

大黄酚复合物的稳定性研究

李红¹, 吴振^{2*}, 陈岗², 顾佳玺³, 詹永², 谭红军²

¹重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121;

²重庆市中药研究院, 重庆 400065; ³重庆资源与环境交易所, 重庆 401147

摘要:考察大黄酚-酵母葡聚糖复合物(Chr- β -glu)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。对Chr- β -glu进行高温处理、强光照射、不同pH和介质试验,采用动力学方法建立Chr- β -glu降解速率方程,考察其对复合物中大黄酚影响。Chr- β -glu具有一定的热稳定性、抗光照特性,但高pH条件下复合物不稳定;介质种类对其影响较大。Chr- β -glu的稳定性与温度、光照强度、pH值和介质种类关系密切。Chr- β -glu应在低温、避光的条件下贮存,应在低pH值条件下使用。

关键词: 大黄酚; 酵母葡聚糖复合物; 稳定性; 降解动力学

中图分类号: R284

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.020

Stability of Inclusion Complex of Chrysophanol

LI Hong¹, WU Zhen^{2*}, CHEN Gang², GU Jia-xi³, ZHAN Yong², TAN Hong-jun²

¹Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China; ²Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; ³Chongqing Resources and Environment Exchange, Chongqing 401147, China

Abstract: To provide the experimental basis for the formulation selection, process design and storage conditions, the stability of inclusion complex of Chr and β -glucan (Chr- β -glu) was investigated. The influences of temperate, light intensity, pH and different solvent on the stability of Chr- β -glu was evaluated by degradation rate equation. It showed that Chr- β -glu had anti-light stability and thermal stability. However, the complex degradation rate was increased at high pH level. Its stability was great influenced by different solvent. The stability of Chr- β -glu is closely related to light intensity, temperate, pH and solvent type. So it should be stored in low temperature, keep out in sun and should be used in low pH level.

Key words: Chrysophanol; yeast glucan complex; stability; degradative kinetics

大黄酚(Chrysophanol, 缩写Chr), 是大黄、虎杖、何首乌、决明子、芦荟等中的一种游离蒽醌类活性成分, 化学名为1,8-二羟基-3-甲基蒽醌, 大黄酚的蒽醌环上含有二个羟基和一个甲基, 极性较强, 具有较强的还原性^[1]。大黄酚具有抗菌、缩短血液凝固时间、兴奋神经、麻痹肌肉、止咳、利尿、抗癌作用^[2,3], 特别是近年来研究表明, 大黄酚具有改善阿尔茨海默病患者的学习记忆和认知功能、提高抗氧化能力等多种药理作用^[4,5], 同时其可以通过抗炎作用改善脑神经损伤^[6]; 最新研究发现大黄酚可以通过AKT-ERK1/2信号通路促进绒毛膜癌的凋亡^[7]。但是大黄酚具有味苦、难溶于水、理化性质

不稳定, 遇光易氧化以及对胃肠道有刺激性等不利因素^[8,9], 因而没有适宜的剂型供临床应用。

近年来, 为了提高大黄酚生物利用度研究开发了很多新制剂, 如大黄酚超分子包合物^[10,11]、大黄酚环糊精包合物^[12]、大黄酚纳米体系^[13]、大黄酚脂质体^[14,15]等。小分子药物经过超分子包合后, 粒径减小且高度分散, 表面积相应增大, 其溶出速率也会增加, 从而改善药物吸收, 提高其生物利用度; 另一方面小分子药物超分子包合后, 不但可以掩盖药物的不良气味、提高药物的稳定性, 防止药物在胃内失活或减少对胃的刺激, 可进一步制成其他剂型, 如散剂、片剂、颗粒剂、胶囊剂等, 还可制备成缓释或控释制剂, 可使药物浓集于靶区, 提高疗效, 降低药物的毒副作用^[11,16]。前期通过电磁搅拌-喷雾干燥法制备了大黄酚-酵母葡聚糖复合物(Chr- β -glu)^[10,11], 并对其制备工艺进行了研究; 为了保证Chr- β -glu的质量和品质, 本文研究温度、光照强度、

