

· 制剂与质量 ·

山楂叶总黄酮磷脂复合物的研究

熊 阳^{1,2}, 盛卫国¹, 杜佳琦¹, 徐莲英^{1*}

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要: 目的 研究山楂叶总黄酮磷脂复合物的制备方法并对复合物的形成进行验证。方法 以无水乙醇作为反应溶剂; 磷脂与药物的比例为2:1; 反应物质量浓度为20 mg/mL; 60℃ 搅拌2 h至反应液澄清, 除去溶剂后将能溶于二氯甲烷的物质真空干燥即为药物与磷脂的复合物; 采用紫外光谱分析、红外光谱分析、差示扫描分析对复合物的形成进行验证。结果 该方法简单可行, 山楂叶总黄酮与磷脂的复合率达96%以上。复合物的光谱分析与反应物单体及物理混合物有一定的差别。结论 磷脂复合物给药系统能够应用于某些中药提取物, 但与多种成分形成复合物的机制有待进一步研究。

关键词: 山楂叶总黄酮; 磷脂复合物; 制备

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)03-0353-04

Total flavonoids of hawthorn leaves-phospholipid complexX D N G Yang^{1,2}, S H E N G W e i g u o¹, D U J i a - q i¹, X U L i a n - y i n g¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

Abstract: **Objective** To explore the preparation of phospholipid complex of total flavonoids of hawthorn leaves and test the formation of phospholipid complex. **Methods** Using dehydrated alcohol as reaction solvent, the ratio of phospholipid and the drug was 2:1, reactant concentration was 20 mg/mL, reactants were stirred for 2 h at 60℃ until the medium cleared. The solvent was removed by vacuum evaporation, then the matter dissolved in dichloromethane was obtained, that is the complex. The formation of complex was analyzed by using the ultraviolet spectrum, infrared spectrum, and differential scanning. **Results** The method was easy and feasible; The combining ratio was more than 96%. Spectral analysis of complex had some difference between reactant monomer and physical mixture of total flavonoids of hawthorn leaves and phospholipid. **Conclusion** Phospholipid complex delivery system can be used in some Chinese herb extracts, but the mechanism should be studied in future.

Key words: total flavonoids of hawthorn leaves; phospholipid complex; preparation

山楂叶总黄酮是防治心脑血管疾病的安全有效的物质, 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^[1]。黄酮类物质油水分分配系数小, 不易吸收, 其酚羟基在肝脏内易发生葡萄糖醛酸化或甲基化等结合反应而代谢失活, 使其在体内的半衰期短。因此其生物利用度较低, 不能有效地发挥其治疗作用^[2-4]。磷脂复合物是一种新型的、有潜力的给药系统, Bom bardelli 等^[5]在研究脂质体的时候偶然发现: 天然黄酮类化合物对磷脂有特殊的亲和力, 二者可结合形成复合物, 并表现出与母体药物显著不同的生物学特性和药理活性强度。后来的研究发

现, 很多类型的天然成分和天然提取物都可以制成磷脂复合物, 这类磷脂复合物被命名为phyto some。磷脂复合物是将药物与磷脂溶解于适宜的溶剂中, 反应一定时间后蒸去溶剂所得的均一固体物。磷脂复合物的有关研究是自加拿大的学者Venkataram 和Rogers 于1984年发表的文章^[6]而相继开展起来。将灰黄霉素与磷脂共同溶于氯仿中, 蒸去溶剂所得的固体共沉淀物即磷脂复合物对药物的溶出有明显的促进作用, 而且磷脂作为载体可用较少的量(5%)即可促进药物的溶出。随后人们对这种制剂形式进行了广泛的研究, 所研究的药物有Indomethacin、Ke-

* 收稿日期: 2007-06-13

基金项目: 浙江省教育厅资助项目(20060718)

