

文章编号: 1673 1689(2010)05-0721-05

葛根素-羟丙基-β-环糊精包合物的制备及表征

张东升¹, 夏荣光², 张银志³, 王红连¹, 徐淏¹, 赵晓联*¹

(1. 江苏省苏微微生物研究有限公司, 江苏 无锡 214063; 2. 句容茅宝山葛业有限公司, 江苏 句容 212400; 3. 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以 HP-β-CD 作为客体分子葛根素的载体, 采用均匀设计法研究制备包合物的最优工艺, 采用圆二色谱, 红外光谱, 紫外光谱, 薄层色谱等方法对产物进行了表征, 研究表明: 产物的溶解度、光学特性、亲水性质等得到改善, 为开发具有延缓葛根素作用时间的新口服剂型提供了理论依据。

关键词: 葛根素; 羟丙基-β-环糊精; 包合物

中图分类号: TS 236.9

文献标识码: A

Preparation and Properties of the Inclusion Compound of Puerarin with Hydroxypropyl-β-cyclodextrin

ZHANG Dong-sheng¹, XIA Rong-guang², ZHANG Yin-zhi³, WANG HONG-lian¹, XU Hao¹, ZHAO Xiaolian*¹

(1. Jiangsu Su Wei Institute of Microbiology Co., LTD, Wuxi 214063, China, 2. Ju Rong Mao Bao Shan Ge Ye Co., LTD, Jurong 212400, China; 3. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Uniform Design was used to select the best inclusion processing conditions for the compound of puerarin with hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD). CD, TLC, UV and IR were applied to verify the inclusion complex. Experiments showed that solubility, optical properties, hydrophilic nature of the inclusion complex had been improved. That provided a theoretical basis in order to develop the role of the time delay of puerarin new oral dosage form.

Key words: puerarin; HP-β-CD; inclusion compound

葛根素为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Owi 或葛根藤 *P. thomsonii* Benth. 的根中提取的最主要异黄酮类化合物, 具有抗心肌缺

血, 扩血管, 降血压, 抗血栓等功能^[1]。正常成人口服葛根素 36 h 后仅有 0.79% 以原形自尿中排出, 72 h 后自粪便排出 73.3%^[2], 因此葛根素的口服利

收稿日期: 2009-12-25

基金项目: 镇江市科技计划项目 (NY2008009)。

作者简介: 张东升 (1975-), 男, 江苏盐城人, 助理研究员, 主要从事功能性食品的研究与开发。Email: zds0127@sina.com

* 通信作者: 赵晓联 (1968-), 男, 江苏宜兴人, 研究员, 工学博士, 主要从事食品安全与功能性食品的开发。

Email: zhaoXL118@263.net

用率较低。羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD)具有内亲油外亲水的无顶圆锥状空腔结构,易与客体分子形成复合物,从而使相关客体分子溶解度、光学特性、亲水性得到改善^[3],且与β-环糊精相比,其常温水溶性更大,无毒,易与生物环境相容,溶血作用也显著降低,被视为最有应用前景的β-环糊精衍生物^[4,5]。

作者采用HP-β-CD作为客体分子葛根素的载体,利用均匀设计法研究制备包合物的最优工艺,并利用圆二色谱等手段进行包合物的鉴定。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

葛根素:健康食品研究室提供,纯度98%,葛根素标准品:中国药品生物制品检定所提供;HP-β-CD:上海西宝生物科技有限公司产品;β-环糊精:国药集团化学试剂公司产品。圆二色谱仪:MOS-450,法国BioLogic公司产品,红外光谱仪:NICO-LET NEXUS 470,热电公司产品;紫外-可见分光光度计:Cintra 10e, GBC 公司产品;冻干机:Lyph. lock 6,美国Labconco公司产品;磁力搅拌器:IKA 公司产品,恒温箱:上海博讯实业有限公司医疗设备厂产品。

1.2 包合物的制备

1.2.1 葛根素-HP-β-CD 包合物的制备工艺 取0.8325 g的葛根素,用一体积分数95%乙醇热溶,缓缓滴加到含等摩尔HP-β-CD的水溶液中,50 Hz超声1 h后,在一定的温度下磁力搅拌混合一定的时间,真空浓缩,冰箱预冻24 h,冷冻干燥,粉碎即得。

