

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.09.012

◇ 药物分析 ◇

龙血竭-羟丙基- β -环糊精包合物的制备及评价

李争艳¹, 陈凌云², 罗静², 余晓玲¹作者单位:¹云南中医学院第三附属医院、昆明市中医医院制剂科, 云南 昆明 650051;²云南中医学院药学院, 云南 昆明 650200

通信作者: 余晓玲, 女, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向为医院制剂开发与应用, E-mail: 892535568@qq.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81360581); 昆明市科技计划项目(2015-1-S-00669, 2016-1-S-03316)

摘要:目的 制备龙血竭与羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)包合物, 提高龙血竭的溶解度。方法 通过测定龙血素A、B的含量, 计算包合率和包合物收率。在单因素试验的基础上, 以包合时间、包合温度、龙血竭与羟丙基- β -环糊精的质量比为影响因素, 以包合率和包合物收率的综合评分为评价指标, 使用正交试验法优化龙血竭的包合工艺。采用紫外光谱扫描法、差示扫描量热法、溶解度测定法对包合物进行评价。结果 最佳包合工艺: 包合时间2 h, 包合温度40℃, 龙血竭与HP- β -CD质量之比为1:8, 采用优选的工艺条件制备的龙血竭羟丙基- β -环糊精包合物的平均包合率为86.85%, 平均收率为79.18%。结论 该工艺的包合率及包合物收率较高, 包合效果较好, 可以明显提高龙血竭的溶解度。

关键词: 龙血竭; 羟丙基- β -环糊精; 包合物; 制备; 色谱法, 高压液相

Preparation and characterization of dragon's blood- HP- β -CD inclusion compound

LI Zhengyan¹, CHEN Lingyun², LUO Jing², YU Xiaoling¹

Author Affiliations: ¹Department of Production Section, The Third Affiliated Hospital of Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, Kunming, Yunnan 650051, China; ²College of Pharmacy, Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, Kunming, Yunnan 650200, China

Abstract: Objective Preparation of dragon's blood-HP- β -CD inclusion compounds to improve the solubility of dragon's blood. **Methods** By measuring the content of dragon blood A, B, calculating the inclusion rate and yield of inclusion, based on the single factor experiment, the preparation process was optimized by orthogonal test with inclusion time, inclusion temperature and ratio of dragon's blood to HP- β -CD as influencing factors, and inclusion rate and drug yield as evaluation index. The characterization was performed by UV spectroscopy, differential scanning calorimetry and solubility determination. **Results** The results showed that optimum preparation conditions for dragon's blood-HP- β -CD inclusion compound was as follow: the time of 2h, the temperature of 40℃ and dragon's blood to HP- β -CD ratio of 1:8. Under the optimized conditions, the inclusion rate of dragon's blood-HP- β -CD inclusion compound was 86.85%, the drug yield was 79.18%. **Conclusion** The process can improve the rate of inclusion and drug yield, and the solubility of dragon's blood.

Key words: Dragon's blood; HP- β -CD; Inclusion compound; Preparation; Chromatography, high pressure liquid

龙血竭为百合科植物剑叶龙血树(*Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen)的含脂树皮和木质部经提取得到的树脂^[1], 性味甘、温、咸、平, 归心、肝、经, 具活血散瘀、定痛止血、生肌敛疮的功效。现代研究证实, 龙血竭具有显著的抗炎止痛、抗菌、促进表皮修复、活血止血双向调节、调节血管新生、抗氧自由基等药理作用^[2-5]。环糊精(Cyclodextrin, CD)具有内腔疏水、外部亲水的特殊结构, 能与多种客体分子形成包合物, 具有毒副作用小、生物相容性好的优点^[6-9]。龙血竭微溶于水, 本研究自2017年10月至2018年3月将龙血竭用HP- β -CD包合后, 能