作者简介: 熊 阳(1979—), 女, 浙江中医药大学讲师, 上海中医药大学在读博士, 研究方向为中药新剂型与新型给药系统。

Tel: (021)51322685 E-mail: xyxnb@126.com

* 通讯作者 徐莲英

toprofen、Flurbiprofen、Phentoin、Phenobarbital、Ethopropazine 等。目前国内中药活性成分已有黄芩苷、葛根素、灯盏花素、丹皮酚等制成磷脂复合物。本实验制备了山楂叶提取物的磷脂复合物,并对复合物的形成进行了验证。拟通过磷脂复合物给药系统同时提高苷和苷元的生物利用度,为中药混合性成分的研究提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 8453 紫外可见光谱仪(美国惠普公司),傅里叶变换红外光谱仪(美国 Nicolet 公司), Sartorius Mettler Toledo DSC 822e 差示扫描仪(德国梅特勒公司),Mettler Toledo G135 电子天平(德国梅特勒公司),LXJ—II B 型低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂),旋转蒸发器(上海申生科技有限公司),MS—2000 多点磁力搅拌器(天津市矽新科技有限公司)。

山楂叶总黄酮(山东临沂爱康药业有限公司,含总黄酮 90%),大豆磷脂(上海太伟药业有限公司,PC> 80%,批号 0509207),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 山楂叶总黄酮磷脂复合物的制备方法:称取一定量大豆卵磷脂和山楂叶总黄酮溶于溶剂中,在一定温度下磁力搅拌一定时间,减压蒸馏除去溶剂,再加入二氯甲烷,充分溶解磷脂及复合物,4 000 r/min 离心,取上清液,去除有机溶剂后真空低温干燥,即得山楂叶总黄酮磷脂复合物。产物为棕红色略带黏性的粉末。

2.2 复合率的计算:由于山楂叶总黄酮中成分几乎不溶于二氯甲烷,而磷脂以及磷脂复合物易溶于二氯甲烷,将制备好的磷脂复合物加入适量二氯甲烷,磷脂复合物及多余的磷脂溶于其中,离心后的沉淀经多次以二氯甲烷洗涤后即未复合的山楂叶总黄酮或其他杂质。将沉淀以乙醇溶解,定容,并取适量进行紫外分光光度法测定^[7]。根据测定结果折算出原料药质量。山楂叶总黄酮初始投药量与沉淀药量的差值即为与磷脂复合的药量,从而计算出山楂叶总黄酮与磷脂的复合率。

2.3 单因素影响试验

2.3.1 反应溶剂的选择:固定大豆磷脂与山楂叶总黄酮的投料比为 2:1,反应温度为 50℃,反应时间为 2 h,以山楂叶总黄酮与磷脂的复合率为评估标准,对 6 种溶剂四氢呋喃、二氯甲烷、醋酸乙酯、丙酮、无水乙醇、95% 乙醇进行考察,结果见表 1。可见,以四氢呋喃和无水乙醇为溶剂时,药物的复合率

表 1 不同反应溶剂对复合率的影响(n=3)

Table 1 Effects of different solvents on drug combining ratio (n=3)

溶剂	复合率/%	溶剂	复合率/%
四氢呋喃	94.5±0.82	丙酮	10.6±1.89
二氯甲烷	13.2±1.58	无水乙醇	95.3±0.91
醋酸乙酯	16.8±1.47	95% 乙醇	34.9±1.21

均超过 90%。考虑到乙醇的毒性较四氢呋喃小,故实验中采用无水乙醇为溶剂。

2.3.2 反应物投料比的影响:固定反应溶剂为无水乙醇,反应温度为 50℃,反应时间为 2 h,分别考察大豆磷脂与山楂叶总黄酮的投料比为:3:1、2:1、1:1、1:2 时的复合率,结果见表 2。药物的复合率受磷脂与山楂叶总黄酮投料比的影响较大,随磷脂投入量的增大而复合率增大,当磷脂与药物的比例为 3:1 时,所得复合物很黏,且搅拌后容器壁上有一些黏附物,而采用 1:2 的比例时,复合效果很差,2:1 的比例较为适中,搅拌后容器壁上干净,且所得复合物黏性适中,易于粉碎。

表 2 不同反应物投料比对复合率的影响(n=3)

Table 2 Effects of different proportions of reagents on drug combining ratio (n=3)

