

辅料对油橄榄叶提取物中橄榄苦苷与羟基酪醇稳定性的影响

孙小明¹, 裴栋¹, 刘晔玮², 邸多隆^{1*} (1.中国科学院兰州化学物理研究所, 中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室和甘肃省天然药物重点实验室, 兰州 730000; 2.兰州大学公共卫生学院营养与食品卫生研究所, 兰州 730000)

摘要: 目的 考察辅料种类、温度和时间对油橄榄叶中橄榄苦苷和羟基酪醇稳定性和均一性的影响。方法 橄榄苦苷与羟基酪醇的检测采用 SinoChrom ODS-BP 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-水(25:75)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 232 nm。结果 以淀粉、羧甲基淀粉钠、微晶纤维素、低取代羟丙纤维素和滑石粉为辅料制得颗粒中的橄榄苦苷与羟基酪醇含量稳定。制颗粒过程中采用 70 ℃烘干 1 h 即可。稠浸膏于 4 ℃条件下, 密闭遮光放置 96 h 后, 其橄榄苦苷与羟基酪醇含量均一且稳定。结论 上述制剂辅料可用于油橄榄叶提取物的颗粒剂或片剂研究, 且含量均一、稳定。

关键词: 油橄榄叶; 橄榄苦苷; 羟基酪醇; 均一性; 稳定性; 高效液相色谱法; 辅料

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)03-0261-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.03.001

Impact of the Excipients on the Stabilities of Oleuropein and Hydroxytyrosol in Olive Leaf Extract

SUN Xiaoming¹, PEI Dong¹, LIU Yewei², DI Duolong^{1*} (1.Key Laboratory for Natural Medicine of Gansu Province, Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; 2.Institute of Nutrition and Food Hygiene of Public Health, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the influence of excipients, temperature and time on the stability and uniformity of hydroxytyrosol and oleuropein in olive leaf extract. **METHODS** The contents of hydroxytyrosol and oleuropein were analyzed by high performance liquid chromatography, equipped with SinoChrom ODS-BP column(4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phases contain acetonitrile and water (25 : 75). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and detection wavelength was 232 nm. **RESULTS** The contents of hydroxytyrosol and oleuropein in solid particles contained starch, sodium carboxymethyl starch, microcrystalline cellulose, low substituted hydroxypropyl cellulose and talcum powder were stable. During the course of preparation, the best condition of 70 ℃ and 1 h should be chosen. Besides, under 4 ℃ and 96 h, the contents of hydroxytyrosol and oleuropein were still stable and uniform. **CONCLUSION** The above excipients can be used in the pharmaceuticals studies and the main compounds in extract are stable.

KEY WORDS: olive leaves; oleuropein; hydroxytyrosol; homogeneity; stability; HPLC; excipients

地中海地区国家多以橄榄油作为食用油, 因此该地区心血管疾病发病率较低^[1]。经研究发现, 橄榄油中富含多酚类成分, 能够有效地预防心血管疾病的发病。其中, 橄榄苦苷和羟基酪醇是最具代表性的多酚类物质, 且在油橄榄叶中含量较高^[2]。橄榄苦苷为裂环烯醚萜类化合物, 羟基酪醇为橄榄苦苷的水解产物, 且其抗氧化活性强于橄榄苦苷^[3]。目前, 油橄榄叶及其提取物已被欧洲药典收载, 具有抗炎、降血压、降血糖和降血脂作

用, 国外已将其作为膳食补充剂使用^[4-5]。

我国甘肃陇南地区适宜油橄榄树的种植, 该地区的油橄榄叶产量丰富且质优。在油橄榄叶提取物及其制剂生产过程中, 其主要成分的含量变化对活性有很大影响, 但目前对油橄榄叶中多酚类化合物的稳定性少有报道^[6-7]。因此, 本实验首次以橄榄苦苷和羟基酪醇为目标化合物, 结合研究实际需要, 考察了常用制剂辅料对其稳定性的影响, 并考察了稠浸膏中橄榄苦苷与羟基酪醇的

