

大黄酚与甲基化- β -环糊精的超分子包合和体外释放特性研究

吴振¹,李红^{2,3},陈岗¹,师萱¹,谭红军^{1*}

¹重庆市中药研究院,重庆 400065;²重庆市食品药品检验所,重庆 401121;³重庆市计量质量检测研究院 重庆市食品安全工程技术中心 国家农副加工产品及调味品质量监督检验中心,重庆 401123

摘要:为提高大黄酚(Chr)的水溶性,采用电磁搅拌-喷雾干燥法(ES)制备 Chr-甲基化- β -环糊精(M- β -CD)包合物,通过相溶解度、体外释放特性等实验考察 Chr 包合前后的溶解、释放特性。结果发现:不同温度下 Chr 的相溶解度图均呈现出 A_L 型特点,在 25、35 和 45 °C 条件下 Chr 与 M- β -CD 包合过程的超分子包合常数分别为 6.56×10^2 、 7.85×10^2 、 1.09×10^3 L/mol;包合过程的 ΔH^0 为 20.09 kJ/mol; ΔS^0 为 121.11 J/(mol·K); ΔG^0 分别为 -16.01、-17.21、-18.42 kJ/mol;Job's 测定显示 Chr 与 M- β -CD 可自发形成摩尔比为 1:1 的包合物;形成的超分子包合物均有较好的增溶作用,整个包合过程体现为熵驱动过程。体外释放实验表明:ES 法制备的包合物的累积释放率明显优于 Chr 原药和 Chr 与 M- β -CD 的物理混合物。Chr-M- β -CD 包合物理化性质及体外释药性能良好,有望成为理想的 Chr 给药系统。

关键词: 大黄酚;甲基化- β -环糊精;超分子包合;体外释放特性

中图分类号:R932;TS201.2

文献标识码:A

Supramolecular Inclusion Property of Methylated- β -cyclodextrin with Chrysophanol and Its *in vitro* Release Behavior

WU Zhen¹, LI Hong^{2,3}, CHEN Gang¹, SHI Xuan¹, TAN Hong-jun^{1*}

¹Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; ²Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China; ³Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection, Chongqing Engineering Research Center of Food Safety, China National Quality Supervision & Inspection Center for Processed Agricultural Products and Condiments, Chongqing 401123, China

Abstract: To improve the solubility of chrysophanol (Chr), the inclusion complex of Chr-methylated- β -cyclodextrin (M- β -CD) prepared by electromagnetic stirring and spray drying methods (ES) and its supramolecular inclusion property and *in vitro* release behavior were investigated. Under different temperatures, phase solubility diagrams showed the characteristics of A_L type. Under the temperatures of 25, 35, and 45 °C, the supramolecular inclusion constants were 6.56×10^2 , 7.85×10^2 and 1.09×10^3 L/mol, respectively. For thermodynamic parameters determination, $\Delta H^0 = 20.09$ kJ/mol; $\Delta S^0 = 121.11$ J/(mol·K); $\Delta G^0 = -16.01, -17.21$ and -18.42 kJ/mol. The supramolecular complex of M- β -CD with Chr can be formed spontaneously in 1:1 molar ratio. The whole inclusion process was characterized by the entropy driven process. The cumulative release rate of Chr-M- β -CD complex was significant higher than Chr alone and their physical mixture. Chr-M- β -CD complex were sound in physicochemical and release property. It was simple to prepare and can be used as ideal drug delivery system for Chr.

Key words: chrysophanol; methylated- β -cyclodextrin; supramolecular inclusion; *in vitro* release behavior

大黄酚(chrysophanol, Chr),是大黄、虎杖、何首乌、决明子等中药中提取的一种蒽醌类活性成分,化学名为 1,8-二羟基-3-甲基蒽醌(图 1),具有抗菌、

缩短血液凝固时间、兴奋神经、麻痹肌肉、止咳、利尿、抗癌作用。近年来研究表明,大黄酚能延缓衰老,能清除氧自由基,增强抗氧化能力和改善学习记忆障碍等作用^[1]。但大黄酚具有味苦、对胃有刺激性,难溶于水、理化性质不稳定,见光易氧化等不利因素^[2],因而没有适宜的剂型供临床应用。因此,提高该类小分子生物活性成分的溶解度(增溶)对

