

· 工艺与制剂 ·

α -常春藤皂苷-羟丙基- β -环糊精包合物的制备及鉴定

饶涛¹, 李东勋², 何秀菊², 冯育林², 罗晓健^{1,2*}

(1. 江西中医学院, 南昌 330006; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 制备并鉴定 α -常春藤皂苷-羟丙基- β -环糊精包合物(BD-HP- β -CD)。方法: 采取饱和水溶液法制备 BD-HP- β -CD, 以包合物得率和包封率为指标, 通过正交试验考察温度、时间和搅拌速度对包合工艺的影响; 采用 X-射线衍射法(XRD)及差示扫描量热法(DSC)鉴定包合物物相, 相溶解度法考察 HP- β -CD 对 α -常春藤皂苷(BD)的增溶效果。结果: 最佳包合工艺为包合温度 37 °C, 搅拌速度 300 r·min⁻¹, 包合时间 2 h, 包合物平均得率 93.3%, 包封率 70.7%。BD-HP- β -CD 在 pH 8.5, 1.2, 6.8 介质中表观溶解度较 BD 分别约提高了 4, 60, 200 倍, XRD 和 DSC 中 BD 的特征峰消失证实包合物已形成。结论: HP- β -CD 对 BD 具有较好的增溶作用。

[关键词] α -常春藤皂苷; 羟丙基- β -环糊精; 包合物; 溶解度

[中图分类号] R283.6; R943 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)18-0001-04

[doi] 10.11653/syjf2013180001

Preparation and Identification of α -Hederagenin-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex

RAO Tao¹, LI Dong-xun², HE Xiu-ju², FENG Yu-lin², LUO Xiao-jian^{1,2*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare and identify α -hederagenin-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex (BD-HP- β -CD). **Method:** BD-HP- β -CD was prepared by saturated aqueous solution. With yield of inclusion complex and entrapment efficiency as indexes, effects of temperature, time and stirring speed on inclusion technology was investigated by orthogonal design. Phase of BD-HP- β -CD was characterized by X-ray diffractometry (XRD) and differential scanning calorimetry (DSC), solubilization effect of HP- β -CD to BD was investigated by phase solubility method. **Result:** Optimum inclusion technology was as following: inclusion temperature of 37 °C, stirring speed 300 r·min⁻¹, inclusion time 2 h. Average yield of inclusion complex was 93.3%, encapsulation efficiency was 70.7%, apparent solubility of BD-HP- β -CD compared to BD in pH 8.5, 1.2, 6.8 medium increased by about 4, 60, 200 times, disappearance of BD characteristic peak in XRD and DSC confirmed that inclusion has been formed. **Conclusion:** HP- β -CD could significantly improve solubility and dissolution of BD.

[Key words] α -hederagenin; hydroxypropyl- β -cyclodextrin; inclusion complex; solubility

[收稿日期] 20130207(008)

[基金项目] 国家“十二五重大新药创制”项目(2012zx09103201-008); 江西省科技支撑项目(201111BBG70005-2, 201211BBG70019); 江西省自然科学基金项目(20122BAB205032)

[第一作者] 饶涛, 硕士, 从事中药新剂型研究, Tel: 13677068520, E-mail: raotao98@126.com

[通讯作者] * 罗晓健, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药新剂型研究, Tel: 13879169286, E-mail: luoxj98@126.com

预知子为木通、三叶木通或白木通的干燥果实, 味苦, 性寒, 具有疏肝理气、活血止痛、散结、利尿的功效, 用于治疗腕肘腹痛、经痛闭经、痰核痞块、小便不利。现代药理研究发现预知子具有抗炎、抗肿瘤、抗血栓、利尿等作用^[1-2]。 α -常春藤皂苷(BD)为预知子总皂苷中主要成分, 具有抗肿瘤等多种药理活性^[3], 但水溶性和吸收较差。包合技术具有增加药物溶解度、掩盖药物异味、提高生物利用度、提高患者顺应性等优点^[4-6]。本实验采用饱和水溶液法制备 α -常春藤皂苷-羟丙基- β -环糊精包合物(BD-HP- β -CD), 运用 X-射线衍射法和差示扫描量热法对 BD-HP- β -CD 进行物相鉴定, 并考察其体外溶出及增溶效果, 为 BD 的开发利用提供参考。

