黄酮; 磷脂复合物; 稳定性; 牡荆素鼠李糖苷; 黄酮

中图分类号: R283.6; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)05-0915-04

Influencing factors on stability of hawthorn leaves total flavonoids-phospholipid complex

TONG Li-jiao¹, GAO Min², HOU Gui-lan³, WANG Xin-bo¹, SHI Sen-lin²

1. Lin'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lin'an 311300, China

2. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

3. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China

Key words: hawthorn leaves total flavonoids (HLF); phospholipid complex (PPC); stability; vitexinrhamnoside; flavonoids

山楂叶总黄酮主要含有槲皮素、金丝桃苷、牡荆素、牡荆素鼠李糖苷、山柰酚、芦丁等; 其药理作用及适用范围广泛, 具有明显的降压、调血脂、保护心肌、抗心肌梗死、显著抑制血小板聚集等治疗心血管疾病的作用^[1-4]。鉴于其口服吸收较差, 本课题组制备了山楂叶总黄酮磷脂复合物, 以期提高其小肠吸收率^[5]。

由于黄酮类化合物的结构特点, 其对光、温度、湿度等条件不稳定^[6], 容易水解、氧化变性。同时, 固体分散体的稳定性也欠佳, 易出现老化现象。为此, 本实验对山楂叶总黄酮磷脂复合物进行影响因素试验, 考察其稳定性, 为剂型选择、工艺设计和储存提供依据。

1 仪器与材料

UV-2450 紫外-可见分光光度计 (日本岛津公

司), Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), KH-250DB 型数控超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司), JA2003N 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), DGG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海森信试验仪器有限公司), WH-861 旋涡混合器 (太仓市科教器材厂), RCZ-6C2 型药物溶出度仪 (上海黄海药检仪器有限公司), Avanti J-26 XP 高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司)。

芦丁 (批号 100080-200707)、牡荆素鼠李糖苷 (批号 111668-200401) 对照品购于中国药品生物制品检定所; 山楂叶总黄酮 (批号 AKH081201, 总黄酮质量分数 > 80.0%, 山东临沂爱康药业有限公司); 山楂叶总黄酮磷脂复合物 (自制^[7])。乙腈、甲醇为色谱纯 (德国默克公司), 氢氧化钠、亚硝酸

收稿日期: 2011-11-28

基金项目: 浙江省中医药科技项目 (2008CA090)

作者简介: 童丽姣 (1970—), 女, 副主任中药师, 主要从事临床中药学与中药制剂新技术研究。Tel: 13067738258 E-mail: ejiao2008@sina.com

*通讯作者 石森林 Tel: 13157106148 E-mail: pjstone@163.com

钠、硝酸铝、乙醇、甲醇、异丙醇、四氢呋喃、三乙胺、磷酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾等试剂均为分析纯,液相用水为去离子水,其他用水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的测定^[7]

2.1.1 对照品溶液的制备 取芦丁对照品约 25 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,用乙醇溶解并稀释至刻度,密塞,摇匀,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取山楂叶总黄酮磷脂复合物约 60 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加入乙醇适量超声处理 30 min 后,取出,放凉,用乙醇稀释至刻度,密塞,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 线性关系考察 精密量取对照品溶液各 1、2、3、4、5、6 mL,分别置 25 mL 量瓶中,各加水至 6 mL,加 5%亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 10%硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液 10 mL,再加水至刻度,密塞,摇匀,放置 15 min,在 510 nm 处测定吸光度 (A) 值,以 A 值为纵坐标,质量浓度为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=0.013 X-0.012 5$, $r=0.999 9$,表明芦丁在 9.944~59.664 $\mu\text{g/mL}$ 与 A 值呈良好的线性关系。

2.1.4 样品测定 精密量取供试品溶液 2 mL,分置 25 mL 量瓶中,加水 4 mL,加 5%亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 10%硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液 10 mL,再加水至刻度,密塞,摇匀,放置 15 min,在 510 nm 处测定 A 值,依法^[7]计算样品中总黄酮的量。

