

姜黄素环糊精分子包合物的构建和优化

李 艺¹, 梅 虎², 赵春景³, 王 红¹, 罗 文³, 张景勃^{*1}

(1. 重庆医科大学 药物高校工程研究中心, 重庆 400016; 2. 重庆大学 生物工程学院, 重庆 400023; 3. 重庆医科大学 附属第二医院药剂科, 重庆 400010)

摘要: 构建、优化和计算机模拟可增溶姜黄素(CCN)的环糊精分子包合物(CCIC)。采用研磨法制备 CCIC, 显微观察法、差示量热扫描法、红外光谱法验证包合物的形成。以溶解度为评价指标, 通过正交设计优化 CCIC 的制备工艺。用计算机进行 CCIC 的分子结构模拟。结果表明: CCIC 最优制备工艺为包合投料比(摩尔比)为 1:1, 研磨温度为 40 °C, 包合时间为 1.5 h。最优化处方工艺下姜黄素溶解度较游离药物提高了 3.82×10^4 倍。分子模拟结果显示分子包合可降低包合系统能量。因此, 可成功构建、优化和计算机模拟 CCIC, 其溶解度较 CCN 大大提高。

关键词: 姜黄素; 分子包合物; 构建; 优化

中图分类号: Q 556; R 392-33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)11-1197-06

Preparation and Process Optimization of Curcumin-Cyclodextrin Inclusion Complexes

LI Yi¹, MEI Hu², ZHAO Chunjing³, WANG Hong¹, LUO Wen³, ZHANG Jingqing^{*1}

(1. Medicine Engineering Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400023, China; 3. Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: In order to improve the water solubility of curcumin (CCN), curcumin-cyclodextrin inclusion complexes (CCIC) were prepared and the preparing process was optimized. The CCIC was prepared by grinding method. Microscopic observation method, differential scanning calorimetry, and infrared spectroscopy method were used to validate the formation of the CCIC. The orthogonal design was used to optimize the preparation process of CCN. Solubility was a evaluation index. The optimal condition of these three effects to prepare CCN were that the inclusion of feed ratio was 1:1, the grinding temperature was 40 °C, the inclusion time was 1.5 h. The solubility of CCN in inclusion complex prepared by optional condition was (1.72 ± 0.03) mg/mL which increased 3.82×10^4 times compared with free drug. The process was stable and feasible. The preparation process was repeatable and reasonable. It effectively improved the solubility of CCN in the water.

Keywords: curcumine, preparation process, orthogonal experiment

收稿日期: 2015-06-26

基金项目: 重庆市教委资助项目(KJ120321)。

* 通信作者: 张景勃(1973—), 女, 重庆市人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药物新剂型与新技术研究。

E-mail: zjqrae01@163.com

引用本文: 李艺, 梅虎, 赵春景, 等. 姜黄素环糊精分子包合物的构建和优化[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(11): 1197-1202.

