

黄芩苷磷脂复合物基本性质研究

史亚军^{1,3}, 吴品江¹, 许润春¹, 林彦君¹, 马鸿雁¹, 杨明^{1,2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

3. 陕西中医学院药学院, 陕西 咸阳 712046

摘要: 目的 考察黄芩苷与磷脂形成复合物的基本性质。方法 对制备的黄芩苷磷脂复合物进行红外光谱、核磁共振氢谱、量子化学及其溶解性、透膜性能等方面研究。结果 红外光谱研究表明黄芩苷磷脂复合物的图谱具有黄芩苷、大豆卵磷脂红外光谱的特征, 与混合物的红外光谱图走势大体一致, 没有明显差异, 但图谱中 $-C=O$ 、 $-N-H$ 的峰形与波数均出现了变化; 核磁共振氢谱结果表明磷脂复合物的形成并未在分子间产生新的化学键, 但 NMR 谱中黄芩苷中羟基的峰形与化学位移同样发生了变异; 量子化学研究表明两个分子之间虽未形成新的化合物, 而是在空间匹配的前提下, 以一种较弱的原子轨道重叠方式靠近在一起形成相对稳定的一种空间构象。形成复合物后对黄芩苷的溶解性改善显著, 透膜累积渗透量大大提高。结论 黄芩苷磷脂复合物的形成并未在分子间产生新的化学键, 它们之间是以一种弱的相互作用力相结合, 从而形成一种较为稳定的复合体, 形成复合物后黄芩苷的理化性质和生物学特性有明显改善。

关键词: 黄芩苷; 磷脂复合物; 红外光谱; 核磁共振氢谱; 量子化学

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)01-0078-05

Basic property of baicalin-phospholipid complex

SHI Ya-jun^{1,3}, WU Pin-jiang¹, XU Run-chun¹, LIN Yan-jun¹, MA Hong-yan¹, YANG Ming^{1,2}

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. College of Pharmacy, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: **Objective** To investigate the basic property of baicalin complex with phospholipid. **Methods** To study the baicalin complex with phospholipid by means of IR, 1H -NMR, quantum chemistry, dissolubility, and the property of permeation membrane. **Results** The result of IR indicated that spectrogram of baicalin complex with phospholipid had the same tendency in property with baicalin and mixture. While the peak shape and wave number of $-C=O$, $-N-H$ appeared abnormal. The 1H -NMR indicated that the phospholipid complex did not produce new chemical bonds between the two molecules. But the peak shape and chemical shift produced a certain change. The quantum chemistry result revealed that the two molecules did not form new compounds. On the basis of space matching, the two formed a relatively stable spatial relation by a weaker atomic orbitals overlap method. The solubility of baicalin was significantly improved, the permeation membrane ratio of baicalin was boost. **Conclusion** The formation of baicalin-phospholipid complex does not produce new chemical bonds. The two form a relatively stable complex by some weak interaction force. The physicochemical properties and biological characteristics of the complex are greatly improved.

Key words: baicalin; phospholipid complex; IR; 1H -NMR; quantum chemistry

黄芩苷(baicalin)是黄芩的主要有效成分, 具有抗炎、抗病毒等多方面的药理作用^[1]。但由于黄芩苷脂溶性、水溶性均较差而造成体内吸收差、生

物利用度低, 从而限制了其临床的应用。磷脂(phospholipid)与药物制成的磷脂复合物可有效地提高难溶性药物在体内的吸收, 显著改善其生物有

收稿日期: 2011-05-17

基金项目: 国家重大新药创制专项(2009ZX09103-353); 陕西省教育厅科研专项资助(11JK0680)

作者简介: 史亚军(1976—), 男, 陕西武功人, 博士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (028)61800127 E-mail: iottsyj@163.com

*通讯作者 杨明 Tel: (0791)7118658 E-mail: yangming16@126.com

效性^[2-3]。本实验从黄芩苷、磷脂及其物理混合物和复合物的¹H-NMR谱、IR谱等方面进行研究对比,以分子轨道理论为指导,通过量子化学手段、复合物电子云结构分析和形成的复合物理化性质等方面的深入研究,以揭示复合物的形成机制,进一步完善和丰富磷脂复合物的定义,并对形成的磷脂复合物的生物学特性进行研究,解释其改善生物利用度的机制。

