

胶体二氧化硅固化银杏黄酮组分磷脂复合物的研究

夏海建^{1,2}, 张振海², 孙 娥², 陈小云^{1,2}, 万高星河¹, 贾晓斌^{1,2*}

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

2. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

摘要: 目的 制备银杏黄酮组分磷脂复合物(GF-PC), 并利用胶体二氧化硅(CS)对其进行固化。方法 以CS为载体, 固化GF-PC。采用差示扫描量热分析(DSC)法、X射线粉末衍射分析(XPRD)法和扫描电镜(SEM)法对所制备的磷脂复合物和固化粉末进行物相表征, 并考察其体外溶出和流动性。结果 DSC和XPRD图谱表明, GF以无定形态存在于固化粉末中。体外溶出结果表明, 固化粉末能够有效促进药物的溶出。结论 CS固化GF-PC的制备工艺简单、操作方便, 在提高自身流动性的同时能够显著改善其溶出性。

关键词: 银杏黄酮组分; 胶体二氧化硅; 磷脂复合物; 固化粉末; 表征

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)08-1078-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.08.008

Solidifying of ginkgo flavones phospholipid complex using colloidal silica

XIA Hai-jian^{1,2}, ZHANG Zhen-hai², SUN E², CHEN Xiao-yun^{1,2}, WAN-GAO Xing-he¹, JIA Xiao-bin^{1,2}

1. Affiliated Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To prepare ginkgo flavones phospholipid complex (GF-PC) and to solidify it using colloidal silica (CS). **Methods** CS was used as a carrier to solidify GF-PC. The structures of the phospholipid complex and solidified powder were also characterized by differential scanning calorimetry, X-ray diffractometer, and scanning electron microscope, and dissolution *in vitro* and fluidity were also investigated. **Results** The phase analysis indicated that ginkgo flavones existed in the phospholipid complex and solidified powder as amorphous state. Dissolution *in vitro* showed that the solidified powder could effectively promote the drug dissolution. **Conclusion** The process of the solidified powder is simple and convenient. The powder prepared can significantly improve the fluidity of the GF-PC and promote the dissolution *in vitro*.

Key words: ginkgo flavones; colloidal silica; phospholipid complex; solidified powder; characterization

银杏黄酮是从传统中药银杏中提取分离的有效成分之一, 主要以黄酮醇苷形式存在, 具有抗氧化、清除自由基、舒张血管、抗心肌缺血、心肌保护和内皮细胞保护等作用, 在保护心血管系统方面有广泛的应用^[1-2]。但由于银杏黄酮主要有效成分脂溶性低, 肠透过性差, 口服给药生物利用度低, 严重影响其临床疗效^[3-4]。

磷脂复合物(PC)能够有效地改善药物的脂溶性, 减少药物不良反应, 增强药物吸收, 提高药物

的生物利用度^[5-6], 然而PC存在黏度大、流动性差、不利于制剂加工的缺点。胶体二氧化硅(CS)具有形状规则、粒径范围可控、比表面积大和吸附能力强等特点, 作为载体能有效促进药物的溶出^[7-9]。本实验在PC的基础上, 以银杏黄酮组分(GF)作为模型药物, 选择CS作为载体材料, 采用溶剂法固化GF-PC。利用差示扫描量热分析(DSC)法、X射线粉末衍射分析(XPRD)法和扫描电镜(SEM)法对固化粉末进行物相表征, 并对其理化性质进行

收稿日期: 2013-11-07

基金项目: 江苏省中医药领军人才专项(2006); 江苏省高等学校大学生创新训练计划项目(011042004000)

作者简介: 夏海建, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂新剂型研究。E-mail: haij-1988@163.com

*通信作者 贾晓斌 Tel/Fax: (025)85637809 E-mail: xiaobin_jia_nj@126.com

初步研究。

1 仪器与材料

AcQuity™ 超高效液相色谱仪 (Waters, 600 型泵, 717 自动进样器, 2996DAD 紫外检测器, Empower 数据处理系统); DSC204 差示扫描量热仪 (德国 Netzsch 公司); 6390LV 扫描电子显微镜 (日本电子公司); D8 型 X 射线衍射仪 (德国 Bruker 公司); ZRS—8G 型智能溶出试验仪 (天津大学无线电厂); LY202—B 旋转蒸发仪 (上海礼研化工设备有限公司), Mettler 204 十万分之一天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司)。

