

中药口服液中鞣花酸分子稳定储存的制剂学机制与调控策略

黄浩洲¹, 林俊芝², 魏夕川¹, 马鸿雁¹, 刘海燕^{3,4}, 樊三虎^{3,4},
邹文铨⁵, 韩丽^{1*}, 张定莖^{1*}

- (1. 成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137;
2. 成都中医药大学附属医院中心实验室, 四川 成都 610072; 3. 成都市三勒浆药业集团, 四川 成都 610000;
4. 乳品营养与功能四川省重点实验室, 四川 成都 610000; 5. 四川大学化学学院, 四川 成都 610064)

摘要: 鞣花酸普遍存在于植物中, 被认为是具有开发潜力的抗氧化与抗肿瘤候选药物。但鞣花酸极易沉淀, 如何提高其生物利用度一直是制药行业关注的问题。本课题组偶然发现, 三勒浆口服液在低温条件下储存稳定性非常优异, 鞣花酸呈现“低温易溶”的反常现象。为揭示其科学原理, 讨论相应的调控策略, 本文将该口服液分别在高、中和低3种温度下储存3个月, 采用沉淀量、上清液-沉淀HPLC化学轮廓、沉淀形貌和物理相态综合表征等分析方法系统追踪调查存放过程中口服液成分与相态的变化规律。结果显示, 低温下的沉淀量仅为室温1/3, 温度升高, 沉淀量急剧增加。上清液-沉淀物HPLC分析发现鞣花酸沉淀来源于化学降解与物理沉降两条途径。化学降解与河黎勒酸、柯里拉京等水解鞣质酸性条件下水解产生鞣花酸有关。物理沉降与升温后多酚胶体缔合度与黏度降低有关。该研究阐释了中药液体制剂中鞣花酸稳定机制, 为含鞣花酸制剂的高效利用及澄清晰度改善提供了理论依据。

关键词: 鞣花酸; 中药; 口服液; 澄清晰度; 胶体; 化学沉淀

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)04-0737-09

Pharmaceutical mechanism and control strategy for storage of ellagic acid stably in traditional Chinese medicine oral liquid

HUANG Hao-zhou¹, LIN Jun-zhi², WEI Xi-chuan¹, MA Hong-yan¹, LIU Hai-yan^{3,4},
FAN San-hu^{3,4}, ZOU Wen-quan⁵, HAN Li^{1*}, ZHANG Ding-kun^{1*}

- (1. Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research and Utilization on Chinese Material Medical Resources Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Pharmacy College, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. Central Laboratory, Teaching Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China; 3. Sanajon Pharmaceutical Group, Chengdu 610000, China; 4. Sichuan Key Laboratory of Nutrition and Function of Dairy, Chengdu 610000, China; 5. College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Ellagic acid is ubiquitous in plants and is considered as a potential candidate for antioxidant and antineoplastic drugs. However, ellagic acid has poor solubility and precipitates easily even after initial solubilization. Improvement of its bioavailability has been a concern of pharmaceutical industry. It was found that storage in Sanlejiang oral liquid at low temperature keeps its stability. Ellagic acid is anomalous in a way that is easily soluble at low temperatures but precipitates at high temperatures. In order to reveal the mechanism of this phenomenon and develop precipitation prevention and control strategies, ellagic acid in Sanlejiang oral liquid was stored at high,

收稿日期: 2018-12-20; 修回日期: 2019-01-07.

基金项目: 中国博士后基金面上项目 (2017M623308XB); 成都中医药大学科技发展基金资助项目 (ZRQN1775, ZRYY1717); 成都中医药大学中药学学科特色创新科研团队 (CXTD2018006); 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划 (QNXZ2018003).

*通讯作者 Tel: 86-28-61800231, Fax: 86-28-61800127, E-mail: 465790643@qq.com; hanliy@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-1131

medium and low temperatures for three months. The changes of composition and phase state of the whole system during storage were systematically tracked and studied by means of precipitation amount or morphology, HPLC chemical profile of supernatant *versus* precipitates, and comprehensive characterization of physical phase state. The results show that the amount of precipitation at low temperature is only 1/3 of that at normal room temperature. As the temperature rises, the sedimentation increases sharply. HPLC analyses of supernatant *versus* precipitates revealed that ellagic acid precipitation originated from two ways: chemical degradation and physical deposition. The chemical sedimentation is related to the hydrolysis of tannins under acidic condition, forming chebulagic acid and corilagin. Physical sedimentation is related to the decrease of the association degree and viscosity of polyphenol colloids when temperature rises. This study elucidated the stability mechanism of ellagic acid in liquid preparations of TCM, and provided the mechanistic basis for efficient utilization and solution preparation of ellagic acid.

Key words: ellagic acid; traditional Chinese medicine; oral liquid; clarity; colloid; chemical precipitation

鞣花酸 (ellagic acid, EA) 是一种天然存在的多酚化合物, 具有很强的抗氧化^[1]和抗癌特性, 大量存在于各种浆果、干果和中药材中^[2]。EA 抗肿瘤活性主要归因于直接的抗增殖和凋亡作用。同时, 可抑制肿瘤细胞的迁移、细胞外基质的侵袭和血管生成, 还可增加肿瘤对化疗和放疗的敏感性^[3,4]。此外, EA 还具有较强的抗炎^[5]、保肝^[6]、抗辐射^[7]、降血脂^[8]及保护神经系统^[9]、预防糖尿病^[10]和心血管疾病^[11]等作用。鉴于其突出的抗癌作用和健康益处, 在欧美国家被作为潜在的抗肿瘤活性成分及食品、化妆品的补充膳食剂。

EA 在纯水中极为难溶, 溶解度小于 $9.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (pH 7.4)^[12], 这与其特殊的平面结构有关 (图 1)^[13]。EA 中苯环容易与其他 EA 分子的苯环形成疏水作用, 形成结晶。虽然分子中羟基有一定水溶性, 但分子间的氢键作用更倾向形成较为稳定的规则层状晶体结构^[13,14]。因此, 当 EA 以传统的固体制剂形式服用时, 体内吸收差^[15]、生物利用度低^[16], 被归为 BCS IV 类药物^[17]。为提高其生物利用度, β -环糊精^[17]、纳米囊泡^[18]和固体分散体^[19]被用于 EA 的增溶, 使其溶解度达到了 $39 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上。但有趣的是, 一些果汁、保健饮品^[20]和中药口服液中 EA 的含量远高于该数值^[21]。本课题组发现中药三勒浆口服液中 EA 的含量高达 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[22], 溶解度是纯水的 50 倍以上。这说明当 EA 以分子态存在于液体制剂时, 更能确保其药效的发挥。然而, 液体制剂普遍存在稳定性差的共性问题。EA 分子在存放过程中逐渐析出, 转移形成沉淀, 导致药效的降低。这表明液体制剂中 EA 的增溶体系并不十分稳定。因此, 探寻中药口服液中 EA 分子态稳定储存的