1 材料

LC20A 型高效液相色谱仪、AUW-220D 型电子分析天平(日本岛津公司), 89HW-1 型磁力搅拌器(瑞士梅特勒-托利多公司), AL104-01 型电子天平(梅特勒-托利多公司), 8000 型差示扫描量热仪(美国 PerkinElmer 股份有限公司), Dmax2400 型 X 射线衍射仪(日本理学公司), PB-10 型 pH 酸度计(赛多利斯公司), TG16-WS 型台式高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司), SHZ-82 型气浴恒温振荡器(常州国华电器有限公司), 101-3-BS-II 型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂)。

α -常春藤皂苷原料(国家中药固体制剂工程研究中心), α -常春藤皂苷对照品(国家中药固体制剂工程研究中心, 纯度 98.5%, 批号 20110703), 羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD, 山东新大精细化工), 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为双蒸水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 BD 含量测定

2.1.1 检测波长的选择 称取一定量 HP- β -CD 和 BD 对照品, 用甲醇溶解, 以甲醇为空白, 于 200 ~ 400 nm 进行扫描, 结果显示 BD 在 203 nm 处有最大吸收, 而 HP- β -CD 在此处无吸收, 故选择检测波长 203 nm。

2.1.2 色谱条件 大连伊利特 Hypersil ODS 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流动相 1% 磷酸水溶液-乙腈(58:42), 流速 1 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 203 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L。

2.1.3 标准曲线的绘制 取 BD 对照品 25 mg, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解并定容, 得 1.0 g \cdot L⁻¹ 的 BD 对照品母液。分别精密量取母液 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 2 mL 置于 10 mL 量

瓶中, 加甲醇定容, 按 2.1.1 项下色谱条件进行测定, 以 BD 质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 4\ 143.4X - 1\ 999.9$ ($r = 0.999\ 9$), 表明 BD 在 0.02 ~ 2.00 μ g 与峰面积呈良好线性关系。

2.1.4 精密度试验 取高、中、低质量浓度的 BD 对照品溶液, 分别于日内、日间各重复进样 5 次, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 结果显示 BD 高、中、低质量浓度日内峰面积的 RSD 分别为 0.71%, 0.63%, 0.85%, 日间则依次为 0.73%, 0.62%, 0.91%。

2.1.5 加样回收率试验 取同一批次 BD-HP- β -CD 9 份, 配制 376.5 mg \cdot L⁻¹ 的供试品溶液, 分别精密量取 100 μ L 置于量瓶中, 分为 3 组, 各组依次加入 80, 100, 120 μ L 对照品溶液, 测定峰面积, 计算加样回收率, 结果 BD 平均加样回收率 99.6%, RSD 0.8%。

2.2 BD-HP- β -CD 的制备^[7-8] 采用饱和水溶液法制备。称取处方量 BD, 加适量乙醇溶解, 根据处方投料比称取 HP- β -CD, 加水溶解制成饱和水溶液, 在设定的搅拌温度和搅拌速度下, 将 BD 乙醇溶液缓慢滴加至 HP- β -CD 水溶液中, 滴加完毕后继续搅拌至规定时间, 静置 24 h, 过滤, 滤液减压干燥 12 h, 干燥物用适量乙醇快速冲洗, 烘干, 得 BD-HP- β -CD 包合物。选取包合时间、包合温度、搅拌速度为考察因素, 以包合物得率及药物包封率为指标, 每个因素选取 3 个水平, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3, 4。

包合物得率 = 包合物质量 / 总投入量 \times 100%;