GF (总黄酮质量分数 > 60%, 实验室自制); 对照品槲皮素 (批号 100081-200907, 质量分数 > 98%)、山柰酚 (批号 110861-200808, 质量分数 > 98%)、异鼠李素 (批号 110860-200608, 质量分数 > 98%) 均购于中国食品药品检定研究院; 大豆卵磷脂 (批号 20120701, 上海太伟药业有限公司); CS (SYLOID® 244FP, 美国 Grace 公司, 批号 1000202378); 无水乙醇等试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。甲醇为色谱纯, 水为高纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 GF 定量测定方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 BEH C₁₈ 柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液 (30 : 70); 柱温 30 °C; 样品室温度 4 °C; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 2 μL; 检测波长 360 nm。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素、山柰酚、异鼠李素对照品 4.64、4.46、4.25 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用色谱甲醇溶解并定容至刻度, 得到质量浓度为 464、446、425 μg/mL 的对照品溶液, 备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 取适量的 CS 固化粉末, 向其中加入 25 mL 甲醇-25% HCl 溶液 (4 : 1) 的混合溶液, 置于 80 °C 水浴加热回流 1 h, 迅速冷却至室温, 转移至 50 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 线性关系考察 分别精密量取 1 mL 各对照品溶液适量, 置于同一个 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度, 配制成含槲皮素 46.4 μg/mL、山柰酚 44.6 μg/mL、异鼠李素 42.5 μg/mL 的混合对照品储备液。再吸取适量的混合对照品储备液, 用甲醇稀释成含槲皮素 0.464、4.64、9.28、23.2、46.4

μg/mL, 山柰酚 0.425、4.25、8.50、21.25、42.5 μg/mL, 异鼠李素 0.446、4.46、8.92、22.3、44.6 μg/mL 的系列对照品溶液, 按上述色谱条件分别进样测定, 以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积积分值为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得槲皮素回归方程为 $Y = 36\,974X - 35\,442$, $r = 0.998\,2$, 表明槲皮素在 0.464~46.4 μg/mL 线性关系良好; 山柰酚回归方程为 $Y = 39\,090X - 39\,278$, $r = 0.997\,6$, 表明山柰酚在 0.425~42.5 μg/mL 线性关系良好; 异鼠李素回归方程为 $Y = 21\,136X - 24\,725$, $r = 0.998\,8$, 表明异鼠李素在 0.446~44.6 μg/mL 线性关系良好, 见图 1。

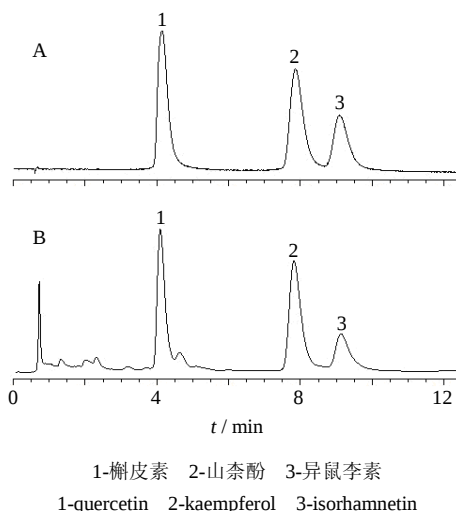


图1 混合对照品 (A) 和供试品 (B) 的 UPLC 色谱图
Fig. 1 UPLC of mixed reference substance (A) and sample (B)

2.1.5 精密度试验 分别吸取制备好的混合对照品溶液, 按照上述色谱条件分别 UPLC 进样测定槲皮素、山柰酚和异鼠李素的峰面积, 重复 6 次, 结果 3 种成分峰面积的 RSD 值分别为 0.28%、0.96%、0.84%, 表明本方法精密度良好。

2.1.6 重复性试验 精密称取同一 CS 固化粉末 6 份, 按供试品溶液制备方法平行制备 6 份供试品溶液, 分别进样, 测定 3 种成分的峰面积, 计算各成分的质量分数, 结果其 RSD 值分别为 2.4%、2.1%、2.9%, 表明本方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 取样 UPLC 进样, 测定 3 种成分的峰面积, 计算峰面积的 RSD 值分别为 1.82%、2.37%、2.15%, 表明供试品溶液至少在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 回收率试验 精密量取同一 CS 固化粉末的

