

# 异甘草素- $\beta$ -环糊精包合物的制备及增溶作用

郭丽娟, 元永波, 李慧, 刘利军\*

(宁夏大学化学化工学院, 银川 750021)

**[摘要]** 目的: 筛选制备异甘草素- $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)包合物的最佳制备条件, 以达到提高药物水溶性的目的。方法: 采用正交设计试验以包合率和收率为指标优化最佳工艺条件, 利用计算机模拟实验比较了不同包合方式和包合比的能量变化, 通过 IR 和 XRD 对包合物进行表征, 荧光光度法验证包合比。结果: 采用饱和水溶液法制备包合物, 最佳包合条件为异甘草素和  $\beta$ -CD 的摩尔比 1:2, 包合时间 5 h, 温度 60 °C。包合率 >98%, 可能的包合方式为异甘草素的 A 环进入  $\beta$ -CD 的大口端, B 环进入  $\beta$ -CD 的小口端。结论: 异甘草素制成  $\beta$ -CD 包合物可以达到提高药物水溶性的目的。

**[关键词]** 异甘草素;  $\beta$ -环糊精; 包合物; 正交实验; 增溶

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0018-04

## Preparation and Solubilization of Isoliquiritigenin- $\beta$ -cyclodextrin Inclusion

GUO Li-juan, YUAN Yong-bo, LI Hui, LIU Li-jun\*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**[Abstract]** **Objective:** Selected optimum preparation condition of isoliquiritigenin  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) inclusion, in order to improve solubility of water-soluble drugs. **Method:** Preparation technology was optimized by orthogonal test with inclusion ratio and yield as indexes, energy change of different inclusion mode and inclusion ratio was compared by computer simulation experiment, inclusion was identified by IR and XRD power diffraction, and inclusion ratio was tested by fluorometry. **Result:** Inclusion was prepared by saturated aqueous solution method. Optimum inclusion condition was: molar ratio of isoliquiritigenin to  $\beta$ -CD 1:2, inclusion time 5 h, temperature 60 °C. Inclusion efficiency could exceed 98%, possible inclusion approach was: A ring of isoliquiritigenin was external to larger side of  $\beta$ -CD, B ring of isoliquiritigenin was external to smaller side of  $\beta$ -CD. **Conclusion:** This result showed that water solubility was obviously increased of inclusion.

**[Key words]** isoliquiritigenin (ISL);  $\beta$ -cyclodextrin; inclusion; orthogonal test; solubilization

异甘草素是存在于甘草和其他植物中的羟基查尔酮类化合物, 具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等较为广泛的药理活性, 并对心脏和脑有保护作用<sup>[1]</sup>, 近年来备受关注。由于其在甘草中含量低且水溶性较差, 在一定程度上影响了它的研究与应用。 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)能与客体分子形成包合物, 并通过超分子结合作用增加低分子药物的水溶性和稳定性, 提高

生物利用度<sup>[2-3]</sup>。本研究按文献方法合成了异甘草素<sup>[4]</sup>, 用正交试验法对饱和水溶液法制备工艺进行优化, 利用计算机模拟实验计算包合方式和包合比, 通过 IR 和 XRD 表征包合物的形成, 荧光光度法验证了包合比。

### 1 仪器与试剂

TU-1810 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), DF-101Z 型集热式恒温加热搅拌器(郑州长城科工贸有限公司), KQ5200DE 型数据超声波(昆山市超声仪器有限公司), FTIR-8400S 型红外光谱仪, X-4 型数字显示显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司), AM-400MH 型核磁共振仪 DMSO- $d_6$  做溶剂, TMS 为内标, D/MAX2200PC 型 X-射线衍射仪(日本理学公司), F-4600 FL 型荧

