

· 药剂与工艺 ·

槲皮素精氨酸复合物的制备研究

符伟玉, 余 戟*, 莫丽儿, 兰柳波**, 梁念慈***

(广东医学院 化学教研室, 广东 湛江 524023)

摘要: 目的 制备水溶性槲皮素精氨酸复合物(QAC), 拓宽槲皮素的给药途径。方法 取一定量槲皮素(QUE)和L-精氨酸在乙醇中回流制备QAC, 通过胶束纸色谱、紫外吸收光谱、红外吸收光谱和X射线衍射图谱对QAC进行结构鉴定。结果 摩尔比为1:1的QUE和L-精氨酸形成了QAC, 并且QAC常温下稳定存在。与QUE比较, QAC的水溶性明显增大, 仍然对抑制细胞生长具有较强的活性。结论 该制备方法简捷实用, 有助于提高QUE的生物利用度。

关键词: 槲皮素; 槲皮素精氨酸复合物; 制备; HL-60细胞

中图分类号: R283.3; R286.01 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)08-0695-03

Preparation of quercetin-arginine complex

FU Wei-yu, SHE J, MO Li-er, LAN Liu-bo, LIANG Nian-ci

(Department of Chemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract Object To prepare the water soluble quercetin-arginine complex (QAC) and widen the administration path of quercetin (QUE). **Methods** Definite QUE and L-arginine were refluxed in alcohol to prepare QAC. The QAC structure was identified by micellar paper chromatography, UV spectrometry, IR spectrometry, and X ray diffraction. **Results** QAC was prepared from QUE and L-arginine in molar ratio 1:1. The inhibitory activity of QAC that existed stably in room temperature on cancer cell growth was as strong as that of QUE, and the solubility of QAC in water was remarkably enhanced. **Conclusion** The above preparation method is simple and available, and it is suitable to improve the bioavailability.

Key words quercetin (QUE); quercetin-arginine complex (QAC); preparation; HL-60 cell

槲皮素(quercetin, QUE)属黄酮类化合物,在植物界分布广泛,其明显的抗自由基、抑制癌细胞生长、对抗致癌促癌因子的作用^[1~4]日益得到关注。但槲皮素在水中几乎不溶,影响了槲皮素在体内的吸收和代谢^[5],限制了它的给药途径。通过将槲皮素与碱性的精氨酸结合制备成的药物前体,能大大增加槲皮素在水中的溶解度^[6],从而为拓宽槲皮素的给药途径,提高其生物利用度创造了条件。本研究对槲皮素精氨酸复合物(quercetin-arginine complex, QAC)的制备工艺、稳定性及抑制癌细胞生长活性作了一些探索。

1 仪器与试剂

Lambda-2S型紫外可见光谱仪(PE公司), 175C/UM A-500型显微红外光谱仪(Bio-RAD), D/max-3A型X射线衍射仪(日本理学公司), DZ-88型电热恒温真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂),

85-2型恒温磁力搅拌器(深圳天南海北有限公司), SB2200型超声波清洗器(上海Branson公司), 0.22 μm微孔滤膜(上海半岛有限公司净化器厂), CO₂孵箱(Precision), IS6000C型液闪记数仪(Beckman), 槲皮素(Sigma公司), L-精氨酸(上海丽珠东风生物技术有限公司), SDS(日本进口分装, 上海化学试剂采购供应站), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 QAC的制备: 称取槲皮素 207 mg, 在微温下完全溶于 40 mL无水乙醇中, 加入L-精氨酸 112.5 mg, 搅拌, 并用pH为10~11的Na₂CO₃溶液将反应系统调至pH=8左右, 搅拌回流2 h。反应完毕, 减压除去溶剂, 低温真空干燥, 加入经无水Na₂SO₄干燥的无水乙醇, 充分震荡, 减压抽滤, 滤液减压蒸干乙醇后, 加入冷冻的双蒸水, 搅拌震荡3次(10 mL/次), 抽滤, 合并滤液, 超声20 min, 过0.22 μm