供试品溶液6份,分别精密加入等量的对照品,超声至溶解,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液。按上述色谱条件分别进样,依法测定,计算回收率和RSD值。结果槲皮素、山柰酚和异鼠李素的平均回收率分别为101.65%、102.38%、98.47%,RSD值分别为2.48%、3.57%、3.16%。

2.2 CS 固化 GF-PC 的制备

2.2.1 GF-PC 的制备^[10-11] 精密称取20 mg GF和40 mg 大豆磷脂,加入适量无水乙醇溶解,混匀,于一定的温度下搅拌反应1 h后,40 $^{\circ}\text{C}$ 减压除去反应溶剂,然后再加入适量二氯甲烷,充分溶解其中的磷脂及复合物,滤过,收集滤液,将二氯甲烷蒸干,收集固体,即得GF-PC。

2.2.2 CS 固化粉末的制备 精密称取一定量的GF-PC,加入适量无水乙醇溶解,按CS与PC的质量比(2:1、1:1、1:2)向其中加入CS,搅拌反应30 min,40 $^{\circ}\text{C}$ 减压除去反应溶剂,收集即得CS固化粉末,备用。

2.3 体外溶出度考察

精密称取GF原料药、PC和CS固化粉末(均相当于含等量的GF),按照《中国药典》2010年版二部附录XC浆法,以pH 1.2的盐酸为溶出介质,调节转速100 r/min,温度(37 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。每份样品平行测定3次,分别于5、15、30、45、60、120、180 min取样5 mL,并立即补充同温度等体积的溶出介质。将5 mL溶出介质置于具塞试管中,加入甲醇-25% HCl溶液(4:1)的混合溶液25 mL。置于80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热回流1 h,迅速冷却至室温,转移至50 mL量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,取适量以0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液进行UPLC测定,计算溶出介质中GF的量[GF的量=(槲皮素的量+山柰酚的量+异鼠李素的量) $\times$ 2.51],并换算成累积溶出率,绘制体外溶出时间曲线图,结果见图2。结果表明,GF原料药、物理混合物和GF-PC中GF的溶出速度和溶出量没有显著差异,而与GF原料药、物理混合物和GF-PC相比,CS固化粉末中的GF的溶出速度和溶出量都得到显著的提高,这可能是由于药物高度充分分散在载体中的结果。同时不同质量比的CS固化粉末(2:1、1:1、1:2)都能够显著促进药物的溶出,且三者之间无显著差异,为了减少制剂中辅料CS的用量,本实验选择GF-PC与CS的质量比为2:1来制备GF固化粉末。

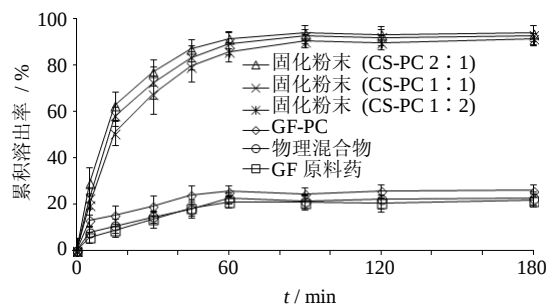


图2 GF、GF-PC、物理混合物和不同质量比的CS固化粉末的溶出曲线

Fig. 2 Dissolution curves of GF, GF-PC, physical mixture, and CS solidified powder with different ratios

2.4 差示扫描量热分析(DSC)

以 Al_2O_3 为参比物,升温速度10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,升温范围0~500 $^{\circ}\text{C}$,分别对GF、大豆磷脂、CS、物理混合物、GF-PC和CS固化粉末进行DSC分析。结果见图3。结果表明,GF在86.7 $^{\circ}\text{C}$ 和327.2 $^{\circ}\text{C}$ 分别有个熔点峰,大豆磷脂有3个明显的熔点峰,物理混合物的DSC曲线中仍存在GF的吸热峰,说明药物的晶型未改变,GF仍以结晶的形式存在,而PC和固化粉末的DSC曲线中PC原料药的特征峰均消失,说明其中的GF可能以非晶体形式存在,推测是由于GF高度分散在磷脂分子中,与磷脂相结合形成新的物相,且CS固化对药物形态没有产生影响。