收稿日期: 2016-10-21 接受日期: 2016-11-14

基金项目: 重庆市基本科研业务费资助项目(2015cstc-jbty-01911); 重庆市基本科研业务费资助项目(JA-15-14); 重庆市集成示范计划(cstc2015jcsf-kjfp80014); 重庆市卫生局中医药科研课题(ZY20132075)

* 通信作者 Tel: 86-23-89029055; E-mail: wuzhen985@126.com

pH 和介质种类等因素对大黄酚复合物稳定性的影响,为剂型选择、工艺设计和储存提供依据。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司);PHS-3C 酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司);HH-S 型恒温水浴锅、DHG-9240A 电热恒温鼓风干燥箱、SHZ-D(III)旋转水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);KH-250DB 型数控超声波清洗器(昆山禾创市超声仪器有限公司);SD-1500 实验型喷雾干燥机(上海沃迪科技有限公司);R-124 旋转蒸发仪(瑞典 BUCHI 公司);CP-224S 电子天平(德国赛多利斯)。

大黄酚标准品(Chr, HPLC $\geq 98\%$, 南京奥多福尼生物科技有限公司);酵母 β -葡聚糖(朗深系生物技术有限公司);大黄酚复合物(自制^[10,11]);其它化学试剂均为国产分析纯;所用水为双蒸水,所用溶液均自行配制。

数据分析软件: Origin 8.5 (OriginLab Co., Northampton, USA)。

2 方法与结果

2.1 Chr- β -glu 制备

将 β -glu 溶于适量去离子水中, 80 °C 搅拌溶解 1h 使其充分溶解成为澄清透明的溶液;采用电磁搅拌-喷雾干燥法制备 Chr- β -glu, 称取规定量的 Chr 置于 50% 乙醇中, 30 °C 回流或者搅拌加热使药物完全溶解;在搅拌和加热条件下, 向葡聚糖溶液中加入大黄酚溶液, 搅拌 12 h 后, 静置。将溶液真空旋转蒸发除去乙醇, 用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤以除去未被包合的大黄酚, 将滤液进行喷雾干燥, 得 Chr- β -glu 固体粉末。喷雾干燥的工艺参数: 蠕动泵流速: 1.2 mL/min, 进口温度 90 °C, 喷雾流量 300 mL/h。

2.2 Chr 的测定

2.2.1 HPLC 条件

日本岛津公司 LC-20A 高效液相色谱仪, 色谱

柱为 C₁₈ Hypersil BDS (250 mm \times 4.6 mm)。检测波长: 254 nm; 柱温: 30 °C; 流动相甲醇 - 0.1% 磷酸 (65:35); 流速 1.2 mL/min, 进样量: 20 μL 。

2.2.2 标准曲线考察

精密称取 Chr 对照品适量, 加甲醇溶解, 制成 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Chr 对照品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件分别进样 2、5、10、15、20 μL 。以峰面积的积分值(y)对进样质量浓度(x)进行线性回归, 得回归方程 $y = 1206.8x - 6026.2$, $R^2 = 0.9998$ 。表明 Chr 在 40 ~ 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与峰面积积分值线性关系良好。

2.2.3 精密度实验

制备低、中、高浓度的 Chr 溶液, HPLC 测定, 同日内测 5 次及每天测 1 次、连续测 5 d。结果日内和日间的平均 RSD 均 $< 2\%$, 表明本方法精密度好。

2.2.4 重复性实验

取 Chr 对照品适量, 共 6 份, 按样品处理和测定方法平行测定, 计算 Chr 含量, 结果 RSD 均小于 1%, 表明方法重复性良好。

2.2.5 回收率实验

精确称取 0.03mg 大黄酚, 共 6 份, 与不同浓度的 Chr- β -glu 样品溶液混合, HPLC 测定 Chr 浓度, 回收率均在 95% ~ 105% 内, 且 RSD 值小于 2.0%, 表明本方法具有良好的准确度。

