

柚皮苷-卵磷脂包合物的制备及其理化性质研究

许鹭¹, 蓝木香², 杨继国¹, 袁尔东¹, 宁正祥¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 嘉应学院, 广东梅州 514015)

摘要: 柚皮苷是一种天然抗氧化剂, 具有多种生物活性, 但是存在脂溶性差、口服吸收率低等问题。为了提高柚皮苷的脂溶性和生物利用度, 本研究制备了柚皮苷-卵磷脂包合物, 并采用紫外(UV), 红外(IR), 差示量热扫描(DSC), X-射线衍射(XRD)等波谱分析方法研究了该包合物的理化性质。研究表明, 柚皮苷与卵磷脂并没有形成一种新的化合物, 柚皮苷只是以一种无定形态分散在卵磷脂中, 二者是通过氢键、范德华力等非共价键形式相结合。同时对比了柚皮苷与柚皮苷-卵磷脂包合物中柚皮苷在正辛醇中的溶解性, 结果表明, 与卵磷脂形成包合物后, 柚皮苷在正辛醇中的溶解度由 3.28 $\mu\text{g/mL}$ 增加至 755.50 $\mu\text{g/mL}$, 脂溶性得到了显著提高; 亚油酸体系中抗氧化能力实验表明, 柚皮苷与卵磷脂的包合可以显著提高柚皮苷在脂溶性体系中的抗氧化能力。

关键词: 柚皮苷; 卵磷脂; 包合物; 脂溶性

文章编号: 1673-9078(2015)8-237-241

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.037

Preparation and Physicochemical Properties of the Naringin and Lecithin Complex

XU Lu¹, LAN Mu-xiang², YANG Ji-guo¹, YUAN Er-dong¹, NING Zheng-xiang¹

(1. College of Light Industry and Food, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. JiaYing University, Meizhou 514015, China)

Abstract: Naringin exhibits several bioactivities such as antioxidant activity, but it is poorly lipophilic and has low oral bioavailability, which limits its application. In order to improve solubility in lipid and its bioavailability, naringin was combined with lecithin to obtain a naringin-lecithin complex. The physicochemical properties of the complex were analyzed by ultraviolet-visible (UV) spectrometry, infrared (IR) spectrometry, differential scanning calorimetry (DSC), and X-ray diffractometry (XRD). It was found that the combination of naringin and lecithin did not form a new compound; rather they combine via non-covalent bond such as hydrogen bonds and Van der Waals force, where naringin is scattered in an amorphous state within lecithin. Meanwhile comparing the naringin solubility of native and naringin forms in n-octanol were compared, indicating that the solubility of naringin was significantly improved from 3.29 (native) to 755.50 $\mu\text{g/mL}$ (complex). The result of antioxidant activity tests of samples in a linoleic acid system showed that the antioxidant activity of naringin in oil could be significantly improved by complexing with lecithin.

Key words: naringin; lecithin; complex; lipophilicity

柚皮苷, 又称柑橘甙、异橙皮甙, 是一种二氢黄酮类物质, 广泛存在于芸香科植物中。近来的研究表明柚皮苷具有良好的天然抗氧化活性^[1], 在降低人体内胆固醇、降血压、抗炎、抗病毒等方面有显著作用^[2-6]。但它在食品和临床应用中却表现出明显的不足: 柚皮苷是极性化合物, 难溶于油脂, 且将其乳化后再加入到油脂中又会随着时间的延长而不断从油脂中析出, 将柚皮苷开发为保健食品或药品时, 其在生物膜

收稿日期: 2014-10-12

基金项目: 十二五科技支撑计划子课题(2012BAD33B11)