1.2.2 均匀设计 为了使客体分子在主体中均匀分散,以利包含多以各种有机溶媒对客体分子进行预处理。试验以包含的温度、时间和溶解葛根素所用的溶媒——乙醇体积与水溶液体积比为主要影响因素,不同水平,以包含物得率为指标,进行均匀设计^[6]。试验设计采用 U_n^* 表,选用混合均匀设计表 $U_{12}(12 \times 4^2)$,均匀设计偏差为 $D=0.2663$ 。

1.2.3 标准曲线的建立 精密称取葛根素标准品4.00 mg于50 mL容量瓶中,体积分数50%乙醇水溶液定容,配制成0.08 g/L的母液,取少量,适当稀释后进行紫外光谱扫描,确定最大的吸收波长为249 nm。分别移取母液0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,体积分数20%乙醇定容于10 mL的容量瓶中,配制成2、4、8、12、16、20 mg/L的标准溶液,249 nm下测定吸光度,得标准曲线。

表1 均匀设计各因素水平

Tab. 1 The level of each factor uniform design

水平	因素		
	时间/min	温度/℃	体积比/%
1	30	30	10
2	60	40	20
3	90	50	30
4	120	60	40
5	150	-	-
6	180	-	-
7	210	-	-
8	240	-	-
9	270	-	-
10	300	-	-
11	330	-	-
12	360	-	-

1.2.4 包合物的稳定常数及摩尔比测定 采用相溶解度实验^[7]。取不同质量分数(0%、0.25%、0.5%、1.0%、2.0%)HP-β-CD的水溶液各20 mL,均加入过量葛根素0.2 g,50 Hz超声波作用1 h,60℃振荡器避光振荡24 h,静置3 d,0.45 μm滤膜过滤,滤液定容至100 mL。取滤液0.2 mL,体积分数20%乙醇定容至10 mL后,再稀释50倍,249 nm下测定吸光度,依据1.2.3标准曲线计算出葛根素的摩尔浓度为纵坐标,以HP-β-CD的摩尔浓度为横坐标作图,进行线性回归。

1.2.5 包含物得率的测定 称取包含物50 mg置具塞试管中,加乙酸乙酯5 mL振荡处理5 min,离心去除清液(洗脱未包含的葛根素),残渣置50 mL容量瓶中,加无水乙醇超声溶解,放冷,摇匀,无水乙醇稀释至刻度,取0.5 mL用20%乙醇稀释一定倍数,以溶剂为空白对照,249 nm测定紫外吸收,计算包含物得率。

包含物得率=包含物实测质量/(HP-β-CD质量+葛根素质量)×100%

1.2.6 溶解度测定 取过量恒重(W_1)的葛根素、HP-β-CD-葛根素包含物、β-CD-葛根素包含物分别置于大试管中,加水(V)制成过饱和溶液,30℃水浴溶解,常温静置3 d,0.45 μm滤膜过滤,滤渣恒重(W_2),计算各物质常温(15℃)下水中的溶解度(S)。

溶解度 $S(\text{mol/L}) = (W_1 - W_2)/(M \cdot V)$
 M 为摩尔质量。

1.3 包合物的表征分析

1.3.1 圆二色谱法 平面偏振光通过光学活性物质时,圆偏振光除发生旋转外,还发生被吸收的现象,导致左右旋转圆偏振光的能量不同,振幅也不同,此现象称为圆二色性^[8]。190~310 nm 波长下测定等摩尔浓度(5.0×10^{-3} mol/L)的葛根素水溶液、HP-β-CD 水溶液、葛根素-HP-β-CD 包合物水溶液的旋光度,以波长为横坐标,圆二色性物质的旋光度为纵坐标绘图。从曲线的形状来判断包合物的形成。

1.3.2 红外光谱 将葛根素、葛根素-HP-β-CD 包合物、HP-β-CD 和两者的物理混合物进行 KBr 压片,分辨率: 4 cm^{-1} ,扫描次数: 32 次,得到相应的红外图谱。由于环糊精在 $4\ 000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 范围内吸收峰很强,容易掩盖客体分子的吸收峰,比较包合物的图谱中谱峰的位移或新峰来定性说明包合物的形成。

1.3.3 紫外光谱扫描 取 1.2.6 的过滤液,稀释一定倍数,进行 HP-β-CD 葛根素包合物饱和水溶液与葛根素标准品饱和水溶液的紫外扫描,比较两者紫外光谱的最大吸收峰的位置和高度,以此来判断包合物的形成。

