

九里香叶总黄酮-羟丙基- β -环糊精包合物的制备、鉴定和热力学稳定性研究

章建芳^{1,2}, 林燕飞³, 金圣煊³, 雷荣剑³, 高建青^{1*} (1. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 2. 浙江亚克药业有限公司, 杭州 310053; 3. 杭州创新中药标准化研究所, 杭州 310053)

摘要: 目的 制备和鉴定九里香叶总黄酮-羟丙基- β -环糊精包合物, 并考察九里香叶总黄酮和羟丙基- β -环糊精之间的包合摩尔比及包合过程的热力学常数。方法 采用溶液-搅拌法制备九里香叶总黄酮-羟丙基- β -环糊精包合物, 采用差示扫描量热法、X 射线衍射法和红外光谱法对包合物进行鉴定, 通过表观溶解度法考察包合物中主客分子之间的包合摩尔比及包合过程的热力学常数。结果 25, 35, 45 °C 时九里香叶总黄酮和羟丙基- β -环糊精能形成 1:1 摩尔比包合物, 相溶解度图呈 A_L 型, 包合过程为放热反应。结论 九里香叶总黄酮与羟丙基- β -环糊精能自发地形成 1:1 摩尔比包合物, 从而显著提高九里香叶总黄酮在水中的溶解度。

关键词: 九里香; 包合物; 差示扫描量热法; X 射线衍射法; 相溶解度法

作者简介: 章建芳, 女, 工程师
Tel: (0571)88208437 E-mail: gaojianqing@zju.edu.cn

Tel: (0571)86696089

E-mail: zhangjf618@163.com

*通信作者: 高建青, 男, 博士, 教授

中国现代应用药学 2010 年 9 月第 27 卷第 9 期

Chin JMAP, 2010 September, Vol.27 No.9

• 821 •

Preparation, Identification and Thermodynamic Stability Study of *Murraya Exotica* L. Leaves Flavonoids Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex

ZHANG Jianfang^{1,2}, LIN Yanfei³, JIN Shengxuan³, LEI Rongjian³, GAO Jianqing^{1*} (1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Zhejiang Yake Pharmaceutical Co., Ltd, Hangzhou 310053, China; 3. Hangzhou Innovation TCM Standardization Research Institute Co., Ltd, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare and identify *Murraya exotica* L. leaves flavonoids hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex(JK-HP- β -CD). The molar ratio between *Murraya exotica* L. leaves flavonoids and HP- β -CD as well as the thermodynamic constants in inclusion was also studied. **METHODS** The JK-HP- β -CD inclusion complex was prepared with solution-agitating method. Meanwhile, the inclusion complex was identified by differential scanning calorimetry, X-ray diffraction and infrared spectrometry, respectively. The molar ratio between host and guest molecules and the thermodynamic constants during the inclusion process were also investigated by phase solubility method. **RESULTS** A 1 : 1 molar ratio inclusion complex of JK with HP- β -CD could be formed at 25, 35, 45 °C. The phase diagram was A_L type and the procedure of inclusion was a heat release process. **CONCLUSION** A 1 : 1 molar ratio inclusion complex of JK with HP- β -CD could be formed spontaneously, which increased the solubility of JK in aqueous solution obviously.

KEY WORDS: *Murraya exotica* L.; inclusion complex; differential scanning calorimetry; X-ray diffraction; phase solubility

九里香叶总黄酮(JK)是从芸香科植物九里香 *Murraya exotica* L.和千里香 *Murraya paniculata* (L.) Jack 的干燥叶和带叶嫩枝中提取分离的以黄酮类化合物为主要成分的有效部位,黄酮含量达到92%以上,其中主要含有5, 7, 3', 4'-四甲氧基黄酮(JA)和5, 7, 3', 4', 5'-五甲氧基黄酮(JB)。JK是中药九里香的主要有效成分之一,对急性心肌梗死和糖尿病具有治疗作用。JK为淡黄绿色粉末,极性低,水溶性差,在25 °C水中的溶解度仅为0.135 mg·mL⁻¹,严重影响体内吸收,从而限制其临床应用。