2.3 不同条件对 Chr- β -glu 稳定性的影响

2.3.1 高温条件对 Chr- β -glu 稳定性的影响

取大黄酚复合物适量, 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 °C 温度下放置, 分别于 0、6、12、24、30、36 h 取样, 精密称定质量, 按照 HPLC 测定方法进行操作, 测定大黄酚浓度 C , 以 $\lg C$ 对时间 t 作图为一 直线, 表明 Chr- β -glu 中大黄酚在不同温度条件下降解为一级动力学过程。求出 pH = 7 不同温度条件下复合物中大黄酚的降解动力学方程、降解动力学方程的线性相关系数 (R^2)、降解速率常数 ($K_{\text{Chr-}\beta\text{-glu}}$)、半衰期 ($t_{1/2}$), 结果见表 1。实验结果表明, 温度对大黄酚复合物中大黄酚的影响较小。

表 1 不同温度对大黄酚复合物稳定性影响 (pH = 7, 500LUX) ($n = 3$)
Table 1 The influence of different temperature on stability of Chr- β -glu ($n = 3$)

温度(°C)	降解动力学方程	R^2	$K_{\text{Chr-}\beta\text{-glu}}$	$t_{1/2}$ (h)
25	$\lg C = -0.0058t - 0.4630$	0.9923	0.01336	51.9
37	$\lg C = -0.0065t - 0.4630$	0.9961	0.01497	46.3
60	$\lg C = -0.0067t - 0.4598$	0.9976	0.01543	44.9
100	$\lg C = -0.0068t - 0.4495$	0.9967	0.01566	44.3

2.3.2 光照强度条件对 Chr- β -glu 稳定性的影响

取 Chr- β -glu 适量,平摊在培养皿里,厚度 ≤ 5 mm,开口置于(500 ~ 4000) lux 的光照箱中放置,25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温,定时取样,按照 HPLC 测定方法进行的操作,测定大黄酚片浓度 C ,以 $\lg C$ 对时间 t 作图为一

线,表明大黄酚复合物在不同光照条件下降解为一级动力学过程。求出大黄酚复合物 25 $^{\circ}\text{C}$, pH = 7 时不同光照强度下大黄酚复合物的降解动力学方程、 R^2 、 $K_{\text{Chr-}\beta\text{-glu}}$ 、 $t_{1/2}$,结果见表 2。实验结果表明,Chr- β -glu 随着光照强度的增加,缓慢下降。

表 2 不同光照强度对大黄酚复合物稳定性影响 (pH = 7, 25 $^{\circ}\text{C}$) ($n = 3$)

Table 2 The influence of different light intensity on stability of Chr- β -glu ($n = 3$)

光照强 (lux)	降解动力学方程	R^2	$K_{\text{Chr-}\beta\text{-glu}}$	$t_{1/2}$ (h)
1000	$\lg C = -0.0059t - 0.4610$	0.9987	0.01359	50.1
2000	$\lg C = -0.0061t - 0.4631$	0.9955	0.01405	49.3
3000	$\lg C = -0.0064t - 0.4583$	0.9962	0.01474	47.0
4000	$\lg C = -0.0066t - 0.4583$	0.9998	0.01520	45.6

2.3.3 pH 条件对 Chr- β -glu 稳定性的影响

分别用预热至 25 $^{\circ}\text{C}$ 的 pH 4、6、7、8、10 PBS 缓冲液配成质量浓度为 0.1 mg/mL 的 Chr- β -glu 溶液,分别于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中放置,取样,测定大黄酚片浓度 C ,以 $\lg C$ 对时间 t 作图为一曲线,表明大黄酚复合物在不同 pH 条件下降解为一级动力学过程。求出大黄酚复合物 25 $^{\circ}\text{C}$, pH = 7 时不同光照强度下