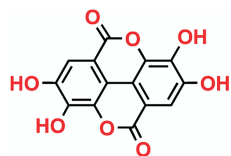


Figure 1 Structure of ellagic acid (EA)

制剂学原理和调控策略非常必要。三勒浆口服液 (Sanlejiang oral liquid, SOL) 处方源于印度阿育吠陀医学及藏医名方三果汤 (哲布松散), 由余甘子、诃子和毛诃子等比例组成。现代药理学研究表明, 该处方具有显著的抗氧化^[23]、抗肿瘤^[24]、抗牙龈炎^[25]和降血脂^[26]等药理作用, 成为风靡欧美的补充膳食剂。SOL 在存放过程中不断形成沉淀物, 1~2 个月后会 在瓶底产生明显的片状沉淀, 其主要成分就是 EA, 严重影响了产品的外观、活性及患者心理。基于上述特征, SOL 被选择作为 EA 稳定性的研究对象。

一般地, 化学物质的溶解度随温度的升高而增加。但本课题组在研究中偶然发现, SOL 存在低温下沉淀量明显少于室温的反常现象, 储存 3 个月仅有极少量的肉眼可见沉淀。因此, 本文以该反常现象为切入点, 在 3 个月储存期内探寻沉淀物的形成过程与证据。SOL 分别在低温 (4 °C)、室温 (25 °C) 与高温 (40 °C) 条件下储存 3 个月, 采用沉淀物重量、上清液-沉淀物高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 轮廓变化分析、沉淀物形态观察、稳定性指数、重均分子量、表面张力和黏度等表征方法, 从物理和化学两个角度分析 EA 分子稳定存在的制剂学原理, 以期阐明 EA 影响中药口服液澄清度的微观机制, 为 EA 的高效利用提供新的理论基础与调控策略。

材料与方法

仪器 Shimadzu LC-20AT 液相色谱仪 (日本岛津公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); 马尔文粒径仪 Zetasizer Nano S90 (英国马尔文公司); Turbiscan Lab Expert 多重光稳定性分析仪 (法国 Formulation 公司); DCAT-21 表面张力分析仪 (德国 Dataphysics 公司); DM-2500 显微镜 (德国莱卡公司); LVDV-1T 型黏度计 (上海方瑞仪器有限公司); KQ-500DE 型数控超声仪 (昆山市超声仪器有限公

司); HGC-12A 型氮吹仪 (天津恒奥科技有限公司)。

药品和试剂 三勒浆口服液 (四川华美药业有限公司, 批号: 1804001)。色谱级甲醇 (美国 Fisher 公司); 色谱级甲酸、分析级甲醇、甲苯、盐酸、氢氧化钠、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (成都科隆化学品公司); 对照品没食子酸 (批号: 4051109, 纯度 $\geq 98\%$)、没食子儿茶素没食子酸酯 (批号: PRF7072601, 纯度 $\geq 98\%$)、没食子儿茶素 (批号: 14092403, 纯度 $\geq 98\%$)、儿茶素 (批号: 14051602, 纯度 $\geq 98\%$)、表儿茶素没食子酸酯 (批号: PRF805242, 纯度 $\geq 98\%$)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (批号: PRF15121022, 纯度 $\geq 98\%$)、柯里拉京 (批号: PRF7102406, 纯度 $\geq 98\%$)、鞣花酸 (批号: PRF7101305, 纯度 $\geq 98\%$)、诃子次酸 (批号: AP8070902, 纯度 $\geq 98\%$) (成都普瑞法科技开发有限公司); 诃黎勒酸 (批号: CHB171222, 纯度 $\geq 98\%$)、诃子酸 (批号: CHB171226, 纯度 $\geq 98\%$)、没食子酸乙酯 (批号: CHB171109, 纯度 $\geq 98\%$) (成都克洛玛生物科技有限公司)。

对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 加 50% 甲醇制成含没食子酸 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、没食子儿茶素没食子酸酯 $62 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、没食子儿茶素 $36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、儿茶素 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、表儿茶素没食子酸酯 $56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、表没食子儿茶素没食子酸酯 $92 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、柯里拉京 $132 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、鞣花酸 $116 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、诃子次酸 $104 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、诃黎勒酸 $42 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、诃子酸 $52 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和没食子酸乙酯 $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。

供试品溶液制备 取 SOL (30 mL), 倒入离心管中, 在 $5\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min。精密吸取 1 mL 上清液, 以 50% 甲醇稀释 5 倍, 作为上清液供试品。倾去多余上清液, 加入适量超纯水润洗沉淀物, 再次离心。如此重复两次, 倾去上清液, 沉淀以氮吹仪干燥, 称重后加入 DMSO 20 mL 超声溶解作为沉淀物供试品溶液。

储存过程上清液与沉淀物指纹图谱变化 实验以 15 天为间隔, 分别跟踪调查了 90 天内 3 种温度条件下 (5、25 和 $40\ ^\circ\text{C}$) SOL 的上清液和沉淀的指纹图谱。并对所采集的上清液和沉淀的 EA 峰面积进行提取分析。指纹图谱条件: 色谱柱: Welchrom C_{18} 色谱柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相: 0.2% 磷酸水-甲醇, 采用梯度洗脱, 洗脱程序: 0~6 min, 5% 甲醇; 6~15 min, 5%~7% 甲醇; 15~20 min, 7%~15% 甲醇; 20~25 min, 15%~21% 甲醇; 25~31 min, 21%~22% 甲醇; 31~41 min, 22% 甲醇; 41~47 min, 22%~28% 甲醇; 47~51 min, 28%~32% 甲醇; 51~57 min, 32%~38% 甲醇; 57~70 min, 38%~45% 甲醇; 70~80 min, 45%~65% 甲醇; 检测波长为 270 nm; 体积流量为 1.0

$\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: $25\ ^\circ\text{C}$; 进样量: $10 \mu\text{L}$ ^[22]。

