柿叶黄酮磷脂复合物的制备工艺研究

张胜海[1]，王英姿[1*]，段飞鹏[1]，李彩霞[1]，冯艾灵[1]，孟繁蕴[2]

1. 北京中医药大学中药学院，北京 100102
2. 北京师范大学 中药资源保护与利用北京市重点实验室，北京 100875

摘 要：目的 考察柿叶黄酮磷脂复合物制备过程中的影响因素，并确定最佳制备工艺。**方法** 采用溶剂法制备柿叶黄酮磷脂复合物，以柿叶黄酮中黄酮类化合物与磷脂的复合率为评价指标，结合单因素考察和正交试验，确定其最佳制备工艺条件；采用 X-射线衍射、差示扫描量热分析（DSC）对复合物的形成进行验证。**结果** 反应溶剂、柿叶黄酮与大豆磷脂投料比是磷脂复合物制备过程中的主要影响因素；最佳制备工艺条件为无水乙醇作为反应溶剂，柿叶黄酮与大豆磷脂投料比 1∶2，反应物质量浓度 30 mg/mL，在 30 ℃下反应 1 h；在此条件下复合率为 96.95%。**结论** 本研究建立的柿叶黄酮磷脂复合物最佳制备工艺条件稳定可行，可用于工业生产。

关键词：柿叶黄酮；磷脂复合物；制备工艺；X-射线衍射；差示扫描量热

中图分类号：R283.6 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2013)22 - 3136 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.22.009

Preparation technology for phospholipids complex of total flavonoids from leaves of *Diospyros kaki*

ZHANG Sheng-hai[1], WANG Ying-zi[1], DUAN Fei-peng[1], LI Cai-xia[1], FENG Ai-ling[1], MENG Fan-yun[2]

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China
2. Protection and Utilization of Traditional Chinese Medicine of Beijing Area Major Laboratory, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Abstract: Objective To study the influence factors in the preparation process for phospholipids complex of total flavonoids from the leaves of *Diospyros kaki* (PC-TF-LDK) and to optimize the conditions for the formation. **Methods** The solvent method was used to prepare the PC-TF-LDK, and the optimized conditions were obtained by means of single factor test and orthogonal design test with the complex ratio as evaluation criterion. The formation of the complex was analyzed by the X-ray diffraction and differential scanning calorimetry. **Results** The formation of the PC-TF-LDK was greatly influenced by the ratio of solvents, TF-LDK, and soybean phospholipid. The optimized preparation conditions for the PC-TF-LDK were obtained as follows: the solvent was anhydrous ethanol, the ratio of TF-LDK to soybean phospholipid was 1∶2, the mass of reaction concentration was 30 mg/mL, temperature was 30 ℃, and reaction time was 1 h. Under this condition, 96.95% complex ratio was achieved. **Conclusion** The preparation technology for PC-TF-LDK is reliable, stable, and available for industrial production.

Key words: total flavonoids from leaves of *Diospyros kaki*; phospholipids complex; preparation technology; X-ray diffraction; differential scanning calorimetry

柿叶为柿科植物柿 *Diospyros kaki* L. f. 的新鲜或干燥叶片，其入药始见于明《滇南本草》“经霜叶敷臃疮”。现代研究证明，柿叶中的黄酮类成分具有抗菌消炎、清热解毒、抗氧化、软化血管等作用[1-4]。目前以柿叶黄酮为主要有效成分的成药已应用于临床，主要用于治疗冠心病、心绞痛、脑动脉硬化、缺血性脑血管病等[5]，且安全性高[6]。但是由于柿叶黄酮脂溶性较低，小肠透过性差，进而导致其生

收稿日期：2013-06-03

基金项目：北京市科技新星项目（2008A057）；北京中医药大学复方中药制药研究创新团队项目资助（2011-CXTD-13）；北京中医药大学自主选题在读研究生资助项目“大鼠肠内菌对柿叶黄酮多成分代谢转化的研究”

作者简介：张胜海，男，在读硕士研究生，从事中药制剂研究。E-mail: 20079.8bake@163.com

***通信作者** 王英姿，副教授，从事中药制剂新技术研究。Tel: (010)84738615 E-mail: wangyzi@sina.com

物利用度低，影响了其临床疗效。黄酮类化合物与磷脂在一定条件下形成磷脂复合物后，可使药物亲脂性明显增强，作用时间延长，不良反应降低，同时可增强其在胃肠道中的吸收，提高生物利用度[7-8]。本实验拟采用磷脂复合物制备技术，制备柿叶黄酮磷脂复合物（phospholipids complex of total flavonoids from leaves of *Diospyros kaki*，PC-TF-LDK），以改善其口服吸收。