1 仪器与材料

Spectrum 400 型红外分光光度计(美国珀金埃尔默仪器公司), Gaussian 量子化学软件(友环股份有限公司), Bruker Avance 600 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司), 美国戴安 P680A 高效液相色谱仪, Chromeleon 色谱工作站。黄芩苷(批号 20080412, 质量分数 97.2%, 上海景森生物科技有限公司)、大豆卵磷脂(质量分数 80%, 批号 20070211, 成都科龙化工试剂厂)、黄芩苷磷脂复合物(自制), 所用化学试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄芩苷磷脂复合物的制备

称取黄芩苷 2 g, 大豆卵磷脂 4 g, 加入无水乙醇 400 mL, 置于 55 °C 恒温水浴中磁力搅拌复合 2 h, 将反应液减压回收乙醇, 减压干燥, 即得黄芩苷磷脂复合物。利用黄芩苷难溶于氯仿, 而磷脂和黄芩苷磷脂复合物易溶于氯仿的特性, 将一定量的黄芩苷和磷脂在一定条件下反应后, 减压除去反应溶剂, 然后加入适量氯仿, 充分溶解其中的磷脂及磷脂复合物, 滤过, 再用少量氯仿洗涤, 收集沉淀,

干燥, 称定质量。黄芩苷的初始投药量与沉淀量的差值即为与磷脂结合的黄芩苷的量, 从而计算出黄芩苷与磷脂的复合率, 测定复合率结果为 98%。

2.2 黄芩苷磷脂复合物 IR 谱研究

红外光谱研究采用 KBr 压片法, 在 4 000~400 cm⁻¹ 测定黄芩苷、大豆卵磷脂及两者物理混合物和磷脂复合物的 IR 光谱, 见图 1。分析结果表明, 黄芩苷与大豆卵磷脂的混合物的图谱, 基本上是黄芩苷与大豆卵磷脂主要峰的叠加, 而黄芩苷磷脂复合物的图谱同样具有黄芩苷、大豆卵磷脂红外光谱的特征, 与混合物的红外光谱图形走势大体一致, 没有明显差异, 表明磷脂复合物的形成并未在分子间产生新的化学键。与物理混合物的图谱相比, 黄芩苷磷脂复合物的图谱发生了较大变化, 黄芩苷 3 300~3 600 cm⁻¹ 区域羟基的伸缩振动峰消失, 只能见到大豆卵磷脂在此区的特征; 在 2 800~1 700 cm⁻¹ 处出现 1 739.97 cm⁻¹ 峰, 与大豆卵磷脂中的酯酰基的碳氧双键的伸缩振动峰($\nu_{C=O}$, 1 739.37 cm⁻¹) 一样, 而黄芩苷分子中 C 环上的羰基峰($\nu_{C=O}$, 1 600.96 cm⁻¹) 向高波数移动到 1 667.62 cm⁻¹, 黄芩苷苯环的骨架振动峰($\nu_{C=C}$, 1 609.13、1 573.41、1 551.97、1 496.32 cm⁻¹) 变化更加明显, 其中 1 609.13 cm⁻¹ 峰向高波数移动到 1 617.79 cm⁻¹, 而 1 573.41 cm⁻¹ 的中强峰和 1 551.97 cm⁻¹ 弱峰消失, 出现较弱的 1 587.58 cm⁻¹ 的新峰。而大豆卵磷脂中的饱和长脂肪链的碳氢伸缩振动峰(ν_{C-H} , 2 925.61、2 854.13 cm⁻¹), 及其亚甲基(CH₂)的弯曲振动峰(δ , 1 466.36 cm⁻¹) 均未发生变化。

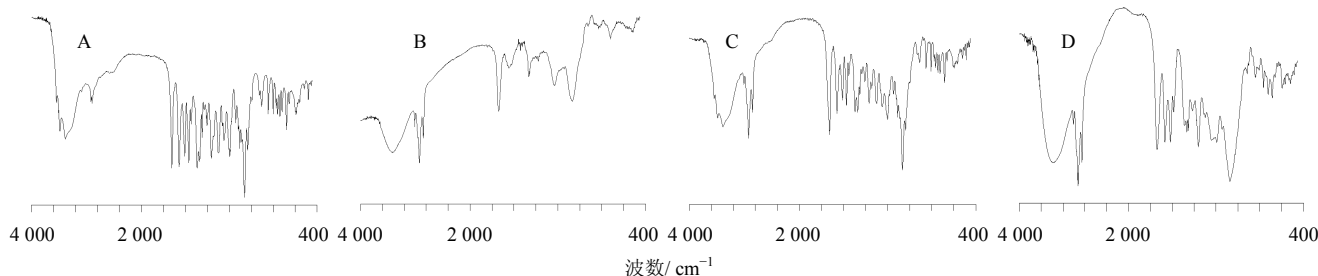


图1 黄芩苷(A)、大豆卵磷脂(B)、物理混合物(C)、磷脂复合物(D)的IR图谱

Fig. 1 IR spectra of baicalin (A), soybean lecithin (B), physical mixture (C), and phospholipids complex (D)

