

# 依达拉奉与环糊精包合物的制备及验证

曾建, 任勇\*, 张振海, 宋玲玲, 于嘉鑫(南京师范大学生命科学学院江苏省医药超分子材料及应用重点实验室, 南京 210046)

**摘要:** 目的 利用包合技术改进依达拉奉理化性质, 为研制新型制剂提供依据。方法 光谱法测定依达拉奉-环糊精包合常数, 研磨法和溶液法制备包合物; 热分析(DTA 和 TGA)及谱学分析( $^1\text{H-NMR}$  和 XRD)验证包合物; 光度法测定依达拉奉含量并考察其稳定性。结果 依达拉奉与环糊精可形成稳定包合物(包合常数  $K_a$  为  $146\sim 4\ 285\ \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), 包合技术能增加依达拉奉溶解度, 提高稳定性。结论 环糊精能显著改善依达拉奉理化性质, 依达拉奉包合技术具有应用价值。

**关键词:** 依达拉奉; 环糊精; 包合常数; 溶解度; 稳定性

中图分类号: R943.41

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)09-0814-04

## Preparation and Characterization of the Edaravone and Cyclodextrin Inclusion Complex

ZENG Jian, REN Yong\*, ZHANG Zhenhai, SONG Lingling, YU Jiaying(Jiangsu Key Laboratory for Supramolecular Medicinal Materials and Applications, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To improve the physicochemical property of edaravone by inclusion technology. **METHODS** The inclusion constant of edaravone and cyclodextrin was determined by spectroscopic methodology and the inclusion complexes were prepared by levigation and solution method, characterized by the thermal analysis (DTA and TGA) methods, nuclear magnetic resonance method ( $^1\text{H-NMR}$ ) and X-ray diffractometry (XRD) techniques. The solubility and stability of edaravone were also measured. **RESULTS** Edaravone formed an optimal inclusion complex with cyclodextrin with the equilibrium constant of  $146\sim 4\ 285\ \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ . The inclusion complex increased the solubility and improved the stability of edaravone. **CONCLUSION** The solubility and stability of edaravone were significantly improved with cyclodextrin and this technique may have medical values for the development of edaravone preparation.

**KEY WORDS:** edaravone; cyclodextrin; equilibrium constant; solubility; stability

依达拉奉(edaravone, EDA), 化学名 3-甲基-1-苯基-2-吡啶啉-5 酮, 是临床上第一个用于治疗急性脑梗塞的自由基清除剂<sup>[1]</sup>。有文献报道 EDA 可抑制脑细胞、血管内皮细胞和神经细胞的氧化损伤<sup>[2]</sup>。但 EDA 水溶解度小, 极易氧化, 对光热不稳定; 目前市售 EDA 注射液(必存<sup>®</sup>)选用丙二醇为溶剂, 具有较强的溶血作用, 且制剂对光较敏感需避光及低温保存。

本试验研究了 EDA 与环糊精(CD)的包合作用, 包合技术对 EDA 新型制剂的研制具有良好的技术可行性, 研究结果目前尚未见报道。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

UV-2450 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司); LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司); 阳极转靶 X-射线衍射仪 D/Max 2500(日本理学公司); TA-60 型差热分析仪(日本岛津公司); Avance

400 核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司); Explorer 电子分析天平(美国 Ohaus 公司)。

### 1.2 材料

EDA(济南中科一通化工有限公司, 纯度: 99.62%, 批号: 080826);  $\beta$ -CD(安徽山河药用辅料股份有限公司, 批号: 081213, 纯度>98%); HP- $\beta$ -CD(江苏泰兴新鑫医药辅料有限公司, 分子量 1 483); SBE- $\beta$ -CD(江苏省医药超分子材料实验室研制, 分子量 2 122); 甲醇(色谱纯, 上海国风医药公司); 纯净水(自制); 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 包合常数( $K_a$ )测定

根据文献[3-5]方法, 取 pH6.86 磷酸盐缓冲液( $2.5\times 10^{-2}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )溶解 EDA 配制溶液 A( $1.1\times 10^{-5}\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 取溶液 A 配制  $5.2\sim 9.9\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 CD 溶液 B。取一定量 A 液进行紫外扫描, 依次向体系中加入  $50\ \mu\text{L}$  的 B 液, 记录体系紫外吸光度的