药物制成环糊精包合物可以改善药物的溶解性能^[1],因此本实验选择毒性低、水溶性大(在水中溶解度为750 g·L⁻¹)的羟丙基- β -环糊精^[2]为包合材料,采用溶液-搅拌法制备九里香叶总黄酮-羟丙基- β -环糊精包合物(JK-HP- β -CD),以显著增加九里香叶总黄酮在水中的溶解度。并用差示扫描量热法(DSC)、X射线衍射法(XRD)和红外光谱法(IR)对包合物进行鉴定,通过相溶解度法考察药物与环糊精之间的包合物质的量比,计算表观稳定常数,为九里香叶总黄酮包合物制剂的制备和临床应用提供依据。

1 仪器与材料

AB204-S 电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); SP-2500 紫外可见分光光度计(上海爱吉伦光谱仪器有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(河南省予华仪器有限公司); R-202 旋转蒸发仪(上海申胜生物技术有限公司); CDR-4P 型差

动热分析仪(上海天平仪器厂); PANalytical X'Pert PRO X射线衍射仪(荷兰); AVATAR370 型傅立叶红外光谱仪(美国-尼高力仪器公司)。

5, 7, 3', 4', 5'-五甲氧基黄酮(JB)对照品(吉林大学化学学院,纯度:99.8%);九里香叶总黄酮(JK)(吉林大学化学学院,纯度以JB计为91.2%);羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD, 安徽山河药用辅料有限公司);乙醇(分析纯,杭州化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 包合物的制备

按摩尔比1 : 1分别称取JK与HP- β -CD适量置烧杯中。HP- β -CD用水溶解(浓度为0.033 mol·L⁻¹),JK加入无水乙醇加热使其完全溶解(浓度为0.033 mol·L⁻¹)。在25 °C磁力搅拌条件下,将JK的乙醇溶液加入到HP- β -CD水溶液中,继续搅拌2 h,取出,4 °C冷藏,过滤,滤液减压浓缩,60 °C真空干燥,即得JK-HP- β -CD包合物。

2.2 JK的测定

2.2.1 测定波长的选择 称取适量JK、HP- β -CD、JK-HP- β -CD用无水乙醇溶解。以空白无水乙醇为对照,分别将3种溶液在紫外分光光度计的200~400 nm波长处进行扫描,结果发现在330 nm处JK和JK-HP- β -CD均有最大吸收,而HP- β -CD在此波长处无吸收,故确定测定波长为330 nm。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密称取JB对照品10.0 mg于25 mL量瓶中,加无水乙醇超声溶解,并定容,

得 $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的JB对照品浓溶液。精密量取JB对照品浓溶液适量,加无水乙醇稀释成2,4,8,16,32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列溶液,测定吸光度。以质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程。结果JB在2~32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内,其吸光度与浓度呈良好的线性关系,其回归方程为: $A=0.056C-0.0158(r=0.9998)$ 。

2.3 包合物载药量和包封率的测定

精密称取干燥后的JK-HP- β -CD 10 mg,用无水乙醇溶解稀释后测定吸光度,计算JK的浓度,再计算载药量(载药量=包合物中JK的质量/包合物质量 $\times 100\%$)和包封率(包封率=包合物中JK的质量/JK投料量),得3批包合物的平均载药量为 $(17.3\pm 0.2)\%$,平均包封率为 $(94.8\pm 0.7)\%$ 。

2.4 增溶倍数的测定

称取过量的JK及按“2.1”法制备的包合物,分别置于10 mL试管中,用纯化水定容,超声5 min,在25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡3 d。用0.45 μm 的微孔滤膜过滤,续滤液蒸干后用无水乙醇溶解,并稀释适当倍数,测定吸光度,计算JK及其包合物的饱和浓度。结果显示JK的饱和浓度为 $0.135\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,包合物中JK的饱和浓度为 $5.928\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,结果表明,HP- β -CD包合后可使JK增溶43.9倍。