基金项目: 国家自然科学基金(21205126); 国家高技术研究发展计划(863 计划, 2014AA022203)

作者简介: 孙小明, 女, 博士, 副研究员 Tel: (0931)4968212
Tel: (0931)4968212 E-mail: didl@licp.cas.cn

E-mail: xmsun@licp.cas.cn

*通信作者: 邸多隆, 男, 博士, 研究员

稳定性与均一性。为油橄榄叶提取物及其制剂生产提供理论依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); BSA224S-CW 型分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); MP10001 电子天平(上海横平科学仪器有限公司); ZFD-5090 型干燥箱(上海智仪分析仪器有限公司); KQ-250DE 数控型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Spring-10R 纯水系统(瑞思捷科学仪器有限公司)。

甲醇(分析纯, 上海广诺化学科技有限公司), 甲醇、乙腈(色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司), 去离子水。油橄榄叶提取物(中科院兰州化物所西北特色植物资源化学重点实验室自制, 橄榄苦苷含量为 52.7%, 羟基酪醇含量为 0.42%); 橄榄苦苷对照品(美国 Sigma 公司, 纯度: 98.9%, 批号: BCBN4404N); 羟基酪醇对照品(成都普菲德生物技术有限公司, 纯度 $\geq 98\%$, 批号: 140105); 淀粉(药用级, 陕西奥克化工有限公司); 羧甲基淀粉钠(CMS-Na, 药用级, 陕西奥克化工有限公司); 微晶纤维素 PH101 型(MCC)和低取代羟丙纤维素(L-HPC)均为药用级, 购自西安天正药用辅料有限公司)。

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 油橄榄叶提取物的制备 净制后的油橄榄叶用 10 倍量水分别加热回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并煎液后过滤, 取滤液经大孔吸附树脂 AB-8 吸附, 以 70%乙醇洗脱, 得洗脱液后, 回收乙醇, 50 °C减压真空干燥得干浸膏, 粉碎后过 80 目筛, 待用。

2.1.2 颗粒的制备 按一定比例取不同种类和比例的辅料与提取物, 过 80 目筛, 混合均匀, 以不同质量的 85%乙醇为黏合剂, 经 20 目筛进行制粒, 18 目筛进行整粒, 鼓风干燥箱内烘干, 待用。

2.2 溶液配制

2.2.1 样品溶液配制 精密称取样品 50 mg, 甲醇溶解, 超声 50 Hz, 15 min, 放至室温并定容至 25 mL, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 待用。

2.2.2 对照品配制 精密称取橄榄苦苷与羟基酪醇对照品 5 mg, 甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 待用。

2.3 色谱条件 通过前期色谱条件优化和方法学

评价, 已经建立了油橄榄叶提取物中橄榄苦苷和羟基酪醇的色谱分析方法^[4]。色谱柱 SinoChrom ODS-BP(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(25:75); 柱温 30 °C; 流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长 232 nm; 进样量 20 μL 。

2.4 烘干时间和时间的选择

2.4.1 温度的选择 以原料-淀粉-CMS-Na(10:6:4)所制的颗粒为分析样品, 分别精密称取 0.5 g 置于已干燥至恒重的扁形称量瓶中, 分别于 50, 60, 70 °C烘干 1 h, 称至恒重, 分析样品干燥失重并测定橄榄苦苷和羟基酪醇含量。

2.4.2 时间的选择 选择原料-淀粉-CMS-Na(10:8:2)所制的颗粒, 分别于 50 °C下烘干 0.5, 1, 1.5, 2, 3 h, 精密称取颗粒 3 g 置于已在与供试品同样条件下干燥至恒重的扁形称量瓶中, 每到所需烘干时间, 称至恒重为止, 取 0.5 g 留样作干燥失重分析和橄榄苦苷、羟基酪醇含量测定。