黄芩苷磷脂复合物的 IR 谱显示, 黄芩苷的黄酮骨架(主要是 4 位羰基、苯环骨架)振动峰均发生了较大变化, 呈向高波数移动的趋势, 而大豆卵磷脂的非极性端相应的主要峰几乎未发生变化, 这一事实充分证明黄芩苷的黄酮骨架受到了磷脂影响,

由于黄酮骨架是一个完整共轭体系, 它受到磷脂的作用被分散到整个骨架中。

2.3 黄芩苷及其磷脂复合物核磁共振成像分析

黄芩苷及其与磷脂物理混合物以氘代二甲基亚砜为溶剂, 磷脂及其磷脂复合物以氘代氯仿为溶剂

进行试验。对黄芩苷、大豆卵磷脂、二者物理混合物及黄芩苷磷脂复合物进行核磁共振成像分析,对黄芩苷磷脂复合物的主要信号进行大致归属,结果黄芩苷磷脂复合物的¹H-NMR中出现的质子信号基本归属于大豆卵磷脂,其中卵磷脂中属于胆碱部分(δ 3.236 9)和甘油部分(δ 3.996 1~4.371 6)的信号变宽,而脂肪酸链的质子信号未发生变化;黄芩苷在 δ 6~8属于芳氢质子及酚羟基质子的信号大部分明显减弱甚至消失,仅显现的归属为黄芩苷的两个信号也明显加宽,不易辨认。由此可知,黄芩苷、大豆磷脂混合物的¹H-NMR谱中能清晰分辨黄芩苷、大豆磷脂的¹H-NMR特征峰。黄芩苷磷脂复合物的¹H-NMR图谱和混合物相比,发生了很大的变化,但从图谱中仍能发现大豆磷脂的油酰基,丙三醇酯的基本骨架,和发生了向低场移动的胆碱中氨基以及向高场移动的黄芩苷黄酮核中的双氢。在复合物¹H-NMR谱中,黄芩苷中糖基的醇羟基,黄酮核骨架上酚基和羟基的质子都消失。

2.4 量子化学探讨复合物形成的印证

2.4.1 分子设计思路 在红外光谱的基础上,对黄芩苷与磷脂结合机制进行了初探。研究主要包括以下几个部分:对黄芩苷和磷脂的分子结构进行理论计算,寻找两个分子的结构特点,推测分子结合的可能方式;在黄芩苷和磷脂优化结构参数的基础上,设计了2个分子的4种结合方式,并对4种结合分子进行了结构优化计算;在结构优化计算的基础上,建立合理的结合方式模型。

2.4.2 黄芩苷和磷脂分子结构优化 以黄芩苷和磷脂的结构式作为参考,初始构型由Hyperchem程序包构成,采用分子立场MM+法对初始构型进行分子结构优化;然后选用Gaussian程序,采用半经验法Am1方法,对构型进行进一步的优化计算,所有计算以Berny梯度法完成,收敛精度均取程序内定值。

在两个分子中,磷脂中氮原子上的氢原子带一定的正电性,而黄芩苷的羟基和羰基上的氧原子带有一定的负电性,两者之间存在静电引力作用。当N-H中H与4-C=O和5-OH中的O接近到一定程度后,H轨道与两个氧轨道发生小部分重叠,即在它们之间便有一定量的电子云分布,于是两个分子便联系在一起,从而形成稳定的复合物。

通过对分子结构的分析,进行如下4种设计并经计算机优化:

(1) 优化前设计结合构型1:带正电性的N原

子上的H与5位O-H的氧原子结合,形成化学键,化学键长为1.14。结果形成化学键,结构优化后两个分子均裂解,此结果与实验结果不符。

(2) 优化前设计结合构型2:带正电性的N上氢原子与C=O上的O结合,形成化学键,化学键长为1.14。结构优化后结果分子不收敛,此结果也与实验结果不一致。

(3) 优化前设计结合构型3:带正电性的N原子上的H与C=O靠近,没有形成化学键,N上H原子与O=C距离为1.14。优化后,H靠近C=O和5-O-H的氧原子,距离分别是3.25、3.63。

(4) 优化前设计结合构型4:带正电性的N上H原子与5-O-H靠近,没有形成化学键,N与O-HC距离为1.14。优化后,H靠近C=O和5O-H的氧原子,距离分别是3.30、3.62,没有形成化学键。