作者简介: 许鹭(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品化学

通讯作者: 杨继国(1977-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为食品生物化学

中通透性较差, 造成口服吸收率低, 这些都限制了柚皮苷的广泛应用。因此有必要研究提高柚皮苷脂溶性和利用度的方法, 为其开发和应用奠定基础。

卵磷脂具有两性分子结构, 含磷酸根及胆碱基的极性端具有亲水性, 两个较长的碳氢链非极性端具有亲脂性。磷脂包合物的研究由来已久, 并逐渐受到重视, 天然黄酮类物质对卵磷脂具有特殊的亲和力。含天然黄酮类物质丰富的保健食品和药物具有良好的营养价值和药理效应, 但由于其本身的理化性质如极性大、脂溶性差等缺陷造成其口服吸收率和生物利用度低, 或者对胃肠壁刺激性大, 不良反应多而限制了其在保健食品及临床上的应用。因此, 提高保健食品及药物中活性成分的体内吸收及其生物利用度是保健食

品和医药学领域重要而紧迫的研究方向。卵磷脂是一类含磷的类脂,卵磷脂中磷原子上羟基上氧原子有得电子倾向,氮原子有较强的失电子倾向。因此,在一定条件下可与一定结构的活性物质形成包合物。近年来,许多国内外文献报道,将活性物质与磷脂在一定条件下形成包合物,可明显增加活性物质的体内吸收,提高其生物利用率^[7-9]。活性成分卵磷脂包合物有着良好的开发研究前景,对于提高保健食品及天然药物的开发和利用,均具有重要的理论和实际意义。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1.1.1 材料

柚皮苷,阿拉丁试剂(上海)有限公司;卵磷脂,上海生工生物工程有限公司;四氢呋喃,天津市瑞金特化学品有限公司,分析纯;无水乙醇,天津市东丽区天大化学试剂厂,分析纯;无水甲醇,天津四友公司,色谱纯;正辛醇,天津市瑞金特化学品有限公司,分析纯。

1.1.2 仪器

电子天平,北京赛多利斯科学仪器有限公司;磁力加热搅拌器,常州国华电器有限公司;TU-1810 PC紫外-可见分光光度计,北京普析通用公司;TENSOR 27型红外光谱仪,德国Bruker公司;Q200差示量热扫描分析仪,美国TA公司;D8型X-射线衍射仪,德国Bruker公司;1260型高效液相色谱仪,美国Agilent公司。

1.2 方法

1.2.1 柚皮苷-卵磷脂包合物的制备^[10]

将400 mg柚皮苷和800 mg卵磷脂溶于约600 mL四氢呋喃中,在室温下磁力搅拌5 h,然后将溶液在80 ℃的水浴中使四氢呋喃挥发完全,冷却后收集淡黄色固体即为柚皮苷-卵磷脂包合物。

1.2.2 柚皮苷与卵磷脂物理混合物的制备

将柚皮苷和卵磷脂按1:2的比例充分研碎、混匀,制得柚皮苷与卵磷脂的物理混合物。

1.2.3 紫外分析

分别取柚皮苷、卵磷脂,柚皮苷-卵磷脂的物理混合物及包合物用甲醇溶解,在200~400 nm波长范围内进行紫外吸收波长的扫描。

1.2.4 红外分析

分别取适量柚皮苷、卵磷脂、柚皮苷-卵磷脂的物理混合物及包合物用KBr压片后进行红外扫描。

1.2.5 X-射线衍射分析

分别取适量柚皮苷、卵磷脂、柚皮苷-卵磷脂的物理混合物及包合物进行X-射线衍射,采用CuK α 靶,石墨单色器衍射单色化,衍射角扫描范围为50~80。

1.2.6 差示扫描量热分析

分别取适量柚皮苷、卵磷脂、柚皮苷-卵磷脂的物理混合物及包合物在氮气环境下进行差示量热扫描分析,升温速度10 ℃/min,扫描温度范围30~300 ℃,氮气流速20 mL/min。

1.2.7 柚皮苷包合物脂溶性的测定

以柚皮苷在正辛醇中的溶解性作为其脂溶性的指标。将过量的柚皮苷与柚皮苷-卵磷脂包合物分别加入到2 mL的正辛醇中,在25 ℃下振荡24 h,取上清液,采用高效液相色谱法测定其中柚皮苷含量,必要时用正辛醇做适当稀释。在高效液相色谱分析之前,所有样品经过0.45 μ m的微滤膜。进样量为5 μ L,检测波长为282 nm,色谱柱为Agilent公司的ZOR BAX SB-C18反相柱(4.6 \times 50 mm; 5 m)对样品进行分离,流动相为甲醇和水(7:3),流速为1.0 mL/min。外标法定量。