2.4.3 浸膏中橄榄苦苷和羟基酪醇的均一性和稳定性考察 将油橄榄叶提取物分别配制浓度为 0.6, 0.67 g $\cdot$ mL⁻¹浸膏, 研磨均匀, 分别将样品分为上、中、下 3 层, 于 4 °C避光密闭保存, 并于测定前临时配制。

3 结果

3.1 分析方法的优化与确定

课题组前期针对油橄榄叶中有效成分开展过系统的研究^[8-9], 并建立了同时测定多种成分的分析方法。由于该提取物中羟基酪醇和橄榄苦苷含量比例相差较大, 因此针对这 2 种化合物进行了色谱条件优化, 使目标化合物实现较好的分离, 结果见图 1。

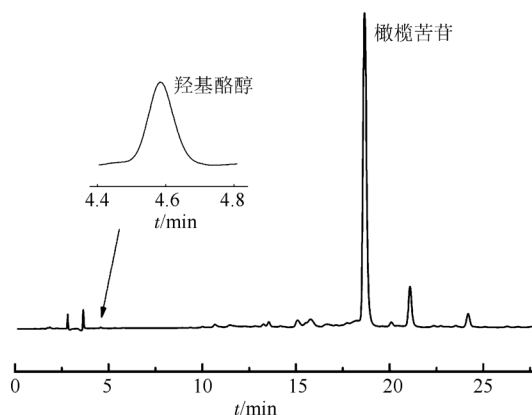


图 1 油橄榄叶提取物液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of olive leaf extract

3.2 辅料对颗粒成型的影响

油橄榄叶提取物中富含黄酮和裂环烯醚萜类化合物, 该类化合物含有较多的酚羟基, 具有较强的抗氧化活性。因此, 以几种常见的片剂辅料为稀释剂和崩解剂, 并通过制粒过程中硬度、黏度、是否易过筛和颗粒得率为检测指标, 考察辅料对该提取物颗粒成型工艺的影响, 结果见表1。

以淀粉和CMS-Na为主要辅料时, 原料-淀粉-CMS-Na(10:8:2)时乙醇的用量少、软材的硬度适中、黏度合适、易于过筛, 并且颗粒得率最高。为了提高颗粒的载药量, 随着颗粒中提取物质量比的增加, 颗粒呈现黏度大、硬度强且不易过筛的特点。因此, 继续尝试了L-HPC和MCC作为药用辅料时, 是否制得合适颗粒。结果表明, 与L-HPC相比, MCC的加入能够提高颗粒的载药量, 并且适宜制粒和过筛。因此确定药物与辅料的最佳比例为CMS-Na:MCC:原料=1:2:7。

表 1 药物与辅料比例的研究

Tab. 1 Results of sample determination

药物与辅料	药辅	硬度	黏度	是否易过筛	得率/%
原料:	1:1:0	适中	适中	易	76.5
淀粉:	2:1:0	适中	偏黏	易	80.7
CMS-Na	4:1:0	偏硬	太黏	不易	60.5
	10:8:2	适中	适中	易	84.5
	10:6:4	适中	适中	易	77.0
	20:8:2	稍硬	较大	不易	66.0
	20:6:4	稍硬	较大	不易	69.3
CMS-Na:	2.5:2.5:5	适中	较小	易	75.2
L-HPC:	1.5:1.5:7	偏硬	较大	不易	54.5
原料	1:2:7	适中	较大	不易	63.0
	2:1:7	适中	较大	不易	53.0
	2:2:6	较小	较小	易	68.0
	1:3:6	偏硬	较小	不易	52.7
	3:1:6	较小	较大	不易	55.0
CMS-Na:	2.5:2.5:5	较小	较小	易	64.2
MCC:	1.5:1.5:7	偏硬	较大	不易	50.5
原料	1:2:7	适中	适中	易	74.5
	2:1:7	偏硬	较大	不易	62.3
	2:2:6	偏硬	较大	不易	55.8
	1:3:6	偏硬	较小	不易	56.6
	3:1:6	较小	较小	易	62.5