够使其使用方便、增加溶解度、增强疗效、提高生物利用度, 为后续的进一步研究提供便利。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪(自动进样器、DAD检测器、恒温柱温箱), C₁₈色谱柱(DIKAM柱, 4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 电子天平(奥豪斯仪器有限公司, 编号: 13512747373); 8002型数显恒温水浴锅(北京永光明医疗仪器厂); SHZ-DⅢ循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂); HJ-4B多头磁力加热搅拌器(常州国华电器有限公司); 差示热分析仪(上海精科天美科学仪器有限公司, 编号:

592114042011); DLSB-5L/10 低温冷却液循环泵(巩义市予华仪器有限责任公司); 电子天平(美国双杰兄弟(集团)有限公司, 编号: 2007063245); 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司, 编号: 92J044Y); UV-2450 紫外可见分光计(SHIMADZU)。

1.2 试药 龙血竭药材由昆明市中医医院提供; 龙血素 A 对照品(购自中国食品药品检定研究院, 批号为 110736-200934); 龙血素 B 对照品(购自中国食品药品检定研究院, 批号为 111558-201006); 羟丙基- β -环糊精(西安德立生物化工有限公司); 包合物(自制); 甲醇(天津市富宇精细化工有限公司); 95% 乙醇; 乙腈(默克股份两合公司); 冰醋酸(天津市大茂化学试剂厂); 娃哈哈纯净水; 硅胶 G 板(青岛海洋化工厂分厂)。

2 龙血竭包合物包合率的测定

2.1 HPLC 测定龙血素 A、B 的含量

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 DIKAMC₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.5% 冰醋酸(26:74); 检测波长: 275 nm; 进样量: 10 μ L; 流速: 1 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 理论塔板数以龙血素 A 计算不低于 6000。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别取龙血素 A、B 对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解制成分别含龙血素 A 86.4 μ g/mL, 龙血素 B 41.2 μ g/mL 的混合溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取龙血竭粉末约 0.1 g, 精密称定, 用甲醇使溶解并定容至 25 mL, 摇匀, 用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.1.4 包合物供试品溶液的制备 取包合物粉末约 0.5 g, 精密称定, 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 超声 20 min, 放冷, 摇匀, 用甲醇定容至刻度, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得包合物供试品溶液。

2.1.5 HP- β -CD 溶液的制备 取 HP- β -CD 0.1 g, 精密称定, 加甲醇使溶解并定容至 25 mL, 摇匀, 用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得 HP- β -CD 溶液。

2.1.6 专属性考察 按上述方法分别制备对照品溶液、供试品溶液、龙血竭包合物溶液及 HP- β -CD 溶液, 分别精密吸取 10 μ L 上述溶液于色谱仪中, 结果如图 1 所示。

2.1.7 线性关系 分别取龙血素 A、龙血素 B 对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解制成分别含龙血素 A 86.4 μ g/mL 龙血素 B 41.2 μ g/mL 的混合溶液。分别精密吸取 1、2、5、10、15、20、25 μ L 不同体积上述对照品溶液, 注入高效液相色谱仪, 测定龙血素 A、龙血素 B 色谱峰积分面积。以龙血素 A、龙血素 B 的进样量为横坐标, 其峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线(见图 2)。结果龙血素 A 对照品的回归方程为 $Y = 3\,735.9X - 6.052\,7$ ($R = 0.999\,9$), 表明在 0.086 4~2.16 μ g 范围内, 龙血素 A 峰面积与进样量有良好的线性关系; 龙血素 B 对照品的回归方程为 $Y = 3\,131.7X - 22.62$ ($R = 0.999\,9$), 表明在 0.041 2~1.03 μ g 范围内, 龙血素 B 峰面积与进样量有良好的线性关系。

2.1.8 稳定性试验 取龙血素 A、B 对照品, 包合物供试品适量依法制备对照品溶液和包合物供试品溶液, 于第 0、4、8、12、16 h, 分别吸取 10 μ L 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 结果表明对照品龙血素 A、B, 包合物龙血素 A、B 的 RSD 分别为 1.14%、1.88%、1.02%、1.25%, 稳定性良好。