1.2.8 柚皮苷包合物在亚油酸体系中抗氧化能力的测定

亚油酸体系:0.28 g亚油酸、0.28 g吐温20、50 mL磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.0)相互混合,超声均质,制成亚油酸乳液。0.5 mL浓度为0.2 mg/mL的特丁基对苯二酚(TBHQ)、柚皮苷及柚皮苷-卵磷脂包合物的乙醇溶液与2.5 mL亚油酸乳液,2 mL磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.0)相混合,该反应液在37 ℃条件下黑暗处放置,加速氧化,每隔12 h考察一次亚油酸的氧化程度,以过氧化值表征。过氧化值采用硫氰酸盐比色法测定^[11]。

1.2.9 数据分析

所有实验均进行3次平行试验,采用Origin 8.0软件对实验数据分析处理,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与amp;讨论

2.1 紫外吸收光谱分析

紫外吸收光谱的原理是:当物质吸收紫外光后,其价电子从低能级向高能级跃迁,从而产生吸收峰。具有共轭结构的化合物,其 π 电子易于被激发发生跃迁,在紫外区能够产生特征吸收峰。因此,紫外吸收光谱法可以根据最大吸收峰的位置及强度判断其共轭体系的类型。如图1所示,柚皮苷在282 nm处有一个强烈吸收峰,这是由于柚皮苷具有共轭不饱和结构

所致；卵磷脂没有共轭结构，以致其在紫外区没有吸收峰出现；柚皮苷-卵磷脂包合物及其物理混合物在紫外图谱中没有显著差异，且它们均在 282 nm 处有一个强烈吸收峰，与柚皮苷一致。由此可知，柚皮苷与卵磷脂在形成包合物的过程中没有产生新的共轭结构，它们仅仅是通过非共价结合。

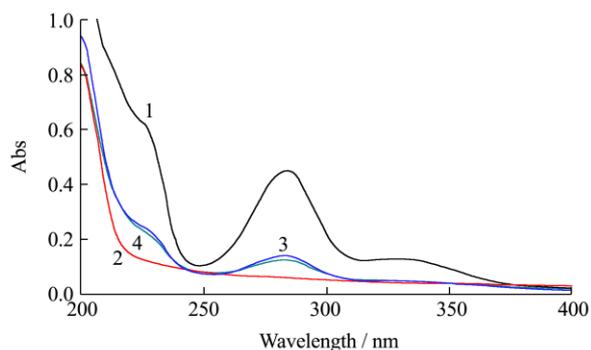


图 1 (1) 柚皮苷、(2) 卵磷脂、(3) 柚皮苷-卵磷脂包合物、(4) 柚皮苷-卵磷脂物理混合物的紫外图谱

Fig.1 UV spectrum of (1) naringin, (2) lecithin, (3) naringin-lecithin complex, (4) naringin-lecithin mixture

2.2 红外光谱分析

红外光谱是样品受到频率连续变化的红外光照射时，分子吸收与其自身内在振动频率相同的辐射，使振-转能级从基态跃迁到激发态，相应于这些区域的透射光强减弱，记录百分透过率 T% 对波数或波长的曲线。红外光谱能够提供许多关于化合物官能团的信息。由图 2 可以知道，在柚皮苷的红外图谱中，约 3422 cm⁻¹ 处代表的是羟基特征峰，随后分别是羰基 (1647 cm⁻¹) 和苯环 (1516 cm⁻¹、1286 cm⁻¹、1196 cm⁻¹) 的特征吸收峰。柚皮苷和卵磷脂的物理混合物与包合物的吸收光谱大致相同，柚皮苷和卵磷脂的特征吸收峰都可以在混合物和包合物的吸收光谱中找到，混合物和包合物的吸收光谱表现为柚皮苷和卵磷脂的吸收光谱的叠加。由此说明，柚皮苷和卵磷脂在形成包合物的过程中并没有形成新的共价键，柚皮苷和卵磷脂在包合物中仍然各自保留其基本的化学结构。