包封率 = 包合物中 BD 质量 / BD 投入量 \times 100%

表 1 α -常春藤皂苷-羟丙基- β -环糊精包合物的包合工艺优选正交试验因素水平

水平	A 包合温度 / $^{\circ}$ C	B 包合时间 /h	C 搅拌速度 / $r \cdot \text{min}^{-1}$
1	25	0.5	60
2	37	2	180
3	50	4	300

由直观分析可知, 各因素对包合工艺的影响顺序为包合温度 > 搅拌速度 > 搅拌时间。各因素对包合物得率的影响均不显著, 但对包封率均具有显著影响, 最佳包合工艺为 $A_2B_2C_3$, 即包合温度 37 $^{\circ}$ C, 搅拌速度 300 $r \cdot \text{min}^{-1}$, 包合时间 2 h。按优选的包合工艺制备 3 批包合物, 结果包合物得率分别为 93.3%, 93.2%, 93.4%, 包封率为 70.6%, 70.5%, 71.1%, 表明该工艺重复性良好。

2.3 BD-HP- β -CD 的鉴定

2.3.1 X-射线粉末衍射法 Cu 靶,kA 线,管压 40 kV,管流 60 mA,扫描范围(2 θ) 5~65°,扫描速度 1°·min⁻¹。分别测定 BD,HP- β -CD,BD 和 HP- β -CD 物理混合物,BD-HP- β -CD 的 X-射线衍射图谱,见图 1,表明 BD-HP- β -CD 中 BD 的衍射峰明显消失,证明包合物已形成。

表 2 α -常春藤皂苷-羟丙基- β -环糊精包合物的包合工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D (空白)	得率 /%	包封率 /%
1	25	0.5	60	1	92.8	10.4
2	25	2	180	2	93.5	17.5
3	25	4	300	3	93.1	25.3
4	37	0.5	180	3	92.8	28.7
5	37	2	300	1	92.7	70.6
6	37	4	60	2	93.0	50.6
7	50	0.5	300	2	93.1	38.4
8	50	2	60	3	93.2	41.5
9	50	4	180	1	93.1	23.1
包合物得率	K_1	93.133	92.900	93.000	92.867	
	K_2	92.833	93.133	93.133	93.200	
	K_3	93.133	93.067	92.967	93.003	
	R	0.300	0.233	0.166	0.333	
包封率	K_1	17.733	25.833	34.167	34.700	
	K_2	49.967	43.200	23.100	35.500	
	K_3	34.333	33.000	44.767	31.833	
	R	32.234	17.367	21.667	3.667	

表 3 包合物得率方差分析

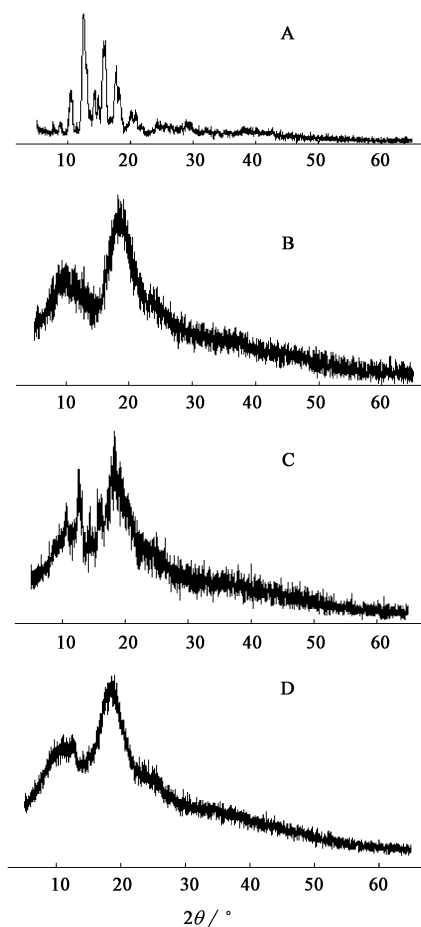
方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.180	2	0.090	1.080	>0.05
B	0.087	2	0.043	0.520	>0.05
C	0.047	2	0.023	0.280	>0.05
D(误差)	0.167	2	0.083	1.00	