大黄酚复合物的降解动力学方程、 R^2 、 $K_{\text{Chr-}\beta\text{-glu}}$ 、 $t_{1/2}$,结果见表 3。实验结果表明,大黄酚复合物随着溶液 pH 值升高,降解速度加快稳定性下降。大黄酚复合物在 pH 为 10 的缓冲溶液中的半衰期仅为 26.2 h。在碱性条件下,大黄酚苯环上的 -OH 以 -O 的形式存在,其给电子能力进一步加强,致使碳链的亲电反应活性大大增强,故 Chr- β -glu 在碱性条件下不稳定。

表 3 不同 pH 对大黄酚复合物稳定性影响 (pH = 7, 25 $^{\circ}\text{C}$) ($n = 3$)

Table 3 The influence of different pH on stability of Chr- β -glu ($n = 3$)

pH	降解动力学方程	R^2	$K_{\text{Chr-}\beta\text{-glu}}$	$t_{1/2}$ (h)
4	$\lg C = -0.0049t - 0.4496$	0.9955	0.01128	61.4
6	$\lg C = -0.0050t - 0.4530$	0.9960	0.01152	60.2
8	$\lg C = -0.0084t - 0.4654$	0.9958	0.01935	35.8
10	$\lg C = -0.0115t - 0.4601$	0.9979	0.02648	26.2

2.3.4 介质种类对 Chr- β -glu 稳定性的影响

取数份 Chr- β -glu 适量,精密称定,分别用蒸馏水、肠溶液、甲醇、乙醇溶解,配制质量浓度为 0.1

mg/mL 的溶液,分别于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中放置,取样。结果如表 4 所示,与甲醇和乙醇环境相比,大黄酚复合物在蒸馏水和肠溶液中较为稳定。

表 4 介质种类对大黄酚复合物稳定性影响 (37 $^{\circ}\text{C}$) ($n = 3$)

Table 4 The effect of different solvent types on stability of Chr- β -glu ($n = 3$)

介质种类	降解动力学方程	R^2	$K_{\text{Chr-}\beta\text{-glu}}$	$t_{1/2}$ (h)
蒸馏水	$\lg C = -0.0051t - 0.4634$	0.9962	0.01175	59.0
肠溶液	$\lg C = -0.0054t - 0.4581$	0.9941	0.01244	55.7
甲醇	$\lg C = -0.0060t - 0.4553$	0.9993	0.01382	50.0
乙醇	$\lg C = -0.0063t - 0.4553$	0.9981	0.01451	47.7

3 讨论

对大黄酚包合物研究表明^[8-12],游离大黄酚自身受光、温度、pH 等因素影响较大,易氧化、水解,因

而大黄酚及其复合物制剂应低温、避光且充氮保存。

大黄酚属蒽醌类化合物,在蒽醌环上有 2 个羟基和 3 位有一个甲基,易发生氧化还原等降解反应,且降解反应复杂。实验结果表明,增加升高温度和

光照强度、提高溶液 pH 值以及改变环境条件均能影响大黄酚复合物的降解速率,且大黄酚复合物在不同温度和酸碱条件下的降解反应均遵循一级动力学规律。大黄酚复合物可用来压片和装胶囊,因此不仅增加了药物的稳定性,而且便于贮存和运输,较好地解决了大黄酚临床应用中的一些问题,具体药效学方面有待于进一步研究。同时本研究关于降解机制的探讨和研究结果,对后续控制方法的建立及稳定化方案的设计具有一定指导意义。