2.2 牡荆素鼠李糖苷的测定^[8]

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取牡荆素鼠李糖苷对照品约 10 mg,置 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品储备液。精密量取对照品储备液 10 mL 置 50 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,密塞,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取山楂叶总黄酮磷脂复合物约 75 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加甲醇适量超声处理 30 min 后,取出,放凉,用甲醇稀释至刻度,密塞,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 色谱条件 Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 334 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 5 μL , 流动相为乙腈 (A) - 水 (B), 梯度洗脱, 洗脱程序: 0~5 min, 5%~10%

A; 5~10 min, 10%~18% A; 10~30 min, 18% A。

2.2.4 线性关系考察 精密称取牡荆素鼠李糖苷对照品,用色谱甲醇配成质量浓度约为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。分别精密量取对照品储备液 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、4.0、6.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中以甲醇稀释至刻度,即得质量浓度分别为 4.0、8.0、12.0、16.0、20.0、24.0、40.0、60.0 $\mu\text{g/mL}$ 牡荆素鼠李糖苷对照品溶液,按上述色谱条件分别进样 5 μL ,记录色谱图,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=8.720 1 X-0.366 4$, $r=1.000 0$,表明牡荆素鼠李糖苷在 4.296~64.440 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积的线性关系良好。

2.2.5 样品测定 精密量取供试品溶液 5 mL,置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,密塞,摇匀,按“2.2.3”项的色谱条件测定,记录峰面积,采用外标一点法测定,依法^[8]计算。

2.3 高温试验

取山楂叶总黄酮磷脂复合物适量,平摊在培养皿里,厚度 ≤ 5 mm,开口置于有盖方盘内,于干燥箱中 60 $^{\circ}\text{C}$ 温度下放置 10 d,于 0、5、10 d 取样,精密称定质量,依法测定其总黄酮、牡荆素鼠李糖苷质量分数,结果见表 1。表明温度对山楂叶总黄酮磷脂复合物中总黄酮和牡荆素鼠李糖苷质量分数的影响较小。

表 1 高温试验结果 ($n=3$)

Table 1 Results of high temperature test ($n=3$)

时间 / d	总黄酮 / %	牡荆素鼠李糖苷 / %	质量变化率 / %
0	25.740 $\pm$ 0.005	2.870 $\pm$ 0.000	—
5	27.030 $\pm$ 0.001	2.880 $\pm$ 0.002	99.670 $\pm$ 0.002
10	27.050 $\pm$ 0.003	2.890 $\pm$ 0.001	97.690 $\pm$ 0.005

2.4 高湿试验

取山楂叶总黄酮磷脂复合物适量,平摊在培养皿里,厚度 ≤ 5 mm,开口置于恒湿密闭干燥器中,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 相对湿度为 (75 $\pm$ 5) % 条件下放置 10 d,于 0、5、10 d 取样,依法测定其总黄酮、牡荆素鼠李糖苷质量分数,结果见表 2。山楂叶总黄酮磷脂复合物易吸湿,吸湿后黏性较大、易结块;总黄酮和牡荆素鼠李糖苷质量分数均降低,因此山楂叶总黄酮磷脂复合物应存放在干燥条件下。

2.5 强光照射试验

取山楂叶总黄酮磷脂复合物适量,平摊在培养

皿里,厚度 ≤ 5 mm,开口置于 $(4\,500\pm 500)$ lx 的光照箱中放置 10 d,于 0、5、10 d 取样,依法测定其总黄酮、牡荆素鼠李糖苷质量分数,结果见表 3。光照对山楂叶总黄酮磷脂复合物的质量、总黄酮和牡荆素鼠李糖苷质量分数无明显影响。

表 2 高湿试验结果 ($n=3$)Table 2 Results of high humidity test ($n=3$)