基金项目: 江苏省科技发展计划项目(BM2007205)

作者简介: 曾建, 男, 硕士 Tel: (025)85891591 E-mail: zengjian85@163.com \*通信作者: 任勇, 男, 博士, 副教授 Tel: (025)85891591 E-mail: renrong@njnu.edu.cn

变化。由  $1/\Delta A = (1/[G]_0 \Delta \epsilon K_a) (1/[CD]_0) + 1/[G]_0 \Delta \epsilon$  的关系式, 通过截距/斜率求得 CD 与 EDA 的  $K_a$ 。式中  $\Delta A$  是加入 CD 后体系紫外吸收值的变化,  $[CD]_0$  是 CD 的总浓度,  $[G]_0$  是 EDA 的总浓度,  $\Delta \epsilon$  为 EDA 与 CD 形成包合物前后摩尔吸收系数之差。

## 2.2 包合物的制备

**2.2.1 研磨法** 精密称取 EDA 和  $\beta$ -CD(摩尔比 1:1)置研钵, 加入适量 pH6.86 磷酸盐缓冲液, 常温锡箔纸避光研磨 3 h 呈糊状, 20 °C 真空干燥得固体包合物。

**2.2.2 溶液法** 精密称取 CD(HP- $\beta$ -CD 或 SBE- $\beta$ -CD)并用定量蒸馏水溶解, 另取等摩尔 EDA 用乙醇溶解后缓慢滴入 CD 溶液中, 磁力搅拌 1 h 后 40 °C 减压去乙醇, 余液冷冻干燥得固体包合物。

## 2.3 包合物的鉴定

**2.3.1 热分析(DTA 和 TGA)** 取 EDA,  $\beta$ -CD, 二者的物理混合物及包合物进行实验。检测条件, 参比:  $Al_2O_3$ ; 测定气氛:  $N_2$ ; 样品量: 约 4.0 mg; 升温速率:  $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 升温范围: 30~350 °C。

**2.3.2  $^1\text{H-NMR}$  测定** 测定条件, 基准试剂: TMS; 溶剂:  $D_2O$ ; 样品:  $\beta$ -CD、EDA/ $\beta$ -CD 包合物; 测定温度: 25 °C。

**2.3.3 XRD 分析** 取 EDA,  $\beta$ -CD, 二者的物理混合物及包合物进行固体粉末 XRD 实验。检测条件: 25 °C,  $Cu-K\alpha$  靶, 扫描速度  $2^\circ\cdot\text{min}^{-1}$ , 采样宽度  $0.02^\circ$ , 扫描范围  $3^\circ\sim 40^\circ$ 。

## 2.4 溶解度研究

**2.4.1 检测波长选择** pH6.86 磷酸盐缓冲液配制适当浓度 EDA 溶液, 200~400 nm 区间扫描显示 EDA 在 240 nm 有强紫外吸收峰且该波长下 CD 无吸收, 故选 240 nm 作为检测波长。

**2.4.2 标准曲线制备** 精密称取 EDA 60.7 mg, 用 50%乙醇溶解并稀释成  $6.07\sim 60.7\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  系列浓度的试液, 测定 240 nm 吸光度, 线性回归得吸光度 ( $A$ )-浓度 ( $C$ ) 标准方程:  $A=721.27C+0.0417$  ( $r=0.9997$ )

**2.4.3 溶解度测定** 用 pH6.86 磷酸盐缓冲液配制不同浓度 CD 溶液各 20 mL, 并加入过量 EDA, 室温振荡 12 h 达饱和,  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  膜过滤后量取滤液适当稀释并测定吸光度, 根据标准方程及稀释倍数得溶解度。

## 2.5 稳定性研究

**2.5.1 液相条件**<sup>[6]</sup> ODS- $C_{18}$  色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 甲醇-0.05 mol $\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾溶液(pH3.5)=50:50; 流速:  $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 柱温: 25 °C; 检测波长: 240 nm; 测定时间: 17 min。

**2.5.2 稳定性检测** 取甲醇配制浓度为  $0.142\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  EDA 母液, 流动相将母液稀释为  $2.84\sim 42.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  系列浓度溶液, 240 nm 检测并以吸收峰面积( $A$ )对质量浓度( $C$ )进行线性回归得方程:  $A=1.9\times 10^5 C+53\ 060$  ( $r=0.9999$ )。