3.3 辅料对橄榄苦苷和羟基酪醇稳定性的影响

分别测定并计算提取物和辅料混合及不添加辅料等比例稀释的提取物中橄榄苦苷和羟基酪醇的含量。将辅料与提取物按一定比例混合后, 置于烘箱中 50℃干燥 2h, 并置室温、日光灯下于干燥器中保存 3d 后, 进行含量测定。结果见图 2~3。

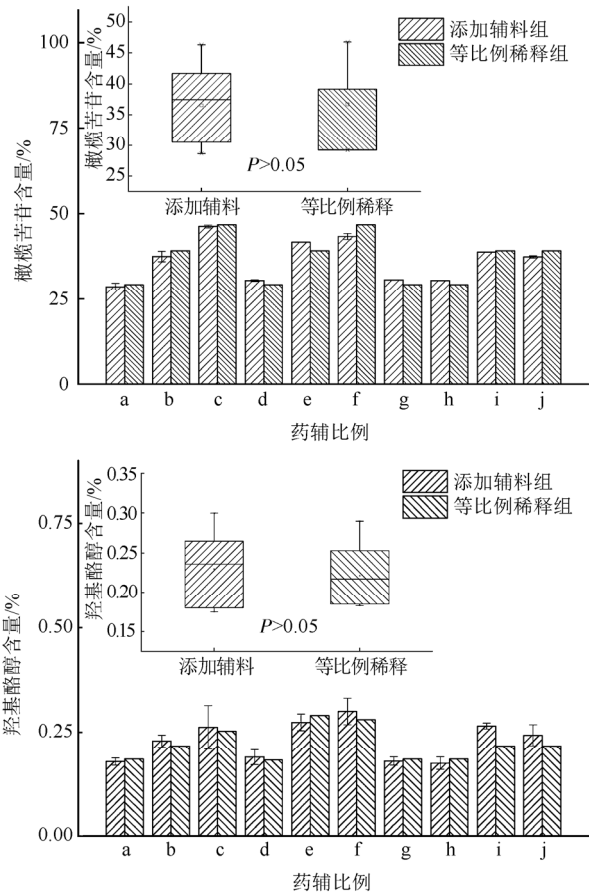


图 2 辅料添加对提取物中橄榄苦苷和羟基酪醇含量的影响
a-提取物: 淀粉=1:1; b-提取物: 淀粉=2:1; c-提取物: 淀粉=4:1; d-提取物: CMC-Na=1:1; e-提取物: CMC-Na=2:1; f-提取物: CMC-Na=4:1; g-提取物: 淀粉: CMC-Na=10:8:2; h-提取物: 淀粉: CMC-Na=10:6:4; i-提取物: 淀粉: CMC-Na=20:8:2; j-提取物: 淀粉: CMC-Na=20:6:4。

Fig. 2 The impact of excipients on the content of oleuropein and hydroxytyrosol in olive leaf extract

a-extract: starch=1:1; b-extract: starch=2:1; c-extract: starch=4:1; d-extract: CMC-Na=1:1; e-extract: CMC-Na=2:1; f-extract: CMC-Na=4:1; g-extract: starch: CMC-Na=10:8:2; h-extract: starch: CMC-Na=10:6:4; i-extract: starch: CMC-Na=20:8:2; j-extract: starch: CMC-Na=20:6:4.