时间 / d	总黄酮 / %	牡荆素鼠李糖苷 / %	质量变化率 / %
0	25.740 ± 0.005	2.870 ± 0.000	—
5	23.240 ± 0.006	2.750 ± 0.001	107.570 ± 0.008
10	22.970 ± 0.009	2.700 ± 0.001	108.200 ± 0.006

表 3 强光照试验结果 ($n=3$)Table 3 Results of bright light test ($n=3$)

时间 / d	总黄酮 / %	牡荆素鼠李糖苷 / %	质量变化率 / %
0	25.740 ± 0.005	2.870 ± 0.000	—
5	25.910 ± 0.006	2.850 ± 0.001	99.950 ± 0.001
10	26.010 ± 0.006	2.860 ± 0.001	99.610 ± 0.002

2.6 介质种类对其溶液稳定性的影响

取数份山楂叶总黄酮磷脂复合物适量,精密称定,分别用蒸馏水、肠溶液、甲醇、乙醇溶解,配制成质量浓度为 0.5、0.2、0.1 mg/mL 的溶液,分别于 37 °C 恒温水浴中放置 10 h,取样,依法测定总黄酮的量^[7],假定初始药物溶液中总黄酮的量为 100%,以 10 h 后药物溶液中总黄酮的量为指标考察其溶液稳定性,结果见表 4。3 个质量浓度的山楂叶总黄酮磷脂复合物,在上述 4 种介质中放置 10 h 后,其溶液中总黄酮的量均有不同程度下降,但均在最初量的 90% 以上。

表 4 山楂叶总黄酮磷脂复合物在不同介质中的稳定性测定结果 ($n=3$)Table 4 Results of HLF-PPC stability in different solvents ($n=3$)

溶剂	10 h 后药物溶液中总黄酮量 / %		
	0.5 mg·mL ⁻¹	0.2 mg·mL ⁻¹	0.1 mg·mL ⁻¹
蒸馏水	93.52 ± 0.60	92.93 ± 1.65	93.07 ± 1.19
肠溶液	93.62 ± 1.09	92.91 ± 2.30	91.84 ± 1.07
甲醇	93.12 ± 0.03	93.44 ± 0.10	93.65 ± 0.34
乙醇	91.93 ± 0.81	91.23 ± 0.73	91.32 ± 0.45

2.7 温度对其水溶液稳定性的影响

分别用预热至 25、37、60、100 °C 的蒸馏水配成质量浓度为 0.5、0.2、0.1 mg/mL 的山楂叶总黄酮磷脂复合物的水溶液,各置于 25、37、60、100 °C 的恒温水浴中放置 10 h,取样,依法测定总黄酮的量^[7],假定初始药物溶液中总黄酮的量为 100%,以 10 h 后药物溶液中总黄酮的量为指标考察稳定性,结果见表 5。3 个质量浓度的山楂叶总黄酮磷脂复合物水溶液在 25、37 °C 时,其水溶液中药物的量均为最初量的 90% 以上,稳定性相对较好;而在 60、100 °C 条件下稳定性较差。

表 5 温度对山楂叶总黄酮磷脂复合物溶液稳定性的影响 ($n=3$)Table 5 Results of HLF-PPC stability at different temperature ($n=3$)

蒸馏水 温度/°C	10 h 后药物溶液中总黄酮量 / %		
	0.5 mg·mL ⁻¹	0.2 mg·mL ⁻¹	0.1 mg·mL ⁻¹
25	93.04 ± 0.16	92.35 ± 0.90	93.07 ± 1.19
37	93.27 ± 0.84	92.74 ± 1.45	93.83 ± 0.35
60	68.88 ± 0.85	63.62 ± 1.52	62.69 ± 0.90
100	59.09 ± 0.29	57.18 ± 1.03	57.17 ± 1.01