收稿日期:2014-2-18

接受日期:2014-05-16

基金项目:重庆市卫生局中医药科研课题项目(ZY20132075);重庆市科委资助项目(cstc2012pt-kyys10001; cstc2012pt-kyys10004)

* 通讯作者 Tel:86-23-89029055; E-mail:thj-1973@163.com

其在医药中的广泛使用和生物功能发挥具有非常重要的意义。

近年来发现,超分子包合技术是提高难溶性非极性分子药物溶解性的有效途径之一。超分子包合技术应用的包合材料主要集中在环糊精、冠醚、杯芳烃、多聚糖等^[3],其中经过选择性修饰的环糊精——甲基化- β -环糊精(M- β -CD),水溶性好,在有机溶剂中也表现出良好的溶解性,因此成为提高药物溶解性的方法之一^[4]。为此本实验采用电磁搅拌-喷雾干燥法(ES)制备 Chr-M- β -CD 包合物制剂,旨在提高其溶解度和稳定性,掩盖不良气味,减少其对胃的刺激性,同时,对其包合过程的热力学参数和体外释放特性进行研究,为大黄酚的应用提供更好的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大黄酚标准品(Chr, HPLC $\geq 98\%$, 南京奥多福尼生物科技有限公司); 2,6-甲基化- β -环糊精(M- β -CD, 平均取代度 10.12, 山东滨州智源生物科技有限公司); 其它化学试剂均为国产分析纯; 所用水为双蒸水, 所用溶液均自行配制。

高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); PHS-3C 酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司); SD-1500 实验型喷雾干燥机(上海沃迪科技有限公司); R-124 旋转蒸发仪(瑞典 BUCHI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 Chr-M- β -CD 包合物和物理混合物的制备

采用电磁搅拌-喷雾干燥法(ES)制备 Chr-M- β -CD 包合物, 分别称取规定量的 Chr 与 M- β -CD 置于烧杯中, 加入 50% 乙醇使二者溶解, 置于磁力加热搅拌器上, 在 30 °C 下, 固定转速为 800 rpm, 搅拌 2 h 后, 静置。将溶液真空旋转蒸发除去乙醇, 用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤以除去未被包合的大黄酚, 将滤液进行喷雾干燥, 得 Chr-M- β -CD 包合物固体粉末。喷雾干燥的工艺参数: 蠕动泵流速: 1.2 mL/min, 进口温度 80 °C, 喷雾流量 300 mL/h。

物理混合物的制备方法: 准确称取适量 Chr 和 M- β -CD (摩尔比和使用量与超分子包合物一致), 置于研钵中混合研磨, 干燥, 避光保存, 备用。

1.2.2 相溶解度的测定

相溶解度的测定参考文献^[5]的方法, 精密称取 M- β -CD 用蒸馏水配成质量分数为 5、10、20、50、

100、150 mmol/L 的系列溶液, 分别吸取 5 mL 置具塞试管中, 均加入过量的 Chr 固体粉末, 超声 10 min 后, 置于恒温振荡器(调整振荡频率为 100 rpm)中分别在 25、35 和 45 °C 条件下, 振荡 5 h。使溶解达到平衡后, 静置, 取上清液用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 滤液用高效液相法测定 Chr 的峰面积, 用标准曲线计算 Chr 的浓度。以 M- β -CD 浓度(mmol/L)为横坐标, Chr 浓度(mmol/L)为纵坐标, 绘制平衡相溶解度图, 并计算线性回归方程及包合常数, 通过相溶解度的研究, 分析 M- β -CD 对 Chr 的增溶作用。

1.2.3 等摩尔连续递变法测定包合摩尔比

采用等摩尔连续递变法(即 Job's 方法)确定化学计量比^[6], 在实验条件下, 将所研究的 Chr 和 M- β -CD 配制成一系列浓度比, 而其总浓度固定不变, M- β -CD 的摩尔分数从 0.1 增大至 0.9。在最大吸收波长 254 nm, 测试体系溶液的吸光度为 A_1 , 纯 Chr 溶液的吸光度为 A_2 , 以吸光度变化($\Delta A = A_2 - A_1$)对 M- β -CD 的摩尔组分作图(Job's 图), 根据图中吸光度变化 ΔA 最大处对应的 M- β -CD 的摩尔组分, 即可以计算出主体 M- β -CD 与客体 Chr 的包合比。

