

· 论著 ·

葡萄籽原花青素 B₂ 磷脂复合物的制备研究

苗智如¹, 徐超斗², 陆 帅³, 蒋国军³ (1. 杭州市萧山区第一人民医院药剂科, 浙江 杭州 311200; 2. 总后卫生部药品仪器检验所, 北京 100071; 3. 萧山医院药剂科, 浙江 萧山 311202)

[摘要] 目的 制备葡萄籽原花青素磷脂复合物, 考察其理化性质, 研究磷脂复合物制剂成型工艺。方法 以葡萄籽原花青素与磷脂的复合率为评价标准, 再以复合率为指标确定复合物制备工艺; 研究原花青素 B₂ 磷脂复合物的理化性质包括脂水分分配系数及溶解性能等; 探讨葡萄籽原花青素磷脂复合物的制剂成型工艺。结果 优化工艺的复合率可达 97%。原花青素 B₂ 磷脂复合物的油水分分配系数与原花青素 B₂ 相比明显增大, 预示其体内吸收有可能提高。原花青素磷脂复合物流动性尚可, 但黏性强, 相对临界湿度小, 引湿性较强。结论 确定了制备葡萄籽原花青素磷脂复合物的最佳工艺, 该复合物明显改善原药的理化性质。

[关键词] 葡萄籽; 原花青素; 磷脂复合物

[中图分类号] R943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)01-0031-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.01.008

Preparation of proanthocyanidins phospholipids complex

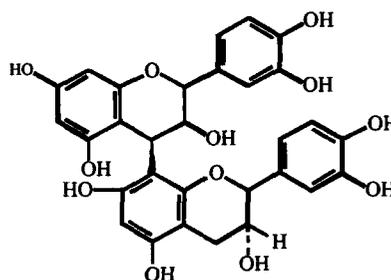
MIAO Zhiru¹, XU Chaodou², LU Shuai³, JIANG Guojun³ (Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Xiaoshan District, Hangzhou 311200, China; 2. Institute for Drug and Instrument Control, General Health Department of PLA, Beijing 100071, China; 3. Department of Pharmacy, Xiaoshan Hospital of Zhejiang Province, Xiaoshan 311202, China)

[Abstract] **Objective** To prepare proanthocyanidins phospholipids complex, investigate the physicochemical properties and study the formulation. **Methods** Proanthocyanidins phospholipids complex was prepared and optimized by solvent evaporation method and physicochemical characteristics of the complex were investigated by means of apparent solubility studies. **Results** The average entrapment efficiencies of phospholipid complex for proanthocyanidins of grape seed was 97%. Moreover, there was a great improvement of the solubility of proanthocyanidins phospholipid complex both in water and n-octanol. **Conclusion** The best method to proanthocyanidins phospholipid complex was achieved, and the physicochemical properties were significantly better from those of proanthocyanidins.

[Key words] grape seed; proanthocyanidins; phospholipid complex

原花青素是多种植物中富含的植物多酚类化合物, 由于其独特的生理保健功能, 近年来倍受关注^[1-7]。原花青素来源广泛, 在许多天然植物, 如葡萄籽、沙棘、黑加仑等中广泛存在。国外关于原花青素的生物活性研究较多, 由于其极强的抗氧化活性, 使原花青素成为近年来在抗癌、抗炎、抗氧化、抗辐射、抗突变、抗过敏、保护心血管以及护肤美容抗衰老等方面研究的热点, 它同时也是极具潜力的一种治疗药物。原花青素是一种由单体(主要是儿茶素、表儿茶素等)、低聚原花青素(单体的二、三、四聚合物体)和高聚原花青素(五聚体以上)组成的化

合物。其中二聚体在各类原花青素中分布最广、抗氧化活性最强, 是最重要的一类。二聚体因 2 个单体的构象或缩合键位不同, 有多种异构体, 现已鉴定出 8 种异构体, 在这 8 种异构体中原花青素 B₂ 是活性最强的一个二聚体。它的结构式如下:



[基金项目] 杭州市科学技术局医疗卫生科研项目(20100633B26); 杭州市萧山区科学技术局重点科研项目(2010225)。

[作者简介] 苗智如, 女, 副主任药师。E-mail: mzm0989@163.com。

[作者简介] 蒋国军。Tel: (0571) 83865516, E-mail: jianguojun999@163.com。

由于原花青素水溶性强, 跨膜转运性能差, 难以

透过胃肠壁而被吸收进入体循环;而且它在胃肠道中性质不稳定、易被降解,导致生物利用度很低。因而影响了原花青素 B₂ 口服制剂疗效的发挥,限制了其在临床上的使用。

磷脂复合物(phytosome)系指在非质子传递体系溶剂中,药物与磷脂以一定配比关系结合而形成的复合物,由药物与磷脂^[7-12]在非质子溶剂中通过范德华力或氢键结合而成。天然活性成分与磷脂结合形成复合物后,常常表现出与原化合物显著的理化性质和生物特性,可以显著提高水溶性药物的脂溶性和稳定性,改善其跨膜转运性能,进而提高药物的生物利用度;同时具有延缓释药,降低体内消除速率等优点。因此,磷脂复合物被认为是改善中药水溶性成分口服生物利用度的一种有效手段。

本研究拟制备葡萄籽原花青素磷脂复合物,并考察其中活性成分原花青素 B₂ 制成磷脂复合物后的脂水分配系数变化,为研究高生物利用度的葡萄籽原花青素制剂奠定基础。

1 材料与仪器

葡萄籽提取物为天津尖峰天然产物研究开发有限公司产品,卵磷脂为上海太伟药业有限公司产品,其余试剂均为国产分析纯。UV1102 型紫外分光光度计为上海天美科学仪器公司产品,旋转蒸发器为上海申科仪器公司产品,XW-80 型涡旋混合器为上海第一医学仪器厂产品,TGL-16G 型台式高速离心机为上海医用分析仪器厂产品,其他均为实验室常用设备。

2 方法和结果

2.1 原花青素磷脂复合物的制备 将原花青素与磷脂以不同比例加入合适的溶剂中,在不同温度下搅拌至澄清,挥除有机溶剂,残余物低温减压干燥后获得原花青素磷脂复合物。

利用氯仿检查磷脂复合物的形成。因为原花青素不溶于氯仿,而被磷脂包裹的磷脂复合物可溶于此溶剂。由此判断所得到的复合物为原花青素磷脂复合物。

研究表明,优化的制备原花青素磷脂复合物的方法为:取原花青素 10 g 与大豆磷脂 40 g,置于 50 L 的混合溶剂[乙醇-四氢呋喃(1:9)]中,40 ℃ 溶解搅拌,持续搅拌 2 h,旋转蒸发除去四氢呋喃,即得产物。优化工艺的复合率可达 97%。

2.2 原花青素 B₂ 及其磷脂复合物的水中饱和溶解度的测定 以 20 ml 水为溶剂,分别加入过量的原花青素 B₂ 和原花青素 B₂ 磷脂复合物搅拌。分

别于 1、2、2.5、3 h 时各取 2 ml 离心(3 000 r/min) 10 min。取上层清液过 0.45 μm 滤膜,取续滤液 1 ml 于 10 ml 容量瓶,稀释至定容,然后在 265 nm 处测紫外吸收度,重复测 3 次。

将过量的原花青素 B₂ 及其磷脂复合物分布溶解于水中,3 h 后达到溶解平衡。测得各自的饱和溶解度,见表 1。原花青素 B₂ 磷脂复合物能显著提高药物的水溶性,至原来的 2.6 倍。

表 1 原花青素 B₂ 及其磷脂复合物在水中的饱和溶解度(μg/ml)

样品	原花青素 B ₂	磷脂复合物
1	185.06	480.87
2	187.41	487.67
3	186.33	483.49
平均值	186.27	484.01

2.3 原花青素 B₂ 及其磷脂复合物在正辛醇中饱和溶解度的测定 分别以 20 ml 的水和正辛醇作为溶剂,加入过量的原花青素 B₂ 搅拌。分别于 1、2、2.5、3 h 时各取 2 ml 离心(3 000 r/min) 10 min。取上层清液过 0.45 μm 滤膜,取续滤液 1 ml 于 10 ml 量瓶,稀释至定容,然后在 265 nm 处测紫外吸收度,重复测 3 次。