2.1.9 重复性试验 取同一批次包合物粉末 6 份, 各 0.5 g, 精密称定, 按 2.1.4 项下包合物供试品制备方法制备样品, 按 2.1.1 项下的色谱条件进行龙血素 A、B 的含量测定, 结果表明包合物龙血素 A、B 的 RSD 分别为 1.24%、1.15%。该方法的重复性良好。

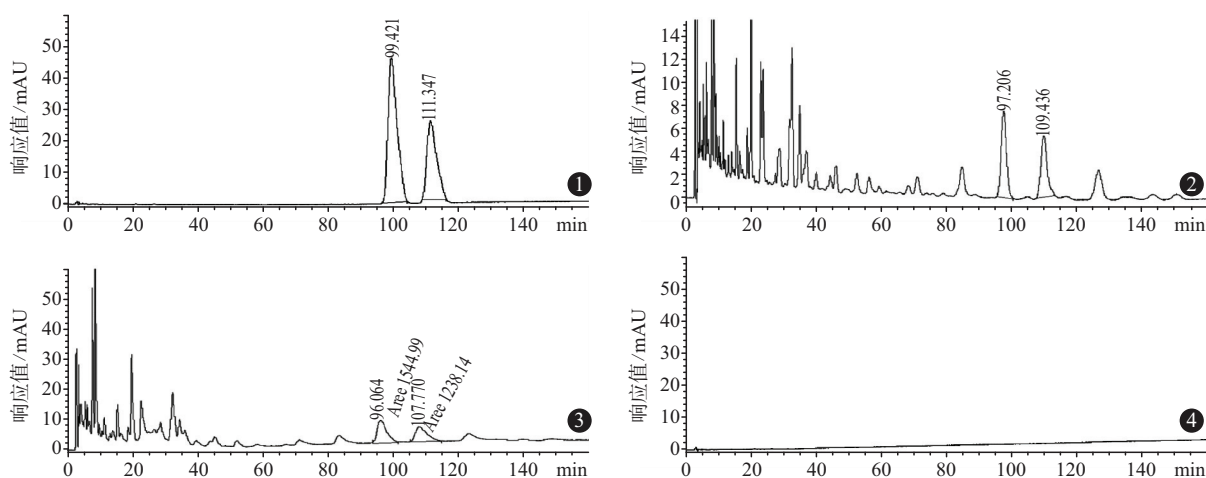


图1 龙血素 A、B 对照品、龙血竭药材、龙血竭包合物及羟丙基- β -环糊精的 HPLC 图谱: 1 为龙血素 A、B 对照品; 2 为龙血竭药材; 3 为龙血竭包合物; 4 为羟丙基- β -环糊精

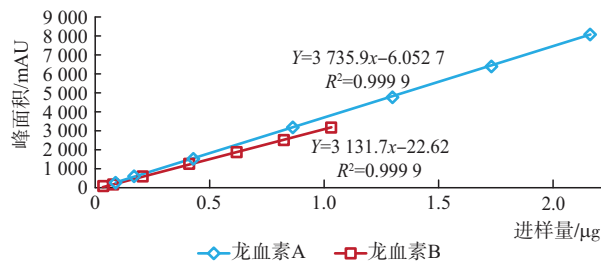


图2 龙血素A、B线性关系

2.1.10 准确度试验 取同一已知含量的龙血竭HP-β-CD包合物(含龙血素A 0.528 2 mg/g,龙血素B 0.595 9 mg/g)9份,每份0.5 g,精密称定,精密加入对照品溶液(含龙血素A 86.4 μg/mL,龙血素B 41.2 μg/mL)适量(5、10、15 mL三个不同水平,每个水平3份),甲醇定容到25 mL,用高效液相色谱仪测定龙血素A和龙血素B的含量,计算回收率,结果表明回收率符合规定。结果见表1,2。