1.3.4 薄层色谱法 称取包合物 50 mg 置具塞试管中,加乙酸乙酯 5 mL 振荡处理 5 min,离心去除清液,重新加乙酸乙酯 10 mL 振荡处理 15 min,离心,倾出上清液为乙酸乙酯提取液;残渣加无水乙醇 10 mL 振荡处理 15 min,离心,倾出上清液为无水乙醇提取液;取 5 mg 葛根素标准品,乙酸乙酯 10 mL 溶解,作为对照品溶液。以 $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=10:0.5$ 溶剂系统展开上述提取液,观察色谱展开后的斑点位置。

2 结果与讨论

2.1 葛根素-HP-β-CD 包合物的制备工艺条件优化

2.1.1 回归模型的建立及预测 采用均匀设计分析软件(Uniform Design Version 3.0)对表 2 进行二次回归模型。采用逐步回归法,显著性水平 $\alpha=0.05$,引入变量的临界值 $F_{\alpha}=2.000$,剔除变量的临界值 $F_{\alpha}=2.000$ 。回归方程: $y=76+0.010\ 75 \times X_1-0.003\ 886 \times X_2^2+0.017\ 85 \times X_2 \times X_3-0.020\ 36 \times X_3^2$, (复相关系数 $R=0.942\ 2$, 剩余标准差 $S=2.012$)。由回归方程项中可以发现时间因素有利于包合,而温度、乙醇体积分数则表现出一定的负影响,尤其乙醇影响最大,但温度升高导致乙醇的挥发,降低了乙醇的体积分数,增加包合的趋势。

利用单纯形法进行试验优化,结果显示, $X_1=360$, $X_2=60$, $X_3=26.3$ 为试验的最优条件,此时的包合物得率 y 预期最大值为 $79.97(\pm 8.659)$ 。

表 2 试验设计与结果

序号	时间 X_1 / min	温度 X_2 / °C	体积比 X_3 / %	包合物得率 / %
1	1	2	2	75.56
2	2	3	4	72.41
3	3	4	2	75.16
4	4	1	4	60.38
5	5	3	2	77.81
6	6	4	4	73.72
7	7	1	1	77.71
8	8	2	3	77.46
9	9	4	1	74.89
10	10	1	3	75.34
11	11	2	1	78.13
12	12	3	3	76.09

2.1.2 最优工艺条件的验证 根据均匀设计软件,推荐的最优条件按 1.2.1 方法制备出了 3 批包合物,与 1.2.5 中相同条件进行包合物得率的测定,包合物得率为 80.92% ,相对误差仅 1.188% ,与软件预测值基本一致,说明回归模型拟合正确。

2.2 标准曲线

以吸光度值为纵坐标,葛根素不同浓度为横坐标,得葛根素标准曲线 $y=0.0802x+0.012$,相关系数为 0.9998 。因 HP-β-CD 在 249 nm 无吸收,该曲线同样适用包合物中葛根素的测定。

2.3 包合物表征结果

2.3.1 紫外光谱扫描 葛根素的标准品紫外吸收扫描 $200 \sim 400 \text{ nm}$,最大吸收为 249 nm 。包合物的紫外吸收扫描 $200 \sim 400 \text{ nm}$,最大吸收也是 249 nm 。HP-β-CD 在 249 nm 处无吸收。包合物饱和水溶液与葛根素的饱和水溶液相比,其紫外光谱的最大吸收峰没有明显的位移,但是吸光度明显的增强,说明形成包合物可以使葛根素在水中的溶解性显著的增强,由此判断包合物的形成。

2.3.2 红外光谱 图 1 可以看出,包合物和 HP-β-CD 的图谱较为一致,但是明显有别于葛根素的红外谱图,葛根素的特征谱峰 $1\ 700 \sim 1\ 100 \text{ cm}^{-1}$, $500 \sim 900 \text{ cm}^{-1}$ 中,羰基吸收峰发生红移至 $1\ 620 \text{ cm}^{-1}$ 左右,其余的峰基本消失或减弱,说明葛根素进入 HP-β-CD 的空腔后,很多特征谱带被糊精所掩盖,但两者仍存在一些差异。如:HP-β-CD 的羟基