2.5 包合物的鉴定

2.5.1 差示扫描量热法(DSC法)鉴定^[3]以空坩埚(氧化铝坩埚)为参比,取JK、HP- β -CD、两者的物理混合物和JK-HP- β -CD适量置样品室中,调节升温速度为 $10\ ^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$,温度测定范围50~400 $^{\circ}\text{C}$,分别记录样品的差热扫描曲线,见图1。

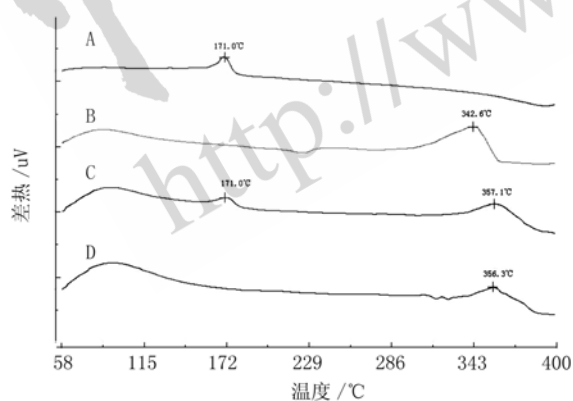


图1 差示扫描量热图

A-JK; B-HP- β -CD; C-JK和HP- β -CD的物理混合物; D-包合物

Fig 1 Patterns of DSC

A-*Murraya exotica* L. leaves flavonoids; B-HP- β -CD; C-physical mixture of *Murraya exotica* L. leaves flavonoids and HP- β -CD; D-inclusion complex

从图中可以看出,JK在171.0 $^{\circ}\text{C}$ 左右有1个吸热峰,为JK的熔点峰;HP- β -CD在90 $^{\circ}\text{C}$ 和342.6 $^{\circ}\text{C}$ 处各有1个吸热峰,前者是由于失水所致,后者是HP- β -CD的熔点峰;物理混合物的DSC曲线基本为两者的叠加,JK和HP- β -CD的峰均存在;而包合物的主药峰完全消失,与物理混合物显著不同,说明形成了包合物。

2.5.2 X射线衍射法鉴别^[3]测试条件:Cu靶/石墨单色器,电压40 kV,管流40 mA,扫描步长 0.0167° ,扫描范围 $5\sim 50^{\circ}$ 。

分别对JK、HP- β -CD、两者的物理混合物和JK-HP- β -CD进行粉末X射线衍射分析,结果见图2。A为JK粉末衍射图谱,有多个特异性结晶峰产生;B为HP- β -CD的X射线衍射图,无明显的晶型峰产生,说明为无定型粉末;C为JK与HP- β -CD的物理混合物,峰形为两种物质的叠加,由于受HP- β -CD量的影响,JK峰均有下降,但其特征峰均存在,说明JK未被包合,两者仅为物理混合;D为包合物的衍射图谱,JK的特征峰消失,提示因主客分子之间的相互作用,使JK的晶型特征消失,形成新的物相。

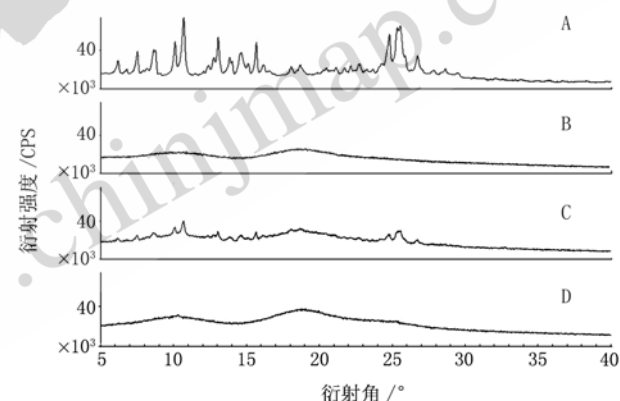


图2 X射线衍射图

A-JK; B-HP- β -CD; C-JK和HP- β -CD的物理混合物; D-包合物

Fig 2 Patterns of XRD

A-*Murraya exotica* L. leaves flavonoids; B-HP- β -CD; C-physical mixture of *Murraya exotica* L. leaves flavonoids and HP- β -CD; D-inclusion complex