储存前后上清液与沉淀物指纹图谱化学轮廓的变化 为研究 SOL 在室温及升温条件下的化学变化, 两种温度下储存 90 天前后的上清液 HPLC 数据分别使用偏最小二乘法判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 和 S-plot 多元统计方法进行分析差异标志物。按供试品制备方法项下制备上清液供试品。所有样品 HPLC 数据使用 LC-solution 软件版本 1.22sp1 (日本岛津公司) 处理。并将 LC 数据文件导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (版本 2012 130723, 中国药典委员会) 对齐并过滤数据。创建化合物峰表, 包括成分保留时间、分组和峰面积等信息。将每个样品的数据标准化并导入软件 SIMCA-P 13.0 (瑞典 Umetrics 公司), 使用多元统计进行分析 (S-plot、PLS-DA) 并计算。S-plot 图中每个点代表保留时间, X 轴代表变量, 离原点越远的数据点的相对贡献度越大, S-plot 图两端的点代表组间可信度最高的成分^[27]。

水解鞣质模型溶液的制备 精密称取柯里拉京和诃黎勒酸对照品适量, 分别加入纯水配制为各含柯里拉京 $52.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、诃黎勒酸 $54.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。将溶液 pH 值调为 3, 过 0.22 微孔滤膜即得模型溶液。首先使用 HPLC 指纹图谱方法获得两种溶液的初始色谱图, 并将各模型溶液分为 3 份, 称定重量, 置于 5、25 和 $40\ ^\circ\text{C}$ 恒温环境下, 1 周后取出并补足重量, 以同样方法获得 HPLC 指纹图谱。

多重光稳定性分析仪方法 多重光稳定性分析仪可实时获得样品透射光强度 (transmission, T)、背散射光强度 (backscattering, BS)、稳定性指数 (turbiscan stability index, TSI) 和粒径等重要的物理参数。TSI 是反映样品稳定性的重要参数, TSI 上升表示稳定性变差。样品中发生任何不稳定现象都会对 T 和 BS 信号强度产生细微影响。这种影响将被记录分析, 表征各种不稳定现象, 包括絮凝、分层及沉淀等。TSI 将所有测量数据纳入其中进行计算, 可在短期内对样品稳定性进行预测和评估。

实验中样品在 880 nm 近红外光源下每 5 min 连续扫描 24 h。扫描高度为 50 mm, 平衡时间为 20 min, 测试温度设定分别为 5、25 和 $40\ ^\circ\text{C}$ 。光学参数设定如下: 连续相光透射强度 (T_0) 为 99.99% (水), 分散相折射率 (n_p) 为 1.36, 连续相折射率 (n_f) 为 1.33。数据使用 Turbiscan Easy Sof 软件 (版本 2.2.0.82, 法国 Formulacion 公司) 处理, 计算公式如下^[28]:

$$\text{TSI} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^i (x_i - x_T)^2}{n - 1}} \quad (1)$$

其中, x_i 为单次测量的平均透射率, x_T 为 x_i 平均值, $x_T = (x_1 + x_2 + \dots + x_i + 1 + \dots + x_n) / n$, n 为扫描次数。

粒径计算基于朗伯-比尔定律。透射光强度 (T) 与颗粒体积分数 (ϕ) 和平均粒径 (d) 之间的具体数学关系如下:

$$T(l, r_i) = T_0 e^{-\frac{2r_i}{l}}, l(d, \phi) = \frac{2d}{3\phi Q_s} \quad (2)$$

其中, r_i 为电池的半径, T_0 为连续相的透射光强度, l 为光子平均自由步长。

SOL不同温度下物理参数测定方法

显微观察及制片方法 吸取少量 SOL, 直接滴于载玻片上, 盖好盖玻片, 采用 DP73 型 CCD 图像采集和计算机图像分析系统完成普通显微观察及图像采集。

表面张力测定方法 将仪器设置为 5、25 和 40 °C 温度下, 加入 SOL 30 mL, 温度平衡后使用 Wilhelmy 吊片法分别测定表面张力。

黏度测定方法 将仪器分别设置为 5、25 和 40 °C 温度下, 选择 1 号转子, 加入 SOL 20 mL, 转速设为 12 $r \cdot \min^{-1}$, 分别测定黏度。

Zeta 电位测定方法 将仪器温度分别设置为 5、25 和 40 °C 温度下, 置于马尔文 Nano S90 毛细管样品池中, 设定分散剂为水, 样品折光率为 1.36, 并测定其 zeta 电位。

分子量测定方法 将仪器设置为 5、25 和 40 °C 温度下, 置于马尔文 Nano S90 样品池中, 样品折光率为

1.36, 标准物质为甲苯, 设置第 1 个样本为纯水, 其余分别稀释 2~10 倍, 依次测量含 SOL 0、0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 的样品散射光强度, 将其与标准物 (甲苯) 产生的散射进行比较, 计算分子量。

统计学方法 统计数据处理使用的软件为 SPSS V12.0 版本, 统计方法为 ANOVA 单因素方差分析, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

结果

1 化学稳定性测试

1.1 不同温度下 SOL 沉淀物的重量变化及分型 通过离心沉淀量统计发现, 3 种温度条件下低温的沉淀量明显低于室温和高温的沉淀量 (图 2A), 表明低温有利于 SOL 的稳定性。室温下的上清液和沉淀指纹图谱 (图 2B, C) 可发现, EA 在上清液中不断减少, 说明 EA 直接进入沉淀。通过换算比对发现, 上清液中损失的 EA 和沉淀中增加的 EA 并不一致, 沉淀中 EA 远多于上清液中损失的 EA。因此, 推测 EA 来源可能有两种途径: 一部分来自 SOL 中 EA 自身沉淀, 即上清液损失的 EA 量, 定义为物理沉淀; 另一部分可能来自于化学转化形成的沉淀, 因此沉淀中 EA 减去上清液中损失的 EA 定义为化学沉淀。计算公式如下:

$$S_p = 5(p_0 - p_n)$$

其中, S_p 为 EA 物理沉淀量, p_0 为第 0 天上清液色谱图中 EA 的峰面积, p_n 为第 n 天上清液中 EA 的

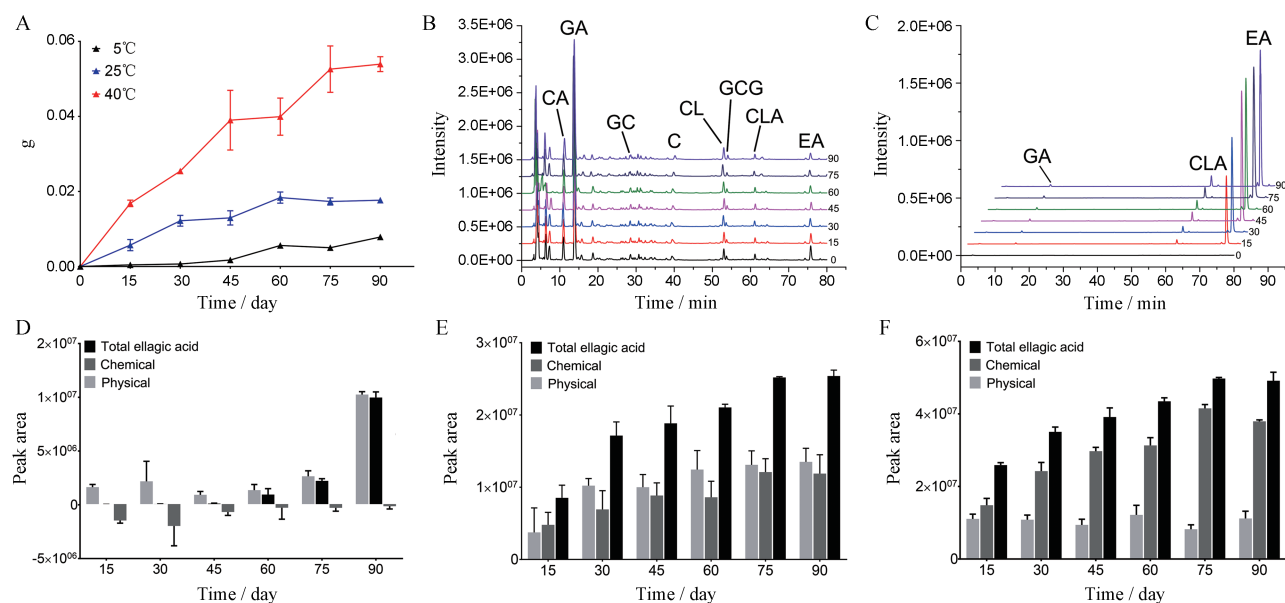


Figure 2 The results of centrifugation and chromatographic data analysis under different temperature storage conditions within three months. A: Centrifugal sedimentation results; B: Supernatant chromatographic results at 25 °C; C: Sedimentation chromatographic results at 25 °C. Comparison of total ellagic acid precipitation, chemical precipitation and physical precipitation at 5 °C (D), 25 °C (E), 40 °C (F). GA: Gallic acid; CA: Chebulic acid; GC: Gallocatechin; C: Catechin; CL: Corilagin; GCG: Gallocatechin gallate; CLA: Chebulagic acid; EA: Ellagic acid

峰面积。

$$S_c = 2P_n/3 - S_p$$

其中, S_c 为 EA 化学沉淀量, p_n 为第 n 天时沉淀物色谱图中 EA 的峰面积。

EA 物理沉淀量与化学沉淀量在低温 (5 °C)、室温 (25 °C) 和高温 (40 °C) 条件下的计算结果如图 2D~F。

在低温下, 沉淀物指纹图谱中显示的 EA 含量 (总量) 在 45 天内与物理沉淀量并不匹配, 计算出的化学沉淀为负值。这可能与 EA 形成的胶粒有关, 在这段时间内, EA 胶粒有所聚集但并未形成沉淀, 因而在离心过程中 EA 并未完全进入沉淀, 但由于自身较大的粒径在制样过程中被滤膜拦截。45 天后, 沉淀物总量和物理沉淀量基本相当, 几乎无化学沉淀, 沉淀物的产生只与自身物理不稳定性有关。

在室温与高温下, 沉淀物中既有 EA 的物理沉淀物, 也有化学沉淀物。随着储存时间的延长, 沉淀物中 EA 的含量不断增加。不同的是, 室温条件下, EA 的物理沉淀量稍高于化学沉淀量; 而高温条件下, 物理沉淀量几乎没有上升, 说明物理沉淀量快速到达了溶解—沉淀平衡, 但 EA 的化学沉淀量持续上升, 且远高于物理沉淀量。上述结果表明, EA 沉淀形成与温度密切相关, 低温显著抑制了其化学沉淀的形成, 同时也延缓了物理沉淀的产生。

1.2 多元统计分析研究储存前后上清液的差异化合物 PLS-DA 分析结果见图 3A。室温下, $R^2X = 0.910$, $R^2Y = 0.993$, $Q^2 = 0.981$ 说明模型质量良好。为防止过度拟合, 进行内部验证测试。设定排列为 100, 室温下, $R^2 = (0.0, 0.326)$, $Q^2 = (0.0, -0.211)$ 结果见图 3B。

进一步采用 S-plot 寻找差异化学标志物。图 3C 显示储存前后化学成分发生了显著变化。

在室温下, 鉴定出 6 个显著变量, 分别为没食子酸 ($R_T = 13.993$)、鞣花酸 ($R_T = 75.932$)、没食子儿茶素 ($R_T = 28.653$)、柯里拉京 ($R_T = 53.158$)、诃黎勒酸 ($R_T = 62.710$) 和儿茶素 ($R_T = 39.984$)。柯里拉京和没食子酸在储存后有所增加, 其余呈增加趋势的化合物未被鉴定出, 可能是水解或氧化反应产生的新化合物。

在高温下, 图 3D 中 $R^2X = 0.948$, $R^2Y = 0.991$, $Q^2 = 0.961$, 模型质量良好。内部验证测试 $R^2 = (0.0, 0.206)$, $Q^2 = (0.0, -0.232)$, 结果见图 3E。图 3F 鉴定出 7 个显著变量, 分别为没食子酸 ($R_T = 13.949$)、诃子次酸 ($R_T = 11.239$)、鞣花酸 ($R_T = 75.907$)、儿茶素 ($R_T = 39.945$)、没食子儿茶素 ($R_T = 28.632$)、柯里拉京 ($R_T = 52.739$)、诃黎勒酸 ($R_T = 62.812$)。结果表明, 高温下 SOL 化学变化表现更为复杂, EA 和没食子酸的变化也更明显。从室温和高温结果分析可知, 诃黎勒酸和柯里拉京均具有较为明显的差异。这是由于 SOL 的 pH 值较低, 在 2.5~3.5 之间, 该条件下一些大分子水解鞣质由于具有不稳定的酯键, 可发生水解反应。其中, 诃黎勒酸首先水解生成柯里拉京和诃子次酸等物质^[29], 而柯里拉京可继续水解, 产生了大量的 EA 和没食子酸^[30]。这解释了实验中没食子酸和 EA 含量增加的现象, 水解生成的 EA 则由于物理不稳定性而产生了更多的沉淀物。

从图 3C 中可以发现, 这种作用在室温条件下依然存在, 但由于温度降低抑制了反应, 故差异较高温更小。实验发现, 一些儿茶素类物质在温度上升的样品中显著降低。可能是类物质易在高温下聚合成缩合鞣