2.3 X-射线衍射分析

X-射线的原理：当一束 X 射线照射到晶体上时，首先被电子所散射，每个电子都是一个新的辐射波源，向空间辐射出与入射波同频率的电磁波。由于这些散射波之间的干涉作用，使得空间某些方向上的波始终保持相互叠加从而这些方向上的相位得到加强，而另一些方向上的波则互相是抵消，根据不同物质内部原子在空间分布的不同可以得到与其相对应的衍射现

象。

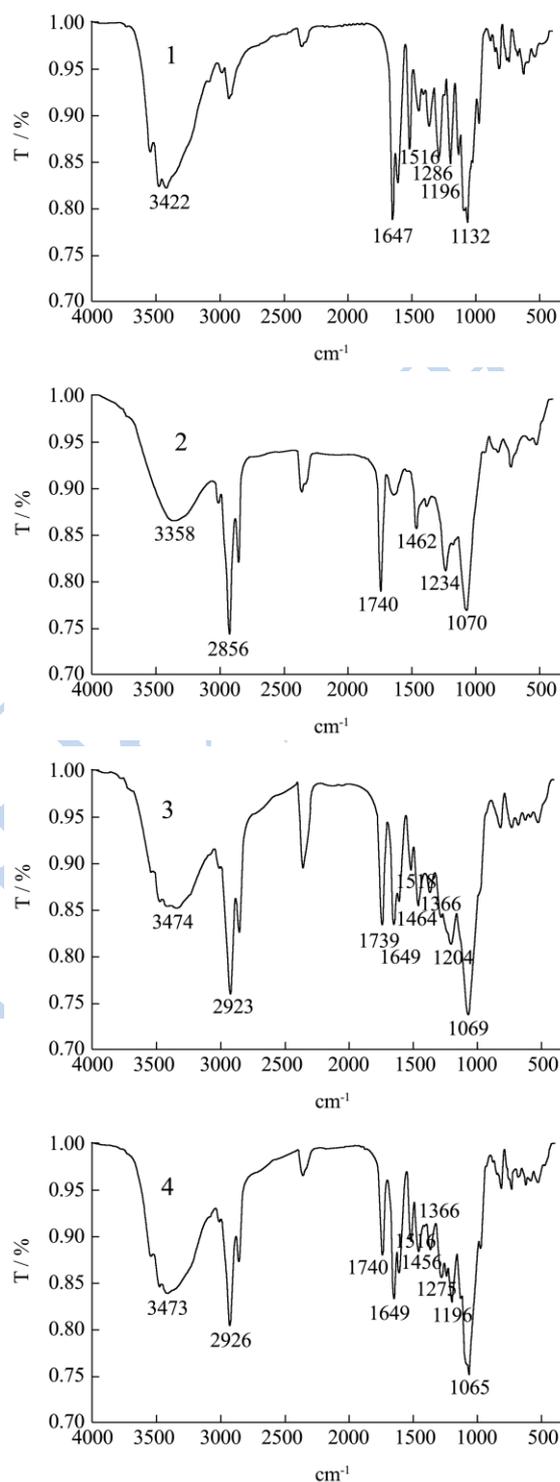


图 2 (1) 柚皮苷、(2) 卵磷脂、(3) 柚皮苷-卵磷脂包合物、(4) 柚皮苷-卵磷脂物理混合物的红外图谱

Fig.2 IR spectrum of (1) naringin, (2) lecithin, (3) naringin-lecithin complex, (4) naringin-lecithin mixture

由图 3 可知，柚皮苷具有尖锐的晶体衍射峰；而卵磷脂作为一种无定形物质存在，没有显示尖锐的晶体衍射峰；在两者的物理混合物中，仍然可以看到橙皮苷尖锐的衍射峰，但不及单纯橙皮苷的密集，表现