设计结合构型3、4的优化结果表明,-NH是处于4-C=O与-OH之间,并在两者间保持一定距离,这与实验结果一致。

通过对黄芩苷和磷脂多种结合方式分别进行量子化学理论计算可知,黄芩苷的羰基、羟基氧原子与磷脂的仲氮上氧原子相互靠近,量子化学计算距离达到3.2、3.6。这个距离明显大于化学键长、以及氢键作用力,说明二者间仅存在一种微弱的作用力而非化学键。从结合方式来看,磷脂分子与黄芩苷分子结合,必须满足分子的空间要求,因此推测两个分子之间没有形成新的化合物,而是在空间匹配的前提下,以一种较弱的异性电荷相互吸引靠近在一起形成相对稳定的一种空间关系。

2.5 磷脂复合物的溶解性分析

前期实验研究结果表明^[4],黄芩苷磷脂复合物在水中溶解量是黄芩苷的4.56倍,磷脂存在时黄芩苷溶解量为其单独存在时的3.17倍;黄芩苷磷脂复合物在正辛醇中,其溶解量是黄芩苷的70.17倍,磷脂存在时黄芩苷溶解量为其单独存在时的54.56倍;结果表明复合物中的黄芩苷与磷脂分子间确有一种力使两者结合在一起,使黄芩苷在水中和正辛醇中的溶解性大大提高,同时也表明这种作用强于二者之间的机械混合作用。黄芩苷磷脂复合物的油/水分配系数随pH值升高而降低,与黄芩苷和物理混合物的表观油/水分配系数的变化趋势基本一致。这一结果表明,黄芩苷磷脂复合物在碱性条件下不稳定,分解成黄芩苷和磷脂,发生分解是由于在碱性环境下,黄芩苷的羟基离子化使黄芩苷分子上的电

荷发生了变化。以上结果表明,形成磷脂复合物后,溶解度得到大大改善。这预示复合物在体内的吸收可能强于黄芩苷及物理混合物。

2.6 黄芩苷磷脂复合物透膜性能的改变

以猪鼻黏膜为实验材料,采用 Valia-Chien 水平渗透扩散池为评价方法,以黄芩苷和黄芩苷磷脂复合物透过猪鼻黏膜的量为评价指标。

2.6.1 色谱条件及系统适应性 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-磷酸 (47:53:0.2), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm, 柱温 40 °C, 进样量 10 μL, 理论板数按黄芩苷峰计算不低于 3 000。

2.6.2 线性关系考察 精密称取黄芩苷对照品配制成 31 μg/mL 对照品溶液, 分别进样 1、2、4、8、16、32 μL, 以黄芩苷进样量 X 为横坐标, 峰面积 Y (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得到回归方程 $Y=45.405 X+0.051 3$, $r=0.999 9$, 结果表明黄芩苷在 0.031~0.992 μg 线性关系良好。

2.6.3 供试品溶液的制备 分别称取黄芩苷及其磷脂复合物过量, 置于锥形瓶中, 加适量 pH 5.8 磷酸缓冲液使药物充分溶解得饱和液, 离心, 取上清液

作为供试品溶液。

2.6.4 透膜试验 取鼻黏膜, 用生理盐水洗净薄膜上残留的血迹, 按要求装于 Valia-Chien 渗透扩散装置, 在该装置供给池和接收池内分别放入磁力搅拌子, 向供给池中加入 6 mL 供试品溶液, 接收池内加入 6 mL 生理盐水。扩散池置于磁力搅拌器水浴锅中, 启动磁力搅拌器, 保持池内药液的温度为 (37±0.5) °C。于实验开始后的第 15、30、45、60、90、120、150、180、240、300 min 用移液管从接收池吸取 1 mL 溶液, 同时补充 1 mL 生理盐水, 使接收池中液体体积保持恒定, 样品液离心后, 取上清液适量, 测定黄芩苷的量, 计算药物透过鼻黏膜的药物稳态流量 (J_{ss}), 滞后时间和表观渗透系数 (P_{app}), 结果见表 1。黄芩苷及其磷脂复合物的累积渗透量 (Q) 对时间呈良好的线性关系, 符合一级动力学方程。黄芩苷磷脂复合物的表观渗透系数 (P_{app}) 大于黄芩苷的, 在统计学上有显著差异, 且磷脂复合物透过离体猪鼻黏膜的滞后时间与黄芩苷相比, 明显缩短。因此推断黄芩苷磷脂复合物若通过鼻腔给药系统可能会优于其他载药体系。