姜黄素 (curcumin, CCN) 最早是从植物根茎提炼出来的一种印度香料, 作为抗炎草药, 具有悠久的历史。CCN 溶于乙醇、丙酮和氯仿等有机溶剂, 几乎不溶于水及乙醚。药理作用广泛, 安全有效性高, 价格低廉, 使其具有广阔的应用前景。但由于 CCN 的溶解度极低, 使其口服吸收不完全, 代谢消除迅速, 生物利用度低, 限制了其应用。药物被环糊精大分子包合后可明显改善药物的理化性质, 提高药物的水溶性和稳定性, 提高药物的生物利用度以及改变药物在体内的分布情况等。为了改善 CCN 在体内的吸收, 提高其口服生物利用度, 本实验选用水溶性大、生物相容性好的羟丙基- β -环糊精 (hydroxypropyl beta cyclodextrin, HBCD) 为材料, 构建了姜黄素羟丙基- β -环糊精分子包合物 (curcumin-cyclodextrin inclusion complexes, CCIC), 通过显微观察法、红外光谱法、差示量热扫描法验证了包合物的形成, 并优化了 CCN 的制备工艺, 成功提高了 CCN 在水溶液中的溶解度, 以计算机模拟了 CCIC 的分子结构及 CCN 分子包合前后的能量变化。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 主要材料、试剂 羟丙基- β -环糊精: 江苏泰兴新鑫医药辅料有限公司产品; 姜黄素: 陕西森弗生物制药有限责任公司产品; 去离子水, 其它试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器 Monobloc AB204-E 型电子天平: 瑞士 METTLER-TOLEDO 仪器公司产品; UV-3150 型紫外分光光度计: 日本岛津公司产品; DZF-6020 型真空干燥箱: 上海博运实业有限公司医疗设备厂制造; DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器: 巩义市于华仪器有限责任公司产品; UV-7504 型紫外可见分光光度计: 上海精密科学仪器有限公司产品; 光学显微镜: 凤凰光学集团有限公司产品; STA 449C 型综合热分析仪: 德国耐驰仪器制造有限公司产品; WQF-510 傅里叶变换红外光谱仪: 上海第二光学仪器厂制造; THZ-82 水浴恒温振荡器: 金坛市荣华仪器制造有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 含量测定方法的确定 精密称取 CCN 11.1 mg 加入适量乙醇溶液溶解, 将其移入 100 mL 的棕

色容量瓶中, 并用乙醇稀释至刻度, 摇匀制成储备液备用。取储备液稀释适当倍数, 以乙醇溶液为空白对照, 在 200~800 nm 进行紫外扫描得 CCN 紫外吸收光谱, 确定最大吸收波长。取 HBCD 适量溶于乙醇中, 以乙醇溶液为空白对照, 在 200~800 nm 进行紫外扫描, 确定辅料有无干扰。精密量取上述母液 10 mL 于 100 mL 的容量瓶中, 用无水乙醇定容至刻度线, 稀释摇匀。取该溶液 1、2、3、4、5 mL 于 10 mL 的容量瓶中, 用无水乙醇定容至刻度线, 稀释摇匀。以乙醇溶液为空白对照, 在 425 nm 处测吸光度, 以 CCN 质量浓度 (C) 对吸光度 (A) 进行线性回归, 绘制标准曲线。按线性范围分别配制高、中、低 3 种浓度的 CCN 乙醇溶液, 在 425 nm 测定吸光度, 计算实际浓度。同日内测定日内精密度, 连续 3 d 测定日间精密度。称取已知含量的 CCIC 适量溶于乙醇溶液中, 移入 10 mL 的容量瓶加乙醇溶液至刻度。取 1 mL 上述溶液分别于 9 个 10 mL 的容量瓶中。取 CCN 储备液 1.1、1.4、1.7 mL 于上述容量瓶中, 每浓度设置 3 组平行, 用乙醇定容至刻度线摇匀。取出适量用乙醇稀释后, 于 425 nm 处测定吸光度值, 代入回归方程求出药物浓度, 并计算回收率。

1.2.2 CCIC 中 CCN 含量的测定 精密称取 CCIC 适量溶于乙醇溶液中, 移至 10 mL 的容量瓶中, 用乙醇稀释至刻度摇匀。取上述溶液再用乙醇溶液稀释适当倍数, 于 425 nm 处测定吸光度, 代入标准方程, 计算 CCIC 中 CCN 的含量。

1.2.3 CCIC 包合物的制备 采用研磨法制备 CCIC, 称取适量 HBCD 加入少量蒸馏水, 研磨均匀, 再缓慢加入 CCN, 边加边研磨至规定时间, 适当干燥, 沉淀用乙酸乙酯洗涤 3 次, 再于 30 °C 真空干燥 3 h, 研细即得 CCIC^[1]。

1.2.4 CCIC 最佳制备工艺的选择 选择 B 投料比 (CCN 与 HPCD 的摩尔比)、 C 包含温度、 D 研磨时间这 3 种对包合物制备影响较大的因素作为考察对象, 每因素各取 3 水平, 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验表设计实验方案, 见表 1。