将过量的原花青素 B₂ 及其磷脂复合物分别溶解于正辛醇中,3 h 后达到溶解平衡。测得各自的饱和溶解度,见表 2。原花青素 B₂ 磷脂复合物能显著提高药物的脂溶性,达 19 倍之多。

表 2 原花青素 B₂ 及其磷脂复合物在正辛醇中的饱和溶解度(μg/ml)

样品	原花青素 B ₂	磷脂复合物
1	1 931.46	35 202.49
2	1 919.00	38 006.23
3	1 925.23	36 604.35
平均值	1 925.23	36 604.36

2.4 原花青素 B₂ 及其磷脂复合物的油水分配系数的测定 制备含药量为 200 μg/ml 的原花青素 B₂ 及其复合物的正辛醇溶液。各取 10 ml 置于 pH 值为 1.0、3.6、4.5、6.0、7.4 的 10 ml 蒸馏水中,室温下搅拌 3 h 后,将上下两层溶液分开,稀释至适宜浓度,在 265 nm 处测紫外吸收度,并按照对照品溶液的紫外吸收换算成浓度。最后将各 pH 值处的正辛醇浓度与水溶液浓度相比较,得出油水分配系数。

制备原花青素 B₂ 的饱和溶液;配制相当于原花青素 B₂ 200 mg/ml 浓度的磷脂复合物的正辛醇溶液。精密移取 10 ml 各样品的正辛醇溶液及 10 ml

不同 pH 值的蒸馏水于 50 ml 圆底烧瓶中, 震摇 3 h 后, 按上述方法测定。结果见表 3 和表 4。

表 3 原花青素 B₂ 的油水分分配系数 (μg/ml)

pH 值	正辛醇中浓度	水中浓度	油水分分配系数
1.0	149.37	43.33	3.447
3.6	147.44	43.33	3.403
4.5	145.83	47.67	3.059
6.0	141.66	42.09	3.366
7.4	132.1	55.4	2.38

表 4 原花青素 B₂ 磷脂复合物的油水分分配系数 (μg/ml)

pH 值	正辛醇中浓度	水中浓度	油水分分配系数
1.0	179.17	44.42	4.034
3.6	171.43	47.82	3.585
4.5	176.95	46.58	3.799
6.0	150.67	49.43	3.047
7.4	167.22	65.44	2.555

药物的水油分配系数与药物在生物膜中的分配有关, 水油分配系数在一定范围内的增大, 会使药物进入生物膜的量增大, 有利于药物的跨膜转运, 从而增加进入体内的药物量, 提高生物利用度。实验表明, 原花青素 B₂ 磷脂复合物的油水分分配系数与原花青素 B₂ 相比明显增大, 预示其体内吸收有可能提高。

2.5 原花青素磷脂复合物性质测定 取原花青素与大豆磷脂, 置于 50 L 的混合溶剂 [乙醇-四氢呋喃 (1:9)] 中, 40 ℃ 溶解搅拌, 持续搅拌 2 h。旋转蒸发除去四氢呋喃。将干燥原花青素磷脂复合物提取物与残渣粉碎, 制得原花青素磷脂复合物。成型工艺过程中, 原花青素磷脂复合物的相对临界湿度、流动性及黏性等对制剂成型有较大影响, 因此对其进行了考察。

2.5.1 相对临界湿度测定 精密称取原花青素磷脂复合物 2~3 g, 平铺于干燥扁形称量瓶中, 分别置于已知湿度 (用不同浓度的硫酸控制湿度) 的干燥器内, 敞口放置 24 h, 再称定重量, 计算吸水率, 结果样品相对湿度在 42% 以内, 引湿性较小。

2.5.2 休止角测定 取原花青素磷脂复合物, 用漏斗法测定休止角 (环境相对湿度 32%), 测定 3 次。结果表明, 原花青素磷脂复合物休止角平均为 45°。

2.5.3 黏性 取原花青素磷脂复合物, 分别用水、40%、70%、90%、95% 及无水乙醇制粒, 以考察其黏性。结果用水、40%、70%、90% 乙醇均无法制粒, 用 95% 乙醇可制粒, 但黏性较大, 难通过筛网, 用无水乙醇较易制粒, 说明原花青素磷脂复合物黏性强, 对制粒有较大影响。