投料比	复合率/%	投料比	复合率/%
3:1	95.7±0.79	1:1	88.7±1.47
2:1	95.3±0.91	1:2	25.9±1.98

2.3.3 反应时间的影响:固定反应溶剂为无水乙醇,大豆磷脂与山楂叶总黄酮的投料比为 2:1,反应温度为 50℃,考察不同反应时间药物的复合率,结果见表 3。可见,反应时间对复合率的影响不大,药物与大豆磷脂的反应于 2 h 后基本完全。超过 2 h 后复合率反而有所下降。

表 3 不同反应时间对复合率的影响(n=3)

Table 3 Effects of different reaction times on drug combining ratio (n=3)

反应时间/h	复合率/%	反应时间/h	复合率/%
0.5	94.35±0.98	2	95.39±0.67
1	94.97±0.76	3	92.42±0.91

2.3.4 反应温度的影响:固定反应溶剂为无水乙醇,大豆磷脂与山楂叶总黄酮的投料比为 2:1,反应时间为 2 h,考察不同反应温度下山楂叶总黄酮与磷脂的复合率。在不同温度下药物结合百分率结果见表 4。随温度升高,药物的复合率增加。可能温度增加药物分子运动更快,有利于复合。但是当温度高于 60℃ 时,磷脂容易氧化,所以试验的温度不能高于 60℃。

表4 不同反应物温度对复合率的影响(n=3)

Table 4 Effects of different reaction temperatures on drug combining ratio (n=3)

反应温度/	复合率/%	反应温度/	复合率/%
30	88.01 ± 1.98	50	94.97 ± 1.14
40	94.24 ± 1.45	60	95.37 ± 1.09

2.3.5 反应物质量浓度的影响: 固定反应溶剂为无水乙醇, 大豆磷脂与山楂叶总黄酮的投料比为2:1, 反应时间为2 h, 反应温度为50℃, 改变乙醇体积, 使反应物质量浓度不同, 考察不同反应物质量浓度对复合率的影响, 结果见表5。反应物质量浓度对药物与磷脂的复合率影响呈正相关, 可能是由于质量浓度增大有利于反应发生。但是, 当反应物质量浓度达到30 mg/mL时, 搅拌后容器壁上有黏着物, 所以计算的复合率与实际复合率可能有所差别。而反应物质量浓度为10、20 mg/mL时, 复合率均较高。为了节省溶剂, 实验中反应物质量浓度可用20 mg/mL。

表5 不同反应物浓度对复合率的影响(n=3)

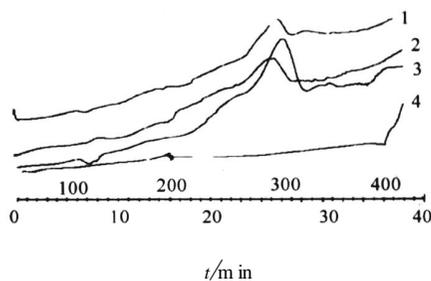
Table 5 Effects of different reactant concentrations on drug combining ratio (n=3)

反应温度/	复合率/%	反应温度/	复合率/%
10	93.83 ± 1.13	30	94.85 ± 1.21
20	94.27 ± 0.94	40	95.42 ± 1.67

从以上实验结果来看, 影响山楂叶总黄酮与磷脂复合率的主要因素是投料比, 而其他因素影响不大, 因此, 根据单因素考察的结果, 初步确定山楂叶总黄酮的制备工艺为药物与磷脂1:2的比例投料, 20 mg/mL的反应物质量浓度, 60℃, 搅拌2 h。以该条件进行3批验证试验, 平均复合率为96.16%, RSD为0.39%, 且形成的复合物黏度较小, 容易粉碎, 为棕红色略带黏性的粉末。