1 仪器与材料

HJ—6A 多头磁力搅拌器（常州国华电器有限公司）；TU—1810 紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司），工作站：UVWin 紫外软件 V5.2.0；BSI10S 型 1/10 000 电子分析天平（赛多利斯仪器系统有限公司）；KH7200DB 型数控超声波清洗器（昆山超声仪器有限公司）；W220 型旋转蒸发仪（上海振捷实验设备有限公司）；DSC—1 差示扫描量热仪（瑞士梅特勒-托利多公司）；MSAL XD—3 衍射仪（北京普析通用仪器有限责任公司）。

芦丁对照品（中国食品药品检定研究院，批号 100080-200707）；柿叶黄酮（陕西华天生物工程有限公司，批号 201003，以芦丁计总黄酮质量分数为 46%）。大豆磷脂（上海太伟药业有限公司，注射级，批号 120108）；乙酸、乙酸钠、三氯化铝、无水乙醇、甲醇、二氯甲烷、四氢呋喃、丙酮、醋酸乙酯等试剂均为分析纯；水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 磷脂复合物的制备[9]

取柿叶黄酮与大豆磷脂在不同投料比、反应溶剂、温度下反应一定时间，减压除去反应溶剂，再加适量二氯甲烷充分溶解反应产物，用孔径 0.45 μm 的微孔滤膜滤过，滤液减压除去二氯甲烷后，在较低温度条件下真空干燥，即得柿叶黄酮磷脂复合物，二氯甲烷不溶物为未参加反应的黄酮类化合物及杂质。

2.2 总黄酮的定量测定

2.2.1 总黄酮的检测方法 分别取待检测溶液各 2 份，其中 1 份先后分别加入 3 mL 1 mol/L HAc-NaAc 缓冲溶液（9.25∶0.75，pH 3.6）和 3 mL 显色剂 $AlCl_3$ 溶液，用 60%乙醇定容至 10 mL 成为显色溶液；另 1 份只加入 3 mL HAc-NaAc 缓冲溶液，用 60%乙醇定容至 10 mL 成为空白溶液；显色 40 min 后在 430 nm 处测定吸光度（*A*）值[10]。

2.2.2 对照品及供试品溶液的制备 对照品溶液的制备：精密称取芦丁对照品适量，用 60%乙醇溶解，配制 495.8 μg/mL 的对照品溶液。供试品溶液的制备：精密称取柿叶黄酮粉末 25.03 mg 置 25 mL 量瓶中，60%乙醇定容，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 线性关系考察 取配制好的对照品溶液，用 60%乙醇稀释成含芦丁 0、9.92、19.83、29.75、39.66、49.58、59.50、69.41、79.33 μg/mL。以“2.2.1”项下方法在 430 nm 处测定，以 *A* 值为纵坐标（*Y*），质量浓度为横坐标（*X*）进行线性回归，得芦丁回归曲线为 $Y=0.099\ 7\ X-0.000\ 5$，$R^2=0.993\ 5$，表明芦丁在 0～79.33 μg/mL 与 *A* 值线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 吸取 495.8 μg/mL 芦丁对照品溶液，以“2.2.1”项下方法连续测定 6 次（每隔 2 h 测定 1 次），测定芦丁的 *A* 值，计算得 RSD 值为 1.21%。结果显示，仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 精密吸取新鲜制备的供试品溶液，按“2.2.1”项下方法，显色 40 min 后，每间隔 15 min 记录 1 次 *A* 值，连续 120 min，计算得 RSD 值为 0.93%，表明供试品溶液在显色后 120 min 内稳定。

2.2.6 重复性试验 分别精密称取柿叶黄酮粉末约 25 mg，平行 6 份，按供试品溶液的制备方法制备后，测定 *A* 值，以回归曲线计算黄酮的量，RSD 值为 2.71%，结果表明此测定方法重复性良好。

2.2.7 回收率试验 取稀释 5 倍的柿叶黄酮供试品溶液 1 mL，共 9 份，每 3 份中分别加入 1.5、1、0.5 mL 稀释 5 倍的芦丁对照品溶液，显色后，测定 *A* 值，以回归曲线计算黄酮的量，回收率分别为 104.18%、96.91%、96.94%，表明此测定方法回收率良好。