**[收稿日期]** 20110414(010)

**[基金项目]** 宁夏科技攻关项目(10GG018)

**[第一作者]** 郭丽娟, 硕士研究生, 从事天然药物合成及分析, Tel: 0951-2062366

**[通讯作者]** \* 刘利军, 教授, 博士, 从事天然药物合成及分析, Tel: 0951-2062366, E-mail: ljliu@nxu.edu.cn

光分光光度计(日本 Hitachi 公司)。三羟甲基氨基甲烷(Tris)、 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD,上海晶片试剂有限公司),其余所有试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 异甘草素的合成** 按文献合成方法<sup>[4]</sup>,得到黄色异甘草素晶体。mp 194 ~ 195 °C; IR (KBr) (max: 3 381, 1 631, 1 604, 1 512, 1 225, 1 215, 1 144, 1 031, 973 cm<sup>-1</sup>); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 13.60 (1H, s, OH-2'), 10.66 (1H, s, OH-4'), 10.14 (1H, s, OH-4), 8.15 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-6'), 7.74 (4H, m, H- $\alpha$ , H- $\beta$ , H-2, 6), 6.84 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-3, 5), 6.39 (1H, dd,  $J$  = 8.4, 2.4 Hz, H-5'), 6.27 (1H, d,  $J$  = 2.4 Hz, H-3'),与文献值一致<sup>[5]</sup>。

**2.2 包合物的制备** 采用饱和水溶液法<sup>[6]</sup>。将 0.726 g  $\beta$ -CD 溶于 13 mL 蒸馏水中,精密称取异甘草素 0.164 g 用 6 mL 无水乙醇溶解后,搅拌下,缓缓滴到  $\beta$ -CD 水溶液中,TLC 跟踪,恒温水浴 60 °C 搅拌 6 h,冷却至室温,冷藏 24 h,抽滤,干燥,得淡黄色包合物粉末。

### 2.3 包合物药物含量的测定

**2.3.1 紫外检测波长的选择** 精密称取异甘草素 20 mg,置 100 mL 量瓶中,用乙醇溶解并定容即得 0.2 g·L<sup>-1</sup> 对照品储备液。精密吸取 1.00 mL 标准储备液置 25.00 mL 量瓶中,乙醇定容,以乙醇为空白对照,进行紫外扫描,结果显示,该化合物在 375 nm 波长处有一吸收峰, $\beta$ -CD 在此波长无干扰,确定 375 nm 为化合物的检测波长。

**2.3.2 标准曲线的建立** 配制系列异甘草素标准溶液,用紫外分光光度计在 375 nm 波长处测其吸光度( $A$ ),以质量浓度( $C$ )为横坐标, $A$  为纵坐标进行线性回归, $A = 0.0833C - 0.047$  ( $r = 0.9998$ )。

**2.3.3 精密度** 分别精密吸取一定量的标准溶液,制成 2,6,10 mg·L<sup>-1</sup> 3 个质量浓度的样品,分别测定日内及日间精密度。测得日内精密度 RSD 分别为 0.22%,1.53%,0.89%,日间精密度 RSD 分别为 0.08%,1.78%,0.98%。

**2.3.4 加样回收率** 精密称取异甘草素包合物 25 mg,置 25 mL 量瓶中,加入 15 mL 乙醇超声 30 min,用水定容至刻度,摇匀。精密吸取 2.5 mL 置 50 mL 量瓶中,分别加入标准储备液 1.0,1.25,1.5 mL,每个平行 3 份,水定容至刻度。按 2.3.2 方法测定吸光度( $A$ )。计算异甘草素的平均回收率为 103.6%,RSD 1.02%。

## 2.4 包合工艺的优化

**2.4.1 包合率及产率的测定** 精密称取异甘草素包合物 50 mg,置 50 mL 量瓶中,加入乙醇 20 mL,超声 10 min,冷却至室温,乙醇定容,离心 20 min。吸取上清液 0.5 mL 于 25 mL 量瓶中,定容,紫外测吸光度,代入回归方程,包合率和收率计算如下<sup>[7-8]</sup>:

$$\text{包合率} = (\text{包合物中异甘草素的质量分数} \times \text{包合物质量} / \text{异甘草素投入量}) \times 100\%$$

$$\text{收率} = \text{包合物质量} / (\beta\text{-CD 投入量} + \text{异甘草素投入量}) \times 100\%$$

**2.4.2 正交设计试验** 采用正交试验设计对饱和水溶液法制备条件进行优选。选择包合温度( $A$ )、包合时间( $B$ )、异甘草素与  $\beta$ -CD 的摩尔比( $C$ ) 3 个影响包合率和收率的主要因素,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验方法进行实验,因素水平设计见表 1。