1.2.4 超分子包合常数和包合过程热力学参数计算

分别对不同温度的各相溶解度曲线的直线部分作线性回归, 求得回归方程的斜率(S_s)和截距(S_0), 按 Higuchi-Connors 公式^[7]计算超分子包合常数(K_b , L/mol)。

$$K_b = \left[\frac{S_s}{S_0(1 - S_s)} \right] \quad (1)$$

式中, S_s 为斜率; S_0 为截距, 即各温度下 Chr 在未添加 M- β -CD 的水溶液中的溶解度。

根据范特霍夫方程 $\ln K_b = -\Delta H^0/RT + \Delta S^0/R$, 以 $\ln K_b$ 对 $1/T$ 作线性回归, 直线的斜率即为 $-\Delta H^0/R$, 截距即为 $\Delta S^0/R$, 从而求得包合反应的焓变 ΔH^0 及熵变 ΔS^0 ; 根据公式 $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$, 计算不同温度下的包合反应的吉布斯自由能变化 ΔG^0 。

1.2.5 Chr-M- β -CD 包合物的体外释放特性研究

参考《中国药典》2010 年版溶出度测定第一法并略作修改, 测定所得体系的体外释药特性。具体方法为: 取 900 mL 含 0.5% 十二烷基硫酸钠的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液置于溶出杯中, 加热, 待其温度恒定在 (37 ± 0.5) °C 后, 分别精密称取 Chr 原药 5 mg、Chr-M- β -CD 包合物(相当于原药 5 mg)、物理混合物(摩尔比和使用量与超分子包合物一致, 相当

于原药 5 mg) 置溶出杯中, 调节转速为 100 rpm, 分别于 5 ~ 200 min 取样 (同时补充等量同温溶液介质), 样品经 0.45 μm 滤膜过滤, 采用 HPLC 测定, 计算各采样点时样品中的药物浓度和累积释放率。同批样品测定 6 份, 结果取平均值。

1.2.6 HPLC 测定 Chr 含量及方法学研究

HPLC 条件: 日本岛津公司 LC-20A 高效液相色谱仪, 色谱柱为 C_{18} Hypersil BDS (250 mm \times 4.6 mm)。检测波长: 254 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流动相甲醇-0.1% 磷酸 (65:35); 流速 1.2 mL/min, 进样量: 20 μL , 大黄酚的 HPLC 色谱图具体如图 1 所示。

标准曲线: 精密称取 Chr 标准品 1.13 mg, 以甲醇为溶剂溶解后定容到 10 mL, 摇匀得 113 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Chr 对照品溶液, 备用。精密吸取 Chr 对照品溶液 2、10、20、100、200、400、1000 μL 至 2 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 使浓度成为 0.113、0.565、1.130、5.650、11.300、22.600、56.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的一系列对照品溶液, 进样, 测定。以质量浓度对峰面积做线性回归。得回归方程 $Y = 89977X - 4833.3$, $R^2 = 0.9999$, 线性范围为 0.113 ~ 56.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

精密实验: 制备低、中、高浓度的 Chr 溶液,

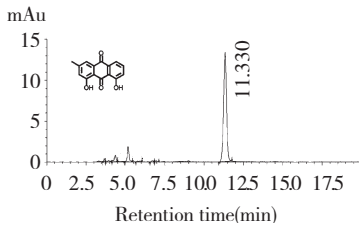


图 1 大黄酚 (Chr) 的 HPLC 色谱图 (内插图 of Chr 分子结构)

Fig. 1 HPLC chromatogram of chrysophanol (insert: molecular structure of chrysophanol)

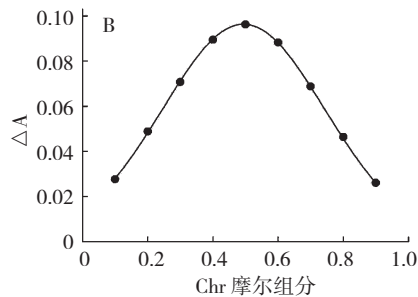
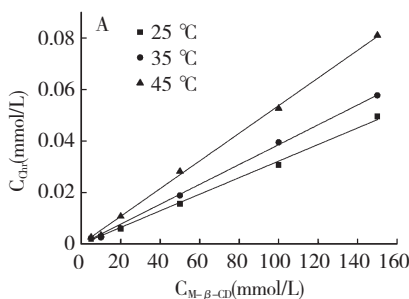