取 EDA 及 CD 包合物固体在 40 °C 热和(4 500  $\pm$  500)Lx 光下放置 10 d, 分别在 5 d 和 10 d 检测样品中 EDA 的含量。

## 3 结果与讨论

### 3.1 $K_a$ 测定

CD 与客体分子的包合是一个动态平衡过程, 包合物形成后会使客体分子的吸收光谱产生位移或吸光强度发生改变<sup>[7]</sup>。根据吸光度变化及 CD 浓度可求出  $K_a$ 。 $K_a$  反映 CD 与客体分子的包合强度, 值越大越易形成稳定的包合物。从表 1 可知, CD 与 EDA 的  $K_a$  为  $146\sim 4\ 285\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 说明 EDA 与 3 种 CD 均有较强的包合强度, 预测包合后 EDA 的稳定性将会得到明显提高。

表 1 EDA 与 CD 的  $K_a$  及回归方程(240 nm)

Tab 1 The  $K_a$  and regression equation of EDA with CD at 240 nm

CD 类型	$K_a$	回归方程
$\beta$ -CD	146	$Y=0.0182X+2.660$ ( $r=0.9904$ )
HP- $\beta$ -CD	1 231	$Y=0.0127X+15.638$ ( $r=0.9947$ )
SBE- $\beta$ -CD	4 285	$Y=0.0058X+24.853$ ( $r=0.9917$ )

### 3.2 包合物鉴定

**3.2.1 DTA 和 TGA 分析** 各实验样品的热分析图谱具有明显差异, 见图 1。DTA 在 131 °C 尖锐熔融峰(吸热)为 EDA 熔点峰, 熔点至 220 °C 的宽吸热峰为 EDA 受热分解;  $\beta$ -CD 在 81 °C 和 310 °C 处分别出现脱水峰和熔融分解峰; 物理混合物出现明显的  $\beta$ -CD 和 EDA 吸热峰特征; 而包合物中 EDA 在 131 °C 的熔融峰和 220 °C 的吸热分解峰基本消失, 220~300 °C 段曲线平坦无  $\beta$ -CD 缓慢吸热分解的特征表现。

此外, TGA 显示 EDA 在 118.35~236.17 °C 熔融分解失重;  $\beta$ -CD 在 96.34 °C 前脱去包合水分, 281.57 °C 开始熔融分解失重; 而物理混合物中非包合的 EDA 失重明显, 且呈现出 89.04 °C 前的

$\beta$ -CD 脱水和 299.31 °C 后的分解失重特征; 包合物曲线虽然保持了  $\beta$ -CD 的脱水特征峰, 但是无明显的 EDA 失重变化特征, 在 160~302.08 °C 内缓慢失重的曲线变化与物理混合物及单纯  $\beta$ -CD 的无失重变化(平坦曲线)皆有明显区别。结合 DTA 结果可判断包合物已经形成。

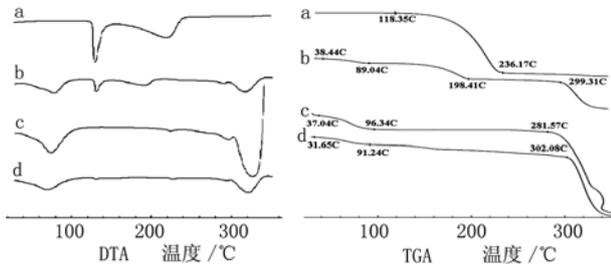


图 1 热分析图谱

a-EDA; b-物理混合物; c- $\beta$ -CD; d-包合物

Fig 1 The thermograms

a-EDA; b-physical mixture; c- $\beta$ -CD; d-inclusion complex

**3.2.2  $^1\text{H-NMR}$  分析**  $\beta$ -CD 和 EDA/ $\beta$ -CD 包合物的  $^1\text{H-NMR}$  结果( $\delta 3 \sim \delta 4$  部分)如图 2 显示, 单纯  $\beta$ -CD 的 C6-H 与 C5-H 信号重叠, 而包合物的两信号峰完全分离, C5-H 从  $\delta 3.72$  移至  $\delta 3.67$  ( $\Delta \delta = 0.05$ ); 另外 C3-H 也从  $\delta 3.83$  改变至  $\delta 3.81$  ( $\Delta \delta = 0.02$ )。