2.4 山楂叶总黄酮磷脂复合物形成的验证

2.4.1 差示扫描量热法(DSC): 以空铝坩锅为参比物, 另一坩锅内放入样品, 扫描速度10℃/min, 扫描范围为50~450℃, 分别绘制磷脂、山楂叶总黄酮和山楂叶总黄酮磷脂复合物的DSC曲线图, 见图1。可见由于山楂叶总黄酮本身是多种成分的混合物, 因此没有确切的熔点, 其熔距很宽, 仅在210℃有一个非常不明显的小峰, 而此峰在物理混合物和复合物中均未出现。因此对于中药混合性成分来说, DSC不能很好的说明问题。物理混合物和复合物的图谱与磷脂图谱比较, 130℃处磷脂有个吸热峰, 复合物中该峰消失, 而在物理混合物中依然存在; 在360℃磷脂有吸热峰, 但在复合物和混合物中该峰都移至350℃, 说明磷脂与药物发生了一定的作用。



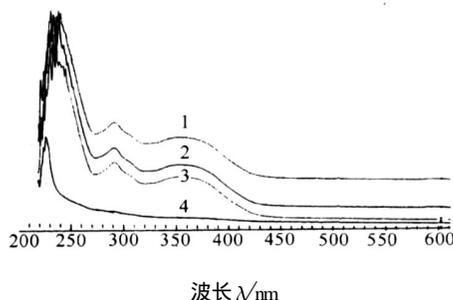
1-山楂叶总黄酮 2-物理混合物 3-复合物 4-磷脂
1-total flavonoids of haw thorn leaves 2-physical mixture 3-complex 4-phospholipids

图1 DSC扫描图谱

Fig. 1 Spectrum of DSC

随着温度的升高和时间的延长, 物理混合物逐渐熔融, 药物和磷脂在熔融的过程中也发生了一定的作用, 或者是形成了复合物。

2.4.2 紫外分光光度法(UV): 精密称取大豆磷脂12 mg, 山楂叶总黄酮6 mg, 山楂叶总黄酮6 mg+磷脂12.4 mg, 磷脂复合物18 mg, 用无水乙醇分别溶解至5 mL。以无水乙醇为空白, 于200~600 nm波长区进行紫外扫描, 见图2。可见大豆磷脂在200~600 nm波长区无吸收峰, 山楂叶总黄酮、物理混合物、磷脂复合物的紫外图谱形状相同, 吸收峰均在272和333 nm处。表明磷脂复合物中山楂叶总黄酮成分的发色团的结构未发生改变。



1-山楂叶总黄酮 2-物理混合物 3-复合物 4-磷脂
1-total flavonoids of haw thorn leaves 2-physical mixture 3-complex 4-phospholipids

图2 紫外扫描图谱

Fig. 2 Spectra of UV

2.4.3 红外光谱分析(IR): 将磷脂、山楂叶总黄酮和物理混合物、磷脂复合物分别制成溴化钾窗片, 测定红外光谱, 见图3。可见山楂叶总黄酮混合的红外光谱基本上呈现山楂叶总黄酮和大豆磷脂两个成分IR图谱的加合, 不过有些吸收峰与山楂叶总黄酮的吸收峰靠得很近, 其峰体的大部分已相互重叠, 故峰体变宽, 吸收波长略有改变, 如磷脂1232 cm⁻¹的峰与山楂叶总黄酮中1242 cm⁻¹的峰有所重叠, 峰变宽且吸收波长移至1236 cm⁻¹。而磷脂复合物的IR

图谱与混合物的IR图谱相比, $1\ 236\ \text{cm}^{-1}$ 的峰消失, 而磷脂的 $1\ 232\ \text{cm}^{-1}$ 是P-O的伸缩振动峰, 说明在复合物形成的过程中, 山楂叶总黄酮某些成分结构中的官能团与大豆磷脂分子的P-O键之间发生了相互作用。