2.8 pH 值对其水溶液稳定性的影响

分别用预热至 37 °C 的 pH 5.0、6.5、7.0、7.4、9.0 PBS 配成质量浓度为 0.5、0.2、0.1 mg/mL 的山楂叶总黄酮磷脂复合物溶液,分别于 37 °C 恒温水浴中放置 10 h,取样,依法测定总黄酮的量^[7],假定初始药物溶液中总黄酮的量为 100%,以 10 h 后的药物溶液中总黄酮的量为指标考察稳定性,结果见表 6。山楂叶总黄酮磷脂复合物溶液在 pH 9.0 条件下,稳定性较差。

表 6 pH 值对山楂叶总黄酮磷脂复合物溶液稳定性的影响 ($n=3$)Table 6 Results of HLF-PPC stability in different pH values ($n=3$)

pH 值	10 h 后药物溶液中总黄酮量 / %		
	0.5 mg·mL ⁻¹	0.2 mg·mL ⁻¹	0.1 mg·mL ⁻¹
5.0	92.30 ± 0.51	80.98 ± 0.60	63.33 ± 0.73
6.5	87.58 ± 1.29	91.18 ± 0.62	90.87 ± 0.41
7.0	82.08 ± 0.32	90.47 ± 0.18	90.52 ± 0.85
7.4	90.31 ± 0.35	80.57 ± 0.99	73.21 ± 0.69
9.0	62.88 ± 0.66	63.11 ± 0.61	62.65 ± 0.62

3 讨论

对磷脂及脂质体稳定性研究表明^[9-10], 天然磷脂自身受光、温度、pH等因素影响较大, 易氧化、水解, 因而磷脂及其制剂应低温、避光且充氮保存。

目前认为, 固体分散体在存储过程中可能出现老化现象, 尤其温度、湿度对其影响较大^[11]。本实验对山楂叶总黄酮磷脂复合物进行了稳定性影响因素考察, 首先在相对湿度为 $(92.5 \pm 5)\%$ 条件下进行湿度试验, 吸湿增重在13%以上, 后选择在相对湿度为 $(75 \pm 5)\%$ 条件下进行试验, 吸湿增重仍在7%以上。影响因素试验结果表明, 湿度是影响山楂叶总黄酮磷脂复合物稳定性的最主要因素, 应存储在干燥的环境下。

温度、pH值对山楂叶总黄酮磷脂复合物水溶液的稳定性有一定影响, 在高温(60、100℃)和高pH(pH 9.0)条件下, 其稳定性较差。

参考文献

- [1] 罗玉梅, 王贺振. 山楂的化学成分及药理研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2004, 15(1): 53-54.
- [2] 李红, 张爽, 纪影实, 等. 山楂叶总黄酮对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 794-798.
- [3] 宋玉超, 连超杰, 雷海民, 等. 山楂叶及其制剂对心血管作用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(1): 25-28.
- [4] 吴士杰, 李秋津, 肖学风, 等. 山楂化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 316-319.
- [5] 史亚军, 吴品江, 许润春, 等. 黄芩苷磷脂复合物基本性质研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 78-80.
- [6] 江永南, 莫红缨, 陈济民. 淫羊藿黄酮磷脂复合物大鼠体内药动学 [J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(10): 582-583.
- [7] 高敏. 山楂叶总黄酮磷脂复合物的制备与评价 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2010.
- [8] 王鑫波, 高敏, 童丽姣, 等. HPLC法测定山楂叶总黄酮磷脂复合物中牡荆素鼠李糖苷 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1341-1343.
- [9] Grit M, Underberg W J M, Crommelin D J A. Hydrolysis of saturated soybean phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions [J]. *J Pharm Sci*, 1993, 82(4): 362-366.
- [10] Crommenlin D J A. Influence of lipid composition and ionic strength on the physical stability of liposomes [J]. *J Pharm Sci*, 1984, 73(11): 1559-1563.
- [11] 崔福德. 药剂学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.