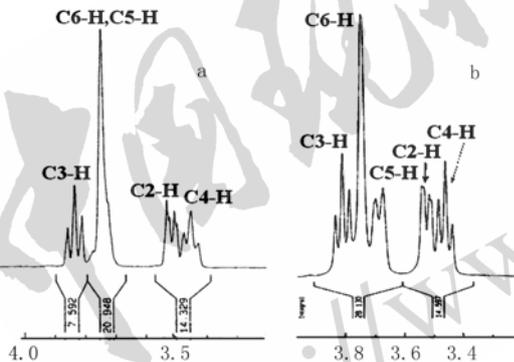


图 2  $^1\text{H-NMR}$  图谱

a- $\beta$ -CD; b-包合物

Fig 2 The  $^1\text{H-NMR}$  spectra of samples

a- $\beta$ -CD; b-inclusion complex

一般而言, 疏水性药物(客体)易由仲碳面(开口大端)进入 CD 空腔形成包合物, CD 环空腔内壁仲碳面 C3-H 和叔碳面 C5-H 的化学位移( $\delta$ )易受客体影响而发生改变<sup>[8]</sup>。客体芳香环结构的电子环流对环平面垂直方向的邻近质子具有极强的屏蔽效应, 通过屏蔽效应产生的 C5-H、C3-H 化学位移( $\delta$ )变化, 易判断客体被包合的部位基团及客体深入

CD 空腔(包合)的程度。测定表明, C5-H 受到更多的 EDA 芳香苯环屏蔽效应, 说明 EDA 分子不仅被包合, 而且苯环已深入 CD 的疏水空腔形成了牢固的包合物如图 3 所示。

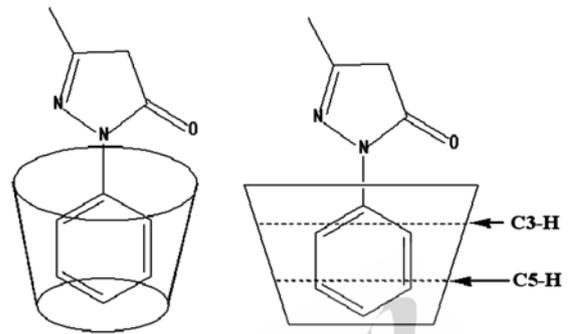


图 3 EDA 与 CD 包合模拟

Fig 3 Inclusion simulation of EDA with CD

**3.2.3 XRD 分析** 样品的 XRD 结果见图 4。由图可知, EDA 和  $\beta$ -CD 具有明显不同的衍射峰; 物理混合物基本是 EDA 与  $\beta$ -CD 衍射图形的叠加, 且 EDA 在  $2\theta = 12.30^\circ, 21.20^\circ, 24.46^\circ$  等处衍射峰仍清晰可见, 说明两者仅是简单的物理混合; 而包合物与物理混合物的图谱差异明显, 包合物的衍射峰均发生不同程度的改变(+为增强, -为减弱)。结果表明包合物的确存在。

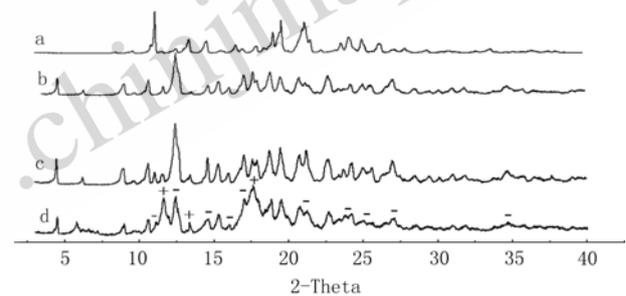


图 4 XRD 图谱

a-EDA; b- $\beta$ -CD; c-物理混合物; d-包合物

Fig 4 XRD patterns

a-EDA; b- $\beta$ -CD; c-physical mixture; d-inclusion complex.