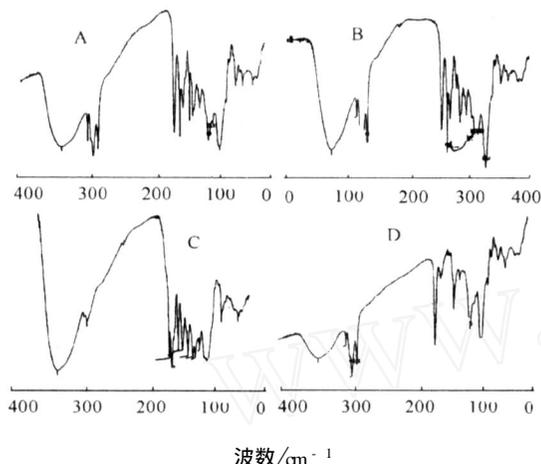


图3 物理混合物(A)、复合物(B)、山楂叶总黄酮(C)和磷脂(D)的红外图谱比较

Fig. 3 Infra-red spectra of physical mixture (A), complex (B), total flavonoids of hawthorn leaves (C), and phospholipids (D)

3 讨论

在制备山楂叶总黄酮的制备过程中发现, 溶剂对复合物制备的影响很大, 曾采用二氯甲烷、氯仿、醋酸乙酯、丙酮、95%乙醇为溶剂, 复合效果均很差, 复合率只有百分之十几甚至更低。这可能是复合物是在分子水平形成的, 所以所选的溶剂应该对磷脂和药物的溶解度都比较大才有利。用丙酮做溶剂, 磷脂不溶于其中, 所以在搅拌的时候磷脂会粘成团导致无法搅拌, 采用回流的方式也无法让磷脂分散开来, 而采用二氯甲烷、氯仿、醋酸乙酯等极性较小的溶剂, 山楂叶总黄酮中某些极性大的成分溶解度非常小, 因此复合率也非常差, 搅拌后无法达到澄清状态, 且二氯甲烷的沸点非常低, 在搅拌的时候很容易挥发。而95%乙醇可能是含水的缘故, 药物与磷脂

的复合也很差, 且复合后在容器底部有非常黏的物质, 估计是磷脂与药物的混合黏块。实验中采用无水乙醇和四氢呋喃为溶剂时, 对磷脂和药物的溶解度都比较大, 在加热和搅拌的条件下, 药物和磷脂很快就以分子形式存在于溶剂中, 搅拌后溶液澄清, 容器壁上也无黏着物, 减压回收溶剂后, 能够很快溶于二氯甲烷。

山楂叶总黄酮是含多种成分的复杂体系, 其主要的成分是总黄酮。由于黄酮类成分含有多个羟基, 与磷脂有特异的亲和力, 因此, 极性较大的黄酮苷, 如芦丁、牡荆素、鼠李糖苷和极性较小的苷元, 如槲皮素、牡荆素都能在同一种体系中与磷脂复合, 复合后都能够溶于二氯甲烷等极性非常小的溶剂, 这预示着体外油水分配系数的大大提高和体内生物利用度的提高。因此, 磷脂复合物给药系统有望能同时提高某些中药混合物中多成分的生物利用度。但是, 由于磷脂本身是一个混合物, 中药提取物也是混合物, 因此, 复合物形成的机制比单体成分难以说明清楚, 这使中药提取物磷脂复合物给药系统的研究增加了一定的难度。

参考文献

- [1] 赵玉平, 王春霞, 杜连祥. 山楂属植物果实和叶中化学成分的研究综述[J]. 饮料工业, 2002, 5(6): 8-12.
- [2] Holman P C H, Katan M B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability [J]. *J Food Chem Toxicol*, 1999, 37: 937-942.
- [3] Rice-Evans C, Spencer J P, Schroeter H, et al. Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms *in vivo* [J]. *Drug Metab Drug Interact*, 2000, 17: 291-310.
- [4] Oliveira E J, Watson D G A, Grant M H. Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and identification of flavonoid glycosides in human plasma [J]. *Xenobiotica*, 2002, 32(4): 279-287.
- [5] Bombardelli E. Photosome: New cosmetic delivery system [J]. *Boll Chim Farm*, 1991, 130(11): 431.
- [6] Venkataram S, Rogers J A. Characteristics of drug-phospholipid coprecipitates I. Physical Properties and dissolution behavior of Griseogulvin in yristoylphosphatidylcholine systems [J]. *J Pharm Sci*, 1984, 73: 757.
- [7] 中国药典[S]. 一部. 2005.