图 2 Chr-M- β -CD 包合物在不同温度下的相溶解度曲线 (A) 和等摩尔连续递变曲线 (B) ($n=6$)

Fig. 2 Phase solubility diagram (A) and continuous variation plot (B) of Chr-M- β -CD + at different temperatures

HPLC 测定, 同日内测 5 次及每天测 1 次, 连续测 5 d。结果日内和日间的平均 RSD 均 $< 2\%$, 表明本方法精密度好。

重复性实验: 取 Chr 对照品适量, 共 6 份, 按样品处理和测定方法平行测定, 计算 Chr 含量, 结果 $RSD = 0.65\%$, 表明方法重复性良好。

回收率实验: 精确称取 0.03 mg 大黄酚, 共 6 份, 与不同浓度的 Chr-M- β -CD 样品溶液混合, HPLC 测定 Chr 浓度, 平均加样回收率 98.10%, $RSD = 1.28\%$ 。

2 结果与分析

2.1 Chr-M- β -CD 包合物的相溶解度分析

包合常数 (K_b) 和结合摩尔比是表征小分子药物与环糊精及其衍生物形成包合物的重要参数, 相溶解度分析被广泛用于评价上述两个参数^[8]。以 C_{Chr} (mmol/L) 为纵坐标, 以 $C_{\text{M-}\beta\text{-CD}}$ (mmol/L) 为横坐标, 绘制相溶解度图, 分别得到 25、35 和 45 $^{\circ}\text{C}$ 时 M- β -CD 不同浓度对 Chr 的相溶解度图, 结果见图 2 (A)。采用线性回归拟合发现, 拟合 R^2 均 > 0.95 。根据 Higuchi 等^[7] 的报道, 环糊精包合物的相溶解度曲线一般分为 A 型和 B 型。客体浓度随环糊精浓度增大而增加的为 A 型, 表现为增溶作用, 进一步分为 3 个亚型: A_L 、 A_P 和 A_N 型。若环糊精对客体以物质的量之比为 1:1 进行包合, 相溶解度曲线呈线性增加, 表现为 A_L 型, 而 A_P 和 A_N 分别为线性增加的正偏差和负偏差。图 2 (A) 显示, Chr 在不同浓度 M- β -CD 作用下的相溶解度图曲线为线性 A_L 型; 随着 M- β -CD 浓度的增加, Chr 的溶解度随之增加, 且有较好的线性关系。图 2 (B) 说明 Chr 与 M- β -CD 形成了物质的量之比为 1:1 的包合物。

Chr-M- β -CD 超分子包合常数 (K_b) 是衡量包合

物稳定性的重要参数, K_b 越大, 表明该药物与空腔

分子的结合越稳定,越容易形成包合物。根据线性方程和式(1)得出包合物在 25、35 和 45 °C 条件下的 K_b 分别为: 6.56×10^2 、 7.85×10^2 、 1.09×10^3 L/mol。 K_b 随温度的升高而升高,这可能是由于分子间作用力(客体 Chr 与空腔 M- β -CD 间的范德华力、疏水客体与空腔间的“疏水性键力”等)的减小造成的^[9]。郑晓霞等^[10]研究发现,Chr-HP- β -CD 的 K_b 为 401.19 L/mol(研究条件为:25 °C),比较发现 M- β -CD 对 Chr 的包合作用更强。Loftsson 等^[11]研究发现,当环糊精及其衍生物对药物的包合常数在 50 L/mol ~ 2000 L/mol 范围内,说明二者之间有较强的相互作用。

2.2 Chr 与 M- β -CD 包合过程的热力学参数分析

以 $\ln K_b$ 对 $1/T$ 作线性回归,得线性回归方程为 $\ln K_b = -2.416 \times 10^3/T + 14.57$ ($R^2 = 0.9655$)。Chr 与 M- β -CD 包合过程的热力学参数结果见表 1。实验结果显示 $\Delta G^0 < 0$,说明 Chr 与 M- β -CD 包合过程是一个自发过程; $\Delta H^0 > 0$,说明包合过程是一个吸热过程; $\Delta S^0 > 0$,说明包合过程是无序化增加的过程。同时实验结果说明 Chr 与 M- β -CD 包合过程为熵驱动过程。环糊精及其衍生物的包合增溶作用