上述实验结果表明, 原花青素磷脂复合物流动性尚可, 但黏性强, 相对临界湿度小, 引湿性较强。

2.6 成型工艺研究

2.6.1 减少物料吸湿性的辅料种类和用量的考察

通过对本品原花青素磷脂复合物的性质考察, 粉末具有很强的吸湿性, 根据经验, 如果不加入一定量的辅料减少物料的吸湿性, 制成胶囊后内容物很容易吸潮结块。所以考察加入不同物料以降低物料的吸湿性。制成混料, 填充胶囊, 放入恒温、恒湿箱中进行加速实验, 结果见表 5。

表 5 原花青素磷脂复合物辅料选择与用量及混合结果

辅料种类	试验号	辅料用量所占比例 (%)	结果
微粉硅胶	1	5.0	第 5 天成团
	2	7.5	第 10 天不成团
	3	10.0	第 10 天不成团
微晶纤维素	4	10.0	第 1 天成团
	5	15.0	第 1 天成团
	6	20.0	第 2 天成团
淀粉	7	10.0	第 1 天成团
	8	15.0	第 1 天成团
	9	20.0	第 2 天成团

从表 5 数据可以看出, 加入一定量的微粉硅胶对物料的吸湿性具有很大影响; 当微粉硅胶的量达到原花青素磷脂复合物混料的 7.5% 以后, 按照影响因素考察的方法, 原花青素磷脂复合物在第 10 天都不会出现成团现象。由此确定加入 7.5% 的微粉硅胶。

2.6.2 胶囊型号和胶囊服用量的确定 原花青素磷脂复合物中加入 7.5% 的微粉硅胶能起到较好的防潮效果, 为确定胶囊型号, 分别取 0、1、2 号胶囊进行装填试验。为使胶囊充填顺利进行, 加入原花青素磷脂复合物量 0.4% 的硬脂酸镁为润滑剂。将干燥粉末和以上辅料混合均匀, 进行胶囊填充, 结果见表 6。

表 6 原花青素磷脂复合物胶囊型号和胶囊服用量

胶囊型号	装量 (g)	每次服用量 (粒)
0	0.45	3.54
1	0.37	4.31
2	0.28	5.70

当使用 1 号和 2 号胶囊时, 每次服用的胶囊数量都大于 4 粒; 为方便患者服用, 减少每次服用胶囊粒数, 所以胶囊型号定为 0 号, 每粒胶囊装填 0.42 g, 不足部分用填充剂补充。

2.6.3 填充剂的选择 加入常用填充剂: 淀粉、预胶化淀粉和糊精与辅料混合后, 均不易吸潮, 再比较混合物料流动性和胶囊的装量差异, 以确定填充剂的种类。方法: 取 73.9 g 原花青素磷脂复合物粉末, 加

入 5.54 g 微粉硅胶, 0.30 g 硬脂酸镁, 再分别加入 10.26 g 不同种类的填充剂(淀粉, 预胶化淀粉, 糊精), 使总量为 90 g。测定所得混合料的休止角, 同时将部分混合料进行胶囊填充, 规格为 0.45 g, 测定其装量差异。实验结果见表 7, 结果表明预胶化淀粉在休止角和胶囊的装量差异方面要明显好于淀粉和糊精。故采用预胶化淀粉作为本品的填充剂。

表 7 原花青素磷脂复合物填充剂选择试验

填充剂	休止角(°)	装量差异(%)
淀粉	43.6	±4.8
预胶化淀粉	39.2	±2.9
糊精	44.5	±5.7

2.6.4 润滑剂的确定 胶囊填充设备为活塞杆挤压式填充机, 按加入原花青素磷脂复合物 7.5% 的微粉硅胶、0.4% 硬脂酸镁与预胶化淀粉处方进行中试填充时, 发现有少量的胶囊出现挤压划破囊壳的情况。因此, 适当加大了硬脂酸镁的用量, 达到原花青素磷脂复合物量的 0.6%, 可顺利进行填充, 以适应大批量生产。

3 讨论

本研究制备了葡萄籽原花青素磷脂复合物, 并考察了原花青素 B₂ 的水中饱和溶解度的测定、正辛醇中饱和溶解度的测定、油水分配系数的测定, 表明葡萄籽原花青素制成磷脂复合物有望提高体内吸收率。在成型工艺中, 对原花青素磷脂复合物的相对临界湿度、流动性及黏性等进行考察, 并考察了制备