注: $F_{0.05}(2,2)=19$ (表 4 同)。

表 4 包封率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	1 558.949	2	779.474	69.901	<0.05
B	457.002	2	228.501	20.491	<0.05
C	704.276	2	352.138	31.579	<0.05
D(误差)	22.302	2	11.151	1.00	

2.3.2 差示扫描量热分析(DSC) 升温范围 50~



A. BD; B. HP- β -CD; C. BD 和 HP- β -CD 物理混合物; D. BD-HP- β -CD

图 1 BD,HP- β -CD,物理混合物及包合物的 XRD

300 °C,升温速度 40 °C·min⁻¹,检测空气为氮气,对 BD,HP- β -CD,物理混合物及 BD-HP- β -CD 进行差示扫描量热分析,见图 2,结果显示物理混合物基本保留了 BD 与 HP- β -CD 的特征峰,而包合物图谱中 BD 的特征峰消失,证明包合物已形成。

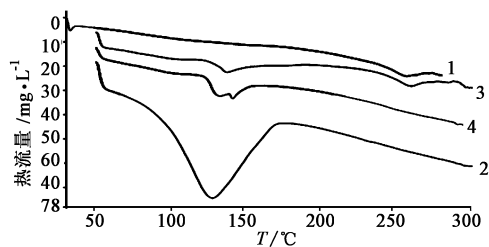


图 2 BD(1),HP- β -CD(2),物理混合物(3)及包合物(4)的 DSC

2.4 表观溶解度的测定 于 25 °C 分别制得 pH 1.2,6.8,8.5 含 BD 的过饱和水溶液,同样条件下制备含 BD-HP- β -CD 的过饱和水溶液,涡旋 1 h,震荡 72 h(240 r·min⁻¹),经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果含 BD 的溶解度分别为 19.63,22.52,1.01 $\times 10^3$ mg·L⁻¹,含 BD-HP- β -CD 的则分别为 1.33 $\times 10^3$,4.24 $\times 10^3$,4.31 $\times 10^3$ mg·L⁻¹。

表明 BD 的表观溶解度随 pH 的升高而增加,这可能与 BD 结构中带有羧基而显弱酸性有关;BD 形成包合物后,表观溶解度同样随着 pH 的升高而增加,但当 pH > 6.8 后,表观溶解度增加不明显,证明 BD 制成包合物后可明显改善表观溶解度。

2.5 溶出度的测定 取 BD 20 mg, BD 与 HP- β -CD 的物理混合物(含 BD 20 mg),3 批 BD-HP- β -CD 样品(含 BD 20 mg)制备成胶囊(1 号胶囊),分别平行制备 6 份,置于沉降篮中,以 PBS 缓冲液(pH 6.8) 1 L 为溶出介质,浆法(中国药典 2010 版第二部附录 XC 第二法),转速 50 r·min⁻¹,于 37 °C 进行溶出度测定,分别于 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min 取溶液 1 mL,经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,测定,绘制溶出曲线,见图 3。结果显示 BD 的溶出度较差,2 h 内释放率 < 20%;物理混合物较 BD 溶出曲线几乎未发生改变,说明 HP- β -CD 与 BD 的机械混合不能改善 BD 溶出度;BD 被 HP- β -CD 包合后,溶出率在 30 min 内 > 80%,溶出度显著提高。