* 收稿日期: 2002-01-22

基金项目: 广东省教育厅重点学科专项基金(9505); 广东医学院科研基金(XK9803)

* 通讯作者 Tel 0759-2388568 E-mail gdmchx@gdmc.edu.cn

** 本校生化教研室

微孔滤膜,滤液用双蒸水定容于 50 mL,即得到 QAC

2.2 紫外吸收光谱测定:取适量 QAC在 200~ 600 nm 范围内用紫外 可见光谱仪扫描,结果见图 1,其中吸收峰 $UV \lambda_{\max}^{MeOH} \text{ nm} 327$

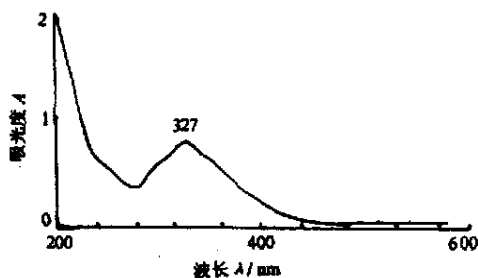
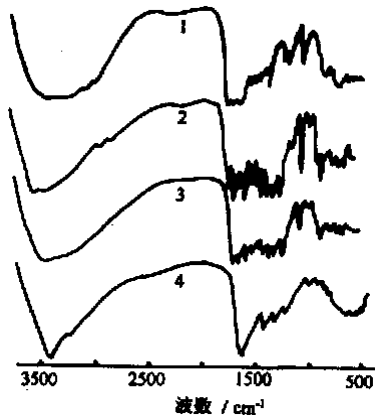


图 1 QAC的紫外吸收光谱图

2.3 胶束纸色谱测定:以 0.01 mol/L SDS胶束溶液作展开剂,结束显示 QAC的 $R_f = 0.652$ (Fe-Cl₃溶液显色)。

2.4 红外吸收光谱测定:用 KBr将槲皮素、L-精氨酸、槲皮素和 L-精氨酸 (1:1)混合物、QAC分别压片,测定各样品红外吸收光谱(图 2) 比较 QAC与槲皮素的吸收谱图,槲皮素在 3 200~ 3 600 cm^{-1} 表现为多羟基的宽峰, QAC的羟基在 3 400 cm^{-1} 的吸收峰变窄而弱,表明羟基的缔合强度的减弱和数目的减少; QAC与混合物的吸收谱图明显不同,表明槲皮素的羟基位上可能结合了 L-精氨酸,形成了 QAC

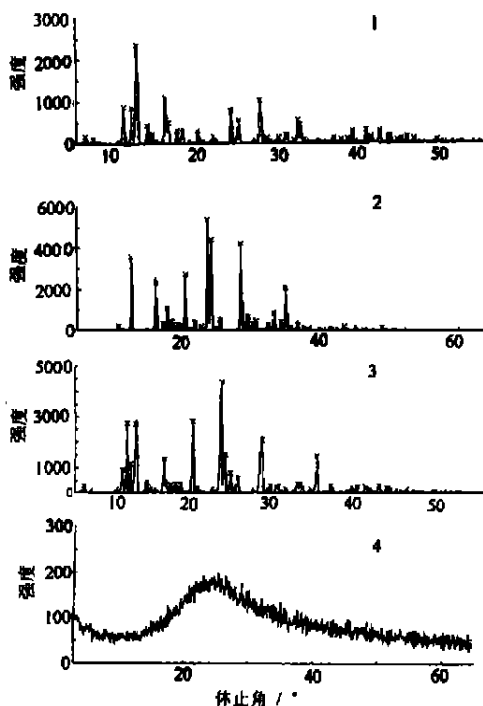


1-L-精氨酸 2-槲皮素 3-槲皮素和 L-精氨酸 (1:1)混合物 4-QAC

图 2 样品红外光谱

2.5 X射线衍射实验:X射线衍射图谱为 Cu靶 / 石墨单色器,电压 35 kV,电流 25 mA,扫描速度 0.1°/s,衍射时间 0.2 s,扫描范围 0°~ 60°。结果见图 3 由图谱可见槲皮素、L-精氨酸为结晶型,因而有尖锐的特征衍射峰,槲皮素和 L-精氨酸 (1:1)混