表 1 CCIC 制备工艺因素-水平表

Table 1 Prepare of CCIC levels of factors

水平	因素		
	$B(\text{mol}:\text{mol})$	$C/^{\circ}\text{C}$	D/h
1	1:1	20	0.5
2	1:2	40	1.0
3	1:3	60	1.5

按正交实验设计表进行试验,以 CCN 溶解度为考察指标,确定最佳制备工艺^[2]。

1.2.5 相溶解度法测定 CCN 与 HBCD 的包含常数 精密称取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol HBCD 溶于 5 mL 蒸馏水中,向上述溶液中加入过量 CCN,放入恒温振荡器中(25±2) °C,振荡 24 h 使溶解达到平衡状态。取出溶液 1 mL,微孔滤膜过滤,滤液用乙醇稀释至适当倍数,在 425 nm 处测定紫外吸光度。以 CCN 含量对 HBCD 含量作图,即得相溶解度图^[3-5]。

1.2.6 溶解度测定 称取适量 CCN 溶于 25 mL 蒸馏水中制备成过饱和溶液,于磁力搅拌器上搅拌,不同时间取样 1 mL,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,滤液用乙醇稀释适当倍数,在 425 nm 处测定吸光度值。溶解平衡时间为相邻样品测定的 A 值小于 0.004 时所对应的时间。按最优化处方工艺制备 CCIC,称取适量溶于 25 mL 蒸馏水中制备成 CCN 过饱和溶液,同方法 1.2.2 取样并处理,测定吸光度值,计算得 CCIC 中 CCN 在蒸馏水中溶解度^[6]。

1.2.7 包含物的鉴定 包含物的鉴定有显微观察法,差示量热扫描分析和红外分光光度法。显微观察法是分别取 CCN、HBCD、CCN 与 HBCD 物理混合物、CCIC 在光学显微镜下观察。差示量热扫描分析是分别取 CCN、HBCD、CCN 与 HBCD 物理混合物、CCIC 进行差示扫描量热分析,以 Al₂O₃ 为参比,升温速度为 10 °C/min,氮气流速为 20 mL/min,扫描范围为-20~350 °C,取样量为 5 mg。分别记录升温曲线。红外分光光度法是将 CCN、HBCD、CCN 与 HBCD 物理混合物、CCIC 加入适量 KBr 压片,在 4000~400 cm⁻¹ 范围内累加扫描 8 次,分辨率为 2 cm⁻¹。

1.2.8 计算机拟合分子包含 采用基于 CHARMM 的能量产生模型模拟 CCN 和 HBCD 的化学结构计算包含前后的能量变化及可能的构象^[7]。

2 结果与讨论

2.1 含量测定方法建立 CCN 储备液以乙醇稀释后的紫外吸收光谱见图 1,由图 1 可知 CCN 在 425 nm 处有最大吸收峰。HBCD 的乙醇液在 425 nm 处没有吸收,不干扰 CCN 测定,所以选择 425 nm 为测定波长。以 CCN 质量浓度(C)对吸光度(A)进行线性回归,得线性回归方程 $A=0.149\ 3C+0.005\ 8$, $R=0.999\ 9$ 。CCN 在 1.1~5.5 μg/mL 浓度范围内与吸光度呈现良好的线性关系,见图 2。日内精密度的结果

见表 2,日间精密度的结果见表 3。从表 2 和表 3 中可以看出,溶液高、中、低浓度日内 RSD 为 0.91%、0.35%、0.58%;日间 RSD 为 1.23%、0.47%、0.75%,精密度的结果符合要求。平均回收率分别为 99.42%、100.14%、100.12%,RSD 为 0.45%、0.92%、1.17%,见表 4。