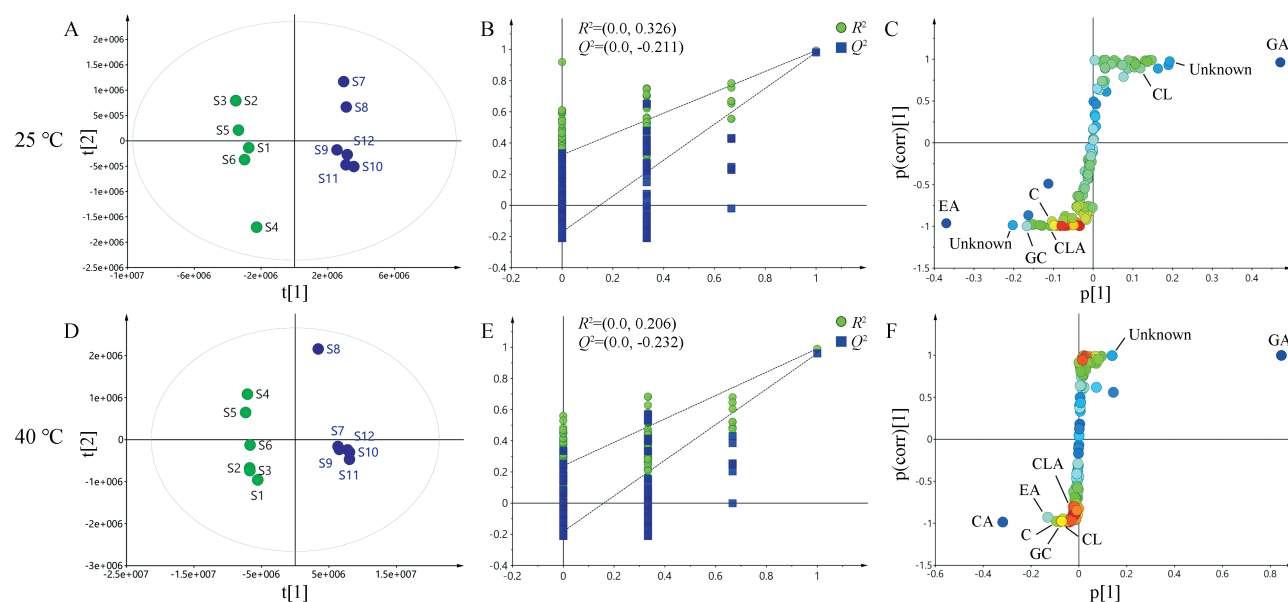


Figure 3 The results of sanlijiang oral liquid (SOL) supernatant before and after storage at 25 °C and 40 °C by multivariate statistical analysis (PLS-DA, S-plot); A, D: PLS-DA results; B, E: Model validation results; C, F: S-plot results

质所导致。

1.3 模型溶液验证 实验结果如图4所示。不同温度下(图4A~C)两种对照品模型溶液均有不同程度的下降。诃黎勒酸溶液(图4D~F)中发现有新生成的没食子酸和EA,并呈上升趋势,而柯里拉京溶液(图4G~I)也是如此。实验还发现,不同温度下降解速率与温度呈正相关,这与上述结果一致。该实验进一步说明SOL中水解鞣质化学稳定性与温度有关,并验证了诃黎勒酸和柯里拉京的化学不稳定性导致EA的产生。

2 物理稳定性及相关参数测试

上述实验证明SOL物理和化学的稳定性与温度密切相关。低温抑制了化学降解,因而化学稳定性提高,但降温过程对提高物理稳定性机制尚未明确,因此进一步考察了不同温度下SOL物性变化,试图阐明其稳定机制。

2.1 多重光稳定性分析仪分析不同温度下稳定性 Turbiscan Lab结果如图5所示,SOL的温度越低,稳定性越高。低温降低了透光率(图5A)、稳定性较高

(图5B)。虽然初始粒径较大,但该温度下粒径在186~190 nm之间波动,较为稳定(图5C);室温下透光率有一定增加,TSI和粒径呈直线上升的趋势,稳定性较低温下降(图5D~F)。高温下SOL的情况(图5G~I)与室温相似,但稳定性更差。因此,根据SOL不同温度下物理参数来看,升温在一定程度上破坏了多酚分子缔合胶体结构,使得部分EA分子失去多酚分子保护而沉淀;降低温度使得SOL获得较大的初始粒径,增大了多酚形成的缔合胶体缔合度^[11],保护了EA分子,有利于其稳定性。

2.2 SOL显微镜观察 显微镜观察发现(图6),不同温度下沉淀形态及沉淀量均有明显差异。5℃下观察到SOL中有一定的细小的沙粒样聚集物(图6A~C),这可能是多酚和EA形成的缔合胶体聚集产生的部分不溶物质,随时间延长有一定的增多。而25℃(图6D~F)和40℃(图6G~I)下SOL沉淀增长速度非常快。从结果中可见,沉淀首先形成较小的半透明状晶体颗粒,约1~5 μm。随着这种颗粒的增加,有明显的聚集趋势,颗粒与颗粒之间由于较大的表面能而首先产生