表 1 异甘草素- $\beta$ -环糊精包合工艺正交试验因素水平

水平	A 包合温度/°C	B 包合时间/h	C M <sub>异甘草素</sub> :M <sub><math>\beta</math>-CD</sub>
1	50	4	1:1
2	60	5	1:2
3	70	6	1:3

**2.4.3 正交试验结果及数据分析** 正交实验安排及结果见表 2,方差分析结果见表 3。

表 2 异甘草素- $\beta$ -环糊精包合工艺正交实验安排及结果

No.	A	B	C	收率/%	包合率/%
1	50	4	1:1	37.92	9.76
2	50	5	1:2	41.14	72.27
3	50	6	1:3	63.30	65.14
4	60	4	1:2	86.17	92.75
5	60	5	1:3	75.33	73.01
6	60	6	1:1	68.88	87.05
7	70	4	1:3	78.78	87.83
8	70	5	1:1	79.53	68.13
9	70	6	1:2	83.64	60.85
包合率/%					
K <sub>1</sub>	49.057	63.447	54.980		
K <sub>2</sub>	84.270	71.137	75.290		
K <sub>3</sub>	72.270	71.013	75.327		
R	35.213	7.690 0	20.347		
收率/%					
K <sub>1</sub>	47.453	67.623	62.110		
K <sub>2</sub>	76.793	65.333	70.317		
K <sub>3</sub>	80.650	71.940	72.470		
R	33.197	6.607 0	10.360		

从表 2 极差  $R$  值可知,对于包合率及收率 2 个指标的影响,因素影响大小依次为  $A > C > B$ ,表 3 方差分析结果表明包合温度对包合物收率有显著性

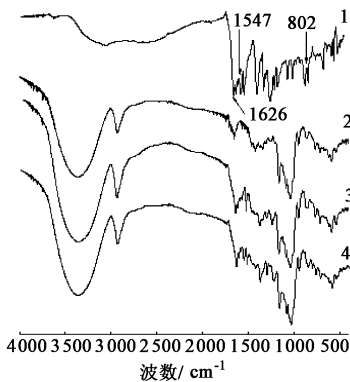
表 3 异甘草素-β-环糊精包合工艺方差分析

指标	因素	SS	f	F	P
包合率	A	1 922. 838	2	16. 518	>0. 05
	B	116. 406	2	1. 000	>0. 05
	C	826. 484	2	7. 100	>0. 05
收率	A	1977. 728	2	29. 288	<0. 05
	B	67. 526	2	1. 000	>0. 05
	C	179. 316	2	2. 656	>0. 05

差异,对包合率没有显著性差异。对 A 因素分析可知, A<sub>2</sub> 是对于包合率最优的因素, A<sub>3</sub> 是对于收率最优的因素,而收率是反映包合物的实际产率,包合率是考察药物被包合程度的重要指标<sup>[9]</sup>,故综合以上数据得出最佳包合条件为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>。最佳包合工艺条件下,包合率可达 98. 69%,产率可达 90. 52%。

**2.5 β-CD 包合物的表征** 待测样品: 异甘草素原料药粉末、β-CD 原料、异甘草素-β-CD 按摩尔比 1:2 的物理混合物以及包合物进行鉴定。

**2.5.1 傅立叶红外光谱法 (IR)** 测试条件 2 mg 样品用 700 mg KBr 制片。扫描范围 400 ~ 4 000 cm<sup>-1</sup>,结果见图 1。



1. 异甘草素; 2. β-CD; 3. 包合物; 4. 物理混合物(图 2 同)

图 1 异甘草素-β-CD 包合物 IR

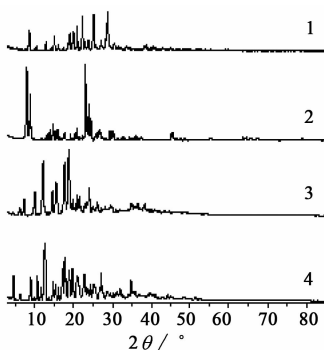


图 2 异甘草素-β-CD 包合物 XRD

从 IR 图谱中得知, 异甘草素在 1 545 cm<sup>-1</sup> 处为

芳环上的 C=C 骨架振动的特征吸收峰, 802 cm<sup>-1</sup> 处为芳环上 C-H 面外弯曲振动的特征吸收峰, 包合物中全部消失, 并且在 1 626 cm<sup>-1</sup> 处的羰基吸收峰在包合物中减弱。说明异甘草素与 β-CD 形成了包合物<sup>[10-11]</sup>。