表 1 不同温度下 Chr 与 M- β -CD 包合过程的热力学参数

Table 1 The thermodynamic parameters of Chr-M- β -CD inclusion complex under different temperatures

温度 Temperature (°C)	K_b (L/mol)	ΔG^0 (kJ/mol)	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 [J/(mol·K)]
25	6.56×10^2	-16.01		
35	7.85×10^2	-17.21	20.09	121.11
45	1.09×10^3	-18.42		

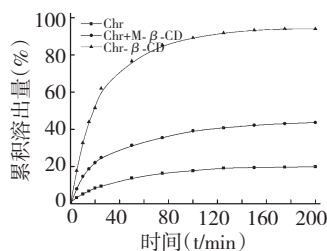


图 3 大黄酚及大黄酚包合物累积释放曲线 ($n=6$)

Fig. 3 Dissolution profiles of Chr and its inclusion complex

注:Chr、Chr-M- β -CD 和 Chr + M- β -Glu 分别表示大黄酚、大黄酚-甲基化- β -环糊精包合物、物理混合物

Note:Chr, Chr-M- β -CD and Chr + M- β -Glu indicated chrysophanol, Chr-methylated- β -cyclodextrin, and physical mixture of chrysophanol and methylated- β -cyclodextrin, respectively

主要通过对客体小分子的包结作用实现,包合物形成是增溶的前提^[12]。包合过程实质是客体分子 Chr 进入 M- β -CD 空腔,并将其中的水分子替换出来的过程,包合的主要驱动力来自于空腔内高焓值水的释放,包合物的形成可能是 Chr 与 M- β -CD 间多种力相互作用的结果,如氢键、范德华力、疏水相互作用,以及 M- β -CD 在包合过程中释放的环张力等。

2.3 Chr-M- β -CD 包合物体外释放特性分析

从图 3 可知,Chr 原药在介质中的溶出行为很差,200 min 在介质中的累积释放率仅为 19.9%。物理混合物中由于水溶性辅料的存在,改善了 Chr 的表面润湿性,对药物的溶出有所改善,但最终的累积释放率也仅为 43.6%。采用电磁搅拌-喷雾干燥法(ES)制备 Chr-M- β -CD 包合物,可以显著提高 Chr 原药的初期释放率和最终的累积释放率。ES 方法将药物溶液在热气流的作用下使雾滴中的水分迅速蒸发,直接获得疏松的干燥品,免去了后期其它加工工艺,且得到的粉末大部分为液滴经过膨胀产生的空心颗粒,有利于粉末的润湿,能更好的改善药物的累积释放率。

3 结论

经过电磁搅拌-喷雾干燥法(ES)制备的 Chr-甲基化- β -环糊精(M- β -CD)包合物提高了 Chr 溶解和溶出行为,不同温度下 Chr 的相溶解度图均呈现出 A_L 型特点。在 25、35 和 45 °C 条件下 Chr 与 M- β -CD 包合过程的超分子包合常数分别为 6.56×10^2 、 7.85×10^2 、 1.09×10^3 L/mol。包合过程的 ΔH^0 为 20.09 kJ/mol; ΔS^0 为 121.11 J/(mol·K); ΔG^0 分别为 -16.01、-17.21、-18.42 kJ/mol; M- β -CD 与 Chr 可自发形成质量比为 1:1 的包合物,整个包合过程体现为熵驱动过程,形成的超分子包合物均有较好的增溶作用,为 Chr 的口服新剂型的设计提供新的思路。同时电磁搅拌-喷雾干燥法(ES)制备得到的 Chr-M- β -CD 包合物粉末大多为液滴经膨胀产生的空心颗粒,有利于被水润湿电磁搅拌-喷雾干燥法制品较有工业化前景。

参考文献

- Li SJ(李淑娟), Li CG(李春更), Hou Y(侯勇), et al. The review on anti-aging of chrysophanol. *Hebei North Univ, Med Ed* (河北北方学院学报,医学版), 2009, 26:69-71.