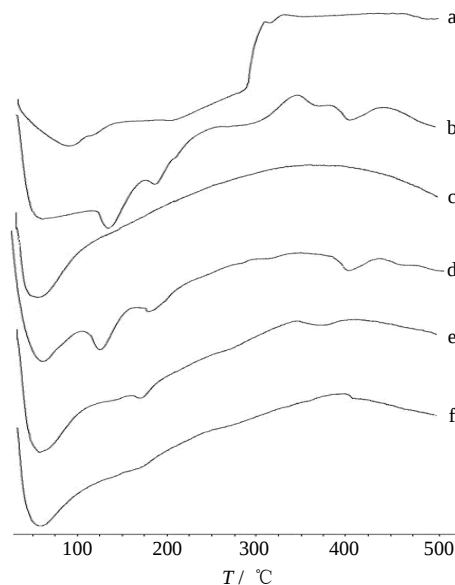


图3 GF(a)、大豆磷脂(b)、CS(c)、物理混合物(d)、GF-PC(e)和CS固化粉末(f)的DSC图

Fig. 3 DSC curves of GF (a), soybean phospholipid (b), CS (c), physical mixture (d), GF-PC (e), and CS solidified powder (f)

2.5 扫描电镜分析 (SEM)

称取一定量的 GF、CS 和 CS 固化粉末, 在其表面真空镀金 70 s, 再通过扫描电镜观察各样品的表面和晶体结构。SEM 结果见图 4。GF 以大小不一的结晶体形式存在, CS 表现为蓬松的不规则形状, 而 CS 固化粉末中, GF 原料药结晶体基本消失, 证明 GF 以非晶形态分散在复合物中。

2.6 X 射线粉末衍射法分析 (XPRD)

测试条件为 Cu 靶 (40 kV, 40 mV); 步进扫描:

0.01°/步; 扫描范围: 5°~70°; 扫描速度: 4°/min。分别对 GF、CS、物理混合物、PC 和 CS 固化粉末进行 XPRD, 结果见图 5。结果表明, GF 原料药在 5°~30°有多个强的结晶特征衍射峰; CS 为非结晶化合物, 没有明显的衍射峰; 物理混合物中仍存在银杏黄酮的结晶衍射峰, 说明药物仍以结晶形式存在于物理混合物中; 而在 2 种复合物中, GF 的晶体衍射峰几乎消失, 说明药物自身的晶体特征被抑制, 以一种无定形态高度分散于复合物中。

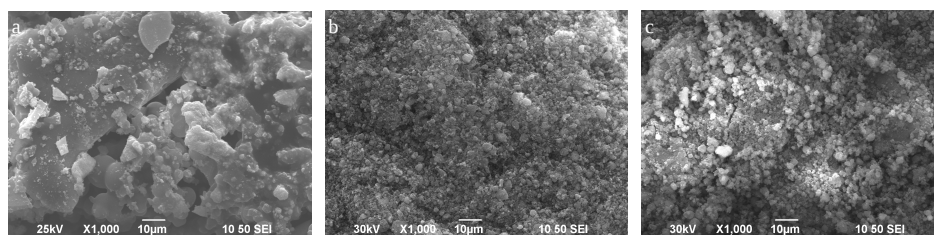


图 4 GF (a)、CS (b) 和 CS 固化粉末 (c) 的 SEM 图

Fig. 4 SEM graphs of GF (a), CS (b), and CS solidified power (c)

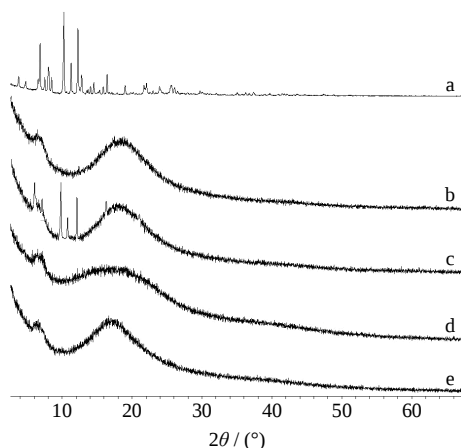


图 5 GF (a)、CS (b)、物理混合物 (c)、GF-PC (d) 和 CS 固化粉末 (e) 的 XPRD 图

Fig. 5 XPRD curves of GF (a), CS (b), physical mixture (c), GF-PC (d), and CS solidified power (e)