经独立样本 *t* 检验, 添加辅料组与等比例稀释组相比, 并无显著性差异, 表明辅料的添加对提取物中橄榄苦苷和羟基酪醇含量无影响, 几种辅料均可作为制剂学研究的参考。

此外, 由于该提取物原料水溶性较好, 以水作为黏合剂将导致软材极黏, 且易结块、分散性不佳、不易过筛, 所以又继续考察了不同浓度的乙醇对制软材的影响。结果表明, 当乙醇浓度为 85%, 质量比例占处方的 8% 时, 能够很好地将辅料和提取物黏合在一起, 且易于分散和过筛。润滑剂比较了滑石粉和硬脂酸镁 0.3% 含量时二者均

能起到较好的润滑性。鉴于滑石粉的胃肠道刺激性等原因,选择硬脂酸镁作为润滑剂。因此,该处方中采用 85%乙醇作为润湿剂,0.3%硬脂酸镁作为润滑剂。

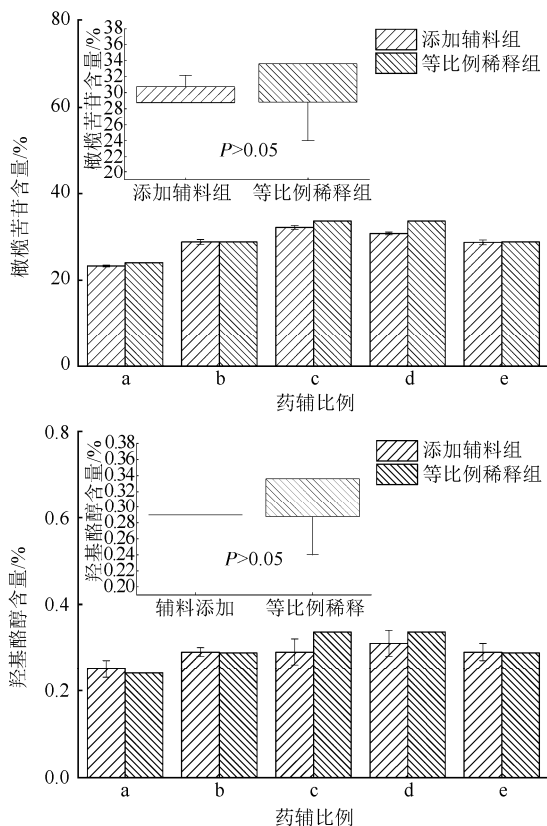


图3 辅料添加对提取物中橄榄苦苷和羟基酪醇含量的影响
a-CMS-Na:MCC:提取物=2.5:2.5:5;b-CMS-Na:MCC:提取物=3:1:6;c-CMS-Na:MCC:提取物=1:2:7;d-CMS-Na:L-HPC:提取物=2:1:7;e-CMS-Na:L-HPC:提取物=1:3:6。

Fig. 3 The impact of excipients on the content of oleuropein and hydroxytyrosol in olive leaf extract

a-CMS-Na:MCC:extract=2.5:2.5:5;b-CMS-Na:MCC:extract=3:1:6;c-CMS-Na:MCC:extract=1:2:7;d-CMS-Na:L-HPC:extract=2:1:7;e-CMS-Na:L-HPC:extract=1:3:6.

3.4 烘干温度和时间对稳定性的影响

干燥是制剂工艺中制粒的关键步骤之一。由于橄榄苦苷熔点为 89~91℃,过高的温度使得提取物粉末发生融化,因此选取其中一种药辅比例,考察其在 50, 60, 70℃条件下,颗粒干燥失重、橄榄苦苷和羟基酪醇的含量变化。结果见表 2。烘干温度为 70℃时仍未对橄榄苦苷与羟基酪醇含量产生影响,因此在制剂研究和生产中,可选择 70℃。此外,分别考察了湿颗粒烘干 0.5~3 h 的橄榄苦苷与羟基酪醇含量,烘干 1 h 后,化合物含量间无显著性差异,因此,表明温度 70℃时,烘干 1 h 即可实现颗粒的干燥,结果见表 3。

表2 温度对橄榄苦苷和羟基酪醇含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 2 The impact of temperature on the content of oleuropein and hydroxytyrosol($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