表1 龙血素A加样回收率实验结果

序号	取样量/g	样品含量/μg	对照品加入量/μg	实际测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.507 4	268.01	432	695.32	98.91	99.26	1.33
2	0.502 1	265.21		693.24	99.08		
3	0.504 1	266.27		695.22	99.29		
4	0.506 8	267.69	864	1 121.52	98.82		
5	0.504 7	266.58		1 140.28	101.12		
6	0.503 6	266.00		1 135.25	100.61		
7	0.501 1	264.68	1 296	1 524.68	97.22		
8	0.501 4	264.84		1 568.54	100.59		
9	0.506 9	267.74		1 533.87	97.69		

表2 龙血素B加样回收率实验结果

序号	取样量/g	样品含量/μg	对照品加入量/μg	实际测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.507 4	268.01	206	475.25	100.60	100.11	1.84
2	0.502 1	265.21		478.55	103.56		
3	0.504 1	266.27		469.24	98.53		
4	0.506 8	267.69	412	672.88	98.35		
5	0.504 7	266.58		678.66	100.02		
6	0.503 6	266.00		684.98	101.69		
7	0.501 1	264.68	618	873.13	98.45		
8	0.501 4	264.84		890.75	101.28		
9	0.506 9	267.74		876.36	98.48		

2.2 包合率的测定及计算

2.2.1 包合率的测定方法 精密称取龙血竭HP-β-CD包合物0.5 g,置于10 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,超声20 min,放冷,摇匀,取续滤液,按2.1.1项下色谱条件进行含量测定。

2.2.2 包合率的计算 精密称取龙血竭粉末0.1 g,置于25 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,取续滤液,按2.1.1项下色谱条件进行含量测定。

包合率=包合物中龙血素A、B的量 / 投入龙血竭中龙血素A、B的量 (式1)

3 包合物制备工艺研究

3.1 单因素考察

3.1.1 包合温度对包合的影响 先精密称取龙血竭粉末,加入95%乙醇使其充分溶解,再精密称取HP-β-CD粉末至100 mL烧杯中,加入40 mL蒸馏水使其充分溶解,龙血竭与HP-β-CD主客分子质量比为1:8,分别在30、40、50、60℃不同温度下,边搅拌边向HP-β-CD水溶液中逐滴加入龙血竭乙醇溶液,恒温搅拌3 h,抽滤,滤液水浴蒸干,所得粉末即为龙血竭HP-β-CD包合物。按公式计算包合物的包合率,并进行综合评分。结果见表3。

包合物收率=包合物质量 / (投入的HP-β-CD质量 + 投入龙血竭质量) × 100% (式2)

综合评分=包合率×0.8+包合物收率×0.2 (式3)

表3 包合温度对包合的影响

序号	包合温度/℃	包合率/%	收率/%	综合评分/分
1	30	57.02	74.44	60.50
2	40	61.40	76.67	64.45
3	50	66.70	73.33	68.03
4	60	66.86	64.44	66.38

结果:由表3可知,随着温度的升高,包合率有所上升,但50℃到60℃变化并不明显。收率随温度上升而下降,50℃到60℃有较明显下降。综合评分随着包合温度的升高而升高,但当温度超过50℃时,综合评分减小,40℃和60℃的综合评分均小于50℃。综合考虑,实验中选择50℃为包合的最佳温度。

3.1.2 包合时间对包合的影响 先精密称取龙血竭粉末,加入适量95%乙醇使其充分溶解,再精密称取HP-β-CD粉末至100 mL烧杯中,加入40 mL蒸馏水使其充分溶解,主客分子质量比为1:8,边搅拌边滴加龙血竭乙醇溶液,50℃下恒温搅拌时间分别为1、2、3、4 h,抽滤,滤液水浴蒸干,即得龙血竭HP-β-CD包合物。结果见表4。