**2.5.2 X-射线粉末衍射法 (XRD)** 测试条件: Cu 靶, 管电压 40 kV, 管电流 30 mA, 扫描范围 2θ 3 ~ 158°, 扫描速度 8° min<sup>-1</sup>。结果见图 2。

从 XRD 图谱中看出, 包合物在 2θ = 18. 84, 12. 20, 17. 70, 15. 56° 等处形成了新的特征衍射峰, 未出现异甘草素在 2θ = 28. 80, 25. 14, 22. 32, 8. 62° 等处的晶体衍射峰, 物理混合物表现为异甘草素和 β-CD 衍射峰的叠加, 表明异甘草素与 β-CD 形成了一种新的物相<sup>[12]</sup>。

**2.5.3 计算机模拟试验** 采用 Gaussian 03<sup>[13]</sup> 量子化学计算程序采用半经验 AM1 方法模拟计算了异甘草素两端的 -OH 分别从 β-CD 空腔大口端进入和小口端进入过程中的能量变化, 建立了 β-CD 与异甘草素不同摩尔配比的分子结构模型, 结果表明异甘草素与 β-CD 摩尔比为 1:2 的包合物更稳定。可能包合方式为异甘草素的 A 环进入 β-CD 的大口端, B 环进入 β-CD 的小口端, 结合能为 -145. 01 kJ·mol<sup>-1</sup>。

**2.6 验证试验**

**2.6.1 用荧光法验证包合比** pH 7. 4 的 Tris-HCl 缓冲溶液 (0. 05 mol·L<sup>-1</sup> Tris 与 0. 15 mol·L<sup>-1</sup> HCl 混合内含 0. 50 mol·L<sup>-1</sup> NaCl), 用 1: 100 的乙醇/Tris-HCl 缓冲溶液配置 5. 0 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup> 的异甘草素储备液, 用 Tris-HCl 缓冲溶液配置 0. 01 mol·L<sup>-1</sup> 的 β-CD 储备液。在 5. 0 × 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup> 的异甘草素的 pH 7. 4 Tris-HCl 的缓冲溶液中, 分别加入适量的 β-CD, 定容。在温度为 25 °C 的条件下, 放置反应 1 h。以 320 nm 为激发波长, 测量 345 ~ 390 nm 的荧光强度。随 β-CD 浓度的增大, 异甘草素的荧光强度随之逐渐增加。根据 Benesi-Hildebrand 双倒数方程<sup>[14]</sup>:

$$1/(P_0 - P_n) = 1/K_n(P_n - P_0) \times 1/[\beta\text{-CD}]^n + 1/P_n - P_0 \quad (1)$$

式中 P<sub>0</sub> 和 P<sub>n</sub> 是加入 β-CD 前后的荧光强度, 1:n (客体: 主体) 包合物, K<sub>n</sub> 是 1:n (客体: 主体) 包合物的包合常数。测得不同 [β-CD] 下所对应的 P<sub>n</sub> 值, 并以 1/P<sub>0</sub> - P<sub>n</sub> 对 1/[β-CD]<sup>n</sup> 作图, 结果见图 4。从图可见, 当 n=2 时等式 1 为直线, 线性关系 r=0. 997, 表明主客体包合比为 1:2<sup>[11]</sup>。从所得直线的斜率

和截距可求得  $K_n$  值为  $18.175 \times 10^4$ , 根据  $\Delta G^\theta = -RT \ln K^{[12]}$  得标准自由能为  $-30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), 说明异甘草素和  $\beta$ -CD 包合反应能自发进行, 以上分析充分说明异甘草素和  $\beta$ -CD 形成 1:2 的包合物<sup>[14]</sup>。