2.3 柿叶黄酮磷脂复合物制备工艺的质量评价

利用柿叶黄酮不溶于二氯甲烷，而磷脂和柿叶黄酮磷脂复合物均易溶于二氯甲烷的特性，分离游离柿叶黄酮与其磷脂复合物。收集滤过后的二氯甲烷不溶物沉淀，即为未复合的黄酮类化合物或其他杂质，干燥并称定质量。沉淀用一定量 60%乙醇溶解、滤过，续滤液参照“2.2.1”项下方法测定其中总黄酮的量，柿叶黄酮中黄酮类化合物质量与沉淀中黄酮类化合物质量的差值，即为与磷脂反应的黄酮类化合物质量。

$$复合率=(A_1-A_2)/A_1$$

A_1 为初始投药的黄酮质量；A_2 为二氯甲烷不溶物沉淀中的黄酮质量

2.4 单因素考察

2.4.1 反应溶剂的选择 参照“2.1”项下方法，设定柿叶黄酮与大豆磷脂的投料比为 1∶2，反应物的质量浓度为 10 mg/mL，反应温度为 40 ℃，反应时间为 2 h，考察甲醇、无水乙醇、丙酮、二氯甲烷、四氢呋喃、醋酸乙酯 6 种反应溶剂对复合率的影响，结果见表 1。采用甲醇为反应溶剂时，复合率最高，无水乙醇作反应溶剂次之。考虑到环保及溶剂毒性，选择无水乙醇作为反应溶剂。

表 1 不同反应溶剂对复合率的影响 (n=3)

Table 1 Effects of different solvents on complex rates (n=3)

溶 剂	介电常数 / ($F \cdot m^{-1}$)	总黄酮溶解度 / ($mg \cdot mL^{-1}$)	复合率 / %
甲醇	33.2	0.798±0.052	97.22±0.13
无水乙醇	26.8	0.707±0.033	96.73±0.16
丙酮	21.4	0.477±0.086	95.21±0.36
二氯甲烷	8.9	0.004±0.002	47.07±3.26
四氢呋喃	7.6	0.661±0.066	96.59±0.37
醋酸乙酯	6.1	0.069±0.007	50.18±6.96

采用 Spearman 相关分别对不同溶剂的介电常数、柿叶黄酮中黄酮类化合物在不同溶剂中的溶解度与复合率之间的相关性进行分析。分析结果显示介电常数与复合率间 P=0.111＞0.01（双侧），认为介电常数与复合率之间不存在正相关关系；溶解度与复合率间，r=0.864，P=3.82×10^{-6}＜0.01（双侧），认为溶解度与复合率之间存在较强的正相关关系。由此可以推断，溶剂因素引起的复合率差异主要是由于柿叶黄酮在溶剂中的溶解度差异造成的。

2.4.2 反应时间的选择 参照“2.1”项下方法，以无水乙醇作为反应溶剂，柿叶黄酮与大豆磷脂投料比、反应物的质量浓度、反应温度同“2.4.1”项下，考察反应时间 0.5、1、2、3、4、6 h 对复合率的影响，结果其复合率分别为（95.45±0.23）%、（95.43±0.35）%、（95.15±0.39）%、（95.62±0.33）%、（95.39±0.70）%、（94.95±0.31）%。结果表明，0.5 h 后药物的复合率就达到基本稳定，过长的反应时间不利于复合率的提高，拟选择 1、2、3 h 进行正交试验优化反应时间。

2.4.3 反应温度的选择 参照“2.1”项下方法，以无水乙醇为反应溶剂，柿叶黄酮与大豆磷脂投料比、反应物的质量浓度、反应时间同“2.4.1”项下，考察反应温度 22、30、40、50、60 ℃对复合率的影响。结果其复合率分别为（95.62±0.57）%、（95.92±0.78）%、（95.76±0.04）%、（95.99±0.72）%、（96.39±0.64）%。结果显示复合率随反应温度的升高，略有上升，无显著差异，拟选择 22、30、40 ℃进行正交试验优化反应温度。