表4 包合时间对包合的影响

序号	包合时间/h	包合率/%	收率/%	综合评分/分
1	1	67.63	75.59	69.22
2	2	67.36	74.23	68.73
3	3	70.20	72.28	70.62
4	4	69.51	70.98	69.80

由表4可知,随着包合时间的增大,包合率和综合评分变化并不显著,收率有所降低,考虑到2 h和4 h的综合评分均低于3 h的综合评分,所以实验选择3 h为最佳包合时间。

3.1.3 包合速度对包合的影响 先精密称取龙血竭粉末,加入95%乙醇使其充分溶解,再精密称取HP- β -CD粉末至100 mL烧杯中,加入40 mL蒸馏水使其充分溶解,主客分子质量比为1:8,50℃下分别用不同速度搅拌3 h,边搅拌边滴加龙血竭乙醇溶液,滴加完毕开始计时,抽滤,滤液水浴蒸干即得龙血竭HP- β -CD包合物。结果见表5。

表5 包合速度对包合的影响

序号	包合速度/ (r/min)	包合率/%	收率/%	综合评分/ 分
1	600	67.60	70.24	68.13
2	400	69.73	73.90	70.56
3	200	67.53	71.80	68.38

由表5可知,随着搅拌速度的改变,对包合率和收率均没有太大影响,不过从表中可以看出,包合速度为400 r/min时,其包合率、收率和综合评分均高于其余两者,所以实验中选择包合速度为400 r/min。

3.1.4 主客分子质量比对包合的影响 先精密称取龙血竭粉末,加入95%乙醇使其充分溶解,再精密称取HP- β -CD粉末至100 mL烧杯中,加入40 mL蒸馏水,使其充分溶解,50℃下用中速搅拌3 h,主客分子质量比分别为1:6、1:8、1:10、1:12,边搅拌边滴加龙血竭乙醇溶液,抽滤,滤液蒸干,即得龙血竭HP- β -CD包合物。结果见表6。

表6 主客分子质量比对包合的影响

序号	主客分子质量比 (g/g)	包合/ %	收率/ %	综合评分/ 分
1	1:6	64.42	68.94	65.32
2	1:8	65.97	71.49	67.07
3	1:10	65.04	72.81	66.59
4	1:12	52.97	57.12	53.80

由表6可知,主客分子质量比为1:12的综合评分明显低于前三组,前三组实验的包合率、收率、综合评分均无太大差异,质量比为1:8的收率和综合评分均高于质量比为1:6和1:8,综合考虑,选择主客分子最佳质量比为1:8。

3.2 包合物制备工艺条件正交优选

3.2.1 正交试验设计 影响包合率的因素有很多,比如包合时间、包合温度、包合速度、主客分子质量比等因素。通过单因素考察试验选择包合时间、包

合温度、主客分子质量比作为正交试验因素,每个因素选择三个水平:包合时间2、3、4 h(A);包合温度40、50、60℃(B)及主客分子质量比1:6、1:8、1:10(C),以包合率和包合物收率的综合评分为评价指标,权重系数分别为0.8、0.2,进行3因素3水平 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,选择最佳制备工艺。因素水平表见表7、正交试验结果见表8、方差分析结果见表9。

表7 因素水平表

水平	A/h	B/℃	C/(g/g)
1	2	40	1:6
2	3	50	1:8
3	4	60	1:10

表8 正交试验结果

编号	A	B	C	D	包合 率/%	收率 /%	综合 评分/分
1	1	1	1	1	67.97	73.78	83.17
2	1	2	2	2	77.88	76.90	93.35
3	1	3	3	3	80.17	76.83	95.51
4	2	1	2	3	70.83	77.14	94.42
5	2	2	3	1	84.43	77.44	99.70
6	2	3	1	2	72.49	74.24	87.57
7	3	1	3	2	82.81	78.63	98.47
8	3	2	1	3	69.80	66.84	83.14
9	3	3	2	1	81.18	74.70	95.92
K_1	92.020	84.627	92.930	93.897			
K_2	92.063	94.563	93.130	92.510			
K_3	93.000	97.893	91.023	3.220			
R	0.980	13.266	2.107	90.677			