2.7 流动性测定

取 PC 和 CS 固化粉末适量, 加入一平口漏斗中, 轻微振动, 用秒表测定流出时间, 计算流出速度; 同时采用固定漏斗法, 测定其休止角。结果表明, CS 固化粉末的流动速度为 (1.947 ± 0.280) g/s (表示每秒流动克数), PC 的流动性几乎为 0, CS 固化粉末的休止角为 $(34.78 \pm 0.49)^\circ$, 而 PC 黏稠性大, 黏附在漏斗内壁上无法测出其休止角。因此, 综合流出速度和休止角 2 个指标, 可知与黏稠的 PC 相比, CS 固化粉末具有很好的流动性。

3 讨论

中药活性组分通过与磷脂复合而形成一种新的有潜力的给药系统, 能显著地改善其生物有效性, 具有良好的应用研究价值和开发前景^[12-13], 但 PC 自身也存在黏稠性大、流动性差的特点。SYLOID® 244FP 是一种被广泛用作药物载体的商品化 CS, 粒径小, 比表面积大, 具有降低细孔中药物的结晶度, 提高药物的溶出度等特点。本实验在 PC 的基础上, 尝试使用 CS (SYLOID® 244FP) 作为载体, 制备 CS 固化粉末。研究结果表明 CS 固化 PC 的制备工艺简单, 操作方便, 且能有效改善 PC 黏稠性和流动性。DSC 和 XPRD 结果表明, 固化粉末中药物仍以非晶形态高度均匀的分散在载体中, 在没有改变 PC 中药物形态的同时, 能够有效改善药物溶出性。

参考文献

- [1] 郭健, 刘义, 李延平, 等. 银杏叶总提取物对 H_2O_2 诱发的心肌细胞损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2008, 39(12): 1864-1867.
- [2] Li L, Zhao Y S, Du F F, et al. Intestinal absorption and presystemic elimination of various chemical constituents present in GBE50 extract, a standardized extract of *Ginkgo biloba* leaves [J]. *Curr Drug Metab*, 2012, 13(5): 494-509.
- [3] 汪素娟, 康安, 狄留庆, 等. 银杏叶提取物主要活性成分药理学研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(5):

- 626-631.
- [4] 陈志鹏, 刘俊, 刘丹, 等. 银杏叶提取物磷脂复合物大鼠体内药动学研究 [J]. 中成药, 2010, 32(12): 2067-2070.
- [5] 吴惠仪, 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.
- [6] 李艳贞, 阎卉, 刘欢, 等. 长春瑞滨磷脂复合物的制备及其性质研究 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(6): 570-574.
- [7] Kovačič B, Vrečer F, Planinšek O. Solid dispersions of carvedilol with porous silica [J]. *Chem Pharm Bull*, 2011, 59(4): 427-733.
- [8] Planinšek O, Kovačič B, Vrečer F. Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica [J]. *Int J Pharm*, 2011, 406(1/2): 41-48.
- [9] Mohammad Rabea A, Mohseni M, Mirabedini S M, *et al.* Surface analysis and anti-graffiti behavior of a weathered polyurethane-based coating embedded with hydrophobic nano silica [J]. *Appl Surf Sci*, 2012, 258(10): 4391-4396.
- [10] 朱红, 王德伟, 高尔. 银杏黄酮磷脂复合物的制备及其理化性质的研究 [J]. 潍坊医学院学报, 2007, 29(5): 432-433.
- [11] 孙俊, 陈志鹏, 蔡宝昌. 银杏叶提取物磷脂复合物的制备 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(12): 2671-2673.
- [12] Singh D, Rawat M S, Semalty A, *et al.* Rutin-phospholipid complex: an innovative technique in novel drug delivery system-NDDS [J]. *Curr Drug Deliv*, 2012, 9(3): 305-314.
- [13] Cao F, Gao Y H, Yin Z, *et al.* Enhanced oral bioavailability of oleanolic acid in rats with phospholipid complex [J]. *Lett Drug Des Discov*, 2012, 9(5): 505-512.