2.5.3 红外光谱分析分别取JK、HP- β -CD、两者的物理混合物和JK-HP- β -CD适量,经KBr压片,进行红外光谱分析。结果见图3。由图可见,物理混合物的吸收峰表现为JK与HP- β -CD的红外吸收的加合,包合物与物理混合物的图谱明显不同,包合物中JK在 $1376.63\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰消失,且在 $706.69\ \text{cm}^{-1}$ 处的双峰变成了单峰。由此可以推测,

JK 与 HP-β-CD 形成了包合物。

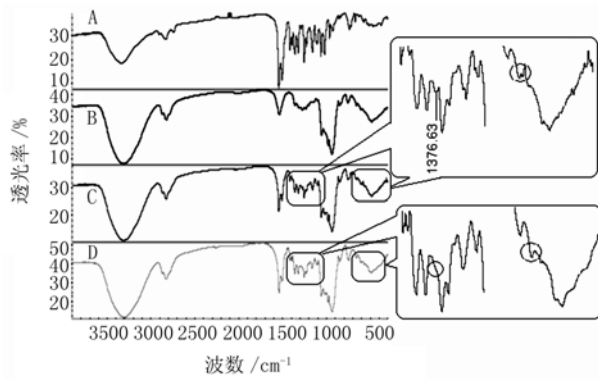


图3 红外图谱

A-JK; B-HP-β-CD; C-JK 和 HP-β-CD 的物理混合物; D-包合物

Fig 3 IR Spectrum

A-Murraya exotica L. leaves flavonoids; B-HP-β-CD; C-physical mixture of Murraya exotica L. leaves flavonoids and HP-β-CD; D-inclusion complex

2.5.4 表观溶解度试验 精密称取 HP-β-CD 适量, 加纯化水配制成浓度分别为 0, 0.685, 1.370, 2.740, 5.479, 10.959, 16.438, 27.397 mmol·L⁻¹ 的 HP-β-CD 溶液。分别吸取上述溶液 10 mL 置具塞试管中, 各管均加入过量的 JK, 超声 20 min, 固定试管于恒温振荡器中, 振荡频率为 100 次·min⁻¹, 振荡 72 h。吸取溶液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 蒸干后用适量无水乙醇溶解, 测定吸光度, 计算 JK 摩尔浓度。以 HP-β-CD 浓度为横坐标, JK 浓度为纵坐标, 绘制平衡相溶解度图。25, 35, 45 °C 时平衡相溶解度图见图 4。由图可见, 在不同温度下, JK 的溶解度均随 HP-β-CD 浓度的增加而呈线性增加, 根据 Higuchi^[4]分类法, 该体系相溶解度图属于 A_L 型,

表 1 不同温度下包合物的热力学参数

Tab 1 Thermodynamic parameters of inclusion complex at different temperatures

温度/°C	方程	R ²	Kc/L·mol ⁻¹	ΔG/kJ·mol ⁻¹	ΔH/kJ·mol ⁻¹	ΔS/kJ·mol ⁻¹
25	Y=0.559 0X+0.129 9	0.999 4	9 758	-22.44		
35	Y=0.480 4X+0.254 8	0.999 6	3 629	-21.74	-43.3	-0.07
45	Y=0.446 2X+0.245 7	0.999 5	3 279	-21.04		

包合过程的吉布斯自由能变化(ΔG)、焓变(ΔH)和熵变(ΔS)均为负值, 表明包合反应可以自发地进行。所得包合物的稳定常数(Kc)较大, 可推测形成的包合物具有较好的稳定性, 但随着温度增高, 表观稳定常数值减小, 表明升温不利于包合物的形成。