合物的主要峰为两种物质叠加, QAC为无定型,因而无特征衍射峰,这说明槲皮素与 L-精氨酸形成 QAC



1-槲皮素 2-L-精氨酸 3-槲皮素和 L-精氨酸 (1:1)混合物 4-QAC

图 3 X射线衍射图谱

2.6 QAC的含量测定:准确称取槲皮素 49.4 mg, 甲醇定容至 100 mL,从中分别精确吸取 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50 mL,并用甲醇定容至 50.0 mL,以 373.5 nm为测定波长,分别测定吸光度 A ,经微机处理,得 $C-A$ 标准曲线和线性回归方程: $C = 14.80A + 0.112$, $r = 1.00$,结果表明槲皮素在 4~ 25 mg/L 浓度内线性关系很好。取所制备的 QAC 溶液 2.00 mL,除去溶剂,干燥,用甲醇溶解并定容至 250.0 mL,测定其吸光度 A ,对照标准曲线,经微机处理,得 $C = 9.99 \text{ mg/L}$ 由此推出投入 207 mg 槲皮素得 QAC 62.45 mg

2.7 QAC稳定性的考察:将 QAC水溶液置于 100 °C 的恒温水浴箱中,经 30 min 加热处理后,分两组, A组常温贮藏, B组置于冰箱中 4 °C 贮藏。经观察, A组 87 d 后出现少许沉降物, B组经 205 d 未见明显沉降

2.8 QAC对急性早幼粒白血病 HL-60细胞生长的抑制作用:采用 MTT法观察 QAC分别在 24, 48 h 对 HL-60细胞生长的抑制作用。槲皮素用二甲基亚砜 (DMSO) 配成原液, QAC用生理复合物水溶

解,超声震荡。各药物临用前用对应的溶剂稀释到所需浓度,煮沸 30 min 消毒。处理细胞时,DMSO 的终浓度小于或等于 0.1%。实验表明该浓度对细胞生长无影响

取对数生长期的 HL-60 细胞 1.0×10^5 /mL,加入 24 孔板中,每孔 1 mL,用药组分别在每孔中加入相当于槲皮素或 QAC 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 μ g / mL 的各溶液 1 μ L,对照组只加入 1 μ L 相应溶剂,每组均设 3 个平行孔,设好空白对照孔,加药的细胞于 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度孵箱中培养 24 和 48 h 后,用台盼蓝拒染法并在倒置显微镜下进行活细胞计数,计算药物对细胞的抑制率,并按改良 Karber 公式计算得 IC₅₀ 值分别为 11.9 和 7.84 μ g / mL; QAC 在 24 和 48 h 对 HL-60 细胞生长抑制的 IC₅₀ 值分别为 13.1 和 9.13 μ g / mL

3 讨论

3.1 我们曾对多种槲皮素和 L-精氨酸的物料比进行了研究,通过对产品含量检测和生物活性的比较,筛选出当槲皮素和精氨酸的物质的量比为 1:1 时,制备的 QAC 能得到较大的水溶性和对 HL-60 细胞生长仍具有较强的抑制活性。