表9 方差分析结果

方差来源	偏平方和	自由度	F值	P值
A	15.652	2	1.929	19.000
B	1.840	2	0.227	19.000
C	258.831	2	35.231	19.000
误差	8.110	2		

注: $F_{0.05(2,2)} = 19.00$

通过统计分析,影响包合率的主次因素为 $C > A > B$,但是A、B两因素中的三个水平很接近,遵照操作方便原则,因素选择A1、B1,C因素中二、三水平比较接近,所以选择C2。最后确定包合物的制备工艺条件为A₁B₁C₂,即包合时间2 h,包合温度40℃,龙血竭与HP- β -CD质量之比为1:8。

3.2.2 包合工艺验证 根据正交试验优选的最佳制备工艺条件,平行制备三批包合物,并测定其包合率和包合物收率的综合评分。结果见表10。

由表10可知,综合评分均高于正交试验中各试验结果,三批包合物的包合率、收率和综合评分的相对平均偏差较小,说明该制备工艺重现性好,合理可行。

表10 包合工艺验证结果

编号	包合率/%	收率/%	综合评分/分
1	87.35	78.21	102.66
2	88.96	80.18	104.69
3	84.24	79.16	99.95
平均	86.85	79.18	102.43
相对平均偏差/%	2.00	0.84	1.62

4 包合物评价

4.1 紫外光谱扫描(UV) 将适量包合物、羟丙基- β -环糊精、龙血竭与羟丙基- β -环糊精物理混合物以及龙血竭分别溶于水中,在室温下于200~800 nm范围进行紫外扫描,结果如图3。

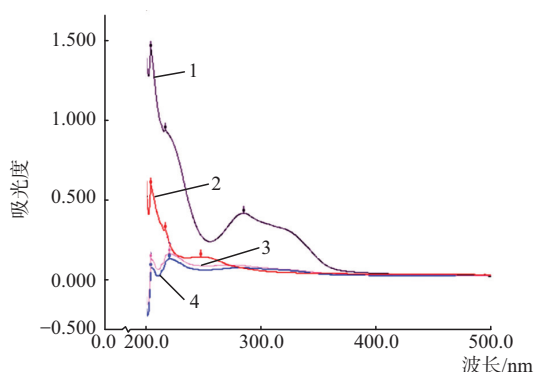


图3 紫外扫描图谱:1为包合物;2为HP- β -CD;3为物理混合物;4为龙血竭

由紫外扫描图谱可知,包合物在285 nm左右有1个吸收峰,HP- β -CD、物理混合物、龙血竭在285 nm处没有吸收峰,故表明龙血竭与HP- β -CD形成了新的物相。

4.2 差示扫描量热法(DSC) 精密称取龙血竭粉末、羟丙基- β -环糊精、龙血竭羟丙基- β -环糊精的简单混合物、包合物四个样品各5 mg进行差示扫描热分析:氧化铝为参比物,量程 $\pm 100 \mu\text{V}$,升温范围30~350 $^{\circ}\text{C}$,升温速率为10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,得DSC图谱,结果见图4。