2.4.4 柿叶黄酮与大豆磷脂投料比的选择 参照“2.1”项下方法，以无水乙醇为反应溶剂，反应物的质量浓度、反应温度、反应时间同“2.4.1”项下，考察柿叶黄酮与大豆磷脂投料比 1∶0.5、1∶0.6、1∶0.7、1∶0.8、1∶0.9、1∶1、1∶2、1∶3、1∶4 对复合率的影响，结果其复合率分别为（−9.08±9.70）%、（40.18±13.43）%、（95.21±0.07）%、（95.80±0.64）%、（95.65±0.77）%、（95.11±0.88）%、（96.03±1.2）%、（96.37±0.99）%、（97.17±0.40）%。结果表明，复合率受柿叶黄酮与大豆磷脂投料比的影响较大，柿叶黄酮与大豆磷脂投料比为 1∶0.7 时，复合率达到较高值，再增加磷脂用量时，复合率虽有升高但变化不显著，磷脂加入量大于 1∶2 时，复合物出现黏结，且磷脂用量越大，复合物越黏。因此拟选择 1∶0.8、1∶1、1∶2 进行正交试验优化柿叶黄酮与大豆磷脂投料比。

2.4.5 反应物质量浓度的选择 参照“2.1”项下方法，以无水乙醇为反应溶剂，反应温度、反应时间、物料比同“2.4.1”项，考察反应物质量浓度分别为 5、10、20、30、40、50、60 mg/mL 对复合率的影响，结果其复合率分别为（95.19±0.34）%、（94.92±0.03）%、（94.92±0.13）%、（94.76±0.09）%、（92.92±0.61）%、（93.02±0.23）%、（93.09±0.62）%。发现复合率随反应物质量浓度的升高有下降的趋势，30～40 mg/mL 下降的最为明显。出于对节省溶剂及复合率的综合考虑，反应物的质量浓度选用 30 mg/mL。

2.5 正交试验优选工艺参数

根据“2.4”项下单因素试验考察的结果，以无水乙醇为反应溶剂，物质量浓度为 30 mg/mL，以复合率为考察指标，选择反应时间（A）、反应温度（B）、柿叶黄酮与大豆磷脂投料比（C）为考察因素，每个因素 3 个水平，选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验，以优化柿叶黄酮磷脂复合物的工艺条件。正交试验设计及结果见表 2，方差分析见表 3。

由表 2 的直观分析可知，各因素对复合率的影响次序为 B＞C＞A，各因素的最佳水平为 $A_2B_2C_3$；表 3 方差分析结果表明，在所选定的因素水平内，

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Table 2 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal tests

试验号	因素				复合率 / %
	A / h	B / ℃	C	误差	
1	1 (1)	22 (1)	1∶0.8 (1)	(1)	91.58
2	1 (1)	30 (2)	1∶1 (2)	(2)	96.44
3	1 (1)	40 (3)	1∶2 (3)	(3)	97.03
4	2 (2)	22 (1)	1∶1 (2)	(3)	92.62
5	2 (2)	30 (2)	1∶2 (3)	(1)	97.08
6	2 (2)	40 (3)	1∶0.8 (1)	(2)	96.01
7	3 (3)	22 (1)	1∶2 (3)	(2)	92.97
8	3 (3)	30 (2)	1∶0.8 (1)	(3)	96.25
9	3 (3)	40 (3)	1∶1 (2)	(1)	96.42
K_1	95.017	92.390	94.613	95.027	
K_2	95.237	96.590	95.160	95.140	
K_3	95.213	96.487	95.693	95.300	
R	0.220	4.200	1.080	0.273	

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.087	2	0.769	
B	34.421	2	303.988	$P<0.01$
C	1.755	2	15.503	
D（误差）	0.113	2		

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$ $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

B 因素对柿叶黄酮磷脂复合物复合率的影响显著，A 和 C 因素的影响不显著。由于反应时间水平间的差异不显著，其偏差平方和甚至小于误差项，可以认为反应时间在选定的水平内对复合率无影响，因此选定 1 h 为最佳反应时间。根据上述实验结果，确定其最佳工艺条件为 $A_1B_2C_3$，即反应时间 1 h、反应温度 30 ℃、柿叶黄酮与大豆磷脂投料比为 1∶2。

2.6 工艺验证试验

结合正交试验与单因素试验结果，以无水乙醇为反应溶剂，柿叶黄酮与大豆磷脂投料比 1∶2、反应物质量浓度 30 mg/mL、反应温度 30 ℃、反应时间 1 h，重复 4 次，测定复合率，进行工艺验证。复合率分别为 96.80%、96.99%、96.99%、97.02%，平均复合率为 96.95%，相对标准偏差为 0.10%；表明正交试验所确定的柿叶黄酮磷脂复合物工艺条件复合率高，条件稳定可行。