3.2 QAC 的结构初步鉴定是通过胶束纸色谱、紫外吸收光谱、红外吸收光谱和 X 射线衍射图谱来进行的。在 0.01 mol/L SDS 胶束溶液中,纸色谱显示 QAC 迁移值为 R_f = 0.652,远大于苷元槲皮素的迁移值,具有与苷类相似的迁移速度^[7],预示槲皮素分子中的羟基被精氨酸结合后,极性增大。紫外吸收光谱显示, QAC 只出现的带 I 吸收峰,波长为 327 nm,与槲皮素的最大吸收波长 373.5 nm 相比, QAC 的带 I 吸收峰向短波方向移动,并且是肩峰,

表明槲皮素分子上的羟基已被结合。而 QAC 的带 II 吸收峰不明显,这与槲皮素结构中的 C 环上的 3', 4' 双羟基系统丧失有关^[8]。此外,红外吸收光谱也显示,槲皮素表现多羟基的宽峰到 QAC 中变化成尖锐的单峰,表明羟基缔合强度的减弱和数目的减少。而且 X 射线衍射图谱表明槲皮素与 L-精氨酸形成 QAC。因此,可初步确定槲皮素的 3', 4' 双羟基位上结合了精氨酸。进一步的结构鉴定有待继续进行。

3.3 制备的 QAC 较易氧化和潮解。回流反应结束时,反应混合物呈杏黄色,但当在除去未反应的槲皮素和精氨酸后,产品很快转变成橙红色,显示产品在空气中极易氧化。在反应中,我们采用 N₂ 气流保护,反应后加入少量 NaHSO₃ 作抗氧化剂,有效地提高了产品的抗氧化能力。QAC 易潮解,当真空干燥后的产品一旦暴露在空气中,立即潮解成粘稠的胶状体,因此,产品的 QAC 含量测定选择通过标准曲线法获得。

参考文献:

- [1] 刘诗平,陈尚猛,朱卫东.槲皮素衍生物的生物活性研究进展[J].中草药,1991,22(4):182-184.
- [2] Kim J H, Kim S H, Alfieri A A, *et al.* Quercetin— an inhibitor of lactate transport and a hyperthermic sensitizer of HeLa cells [J]. Cancer Res, 1984, 44: 102-106.
- [3] Kang T B, Liang N C. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 Leukemia cells [J]. Biochem Pharmacol, 1997, 54: 1013-1018.
- [4] 郑惠珍,唐朝枢. L-精氨酸的跨膜转运及临床意义 [J]. 国外医学—生理、病理科学与临床分册, 1999, 19(6): 475-478.
- [5] 赵维中,戴利明,方明,等.槲皮素在兔体内的药代动力学 [J]. 中国药理学通报, 1992, 8(6): 452-455.
- [6] 顾学裘,李焕秋,乔博路. 鹤草酚精氨酸盐注射剂的研究 [J]. 中草药, 1980, 11(8): 346-349.
- [7] 余戟,陈杰,莫丽儿,等.胶束纸色谱法分离和鉴别黄酮类化合物 [J]. 广东医学院学报, 1999, 17(2): 102-104.
- [8] K R 马卡姆. 黄酮类化合物结构鉴定技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1990.

不同提取工艺的龙血竭差异

胡迎庆,张静泽,刘成航*,邓昌沪***

(武警医学院 药学教研室,天津 300162)

摘要:目的 鉴别不同工艺提取的龙血竭中化学成分的差异。方法 采用薄层色谱法、紫外分光光度法和高效液相色谱法对不同工艺提取的龙血竭进行分析。结果 新工艺提取的血竭中二氢查尔酮类化合物的含量较传统工艺提取的血竭高,二氢查尔酮类化合物含量高,但黄酮类和 类成分含量低。结论 免加热工艺为一种独创的、提取率高的新技术,具有推广价值,将推动中药现代化研究的步伐。

* 收稿日期: 2001-12-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070088)

作者简介: 胡迎庆 (1964-),女,江西上饶人,理学硕士,从事天然药物的研究与开发。Tel: 022-60578198

* 吉林通化东宝药业股份有限公司威海东宝制药厂

*** 厦门今润丰华医药科学有限公司