为二者衍射峰的叠加,但在包合物中却没有这样尖锐的衍射峰,这说明柚皮苷完全分散到卵磷脂中,与卵磷脂形成了一种无定形物质。

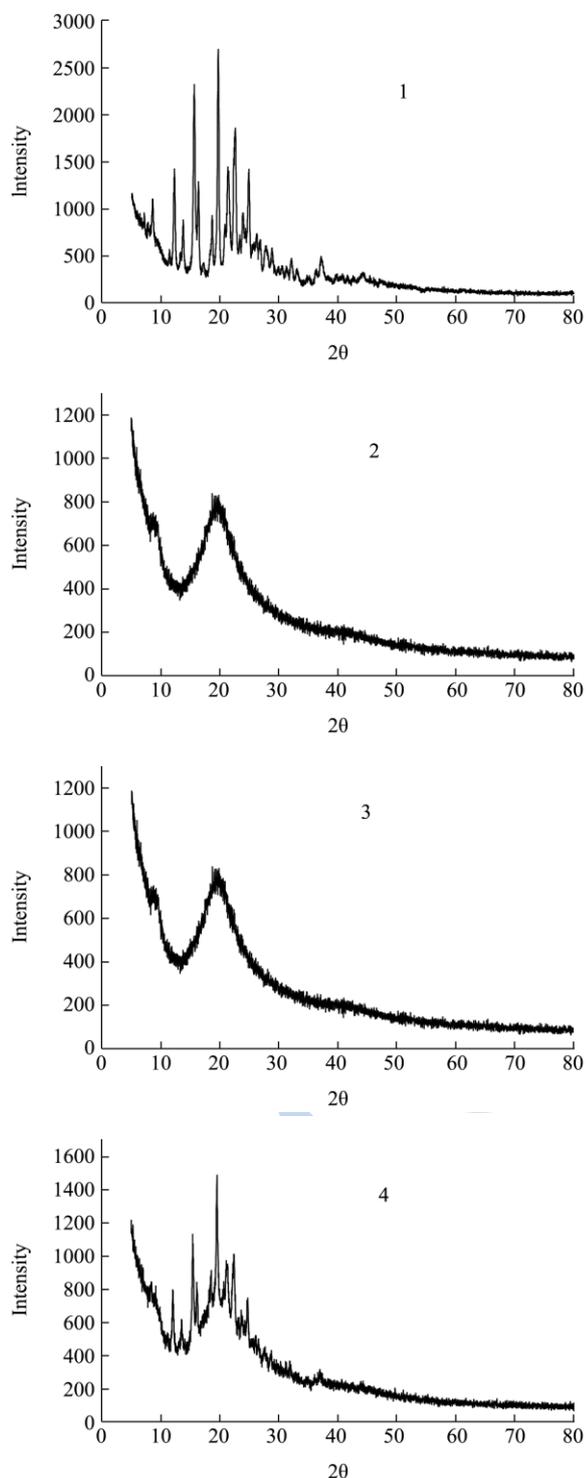


图3 (1)柚皮苷、(2)卵磷脂、(3)柚皮苷-卵磷脂包合物、(4)柚皮苷-卵磷脂物理混合物的X-衍射图

Fig.3 XRD patterns of (1) naringin, (2) lecithin, (3) naringin-lecithin complex, (4) naringin-lecithin mixture

2.4 差示扫描量热分析

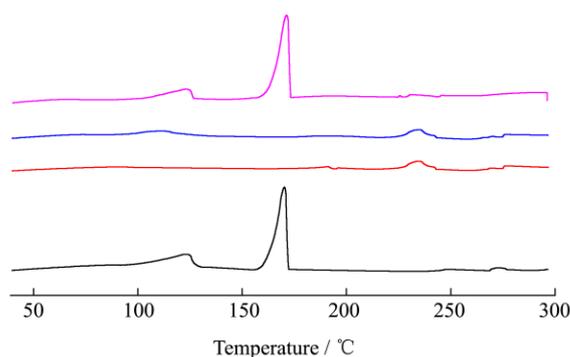


图4 (1)柚皮苷、(2)卵磷脂、(3)柚皮苷-卵磷脂包合物、(4)柚皮苷-卵磷脂物理混合物的差示扫描量热图

Fig.4 DSC curves of (1) naringin, (2) lecithin, (3) naringin-lecithin complex, (4) naringin-lecithin mixture