参考文献

- Seo EJ, Ngoc TM, Lee SM, *et al.* Chrysophanol-8-*O*-glucoside, an anthraquinone derivative in rhubarb, has antiplatelet and anticoagulant activities. *J Pharm Sci*, 2012, 118: 245-254.
- Kim SJ, Kim MC, Lee BJ, *et al.* Anti-Inflammatory activity of chrysophanol through the suppression of NF-kappaB/caspase-1 activation *in vitro* and *in vivo*. *Molecules*, 2010, 15: 6436-6451.
- Kimura Y, Sumiyoshi M, Taniguchi M, *et al.* Antitumor and antimetastatic actions of anthrone-C-glucoside, cassialoin isolated from *Cassia garrettiana* heartwood in colon 26-bearing mice. *Cancer Sci*, 2008, 99: 2336-2348.
- Li SJ, Li CG, Hou Y, *et al.* Advances of chrysophanol on anti-aging research. *J Hebei North Univ*, 2009, 26(1): 69-70.
- Xue ZX(薛占霞), Gao YS(高永山), Shen LX(沈丽霞). Antioxidants mediate chrysophanol-improved learning and memory impairment in mice induced by ammonium chloride. *Adv Pharm Bull* (中国药理学通报), 2015, 31: 1330-1331.
- Zhao Y, Fang Y, Li J, *et al.* Neuroprotective effects of chrysophanol against inflammation in middle cerebral artery occlusion mice. *Neurosci Lett*, 2016, 630: 16-22.
- Lim W, Yang C, Bazer FW, *et al.* Chrysophanol induces apoptosis of choriocarcinoma by through regulation of ROS and the AKT and ERK1/2 pathways. *J Cellul Physiol*, 2017, 232: 331-339.
- Yan CL(严春临), Zhang J(张季), Zhang DS(张丹参), *et al.* Study on preparation of chrysophanol microcapsule and its *in vitro* release behavior. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2011, 3: 7-10.
- Wang YL(王永利), Zhang MM(张明媚), Li WS(李维爽), *et al.* Preparation and quality evaluation of chrysophanol liposome. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2011, 9: 825-827.
- Wu Z(吴振), Li H(李红), Chen G(陈岗), *et al.* Optimization of preparation technology of chrysophanol-glucan complex based on central composite design and response surface methodology. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2014, 45: 1540-1544.
- Li H(李红), Wu Z(吴振), Chen G(陈岗), *et al.* Research on the preparation methods of inclusion complex of chrysophanol. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28: 575-578.
- Wu Z(吴振), Li H(李红), Chen G(陈岗), *et al.* Supermolecular inclusion property of methylated- β -cyclodextrin with chrysophanol and its *in vitro* release behavior. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 1174-1177.
- Huang HN(黄红娜), Zhang DS(张丹参), Zheng XX(郑晓霞), *et al.* Preparation of chrysophanol loaded polybutylcyanoacrylate nanocapsules and its quality inspection. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2010, 41: 547-550.
- Wang LH(王立华), Mao WX(毛微曦), Huang HT(黄慧婷), *et al.* Preparation and quality evaluation of chrysophanol liposomes. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2014, 45: 2014-2017.
- Wang YL(王永利), Wang LH(王立华), Li WS(李维爽), *et al.* Preparation and quality evaluation of chrysophanol liposomes. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2011, 42: 1119-1121.
- Zhao M(赵梅), Wang XD(王晓东), Wang X(王晓), *et al.* Application of supramolecular inclusion technique in pharmaceutical development. *Shandong Sci* (山东科学), 2012, 25: 103-107.
- Lu J(陆娟), Yang F(杨帆), Liu CM(刘春明). Optimization of the extraction technology of total alkaloids from *Radix Sophorae Tonkinensis* with ethanol reflux extraction technology. *J Changchun Norm Univ* (长春师范学院学报), 2011, 10: 48-52.
- Yang XQ(杨小青), Song JC(宋金春), Xie SL(谢顺岚), *et al.* Comparison of antioxidant activity of the total alkaloids in lotus plumule by different extraction methods. *China Med Herald* (中国医药导报), 2015, 12(18): 100-104.

(上接第 125 页)