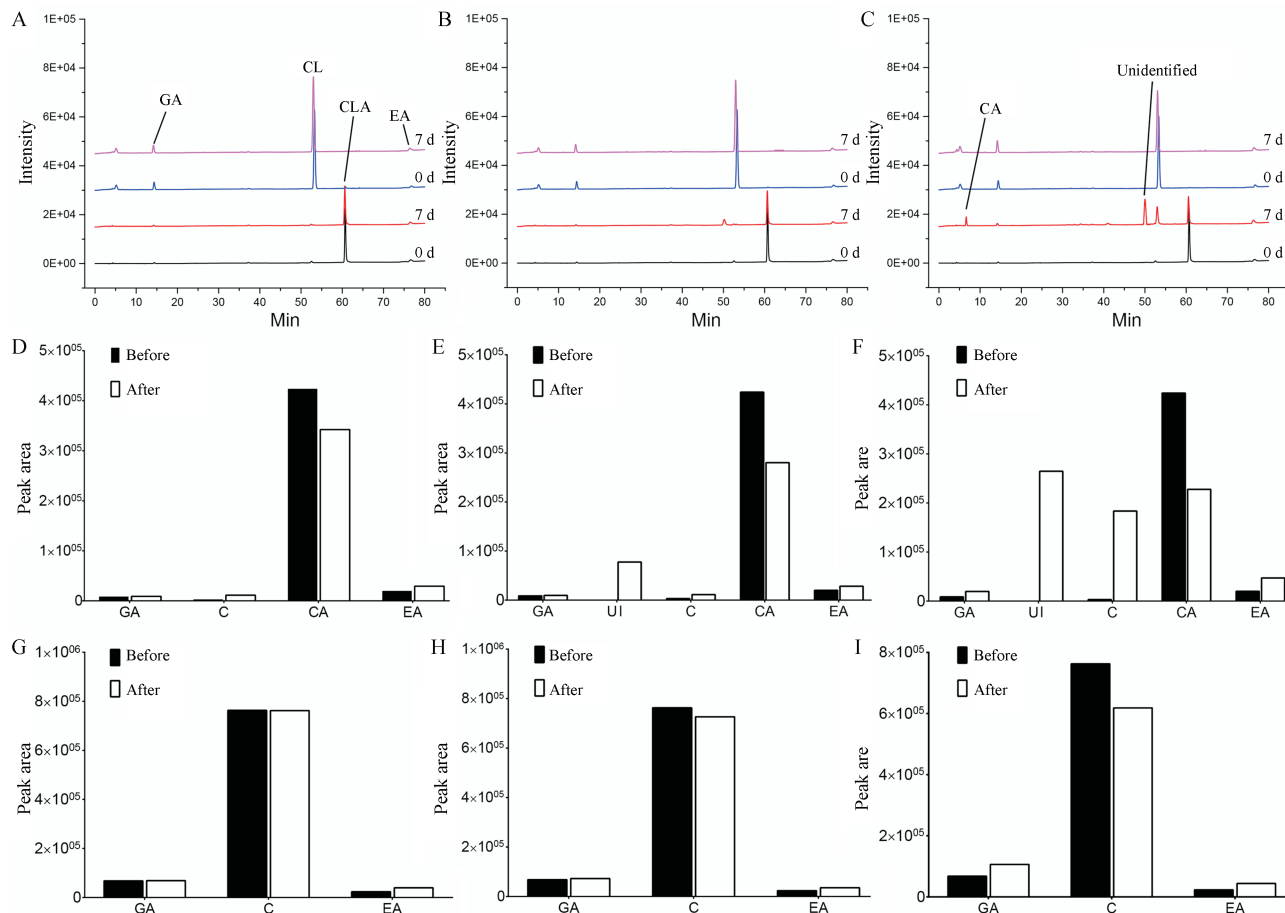


Figure 4 Chromatogram of the corilagin and chebulagic acid model solution at 5 °C (A), 25 °C (B), 40 °C (C). Statistical results of chemical composition peak area in the chromatogram of the chebulagic acid model solution at 5 °C (D), 25 °C (E), 40 °C (F) and corilagin model solution at 5 °C (G), 25 °C (H), 40 °C (I)

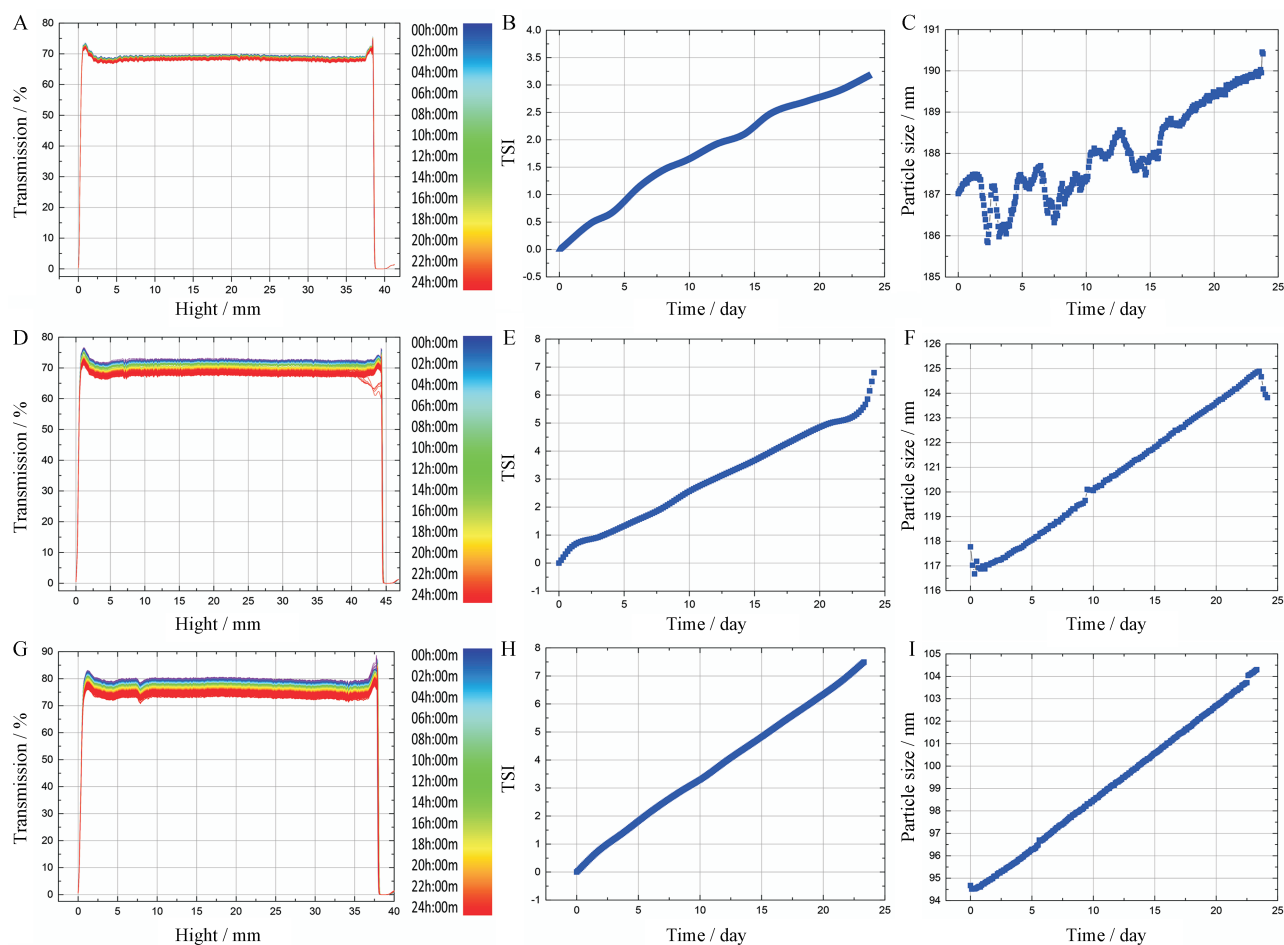


Figure 5 Turbiscan Lab results of different temperature experiments. A, B, C: Change results of transmittance, turbiscan stability index (TSI) and particle size at 5 °C; D, E, F: Change results of transmittance, TSI and particle size at 25 °C; G, H, I: Change results of transmittance, TSI and particle size at 40 °C