差示扫描量热法(DSC)原理是将待测样品与参比试样以一定的控制速度升降温时,根据两者的温度差讯号,由差动热功率补偿单元自动调节试样和参比样品的加热功率,使温度差恒为零,记录为抵消温度差所必须的补偿差动功率随时间和温度变化的值,从而提供物质定性和定量信息。如图4所示:柚皮苷在100℃到120℃之间一个吸收峰,可能是柚皮苷分子在加热中脱去水分子造成的,在171℃处具有一个强吸收峰,是由于柚皮苷熔化所造成的。卵磷脂在30℃到300℃间没有吸热峰。柚皮苷和卵磷脂物理混合物的DSC图谱,主要表现为柚皮苷和卵磷脂图谱的简单叠加。但在包合物中,柚皮苷的吸收热峰消失,主要表现为卵磷脂的特征。这表明橙皮苷已完全分散在卵磷脂中了,而且两者之间存在着氢键或范德华力等作用力。

2.5 柚皮苷及其包合物在正辛醇中的溶解性

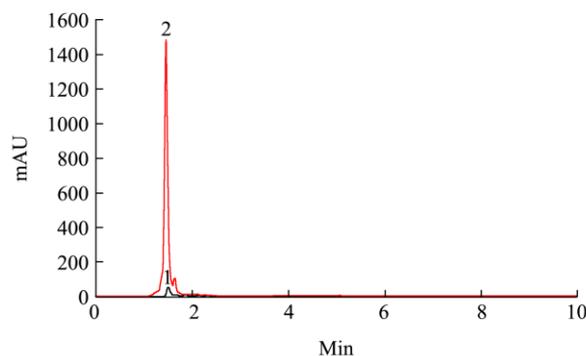


图5 (1)柚皮苷、(2)柚皮苷-卵磷脂包合物在正辛醇中溶解度比较

Fig.5 Solubility comparison of (1) naringin and (2) naringin-lecithin complex in n-octanol

柚皮苷是极性化合物,在油脂中的溶解性极低,而其与卵磷脂形成的包合物后在油脂中的溶解性可以

得到提高。图5是柚皮苷及其包合物中柚皮苷在正辛醇中溶解性的HPLC图。结果表明,柚皮苷在25℃正辛醇中的溶解度为3.39 μg/mL;而在柚皮苷与卵磷脂形成包合物后,柚皮苷在正辛醇中的溶解度增加至755.50 μg/mL,脂溶性得到了显著提高。

2.6 柚皮苷及其包合物在亚油酸体系中的抗氧化能力

亚油酸体系法可用于测定抗氧化物质在亲油体系中的抗氧化能力,本实验考察了柚皮苷及其包合物在亚油酸体系中的抗氧化能力,同时以抗氧化剂TBHQ为对照,实验结果如图6所示。

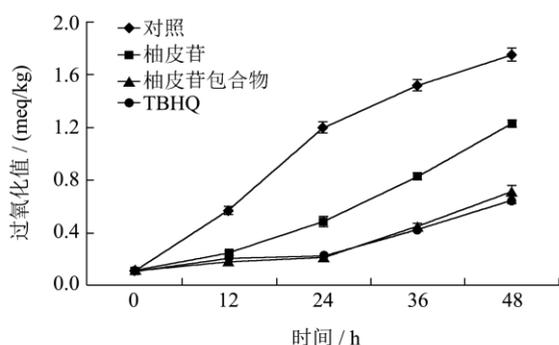


图6 不同样品在亚油酸体系中的抗氧化能力

Fig.6 Antioxidant activity of different samples in linoleic acid system

由图6结果可知,在所研究的条件下,柚皮苷-卵磷脂包合物的抗氧化能力与常用的抗氧化剂TBHQ比较相近,而高于柚皮苷,说明柚皮苷与卵磷脂的包合可以显著提高柚皮苷在脂溶性体系中的抗氧化能力。