原花青素磷脂复合物胶囊剂的辅料, 为葡萄籽原花青素的制剂技术升级奠定基础。

【参考文献】

- [1] 周坦洋, 罗芙蓉, 白彬. 葡萄籽原花青素生物药理活性的研究进展[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2012, 46(1): 94-96.
- [2] 王忠合, 朱俊晨, 陈惠音. 葡萄籽原花青素提取物的保健功能与应用[J]. 食品科技, 2006, 4: 135-139.
- [3] 孙传范. 原花青素的研究进展[J]. 食品与机械, 2010, 26(4): 146-152.
- [4] 马中春. 葡萄籽原花青素的安全性毒理学评价及抗突变作用研究[D]. 吉林大学, 2005.
- [5] 孙芸, 徐宝才, 谷文英. 葡萄籽原花青素抗氧化作用的研究[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(6): 129-134.
- [6] 彭亮, 傅伟忠, 姚思宇, 等. 葡萄籽粉对自然衰老大鼠的抗氧化作用[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 10: 2376-2378.
- [7] 王亚东, 李立, 王海玉, 等. 葡萄籽提取物和大豆磷脂混合制剂对老龄大鼠的抗氧化作用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 9: 1887-1888.
- [8] 王喜泉, 孙树坤, 夏剑秋, 等. 大豆卵磷脂的功能特性及营养保健作用[J]. 大豆通报, 1999, 3: 27-28.
- [9] 蔡珺. 简述卵磷脂功能特性及其应用[J]. 黑龙江科技信息, 2011, 11: 19-20.
- [10] 李立. 大豆磷脂的药用价值[J]. 中国中医药杂志, 1994, 9: 570-572.
- [11] 莫凤奎, 朱澄云, 黄松鹤, 等. 维生素 E 和维生素 C 对大豆磷脂脂质体的抗氧化作用[J]. 中国药物化学杂志, 1997, 2: 46-49.
- [12] 荆海兰. 大豆磷脂的抗衰老作用[J]. 现代中西医结合杂志, 1998, 7(12): 2003.

[收稿日期] 2013-08-08 [修回日期] 2013-09-29

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 15 页)

- [29] Albert H, Santos S, Battaqlia E, et al. Differential expression of CDC25 phosphatases splice variants in human breast cancer cells [J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(10): 1707-1714.
- [30] Park H, Bahn YJ, Ryu SE. Structure-based *de novo* design and biochemical evaluation of novel Cdc25 phosphatase inhibitors [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19(15): 4330-4334.
- [31] Zhou DJ, Mei Q, Li JT, et al. Cyclophilin A and viral infections [J]. Bioch Biophys Res Comm, 2012, 424(4): 647-650.
- [32] Choi KJ, Piao YJ, Lim MJ, et al. Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia-and cisplatin-induced cell death [J]. Cancer Res, 2007, 67(8): 3654-3662.
- [33] Ni SS, Yuan YX, Huang J, et al. Discovering potent small molecule inhibitors of cyclophilin A using *de novo* drug design approach [J]. J Med Chem, 2009, 52(17): 5295-5298.
- [34] Wong C, Chen S. The development, application and limitations of breast cancer cell lines to study tamoxifen and aromataes inhib-

itor resistance [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012, 131(3-5): 83-92.

- [35] Gueto C, Torres J, Vivas-Reyes R. CoMFA, LeapFrog and blind docking studies on sulfonanilide derivatives acting as selective aromataes expression regulators [J]. Eur J Med Chem, 2009, 44(9): 3445-3451.
- [36] Su B, Diaz-Cruz ES, Landini S, et al. Novel sulfonanilide analogues suppress aromataes expression and activity in breast cancer cells independent of COX-2 inhibitor [J]. J Med Chem, 2006, 49(4): 1413-1419.
- [37] Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the B-raf gene in human cancer [J]. Nature, 2002, 417(6892): 949-954.
- [38] Gopalsamy A, Shi M, Hu Y, et al. B-raf kinase inhibitors: hit enrichment through scaffold hopping [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(8): 2431-2434.

[收稿日期] 2013-02-21 [修回日期] 2013-09-06

[本文编辑] 李睿旻