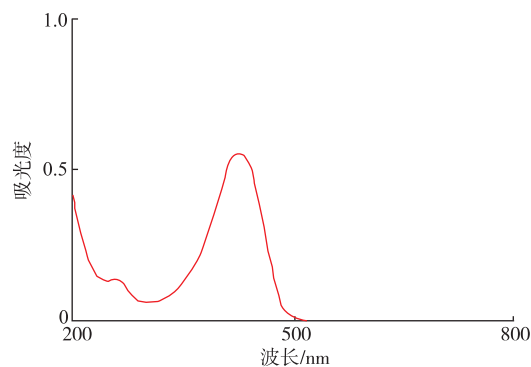


图 1 CCN 的乙醇溶液紫外扫描图

Fig. 1 Ultraviolet scanning spectrum of CCN ethanol solution

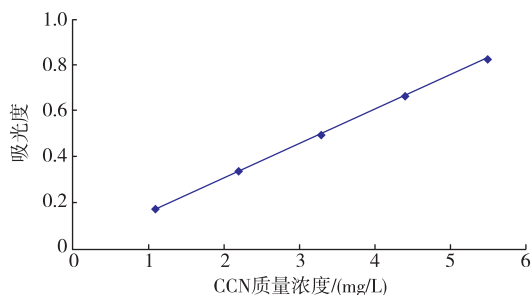


图 2 CCN 的无水乙醇溶液标准曲线

Fig. 2 Standard curve of the CCN in ethanol

表 2 日内精密度的测定结果

Table 2 Result of the intra-day precision

质量浓度/ (μg/mL)	1/ (μg/mL)	2/ (μg/mL)	3/ (μg/mL)	平均值/ (μg/mL)	RSD/ %
低	1.09	1.10	1.11	1.11	0.91
中	3.28	3.28	3.30	3.29	0.35
高	5.52	5.53	5.47	5.51	0.58

表 3 日间精密度的测定结果

Table 3 Result of the inter-day precision

质量浓度/ (μg/mL)	1/ (μg/mL)	2/ (μg/mL)	3/ (μg/mL)	平均值/ (μg/mL)	RSD/ %
低	1.10	1.09	1.07	1.09	1.23
中	3.28	3.28	3.26	3.27	0.47
高	5.52	5.49	5.44	5.48	0.75

表 4 回收率试验

Table 4 Recovery experiment

样品质量/ (μg)	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
150.84	122.1	271.40	98.98	99.42	0.45
	122.1	272.74	99.87		
	122.1	272.07	99.42		
	155.4	306.90	100.44	100.14	0.92
	155.4	306.23	99.10		
	155.4	307.57	100.88		
	188.7	340.39	100.56	100.12	1.17
	188.7	341.06	101.01		
	188.7	339.72	98.79		

2.2 CCIC 最佳制备工艺的选择

按正交实验设计表进行试验,以 CCN 溶解度为考察指标,确定最佳制备工艺。正交实验结果见表 5,方差分析结果见表 6。

表 5 正交试验结果

Table 5 Result of the results of orthogonal experiment

实验号	因 素			溶解度/ (mg/mL)
	A/(mol:mol)	B/ $^{\circ}\text{C}$	C/h	
1	1	1	1	1.08
2	1	2	2	1.49
3	1	3	3	1.76
4	2	1	3	0.85
5	2	2	1	1.55
6	2	3	2	0.83
7	3	1	2	0.76
8	3	2	3	0.40
9	3	3	1	0.28
K_1	1.44	0.90	0.77	
K_2	1.08	1.15	0.87	
K_3	0.48	0.96	1.36	
R	0.96	0.25	0.59	

表 6 方差分析结果

Table 6 Results of analysis of variance

因素	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
B	1.42	2	283.60	$P<0.05$
C	0.10	2	20.40	$P<0.05$
D	0.59	2	117.60	$P<0.05$
误差	0.01	2		