3 结论

柚皮苷来源广泛,具有很好的生物药用活性,在保健食品和医药学领域有着广阔的应用前景,但同时也存在着口服吸收率和生物利用度低等问题。本文利用紫外、红外、X-衍射、差示扫描量热多种波谱学分析方法分析研究了柚皮苷与卵磷脂包合物的理化性质。结果表明,柚皮苷完全分散到卵磷脂中了,在包合物中以无定形态存在,与卵磷脂主要以氢键或范德华力等非共价作用力相结合。与此同时,在柚皮苷和与卵磷脂形成包合物后,柚皮苷在正辛醇中的溶解度由3.39 μg/mL增加至755.50 μg/mL,其脂溶性得到了显著提高,而且柚皮苷与卵磷脂的包合还可以显著提高柚皮苷在脂溶性体系中的抗氧化能力。

参考文献

- [1] Xu Haidong, Yu Cigang, Dai Yijun, et al. Hydroxylation of naringin by *Trichoderma harzianum* to dramatically improve its antioxidative activity [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 45(4): 282-287
- [2] Amit D Kandhare, Pinaki Ghosh, et al. Naringin, a flavanone glycoside, promotes angiogenesis and inhibits endothelial apoptosis through modulation of inflammatory and growth factor expression in diabetic foot ulcer in rats [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2014, 219(5): 101-112
- [3] Rocha Joao, Sepodes Bruno, Mota-Filipe, et al. Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2008, 52(2): 13-18
- [4] Rocha Joao, Vla-Real Helder, Eduardo-Figueira Maria, et al. Anti-inflammatory activity of naringin and the biosynthesised naringenin by naringinase immobilized in microstructured materials in a model of DSS-induced colitis in mice [J]. *Food Research International*, 2009, 42(8): 1010-1017
- [5] 丁红秀,高荫榆,郑渊月,等.毛竹叶柄类黄酮降血糖作用的研究[J].*食品科学*,2006,27(12):742-744
DING Hong-xiu, GAO Yin-yu, ZHEN Yuan-yue, et al. Study on the hypoglycemic effect of flavonoids from moso bamboo leaves [J]. *Food Science and Technology*, 2006, 27(12): 742-744
- [6] 李淑珍,李进.黑果枸杞叶黄酮降血脂作用[J].*时珍国医国药*,2012,23(5):1071-1074
LI Shu-zhen, LI Jin. Hypolipidemic activity of flavonoids from lycium ruthenicum murr [J]. *Lishizhen Medicine and Chinese Medicine*, 2012, 23(5): 1071-1074
- [7] Wang Dan, Li Haiyan, Gu Jingkai, et al. Ternary system of dihydroartemisinin with hydroxypropyl-β-cyclodextrin and lecithin: simultaneous enhancement of drug solubility and stability in aqueous solutions [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, 83: 141-148
- [8] 郝海军,张红芹,贾幼智,等.采用制剂新技术提高中药磷脂包合物的溶出度和生物利用度研究进展[J].*中草药*.2013, 44(17):2474-2479
HAO Hai-jun, ZHANG Hong-jin, JIA You-zhi, et al. Progress in research on enhancing dissolution and bioavailability of Chinese matria medica-phospholipid complex with new preparation techniques [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2013, 44(17): 2474-2479

- [9] 阮婧华,杨付梅,张金洁,等.槲皮素纳米结构脂质载体增加口服吸收机制的研究[J].中国药学杂志,2013,48(5):368-373
RUAN Jin-hua, YANG Fu-mei, ZHANG Jin-jie, et al. Enhancement of intestinal permeability of quercetin by nanostructured lipid carriers [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2013, 48(5): 368-373
- [10] Liu Benguo, Zhu Xiaoi, Zeng Jie et al. Preparation and physicochemical characterization of the supramolecular inclusion complex of naringin dihydrochalcone and hydroxypropyl- β -cyclodextrin [J]. Food Research International, 2013, 54(1): 691-696
- [11] GB/T 5009.37-2003 食用油卫生标准分析方法[S]
GB/T 5009.37-2003 Method for analysis of hygienic standard of edible oils [S]

现代食品科技