2.7 柿叶黄酮磷脂复合物形成的验证

2.7.1 柿叶黄酮磷脂复合物的 X-射线衍射分析 X-射线衍射分析检测条件：石墨单色器单色化 CuKα 辐射；管电压 40 kV；管电流 40 mA。分别将柿叶黄酮、磷脂及两者的物理混合物和复合物进行 X-射线衍射分析，结果见图 1。图 1 显示柿叶黄酮与磷脂的混合物谱图为磷脂与柿叶黄酮谱图的叠加，说明混合物中的柿叶黄酮仍为晶体结构；柿叶黄酮磷脂复合物谱图无晶体的衍射峰，说明复合物中的柿叶黄酮为无定型状态，柿叶黄酮和磷脂形成

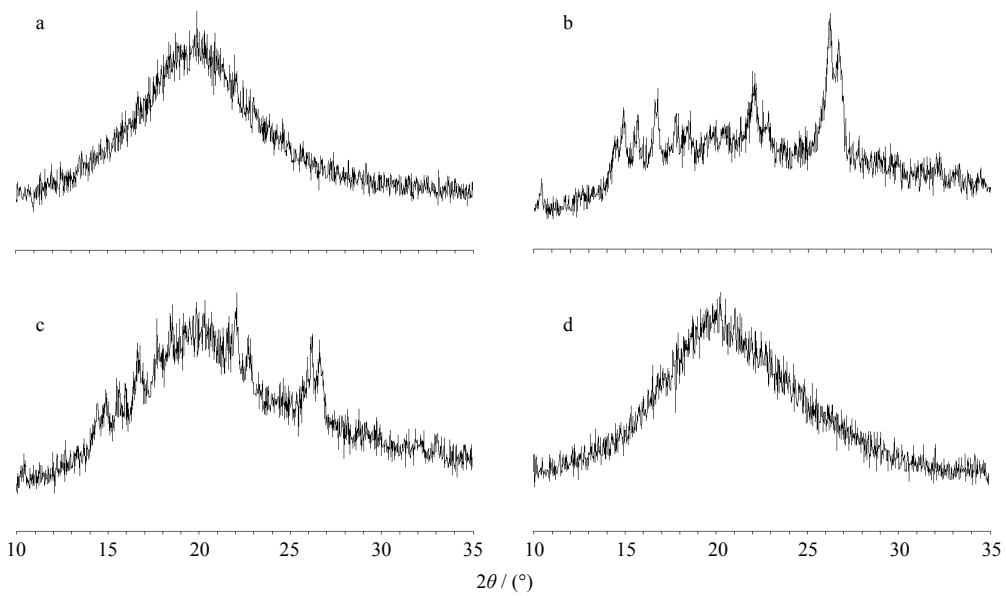

图 1 磷脂 (a)、柿叶黄酮 (b)、混合物 (c) 和磷脂复合物 (d) 的 X-射线衍射图

Fig. 1 X-ray diffraction patterns of phospholipids (a), TF-LDK (b), physical mixture (c), and phospholipids complex (d)

磷脂复合物后其晶型的衍射峰均消失，这表明发生复合反应后柿叶黄酮处于一种高度分散的状态，其自身的晶体特征被抑制[11]。通常无定型物的分子多呈不规则排列，自由能较高，溶解度和溶解速率较大，与水的亲合力也增加，这可能是磷脂复合物溶解性能等性质发生较大变化的原因之一。

2.7.2 差示扫描量热（DSC）分析 DSC 分析条件：以空铝坩锅为参比物，升温速度 10 ℃/min，扫描范围 50～370 ℃，N_2 体积流量 0.2 mL/min。分别称取柿叶黄酮、大豆卵磷脂、复合物及物理混合物进行 DSC 分析，并绘制 DSC 曲线图，见图 2。可以看出，复合物（c）与混合物（d）有明显的不同，复合物在 262.5 ℃处有 1 个吸热峰而混合物在 200～270 ℃为放热过程，说明复合物中黄酮与大豆磷脂分子之间存在一定的作用力，当外界温度升高时才会吸取能量来破坏这种作用力[12]。