注: $F_{0.10}(2,2)=9.00$; $F_{0.05}(2,2)=19.00$

由表 5 正交实验结果可知因素 B 包含投料比的极差 R 最大,所以其对包含实验的影响最大,其次依次为因素 D 研磨时间和因素 C 包含时间。由表 6 方差分析结果可知 3 种因素对实验均有显著影响($P<0.05$)。实验结果较大者为最优处方,根据结果确定最优处方工艺为 $B_1C_2D_3$ 。即包含投料摩尔比为 1:1,研磨温度为 40°C ,包含时间为 1.5 h。按照最优化处方工艺 $B_1C_2D_3$ 重复制备 3 批 CCIC,用“1.2.6 溶解度测定”中方法测定每批 CCIC 溶解度,得到最优化处方工艺下 CCN 的溶解度为 $(1.72\pm0.03)\text{mg/mL}$ 。

药物与环糊精一般形成 1:1 或 1:2 的包合物。由相溶解度法测定 CCN 与 HBCD 的包含常数,得到 CCN 与 HBCD 形成包合物的理论摩尔比为 1:1。而通过正交试验也验证了当 CCN 与 HBCD 的投料摩尔比为 1:1 时,形成的 CCIC 有最大溶解度。

由正交试验得出制备 CCIC 的最优工艺为:包含投料摩尔比为 1:1,研磨温度为 40°C ,包含时间为 1.5 h。随包含时间增加,包含效果也增加。而随温度的增加,包含效果却是先升高后降低,可能是由于 CCIC 在较高温度下不稳定。

2.3 相溶解度法测定 CCN 与 HBCD 的包含常数

相溶解度图见图 3。

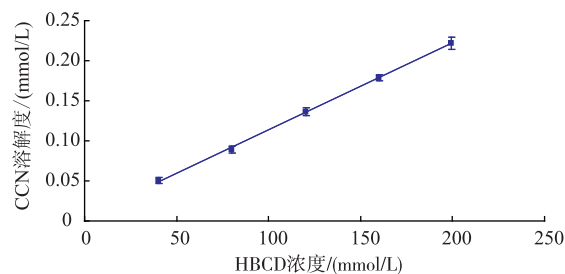


图 3 CCN 相溶解度曲线

Fig. 3 Phase solubility diagram of the CCN

由图 3 可知 CCN 溶解度随 HBCD 的增加而增加。CCN 溶解度对 HBCD 浓度作图直线,二者具有线性关系。直线方程为 $y=0.001x+0.0004$, $R^2=0.9994>0.9900$ 为 AL 型。形成包和物的化学计量比为 1:1。由包含平衡常数 $K=\text{斜率}/\text{截距}(1-\text{斜率})$ ^[8] 得出 $K=2.50\times10^3\text{ L/mol}$ 。

$K_{1:1}$ 的数值范围在 $0\sim1.00\times10^5\text{ L/mol}$,包含平衡常数 K 越大,药物与环糊精形成的包合物越稳定。当包含平衡常数 K 小于 80 L/mol 时,则药物不适宜制备成包合物。相平衡溶解度法测得 CCN 与 HBCD 包含平衡常数 $K=2.50\times10^3\text{ L/mol}$,包含平衡

常数较大,形成的包合物较稳定。

2.4 溶解度测定

实验表明 CCN 达到溶解平衡的时间为 30 min。按最优化处方工艺制备 CCIC 中 CCN 在蒸馏水中溶解度为 (1.76 ± 0.02) mg/mL ($n=3$)。

2.5 包合物的鉴定

显微观察法显示:在光学显微镜下观察,CCIC 为不规则形状,明显不同于 CCN 和 HBCD 的简单物理混合物,证明形成了 CCIC。差示量热扫描图谱见图 4。CCN 在 175 °C 有一个吸热峰,为药物的熔融峰。CCN 与 HBCD 物理混合物在该温度时有此吸热峰,而在 CCIC 中该吸热峰前移,峰型也明显减小,表明 CCN 与 HBCD 形成了包合物。红外分光光度法图谱见图 5。通过比较药物包合前后在红外区吸收的特征差异,根据吸收峰的变化情况(吸收峰的降低、位移或消失),以此证明药物与环糊精是否产生包合作用。在包合物图谱中药物特征吸收峰 $1\ 207\text{ cm}^{-1}$ 峰消失, $1\ 510$ 、 $1\ 457$ 、 $1\ 282$ 、 $1\ 153\text{ cm}^{-1}$ 峰强度明显减弱,表明 CCIC 形成。