3 讨论

由于 JK 在水中的溶解度很小, 因此包合前先用

表示体系中形成了 1 : 1 包合物。

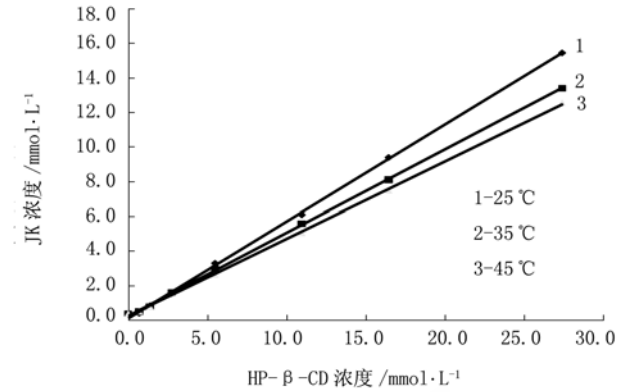


图4 平衡相溶解度图

Fig 4 Phase solubility curves

表观稳定常数(Kc)是衡量包合物稳定性的重要参数, 溶液中游离药物分子与被包合药物分子之间存在一个动态平衡, Kc 值越大, HP-β-CD 对药物稳定作用越强。根据不同温度下药物浓度随 HP-β-CD 变化的平衡相溶解度图得到各温度下的相溶解度方程。利用平衡相溶解度方程的截距(S₀)和斜率(tgφ)可分别计算得到 25, 35, 45 °C 下包合作用的表观稳定常数 Kc($Kc = \frac{tg\phi}{S_0(1-tg\phi)}$)。根据

Van't Hoff 方程: $\ln Kc = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}$, 以 lnKc 对 1/T

做回归方程, 得到 $\ln Kc = 5210.7 \frac{1}{T} - 8.437$ 。由直线

的斜率和截距可以计算出包合反应的焓变(ΔH)和熵变(ΔS), 再根据公式 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, 计算出反应自由能, 结果见表 1。

无水乙醇在加热条件下将其溶解, HP-β-CD 用水溶解, 使主客分子均以分子状态存在, 有利于包合的进行。

相溶解度图(即药物分子浓度对环糊精浓度的函数图)通常分为 A 型和 B 型^[5]。A 型是药物浓度随环糊精浓度增大而增加, 表现为增溶作用, 其进一步分为 3 个亚型: A_L、A_P 和 A_N。若环糊精对药物以 1 : 1 摩尔比例进行包合, 相溶解度图呈线性增加, 表现

为 A_L 型； A_P 和 A_N 分别为线性增加的正偏差和负偏差。由此可判断HP- β -CD与JK是以1:1物质的量比例进行包合的。

包合物热力学参数测定结果表明,随着温度增高,包合的表现稳定常数值减小,可能是由于温度升高引起分子运动加剧而导致这种现象。表明升温不利于包合物的形成。 $\Delta H < 0$,说明包合过程为放热过程,提示在制备包合物时,适当降低温度有利于反应的进行。 ΔS 为负值,说明包合过程为熵值减小的过程。原因可能是包合物形成后,原来可自由运动的客分子JK被限制在HP- β -CD分子的空穴中,自由度减小,结果使得整个包合体系的混乱度减小,熵值变小。根据热力学第二定律,熵值减小的过程不利于反应的进行。但此包合过程极为有利的是焓变(ΔH)的绝对值远远大于熵变(ΔS),弥补了熵变的不利影响。

本实验方法制备的 JK-羟丙基- β -环糊精包合

物,采用差示扫描量热法、X射线衍射法和红外光谱法对包合物进行鉴定,表明包合物形成。形成包合物后使 JK 25 °C 的溶解度提高 43.9 倍,但能否提高体内生物利用度有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] ZHU S S. The New Formulations of Drugs(药物新剂型)[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 36.
- [2] IRIE T, U EKAMA K. Pharmaceutical applications of Cyclodextrins, III. Toxicological issues and safety evaluation [J]. Pharm Sci, 1997, 86(2): 147-162.
- [3] SONG J C, DENG R Y, CHEN J L, et al. Solubilization on puerarin by hydroxypropyl- β -cyclodextrin and preparation of their inclusion compound [J]. Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志), 2008, 28 (13): 1070-1074.
- [4] BREWSTER M E, SIMPKINS J W, HORA M S, et al. The potential use of cyclodextrins in parenteral formulations [J]. Parent Sci Tech, 1989, 4(5): 231-240.
- [5] TAKERU H, KENNETH A. Connors phase-solubility techniques [J]. Adv Anal Chem Instr, 1965, 4: 117-212.

收稿日期: 2010-01-11