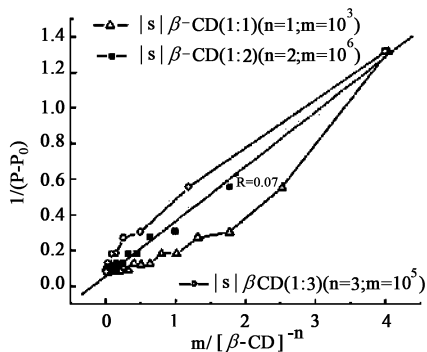


图3  $\beta$ -CD 存在下异甘草素  $1/P_0 - P_n$  对  $m/[\beta\text{-CD}]^n$  的双倒数曲线

**2.6.2 异甘草素溶解度的测定<sup>[15]</sup>** 取过量异甘草素包合物、异甘草素分别加入 10 mL 量瓶中, 加入水 7 mL 左右, 超声 30 min, 冷却至室温, 定容, 过滤, 精密吸取上清液 0.5 mL 置于 50 mL 量瓶中, 定容。紫外测吸光度, 代入回归方程, 得异甘草素饱和水溶液的溶解度为  $0.3025 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 异甘草素包合物饱和水溶液的溶解度为  $4.92 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 3 结论

本实验采用饱和水溶液法制备异甘草素包合物, 以包合率和收率为指标, 通过正交试验, 确定出包合最佳制备工艺为包合温度  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , 异甘草素- $\beta$ -CD 摩尔比 1:2, 包合时间 5 h。IR 和 XRD 表征确定异甘草素- $\beta$ -CD 包合物已形成。荧光法验证异甘草素与  $\beta$ -CD 摩尔比为 1:2, 与正交实验和计算机模拟实验得出的结论一致。异甘草素制成  $\beta$ -CD 包合物后其水溶性增加了 16 倍。该研究为异甘草素的研究与开发提供了科学依据。

### [参考文献]

[1] 李德芳, 王振华, 罗锋, 等. 异甘草素的药理作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 362.  
[2] 王建华, 黄真. 药物超分子  $\beta$ -环糊精不同位置选择性取代研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(7): 485.

[3] RAMIREZ H L, VALDIVI A A, CAO R, et al. Cyclodextrin-grafted polysaccharides as supramolecular carrier systems for naproxen [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(6): 1499.  
[4] Yuan Y B, Li S J, Liu L J. Characterization of interaction between synthetic isoliquiritigenin and bovine serum albumin by fluorescence quenching [J]. Chin J Nat Med, 2010, 8(5): 338.  
[5] 陈屏, 杨峻山. 小叶云实化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(24): 1852.  
[6] 武雪芬, 郑晓珂, 姚宏建, 等. 丹皮酚包合物的热稳定性考察和形成常数测定 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(7): 501.  
[7] 简晖, 高丽丽, 孙婷婷. 正交设计实验优化丹皮酚 HP- $\beta$ -CD 包合物制备工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(12): 37.  
[8] 张梨, 谭群友, 陈亮, 等. 溴吡斯的明- $\beta$ -环糊精包合物的研制 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(6): 466.  
[9] 齐腊梅. 小檗碱- $\beta$ -环糊精包合物的制备工艺研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3): 8.  
[10] Hai T B, Jing W C, Xi Y C, et al. Inclusion complex of butachlor with  $\beta$ -cyclodextrin: characterization, solubility, and speciation-dependent adsorption [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(16): 7453.  
[11] Bo T, Xu W, Hui L L, et al. Study on the supramolecular interaction of thiabendazole and  $\beta$ -cyclodextrin by spectrophotometry and its analytical application [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(22): 8452.  
[12] Revital C, Yevgenia O, Marina K, et al. Structural and functional properties of amylose complexes with genistein [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(11): 4212.  
[13] Frisch M J, Trucks G M, Schlegel H B, et al. Gaussian 03 [M]. Revision B 04. Pittsburgh: Gaussian Inc Pittsburgh PA, 2003.  
[14] Yi L C, Jun T L, Zhu X X. Fluorescence study of inclusion complexes between and polycyclic aromatic fluorescent probes and the size effects of host and guest star-shaped cholic acid derivatives molecules [J]. J Phys Chem B, 2008, 112(11): 3402.  
[15] 张玉叶, 张晓乐. 酮康唑  $\beta$ -环糊精包合物的制备 [J]. 中国药学杂志, 2001, 36(10): 677.

[责任编辑 全燕]