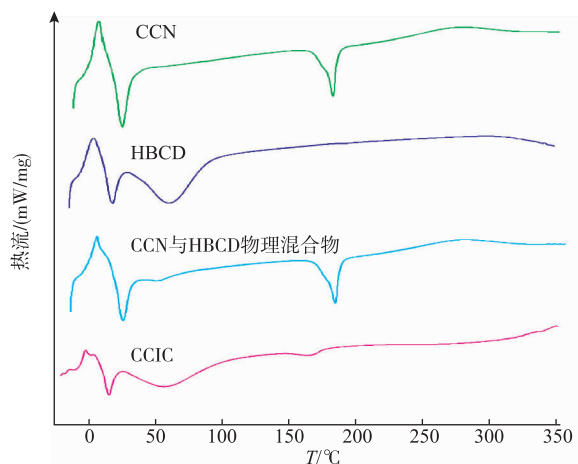


图 4 差示扫描量热图

Fig. 4 Differential scanning calorimetry analysis

2.6 计算机拟合分子包合物

计算机模拟研究结果说明包合后体系能量下降了约 175.728 kJ/mol, 提示 HBCD 可能包含 CCN 后形成了 CCIC, 其可能的构象见图 6。CCN 和 HBCD 的化学结构包合前后的能量变化见表 7。

3 结 语

本实验通过预试验对饱和水溶液法、研磨法、超声法制备 CCIC 进行比较, 得出研磨法制备的

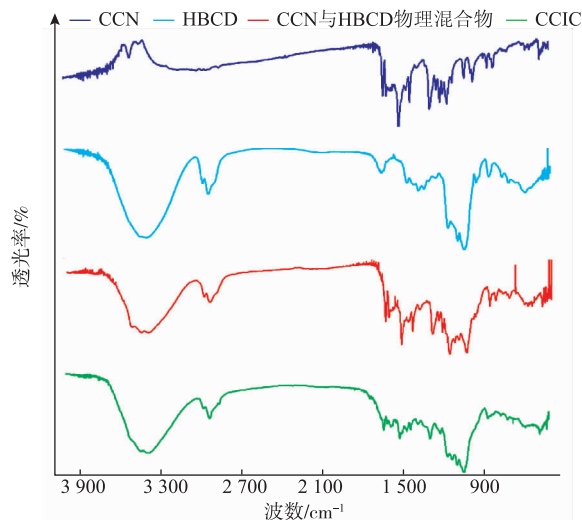
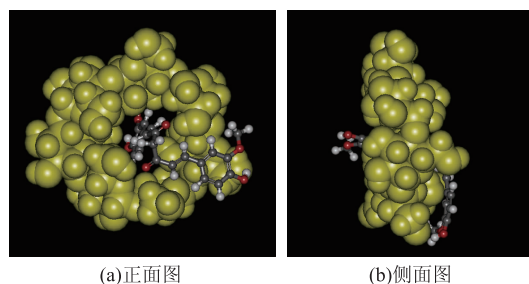


图 5 红外吸收光谱图

Fig. 5 Infrared absorption spectrogram



绿色环状结构为 HBCD 分子,骨架结构为 CCN 的结构,红色为氧原子,灰色为碳原子,白色为氢原子。

图 6 CCIC 计算机拟合得到的构象图

Fig. 6 Computer fitting conformation

表 7 分子拟合 CCIC 包合前后的能量变化

Table 7 Energy changes of inclusive CCIC according to the molecular modeling

参数	能量/(kJ/mol)		
	包合前 E_1	包合后 E_2	结合能 $E(E=E_1-E_2)$
总能量	855.13	679.94	175.14
静电引力	-299.57	-362.17	62.59
范德华力	-56.44	-168.99	112.55
弯折作用能	76.19	76.19	0.00
二面角能	785.96	785.96	0.00
键角能	348.65	348.65	0.00
非正常扭矩	0.29	0.29	0.00