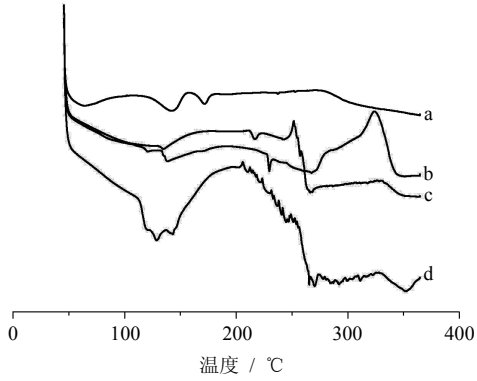

图 2 柿叶黄酮 (a)、磷脂 (b)、磷脂复合物 (c) 和混合物 (d) 的 DSC 扫描图谱

Fig. 2 DSC scanning spectra for TF-LDK (a), phospholipids (b), phospholipids complex (c), and physical mixture (d)

3 讨论

柿叶黄酮与大豆磷脂的投料比为 1∶0.5 时，复合率为负数且相对标准偏差较大，可能是因为当柿叶黄酮与大豆磷脂投料比较小时，复合率较低，未参加反应的柿叶黄酮较多，滤过过程中大量溶解了复合物的二氯甲烷残留在其表面，由于二氯甲烷挥发较快，干燥后溶解的复合物粘在了柿叶黄酮颗粒上，导致称质量时不溶物的质量增加。同样的现象在“2.5”项中也有出现，在使用二氯甲烷及醋酸乙酯作溶剂时，复合率较低，标准差也较大。

在柿叶黄酮与大豆磷脂投料比 1∶0.5～1∶0.7，复合率与磷脂的加入量呈正相关。柿叶黄酮中总黄酮质量分数为 46.6%，所用大豆磷脂中的磷脂酰胆碱（PC）质量分数为 70%左右，PC 的相对分子质量与黄酮的相对分子质量相当，当柿叶黄酮与大豆磷脂投料比为 1∶0.7 时，反应体系中总黄酮与 PC 的物质的量浓度约为 1∶1，复合效率达到较高值，再增加磷脂用量时，复合率虽有升高但变化不显著。磷脂与黄酮的这种 1∶1 结合支持了磷脂的 -NH 是处于 4-C＝O 与-OH 之间的结论[13]。

本研究以柿叶黄酮与磷脂的复合率为评价指标，在单因素试验的基础上采用正交试验设计，优化了柿叶黄酮磷脂复合物的制备工艺，为其工业化生产奠定了基础。

参考文献

[1] 陈 光, 徐绥绪. 柿属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(1): 69.

[2] Li C, Ma X B, Liang Y H, *et al*. Effects of persimmon leaf total flavonoid on enzyme of lipoprotein metabolism and antioxidation in hyperlipidemia rats [J]. *Chin J Nat Med*, 2011, 9(1): 74-77.

[3] 陈 丽, 梁宇红, 裴世成, 等. 柿叶总黄酮对高脂血症大鼠血脂和血液流变学的影响 [J]. 中成药, 2011, 33(8): 1397-1400.

[4] 欧阳平, 贝伟剑, 赖文岩, 等. 柿叶黄酮对缺氧复氧以及晚期糖基化终产物诱导的乳鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(7): 680-682.

[5] 国家药品监督管理局. 脑心清片质量标准 [J]. 中国药品标准, 2002, 3(1): 30-31.

[6] 蔡永明, 项宗尚, 宋紫辉, 等. 脑心清片大鼠长期毒性实验研究 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 752-756.

[7] 卫世杰, 霍务贞, 王立宝. 吸收促进剂对水飞蓟宾及其磷脂复合物肠吸收的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 43-46.

[8] 吴慧仪, 龙晓英, 陈 莉, 等. 磷脂复合物及其对中药活性成分透过生物膜的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 393-398.

[9] 石森林, 高 敏, 童丽姣, 等. 山楂叶总黄酮磷脂复合物的制备工艺 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(1): 243-246.

[10] 范杰平. 柿叶中有效成分的提取与分离研究 [D]. 浙江大学, 2006.

[11] 雍德卿, 席延伟, 翟光喜. 槲皮素磷脂复合物理化性质的研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2005, 26(5): 32-34.

[12] 卫 薇, 赵 栋, 张志荣, 等. 羟喜树碱磷脂复合物理化性质的研究 [J]. 华西药学杂志, 2008, 23(4): 396-399.

[13] 史亚军, 吴品江, 许润春, 等. 黄芩苷磷脂复合物基本性质研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 78-82.