特征峰 3406 cm^{-1} 向低波数位移至 3395 cm^{-1} 附近, 羟基特征峰也向低波数方向移动, 且相对强度有些

变化。由此说明葛根素已经进入 HP- β -CD 的空腔, 形成了包合产物。

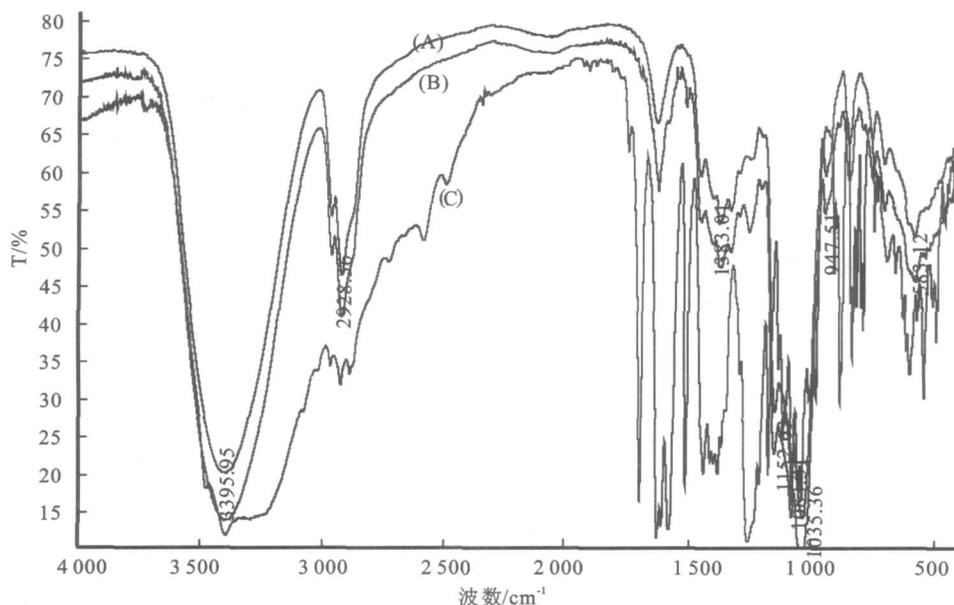


图1 包合物(A)、HP- β -CD(B)、葛根素(C) (由上至下)的红外光谱
Fig. 1 Infrared spectra of inclusion compound, HP- β -CD and puerarin

2.3.3 圆二色谱法 图2中(C)为葛根素的CD谱图, (B)为环糊精的CD谱图, (A)为包合物的CD谱图。根据无光学活性物质或光学活性物质进入CD空腔时, 受环糊精不对称场的作用, 客体发色基团的波长区域将产生外旋性科顿效应的原理, 来确定包合物的形成。葛根素属黄酮苷类物质, 其结构中含有D-葡萄糖, 故有光学活性, 葛根素在200 nm、227 nm、243 nm、254 nm处具有较强的CD谱带, 而HP- β -CD几乎无圆二色光谱性质, 但其包合物在195、211、225 nm处的圆二色光谱图则明显区别于葛根素本身的谱图。说明葛根素在进入HP- β -CD空腔后, 可能其电子偶极矩与CD空腔的对角线平行或形成较小的角度, 从而导致葛根素的圆二色光谱的消失或减弱。

2.3.4 薄层色谱法 无水乙醇提取液与葛根素对照品有相同的荧光点, 说明无水乙醇处理包合物时, 发生了解离葛根素游离出来, 且解离出来的客体分子与对照品有相同的展开距离, 说明物质性质没有发生改变。而乙酸乙酯提取液在相同位置, 没有有展开斑点, 可见包合物已经形成, 且乙酸乙酯处理时不会使葛根素游离出来。

2.4 包合常数的确定

经回归拟合的曲线为: $Y = 0.6486X + 0.0103$, 相关系数为0.9978。由此说明包合物的摩尔组成为1:1^[9]。由该回归方程对应直线的

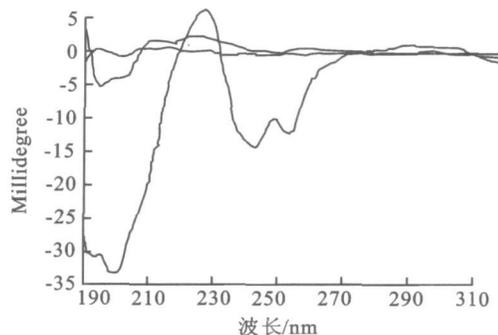


图2 包合物(A)、HP- β -CD(B)和葛根素(C)的圆二色谱图
Fig. 2 circular dichroism spectra of puerarin, inclusion compound, HP- β -CD

斜率和截距, 可以求出包和常数 $K = \text{斜率} / [S]_0$ (\uparrow 斜率), 经计算葛根素常温下的溶解度 $[S]_0$ 为 0.0103 mol/L , 包含常数为 179.20 L/mol 。包含常数也称稳定性常数, 是研究客体分子形成包合物后理化性质改变的重要指标之一, 其值越大表示越容易形成包合产物。