CCIC 较其它两种方法制备的 CCIC 溶解度高,所以选用研磨法制备。HBCD 水溶性较 β -环糊精大^[9],通过预试验对 HBCD 和 β -环糊精进行了考察,研磨法制备 HBCD 和 β -环糊精包合物,HBCD 包合物溶

解度明显高于 β -环糊精包合物。所以试验选择以 HBCD 为材料研磨法制备 CCIC。

CCN 在蒸馏水中的溶解度为 4.5×10^{-5} mg/mL,

制备成包合物后 CCN 溶解度增大了 3.82×10^4 倍。

由此可见将 CCN 制备成 CCIC, 可大大提高 CCN 在水溶液中的溶解度。

参考文献:

- [1] LIU Shan, TAN Qunyou, LIU Juan, JI Liu, et al. Study on taste-masking inclusion compound of dextromethorphan [J]. **Chin JMAP**, 2010, 27(5): 414-418. (in Chinese)
- [2] PAULA D W X, DENADAI A M, SANTORO M M, et al. Supramolecular interactions between losartan and hydroxypropyl- β -CD: ESI mass-spectrometry, NMR techniques, phase solubility, isothermal titration calorimetry and anti-hypertensive studies[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2011, 404(1-2): 116-123
- [3] JIANG Y, SHA X, ZHANG W, et al. Complex of 9-nitro-camptothecin in hydroxypropyl- β -cyclodextrin: In vitro and in vivo evaluation[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2010, 397: 116-121.
- [4] QIAN L, GUAN Y, XIAO H. Preparation and characterization of inclusion complexes of a cationic β -cyclodextrin polymer with butylparaben or triclosan[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2008, 357: 244-251.
- [5] RANPISE N S, KULKARNI N S, MAIR P D, et al. Improvement of water solubility and in vitro dissolution rate of aceclofenac by complexation with beta-cyclodextrin and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin [J]. **Pharmaceutical Development and Technology**, 2010, 15: 64-70.
- [6] HIRLEKAR R, KADAM V. Preformulation study of the inclusion complex warfarin- β -cyclodextrin[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2005, 291: 3-10.
- [7] MATILAINEN L, TOROPAINEN T, VIHOLA H, et al. In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells[J]. **Journal of Controlled Release**, 2008, 126: 10-16.
- [8] LIU Juan, TAN Qunyou, LU Weiping, et al. Study on inclusion process of rifampicin β -cyclodextrin inclusion complex [J]. **Chinese Journal of Hospital Pharmacy**, 2010, 30: 40-42. (in Chinese)
- [9] ZHANG Li, TAN Qunyou, CHEN Liang, et al. Preparation of inclusion compound pyridostigmine bromide- β -cyclodextrin [J]. **Chinese Journal of Hospital Pharmacy**, 2010, 30(6): 466-470. (in Chinese)

科 技 信 息

欧盟批准一种酶制剂作为饲料添加剂

据欧盟网站消息, 2017 年 10 月 18 日欧盟发布 (EU) 2017/1896 条例, 修订 (EC) No 255/2005, 废止 (EC) No 668/2003, 批准一种酶制剂作为饲料添加剂。

据了解, 这种酶制剂为黑曲霉 (NRRL 25541) 产生的 1,3(4)- β -葡聚糖内切酶 (endo-1,3(4)- β -glucanase) 和 1,4- β -木聚糖内切酶 (endo-1,4- β -xylanase) 制剂。该制剂作为饲料添加剂后, 适用的动物品种有肉鸡、蛋鸡、肉用猪、肉用稀有家禽、肉用稀有猪种。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟批准一种酶制剂作为饲料添加剂 [EB/OL]. (2017-10-19). <http://news.foodmate.net/2017/10/446770.html>