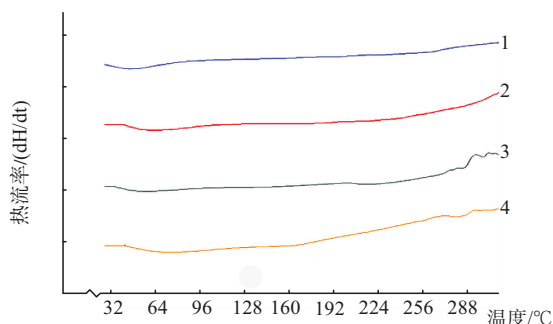


图4 DSC图谱:1为HP- β -CD;2为包合物;3为物理混合物;4为龙血竭

由DSC图谱可知,龙血竭与物理混合物二者都出现吸热峰,即游离龙血竭可产生吸热峰。而HP- β -CD未出现吸热峰,可排除载体材料的干扰。包合物没有出现

吸热峰,即可证明龙血竭与HP- β -CD形成了包合物。

4.3 溶解性 取10 mL水,分别精密称取龙血竭粉末和龙血竭-羟丙基- β -环糊精包合物粉末,使之成为饱和溶液,结果龙血竭几乎不溶,龙血竭包合物的溶解度为656.74 mg/mL,明显高于龙血竭,表明羟丙基- β -环糊精的包合对龙血竭的水溶性有显著提高。

5 讨论

在龙血竭-羟丙基- β -环糊精包合物的制备过程中,分别比较了研磨法、超声法、中和法、饱和水溶液法和水溶液搅拌法^[10-12],分别称取上述五种方法制备的包合物,加入适量水中使其溶解,结果显示水溶液搅拌法制备的包合物可完全溶解,而其余四种方法制备的包合物不能充分溶解,所以本实验选择水溶液搅拌法制备龙血竭羟丙基- β -环糊精。

由于龙血竭微溶于水,溶出和吸收慢,导致体内生物利用度低,而 β -环糊精的“内亲脂,外亲水”的立体双亲性孔隙结构可以用于龙血竭的包合,从而明显提高龙血竭的溶解度,为该制剂的研究开发提供了一条新的制剂开发路径。

参考文献

- [1] 孙晶,庞道然,郑姣,等.龙血竭的药理、临床及质量控制研究进展[J].中国医院用药评价与分析,2017,17(11):1445-1447.
- [2] 孙家均.中药龙血竭外用对糖尿病足溃疡的疗效与C反应蛋白的关系[J].糖尿病新世界,2016,19(20):28-29.
- [3] 石聪,张兰春,余晓玲,等.龙血竭凝胶剂的制备及对创面组织的修复作用[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(2):156-160.
- [4] 褚国华,孙婷,杨庆燕,等.龙血竭紫草软膏在皮肤软组织扩张术后的运用研究——附38例临床资料[J].江苏中医药,2017,49(1):39-40.
- [5] 陈素,吴水才,曾毅,等.龙血竭总黄酮抗炎镇痛作用及其镇痛机制探讨[J].时珍国医国药,2013,24(5):1030-1032.
- [6] 吴振,李红,陈岗,等.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[J].天然产物研究与开发,2014,26(8):1174.
- [7] 吴电彩,汪海斌,马玲,等.参术活血颗粒中挥发油 β -环糊精包合物制备工艺研究[J].安徽医药,2015,19(3):435-438.
- [8] 白云凤,赵培,李桂芬,等.正交试验优选消炎止痛汤中羌活挥发油 β -环糊精包合物的包合工艺[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(7):61-62.
- [9] 施明毅,李建利,谢燕,等.冠心病胶囊挥发油 β -环糊精包合物的制备工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(1):47-50.
- [10] 相聪坤,张静宜,李佳佳,等.白术、桂枝挥发油 β -环糊精包合工艺研究及其包合物评价[J].天然产物研究与开发,2017,29(1):46-51.
- [11] 吴妮,于洁,张峡,等.丹参酮ⅡA β -环糊精包合物制备工艺优化及体外溶出性能研究[J].中国中药杂志,2017,42(23):4611-4617.
- [12] 张乃先,艾莉,董英杰,等.人参皂苷Rg3羟丙基- β -环糊精包合物的制备和表征[J].沈阳药科大学学报,2017,34(12):1033-1037.

(收稿日期:2018-10-16,修回日期:2018-12-17)