2.5 溶解度测定

葛根素在水中的溶解度为 0.0103 mol/L ; 而葛根素- β -CD包合物水中的溶解度为 0.0161 mol/L ; 葛根素-HP- β -CD包合物水中的溶解度为 $>0.4942\text{ mol/L}$, 是 β -CD葛根素包合物水中的溶解度的30.70倍。

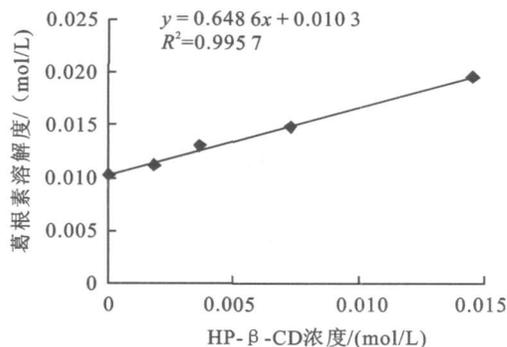


图3 葛根素在 HP-β-CD 中的相溶解度曲线

Fig. 3 The phase solubility of puerarin as a function of HP-β-CD concentrations

3 结语

通过混合水平的均匀设计模型所预测的最优条件被后续试验证实,进一步说明均匀设计是包合

物制备工艺优化的有效方法,具有较高的实用性。

圆二色谱、红外光谱、紫外光谱及薄层色谱的检测结果表明葛根素确实已被包合到 HP-β-CD 的空腔结构中;形成的包合物理化性质发生了不同客体分子的变化,突出表现在水中溶解度的显著增大,为开发具有延缓葛根素作用时间的新口服剂型提供理论依据。

由于 HP-β-CD 较母体 β-CD 具有更强的水溶性,所以在包合物制备时不需要饱和溶液,这有利于提高环糊精的利用率。葛根素溶媒(乙醇)体积的增加有降低包合的趋势^[10],若采用包合之初以适量的溶剂均匀分散葛根素,混匀后升高温度以减少乙醇的浓度来促进包合,从而合理可行的调控包合的生产工艺,对于工业化生产有一定的指导意义,这方面工作有待深入研究。

参考文献(References):

- [1] 侯家玉,方泰惠. 中药药理学[M]. 北京:中国中药出版社,1997.
- [2] 宋金春,邓睿园,陈佳丽,等. 羟丙基β-环糊精对葛根素的增溶作用及其包合物的研制[J]. 中国医院药学杂志,2008,28(13):1070-1074.
SONG Jin chun, DENG Rui yuan, CHEN Jia li, et al. Solubilization on puerarin by hydroxypropyl-β-cyclodextrin and preparation of their inclusion compound[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2008, 28(13):1070-1074. (in Chinese)
- [3] 赵榆林,杨波,毕莉,等. 羟丙基β-环糊精的制备及其表征[J]. 云南化工 2005, 32(2): 9-11.
ZHAO Yu lin, YANG Bo, BI Li, et al. Preparation and Properties of hydroxypropyl-β-cyclodextrin[J]. *Yunnan Chemical Technology*, 2005, 32(2): 9-11. (in Chinese)
- [4] Lajos Szente, Jozsef Szeji li. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1999, 36: 17-28.
- [5] 李文德,周俊侠,张力田,等. 环糊精的发展与改性研究[J]. 山西食品工业, 1996(1): 10-14.
LI Wen de, ZHOU Jun xia, ZHANG Li Tian, et al. Development and modification of cyclodextrins[J]. *Shanxi Food Industry*, 1996(1): 10-14. (in Chinese)
- [6] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京:科学出版社,1994.
- [7] Higuchi T, Connors KA. Phase solubility techniques[J]. *Adv Anal Chem Instrum*, 1965(4): 117-212.
- [8] 毕开顺. 环糊精包合物技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2007. 97-98.
- [9] 涂家生,王平. 硝苯地平β-环糊精包合物的研究[J]. 中国医药工业杂志, 1996, 27(12): 539-542.
TU Jia sheng, WANG Ping. Study on inclusion complex of nifedipine with β-cyclodextrin[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 1996, 27(12): 539-542. (in Chinese)
- [10] Tokomura T, Tsushima Y, Kayano M, et al. Enhancement of bioavailability of cinnarizine from its β-cyclodextrin complex on oral administration with DL-phenylalanine as a competing agent[J]. *J Pharm Sci*, 1985, 74: 496-497.

(责任编辑:朱明)