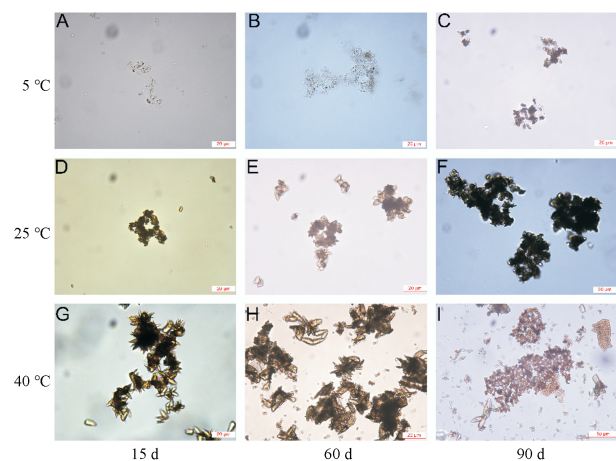


Figure 6 Micrograph of SOL sediments at three temperatures at different time periods. A, B, C: SOL sedimentations in 15, 60, 90 days at 5 °C; D, E, F: SOL sedimentations in 15, 60, 90 days at 25 °C; G, H, I: SOL sedimentations in 15, 60, 90 days at 40 °C

小范围的聚集,最后在90天内形成大面积的片状沉淀。该结果直观显示了EA的微观动态形成过程,并

反映了不同温度下的沉淀形成差异,进一步说明降低SOL体系的温度有助于EA的稳定性。

2.3 不同温度下SOL物理参数 随着温度上升SOL的平均分子量降低(图7A),这与粒径的结果相一致,说明温度降低缔合度增大。随着温度升高SOL的zeta电位绝对值下降(图7B),说明温度越高SOL越不稳定。在考察不同温度SOL表面张力时,设置纯水作为对照,结果发现SOL的表面张力显著低于水的表面张力(图7C),并且随着温度升高而有所降低。表面张力降低虽然有助于EA溶解,但是这种作用力和缔合作用对EA的稳定增溶作用相对弱,不足以抵抗升温产生的化学变化和其自身物理稳定性破坏。因此,升温对EA稳定性依然不利。同样地,黏度测试结果显示SOL明显高于水的黏度(图7D),温度越低黏度越高。黏度的升高抑制了分子间的碰撞几率,使得EA分子或晶体之间的聚合沉淀速率降低,进而抑制了物理沉降行为。从上述的平均分子量和zeta电位的结果可以看出,升温会破坏胶体结构从而导致EA沉淀,但低温

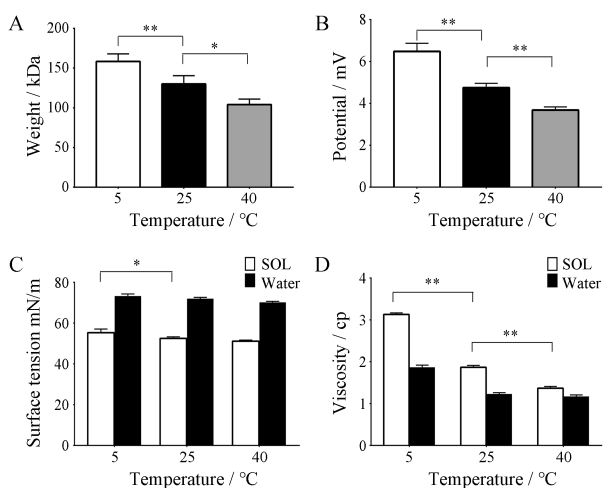


Figure 7 Physical parameters of SOL at 5, 25, 40 °C; A: Average molecular weight; B: Zeta potential; C: Surface tension; D: Viscosity, $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

条件下 SOL 分子缔合度增大,黏度增大,这增强了 EA 稳定性。

讨论

一般而言,中药的液体制剂在低温下更易形成沉淀,其原因主要有两点:首先是悬浮颗粒的热运动减弱,趋于沉降,醇沉过程的冷藏处理便是如此;其次是化学物质的溶解度降低,成分析出,如小檗碱、咖啡因等。EA 极难溶于水,但 SOL 中 EA 却呈现“低温易溶”的反常现象,故本文对此展开研究。

以本文研究为基础,从物理角度分析,其主要作用可能有 3 种:① 多酚分子自身具有一定的表面活性作用^[32];② 缔合胶体对 EA 的增溶作用;③ 溶液黏度的作用。从化学角度分析,主要是低温抑制了鞣质的水解。多酚产生的表面活性作用已在实验中得到验证,而这种作用是在较高温度下 EA 依然能够部分存在于上清液中的主要原因。缔合胶体增溶作用则是通过多酚分子间聚集而使得胶束变大,加上 SOL 黏度的增加,共同抑制了溶液中 EA 分子之间的碰撞和聚集,减少了沉淀量。多酚形成的缔合胶体是一类特殊的胶体,在一定条件下可以从真溶液到胶体溶液之间进行转换,其影响因素主要有多酚浓度、pH 值及温度。pH 值越低、温度越低、多酚浓度越高,则缔合度越高^[31]。因此,如何增强多酚胶体的缔合度及抑制水解作用是稳定性调控的关键所在。实验中 SOL 的 zeta 电位绝对值较低,说明胶体并不稳定,是否是溶液中的金属离子所致还需进一步研究。而 pH 值对 SOL 稳定性可能具有较大影响,调节 pH 值不仅可以改变胶体缔合度,还能控制水解,但过高对胶体缔合度不利,而过低则影响

化学稳定性,因此需从这两个角度出发找到合适的平衡点^[28]。在此基础上,适当增加溶液黏度也具有抑制沉淀的效果。综上,保护缔合胶体、抑制水解作用是提高确保 EA 分子态稳定储存的关键。

实验发现低温下 EA 化学沉淀为负值,为此本文研究了滤膜截留部分 EA 含量。取低温保存的 SOL,以上清液供试品制备方法进行操作,取下滤头推注超出水反复清洗残液,最后用甲醇溶解滤膜上的截留物并测定。结果发现,滤膜 EA 含量约 $23.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,证实滤膜对 EA 的截留导致了化学沉淀负值现象。