### 3.3 溶解度研究

不同浓度 CD 的 EDA 溶解度见表 2。从表可知: CD 可显著增加 EDA 溶解度, 且 CD 浓度越大, 溶解度越高; 磺丁基或羟丙基的取代扩展了 CD 的疏水空间, 增大了 CD 自身溶解度, 能更好地包合而增大 EDA 溶解度。增溶能力  $\text{SBE-}\beta\text{-CD} > \text{HP-}\beta\text{-CD} > \beta\text{-CD}$ , 这与  $K_a$  测定结果基本吻合, 说明包合作用强度是增加 EDA 溶解度的主要因素。

表 2 不同浓度 CD 溶液中 EDA 的溶解度

Tab 2 The solubility of EDA in different concentration of CD solution

CD 种类	浓度/g·(100 mL) <sup>-1</sup>	溶解度/mg·mL <sup>-1</sup>	增溶倍数
0	0	2.623	1.0
β-CD	1.8	3.787	1.4
	5.0	4.729	1.8
	10.0	7.348	2.8
	20.0	18.77	7.2
SBE-β-CD	5.0	7.082	2.7
	10.0	8.656	3.3
	20.0	22.30	8.5
	30.0	30.98	11.8

### 3.4 稳定性研究

光、热条件下原料 EDA 的相对含量分别从 5 d 的 95.2% 和 96.6% 下降到 10 d 的 93.9% 和 94.8%，下降明显；而包合物中 EDA 相对稳定，含量明显高于原料。由此说明，CD 包合使 EDA 稳定性得到明显提高，为制备高质量的 EDA 制剂提供了技术支持，见表 3。

表 3 不同试验条件下样品的相对百分含量( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 3 The percentage content of EDA in the samples( $\bar{x} \pm s$ )

实验样品	(4 500±500)lx		40 °C	
	5 d	10 d	5 d	10 d
EDA	95.2±0.46	93.9±0.40	96.6±0.94	94.8±0.30
β-CD 包合物	98.8±0.21	96.6±0.25	99.2±0.26	97.5±0.06
HP-β-CD 包合物	98.5±0.31	97.9±0.40	98.2±0.21	98.0±0.26
SBE-β-CD 包合物	97.9±0.20	97.5±0.15	98.7±0.06	98.9±0.21

## 4 小结

本试验测定  $K_a$ ，考察 EDA 与 CD 包合的可能性及强度，预测二者能稳定包合；采用多种方法制备并鉴定包合物证明了包合的可行性，EDA 已进入 CD 的疏水空腔形成超分子；CD 包合后明显

改善 EDA 的溶解度及稳定性；同时实验证明包合技术改善 EDA 溶解度及稳定性的效果与  $K_a$  相关， $K_a$  越大，技术效果越好。由于  $K_a$  测定容易、操作简单、样品用量少具有较好的技术预见性，因此是研究 CD 超分子技术的必要参数及重要方法。

本试验采用 CD 包合技术改进 EDA 的物化性质取得了良好结果，该结果对研制高质量的 EDA 冻干粉针剂或进一步深入开发口服制剂均具有重要意义。

## REFERENCES

- [1] NAKAMURA A, AKAMATSU Y, MIYAGI S, et al. A free radical scavenger, edaravone, prevents ischemia-reperfusion injury in liver grafts from non-heart-beating donors [J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(7): 2171-2174.
- [2] WANG J W. Edaravone injection [J]. *Chin New Drugs J*(中国新药杂志), 2004, 13(2): 183-184.
- [3] WANG Y N, SUN J M, YU L L, et al. Determination method of constant for the inclusion complex of drug with cyclodextrin and its derivatives [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2004, 28(1): 23-28.
- [4] MA K F, REN Y, WANG X, et al. Determination of constant for the inclusion complex of Yinqiao volatileoil with β-cyclodextrin [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(8): 740-742.
- [5] ZHANG L, REN Y. Study on the inclusion of insulin and β-cyclodextrin [J]. *Chinese Academic Med Magazine Organisms* (中国医学生物技术应用杂志), 2003, 3: 53-56.
- [6] WEI M, XIAO Y. Determination of the concentration of edaravone in human serum by RP-HPLC [J]. *China Pharm* (中国药房), 2007, 18(8): 590-591.
- [7] WANG M, REN Y, MA X Q, et al. Study on the inclusion complex of prazosin hydrochloride/HP-β-CD [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2005, 36(5): 423-426.
- [8] GAO J F, REN Y, WANG X J. Study on the inclusion complex of vanillin and cyclodextrin [J]. *Chin New Drugs J*(中国新药杂志), 2006, 15(21): 1858-1861.