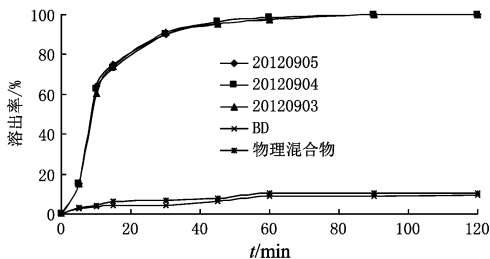


图 3 BD,物理混合物及 BD-HP- β -CD 溶出曲线

2.6 相溶解度考察 在 HP- β -CD 摩尔浓度分别为 0, 0.36, 0.71, 1.07, 1.43 mmol·L⁻¹ 的水溶液中各加入 BD 5 mg,于 25 °C 平衡 3 d,经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取滤液用甲醇适当稀释,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以 HP- β -CD 水溶液摩尔浓度为横坐标,BD 表观溶解度为纵坐标,绘制相溶解度图,进行线性回归,计算包合常数(Kc)。结果表明,随 HP- β -CD 摩尔浓度增加,BD 溶解度呈线性增加,相溶解度曲线为 AL 型,回归方程为 $Y = 0.0667X + 0.173$ ($R^2 = 0.972$),计算 $Kc = 454.7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,说明 HP- β -CD 可与 BD 牢固结合,并对 BD 具有较好的增溶作用,同时验证了 BD-HP- β -CD 的形成。

$$Kc = \text{斜率} / [\text{截距} (1 - \text{斜率})]$$

3 讨论

HP- β -CD 是一种无毒、刺激性小、溶血作用小的包合材料,相对其他普通的环糊精,具备可作为静脉注射辅料的优势^[9-11]。预试验分别考察了 α -CD,

β -CD, γ -CD,HP- β -CD,结果发现 HP- β -CD 效果最好。表面活性剂能提高难溶性药物表观溶解度,尝试考察了聚山梨酯-80、泊洛沙姆 188 对 BD 的增溶效果,发现二者将 BD 的表观溶解度由原来的 25.22 mg·L⁻¹ 分别提高到 40.14, 52.11 mg·L⁻¹,增溶效果并不明显^[12-14]。

[参考文献]

- [1] 高亚玲,张静,高秀玲,等. 预知子的化学成分、药理作用与临床应用研究[J]. 医药化工, 2011, 34(5):34.
- [2] 王家明,高慧敏,洪玉梅,等. 预知子 α -常春藤皂苷的 HPLC 分析[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(16):1212.
- [3] SHI J Z, LIU G T. Effect of alpha-hederin and sapindoside on hepatic microsomal cytochrome P-450 in mice[J]. Acta Pharmacol Sin, 1996, 17(3):264.
- [4] 宋洪涛,郭涛,赵明宏,等. β -环糊精包合物的理化性质考察[J]. 解放军药理学学报, 2002, 18(4):197.
- [5] 丁平田,吴雪梅. 药物制剂的新型辅料 2-羟丙基- β -环糊精[J]. 国外医药合成药, 1996, 17(2):107.
- [6] Lin H S, Chan S Y, Low K S, et al. Kinetic study of a 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin-based formulation of all-trans-retinoic acid in Sprague-Dawley rats after oral or intravenous administration [J]. J Pharm Sci, 2000, 89(2):260.
- [7] 张学农,苗爱东,周慧,等. 维生素 D3- β -环糊精包合物的理化性质及包合作用研究[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(11):742.
- [8] 刘治岐山,王鸣刚,薛明. 苯环壬酯- β -环糊精包合物的制备及评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15):22.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社, 2005:98.
- [10] 郭丽蓉,周莉玲. 冰片 β -环糊精、羟丙基- β -环糊精包合物的制备及稳定性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8):7.
- [11] 崔莉,张振海,孙娥,等. 柚皮苷-羟丙基- β -环糊精包合物酶解制备柚皮素工艺的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(3):310.
- [12] 林瑞来. 难溶性药物溶解度的提高方法[J]. 中国医药指南, 2010, 8(3):32.
- [13] 张海燕,马鸿雁,丛英,等. 聚山梨酸酯增溶作用在中药液体制剂中的适应性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19):322.
- [14] 周建平. 药剂学[M]. 北京:化学工业出版社, 2004:78.

[责任编辑 仝燕]