本文首次观察到 EA 在 SOL 低温下的稳定表现,阐释了其微观稳定机制并提出相应对策,对 EA 的稳定机制及调控策略进行了补充。研究阐明了 EA 储存过程中的稳定性由 SOL 的化学稳定性和物理稳定性的综合作用。该研究不仅为 EA 的高效利用提供了理论基础,也对中药液体制剂的生产与品质优化具有重要的理论价值与实践意义。

References

- [1] Zafrilla P, Ferreres F, Tomás-Barberán FA. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 3651-3655.
- [2] Usta C, Ozdemir S, Schiariti M, et al. The pharmacological use of ellagic acid-rich pomegranate fruit [J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2013, 64: 907-913.
- [3] Wang N, Wang ZY, Mo SL, et al. Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 134: 943-955.
- [4] Eskandari E, Heidarian E, Amini SA, et al. Evaluating the effects of ellagic acid on pSTAT3, pAKT, and pERK1/2 signaling pathways in prostate cancer PC3 cells [J]. *J Cancer Res Ther*, 2016, 12: 1266-1271.
- [5] El-Shitany NA, El-Bastawissy EA, El-Desoky K. Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa B, inducible cyclooxygenase and pro-inflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10 via an antioxidant mechanism [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 19: 290-299.
- [6] Keshtzar E, Khodayar MJ, Javadipour M, et al. Ellagic acid protects against arsenic toxicity in isolated rat mitochondria possibly through the maintaining of complex II [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2016, 35: 1060-1072.
- [7] Hseu YC, Chou CW, Kumar KJS, et al. Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1

- and Nrf-2 antioxidant genes [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50: 1245-1255.
- [8] da Silva Pinto M, de Carvalho JE, Lajolo FM, et al. Evaluation of antiproliferative, anti-type 2 diabetes, and antihypertension potentials of ellagitannins from strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.) using *in vitro* models [J]. *J Med Food*, 2010, 13: 1027-1035.
- [9] Sanadgol N, Golab F, Mostafaie A, et al. Ellagic acid ameliorates cuprizone-induced acute CNS inflammation *via* restriction of microgliosis and down-regulation of CCL2 and CCL3 pro-inflammatory chemokines [J]. *Cell Mol Biol*, 2016, 62: 24-30.
- [10] Uzor PF, Osadebe PO. Antidiabetic activity of the chemical constituents of *Combretum dolichopetalum* root in mice [J]. *Excli J*, 2016, 15: 290-296.
- [11] Lin MC, Yin MC. Preventive effects of ellagic acid against doxorubicin-induced cardio-toxicity in mice [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2013, 13: 185-193.
- [12] Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, et al. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40: 206-210.
- [13] Rossi M, Erlebacher J, Zacharias DE, et al. The crystal and molecular structure of ellagic acid dihydrate: a dietary anti-cancer agent [J]. *Carcinogenesis*, 1991, 12: 2227-2232.
- [14] McL Mathieson A, Poppleton BJ. The crystal structure of ellagic acid [J]. *Acta Crystallogr B*, 1968, 24: 1456-1461.
- [15] Yan L, Yin P, Ma C, et al. Method development and validation for pharmacokinetic and tissue distributions of ellagic acid using ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) [J]. *Molecules*, 2014, 19: 18923-18935.
- [16] Truchado P, Larrosa M, Garcia-Conesa MT, et al. Strawberry processing does not affect the production and urinary excretion of urolithins, ellagic acid metabolites, in humans [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 5749-5754.
- [17] Bulani VD, Kothavade PS, Kundaikar HS, et al. Inclusion complex of ellagic acid with β -cyclodextrin: characterization and *in vitro* anti-inflammatory evaluation [J]. *J Mol Struct*, 2016, 1105: 308-315.
- [18] Junyaprasert VB, Singhsa P, Suksiriworapong J, et al. Physico-chemical properties and skin permeation of Span 60/Tween 60 niosomes of ellagic acid [J]. *Int J Pharm*, 2012, 423: 303-311.
- [19] Li B, Harich K, Wegiel L, et al. Stability and solubility enhancement of ellagic acid in cellulose ester solid dispersions [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92: 1443-1450.
- [20] Gudej J, Tomczyk M. Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus L.* species [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27: 1114-1119.
- [21] Wang Z, Jin R, Wang JZ, et al. Determination of ellagic acid in Yunshi Ganmao Mixture made from Guizhou Miao medicine *Geum japonicum* [J]. *J Tradit Chin Vet Med (中兽医医药杂志)*, 2018, 37: 61-63.
- [22] Jiang H, Zhao SY, Huang HZ, et al. HPLC fingerprint of Sanlejiang oral liquid and content determination of multi-components [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2017, 48: 3741-3747.
- [23] Gupta SK, Kalaiselvan V, Srivastava S, et al. Evaluation of anti-cataract potential of Triphala in selenite-induced cataract: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *J Ayurveda Integr Med*, 2010, 1: 280-286.
- [24] Peterson CT, Denniston K, Chopra D. Therapeutic uses of triphala in ayurvedic medicine [J]. *J Altern Complement Med*, 2017, 23: 607-614.
- [25] Kalaiselvan S, Rasool MK. The anti-inflammatory effect of triphala in arthritic-induced rats [J]. *Pharm Biol*, 2015, 53: 51-60.
- [26] Saravanan S, Srikumar R, Manikandan S, et al. Hypolipidemic effect of triphala in experimentally induced hypercholesteremic rats [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2007, 127: 385-388.
- [27] Zhang N, Li ZH, Zhao HW, et al. Study on *Radix Scrophulariae* for the treatment of hyperthyroidism rat model of yin deficiency based on urine metabonomics [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1843-1851.
- [28] Huang HZ, Zhao SY, Ke XM, et al. Study on the stability control strategy of Triphala solution based on the balance of physical stability and chemical stabilities [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 158: 247-256.
- [29] Yoshida T, Fujii R, Okuda T. Revised structures of chebulinic acid and chebulagic acid [J]. *Chem Pharm Bull*, 1980, 28: 3713-3715.
- [30] Mao X, Wu LF, Zhao HJ, et al. Transport of corilagin, gallic acid, and ellagic acid from *Fructus Phyllanthi* Tannin fraction in Caco-2 cell monolayers [J]. *Evid-Based Complement Alternat Med*, 2016. DOI: 10.1155/2016/9205379.
- [31] Friedman M, Jurgens HS. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 2101-2110.
- [32] Akhtar M, Murray BS, Afeisume EI, et al. Encapsulation of flavonoid in multiple emulsion using spinning disc reactor technology [J]. *Food Hydrocolloid*, 2014, 34: 62-67.