烘干温度/℃	干燥失重/%	橄榄苦苷含量/%	羟基酪醇含量/%
50	0.47±0.03	24.71±0.15	0.18±0.01
60	1.57±0.05	25.83±0.38	0.21±0.04
70	1.82±0.03	27.02±0.82	0.19±0.05

表3 时间对橄榄苦苷和羟基酪醇含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 3 The impact of temperature on the content of oleuropein and hydroxytyrosol($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

烘干时间/h	干燥失重/%	橄榄苦苷含量/%	羟基酪醇含量/%
0.5	0.25±0.07	26.07±0.81	0.17±0.11
1	0.21±0.04	23.55±0.70	0.24±0.05
1.5	0.25±0.02	24.13±0.23	0.24±0.06
2	0.21±0.03	24.60±0.57	0.19±0.04
3	0.22±0.04	24.44±0.96	0.18±0.08

3.5 提取物中橄榄苦苷和羟基酪醇的稳定性考察

考察药理实验中给予动物浸膏样品中橄榄苦苷和羟基酪醇含量的稳定性和均一性,结果见图 4~5。浓度 0.6 和 0.67 g·mL⁻¹ 的浸膏中橄榄苦苷和羟基酪醇含量稳定均一。

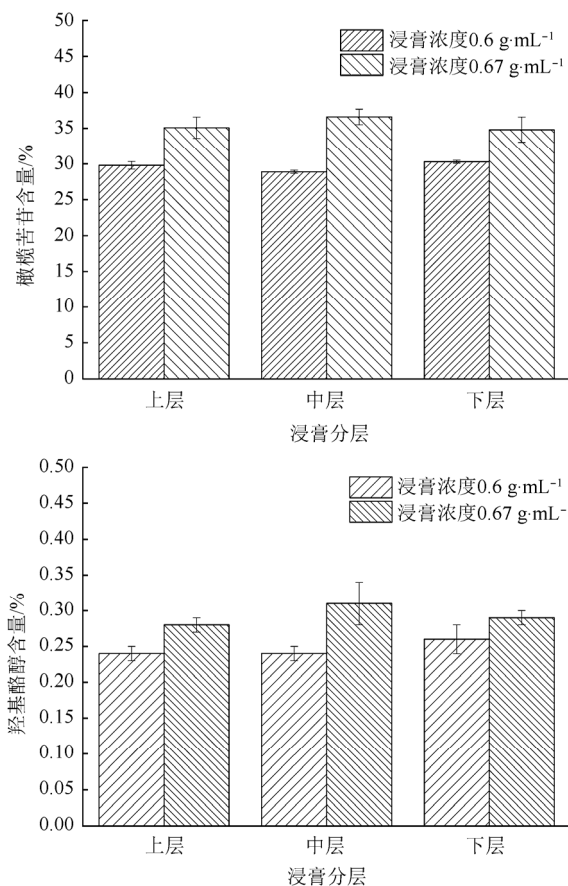


图4 提取物浸膏中橄榄苦苷与羟基酪醇含量均一性

Fig. 4 The dispersion uniformity of oleuropein and hydroxytyrosol in olive leaf extract