表 1 黄芩苷及其磷脂复合物透膜试验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 Permeation membrane of baicalin and baicalin-phospholipid complex ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组 分	R^2	dQ/dt	$J_{ss}/(\times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$	$P_{app}/(\times 10^{-7} \text{cm}\cdot\text{s}^{-1})$	滞后时间 / min
黄芩苷磷脂复合物	0.993 8	0.958 9±0.175 0	20.23±3.69	82.97±15.13*	11.21±5.35
黄芩苷	0.995 6	0.346 1±0.062 4	7.30±1.32	35.65± 6.40	15.68±8.59

与黄芩苷组比较: * $P<0.01$

* $P<0.01$ vs baicalin group

3 讨论

3.1 黄芩苷磷脂复合物形成机制推断

黄芩苷磷脂复合物的 IR 图谱显示,黄芩苷的黄酮骨架 (主要是 4 位羰基、苯环骨架) 振动峰均发生了较大变化, 呈向高波数移动的趋势, 而大豆卵磷脂的非极性端相应的主要峰几乎未发生变化; ¹H-NMR 图谱则发生更加明显的变化, 所有黄芩苷的黄酮骨架分子的信号均减弱、加宽而难以辨认, 并且无法准确得到化学位移值, 而大豆卵磷脂的非极性端的脂肪链的信号清晰可见, 但属于其极性端的甘油和胆碱部分的信号也略有加宽之势, 这些变化与文献报道^[5-6]的一些天然磷脂复合物的 ¹H-NMR 谱、IR 谱的变化测定结果相一致。而并非发生化学作用的结果^[7]。

3.2 复合物形成的条件

形成复合物时, 药物分子与复合剂之间必须存在相互作用的活性基团, 活性基团在适当外力作用下, 可以相互靠近, 从而使分子中特定原子之间电子云相互重叠, 重叠达到一定程度后, 即原子核间的斥力处于一个稳定状态, 从而形成稳定状态的复合物。同时, 形成复合物的外在条件也十分关键, 因磷脂易于水化, 当反应体系中有微量水存在时, 会因形成磷脂水化物而阻止-N-H与-C=O和-OH的靠近使复合反应失败。

3.3 磷脂复合物的定义探讨

通常认为磷脂复合物是药物与磷脂分子通过电荷迁移作用而形成的较为稳定的化合物或络合物^[8]。通过上述实验研究所得出的结论, 黄芩苷磷脂复合

物是黄芩苷分子与乙醇分子在适宜的外力作用下, 两分子的特定部位相互靠近, 两者之间产生一种吸引力而使两者稳定的固定在一起形成的对黄芩苷的物理性质、生物学性质有显著改善的结合体。

总之, 黄芩苷磷脂复合物的组成固定, 它不是药物与磷脂的任意组合, 也并未形成新的化合物, 药物自身的生物活性并未改变。但形成复合物后, 它具有组成单元物不具备的一些优良特性, 而这些特性在制剂学中具有特殊用途, 能极大拓展黄芩苷的临床应用范围, 同时对其他中药有效成分的改性具有一定的借鉴意义。

参考文献

- [1] 宋 珏, 路 通, 谢 林, 等. 黄连解毒汤的药动学-药效学相关性研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 2042-2046.
- [2] Bombardelli E, Patri G F. Complex compounds of bioflavonoids with phospholipids, their preparation and use, and pharmaceutical and cosmetic compositions containing them [P]. EP: 0275005A2, 1988-04-01.
- [3] Morazzoni P, Magistretti M J, Giachetti C, et al. Comparative bioavailability of Silipide, a new flavanolignan complex, in rats [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 1992, 17(1): 39-44.
- [4] 许润春, 林彦君, 吴品江, 等. 黄芩苷磷脂复合物理化性质的研究 [J]. 中成药, 2008, 30(6): 932-934.
- [5] 许建文, 张光军, 陈正跃. 水飞蓟宾-卵磷脂复合物制备工艺比较 [J]. 中国生化药物杂志, 2002, 23(5): 245-247.
- [6] 孟庆国, 高 尔, 王汝琴, 等. 葛根素磷脂复合物的制备及核磁共振和薄层层析研究 [J]. 潍坊医学院学报, 2001, 23(1): 4-5.
- [7] 唐传球, 章平平, 王继勇. 槲皮素-卵磷脂复合物的制备工艺及光谱分析 [J]. 云南中医中药杂志, 2007, 28(4): 38-40.
- [8] 李 颖. 葛根素磷脂复合物的制备技术及体内外特性研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.