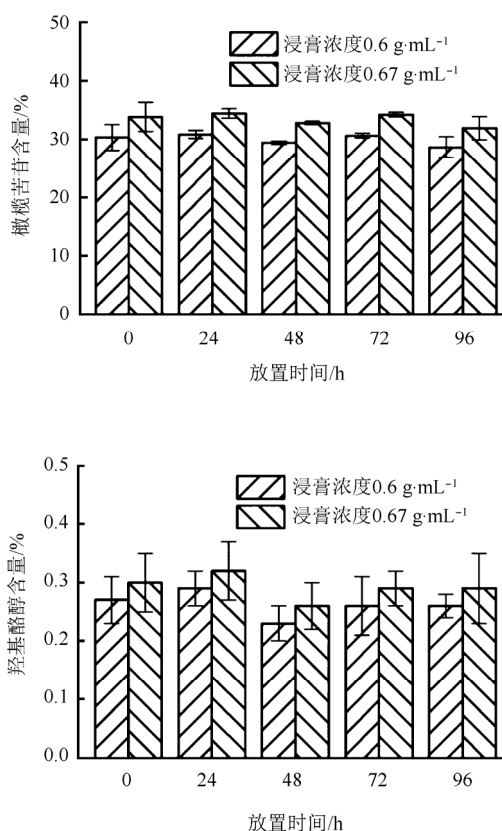


图5 提取物浸膏中橄榄苦苷与羟基酪醇含量稳定性
Fig. 5 The stability of oleuropein and hydroxytyrosol in olive leaf extract

4 讨论

Malik 等^[10]经过较系统的研究认为经过冻融处理环节的油橄榄叶中的橄榄苦苷很快地发生降解,降解率达 57.7%。水提取物中的橄榄苦苷在 7 d 内较稳定,室温条件下 17 d 后完全降解,而 80% 甲醇提取物中,橄榄苦苷在 30 d 内仍较稳定。研究者认为这与叶片中含有的 β -葡萄糖苷酶有关。经煮沸和有机溶剂提取后,酶的活性大大降低使得橄榄苦苷在提取物中较稳定。本研究的提取物经提取后采用大孔吸附树脂分离纯化,富集了橄榄苦苷且其中不含 β -葡萄糖苷酶,因此粉末或浸膏形式下含量均一、稳定。而羟基酪醇具有极强

的抗氧化活性,通常需要低温、密封和遮光条件保存。本研究中所用到的提取物目前阶段于 4 °C 密封且遮光保存,稳定性较好,且在制备颗粒过程中也未见羟基酪醇含量出现明显的变化。因此,上述研究结果表明,常用的颗粒剂和片剂辅料未对油橄榄叶提取物中橄榄苦苷和羟基酪醇含量的稳定性和均一性造成显著性影响。

REFERENCES

- [1] TUCK K L, HAYBALL P J. Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects [J]. J Nutr Biochem, 2002, 13(11): 636-644.
- [2] MONIKA C, ANNA K K, MAREK N. A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein [J]. Food Chem, 2012, 131(3): 940-947.
- [3] ISABEL C F R F, LILLIAN B, MARIA E S, et al. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations [J]. Food Chem, 2007, 103(1): 188-195.
- [4] WANG X F, LI C, LIU Y W, et al. Efficient method for screening and identification of radical scavengers in the leaves of *Olea europaea* L [J]. Biomed Chromatogr, 2011, 25(3): 373-380.
- [5] EP 7. 0 [S]. 2009: 2313.
- [6] XIE P J, HUANG L X, ZHANG C H, et al. Stability of oleuropein in olive leaves extracts and its chelating action to ferrous ions [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2013, 34(4): 133-136.
- [7] WANG C Z, GAO C X, CHEN W Y, et al. The extraction methods and the developing prospect of secoiridoid compounds in *Olea* L. plant [J]. Biomass Chem Eng(生物质化学工程), 2006, 40(2): 45-49.
- [8] XIA Y J, LIU Y F, PEI D, et al. Separation and preparation of polyphenols from leaves of *olea europaea* by preparative medium pressure liquid chromatography [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2014, 45(12): 1689-1692.
- [9] LI C, ZHENG Y Y, WANG X F, et al. Simultaneous separation and purification of flavonoids and oleuropein from *Olea europaea* L. (olive) leaves using macroporous resin [J]. J Sci Food Agric, 2011, 91(15): 2826-2834.
- [10] MALIK N S A, BRADFORD J M. Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive (*Olea europaea* L.) leaves [J]. J Food Agric Environ, 2008, 6(2): 8-13.

收稿日期: 2015-09-14