

右旋龙脑- β -环糊精包合物的制备及其结构表征

陈建平, 苏健裕*, 陈玲, 李琳

华南理工大学 轻工与食品学院, 广东 广州 510640

摘要: **目的** 研究右旋龙脑- β -环糊精最佳包合工艺, 并对其进行结构表征。**方法** 分别采用饱和水溶液法、超声法、研磨法对右旋龙脑进行包合, 以综合评分为指标, 筛选最佳包合方法。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 筛选超声法制备包合物的最佳工艺参数。采用薄层色谱(TLC)法、傅里叶红外光谱(FIIR)法、X射线粉末衍射(XRD)法对包合物进行结构表征。**结果** 制备包合物的最佳工艺参数为: 右旋龙脑与 β -环糊精投料比为1:6, 超声温度为40℃, 超声时间为60 min。在该制备工艺条件下包合物的得率高于88.59%, 包合率高于95.98%。经过TLC、FIIR和XRD确证其包合物已形成。**结论** 本工艺具有较好的包合率和得率, 右旋龙脑被 β -环糊精包合后呈现新的物相特征。

关键词: 右旋龙脑; β -环糊精; 包合物; 结构表征

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)06-0485-05

Preparation of *d*-borneol- β -cyclodextrin inclusion complex and its structure characterization

CHEN Jian-ping, SU Jian-yu, CHEN Ling, LI Lin

College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

Abstract: **Objective** To study the best preparation conditions of *d*-borneol- β -cyclodextrin inclusion complex and its structure characterization. **Method** The inclusion complex was prepared by the methods of saturated solution method, ultrasonic method, and grinding method with composite grade as index. To obtain the best preparation conditions of inclusion complex, $L_9(3^4)$ orthogonal test design was carried out. The structure of inclusion complex was identified by the methods of thin layer chromatography (TLC), Fourier infrared spectrum (FIIR) and X-ray powder diffractometry (XRD). **Results** The optimum preparation conditions were as follows: ratio of *d*-borneol and β -cyclodextrin was 1:6, ultrasound temperature was 40℃, ultrasound time was 60 min. The yield of inclusion complex was over 88.59%, and the inclusion ratio of inclusion complex was over 95.98% under the optimum conditions. The formation of inclusion complex was proved by TLC, FIIR, and XRD. **Conclusion** This technology has good inclusion rate and yield, and the *d*-borneol- β -cyclodextrin inclusion complex exhibits some new physical characteristics.

Key words: *d*-borneol; β -cyclodextrin; inclusion complex; structure characterization

龙脑按来源分为天然龙脑和合成龙脑, 天然龙脑按旋光不同又分为左旋龙脑(艾片)和右旋龙脑(梅片), 合成龙脑是龙脑和异龙脑的混合物^[1]。右旋龙脑自古以来就是一种珍贵药材和名贵香料^[2-4]。现代医学证实, 右旋龙脑具有促进药物透皮吸收、透过血脑屏障的作用^[5], 能有效提高其他药物的血药浓度和生物利用度^[6]。右旋龙脑的水溶性低、沸点较低、室温即升华, 因此含右旋龙脑的药物在贮

存期内极不稳定, 严重影响了药物的疗效, 并限制了其在药物制剂中的使用^[7]。环糊精是淀粉经酶解环合后得到的由 α -1,4糖苷键连接而成的环状低聚糖化合物, 是良好的包合材料^[8]。其主要成分是6、7、8个葡萄糖环合, 分别称为 α -、 β -、 γ -环糊精^[9]。国内工业生产和应用的主要为 β -环糊精。为了更好地发挥右旋龙脑的药效, 本实验采用 β -环糊精将右旋龙脑进行包合, 在单因素试验的基础上采用 $L_9(3^4)$

收稿日期: 2011-08-19

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(10451064101005160); 省部产学研结合项目(2009A090100041, 2010B090500033); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2011ZM0099)

作者简介: 陈建平(1986—), 男, 江西赣州人, 硕士研究生, 研究方向为糖类物质及其药物制备与生物利用。E-mail: cjp516555989@126.com

*通讯作者 苏健裕(1979—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为糖类物质及其药物制备与生物利用。Tel: (020) 87113252 E-mail: jysu@scut.edu.cn

正交设计来筛选包合物的最佳制备工艺参数, 并采用薄层色谱法、傅里叶红外光谱法和X射线粉末衍射对包合物进行结构表征, 以期为右旋龙脑- β -环糊精包合物制备工艺提供参数依据, 同时进一步为右旋龙脑的开发利用提供技术支持。

1 试剂与设备

右旋龙脑原料(质量分数 $\geq 98\%$, 广东嘉应制药股份有限公司); 右旋龙脑对照品(中国药品生物制品检定所, 质量分数为99.9%, 批号111688-200501); β -环糊精(食品级, 山东新大精细化工有限公司); 羟丙基- β -环糊精(化学纯, 山东新大精细化工有限公司); 其他试剂均为分析纯。

SB3200超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); LDZ5—2低速自动平衡离心机(北京雷勃离心机有限公司); Advantage真空冷冻干燥机(美国VirTis公司); Agilent 6890N气相色谱仪(美国Agilent公司); Tensor 37傅立叶变换红外光谱仪(德国Bruker公司); D8 Advance X射线衍射仪(德国Bruker公司); BS224S电子天平(德国Sartorius公司); DZKW—S—4恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 右旋龙脑的GC法测定

2.1.1 色谱条件 HP-5MS弹性石英毛细柱管(长度30 m, 内径0.25 mm, 膜厚约0.25 mm); 氢火焰离子化检测器; 检测温度为270 $^{\circ}\text{C}$; 柱温采用程序升温, 100 $^{\circ}\text{C}$ 恒温1 min后, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至170 $^{\circ}\text{C}$, 保持5 min; 进样口温度为250 $^{\circ}\text{C}$; 检测温度为270 $^{\circ}\text{C}$; 载气为氮气; 体积流量为7.8 mL/min。

2.1.2 标准曲线的制备 精确称取右旋龙脑对照品250 mg, 置于50 mL量瓶中, 加无水乙醇至刻度。分别取上述溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL, 置于10 mL量瓶中, 加无水乙醇至刻度。微孔滤膜滤过, 取1 μL 注入气相色谱仪中, 测定峰面积值。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 回归得线性回归方程 $Y=1\,307\,X+10.14$, $R^2=0.999\,8$, 表明右旋龙脑在0.25~1.75 mg/mL与峰面积线性关系良好。

2.1.3 供试品溶液的制备 取包合物样品100 mg, 精密称定, 置具塞离心管中, 精密加入无水乙醇20 mL, 密塞, 摇匀, 超声处理30 min, 2 500 r/min离心10 min, 吸取上清液, 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.4 精密度试验 精密吸取同一包合物供试品溶液1 μL , 连续进样5次, 测定右旋龙脑的峰面积, 计

算得其RSD为0.7%。

2.1.5 重现性试验 精密称取同一包合物样品5份, 制备供试品溶液, 进样, 测定右旋龙脑的峰面积, 计算得其RSD为0.8%。

2.1.6 加样回收率试验 取含右旋龙脑127.5 mg/g包合物样品5份, 约100 mg, 精密称定, 分别加入右旋龙脑对照品10 mg, 制备供试品溶液, 进样, 测定右旋龙脑的峰面积, 计算得加样回收率为102.9%, RSD为1.9%。

2.1.7 样品测定 取1 μL 供试品溶液注入气相色谱仪中, 测定, 根据线性回归方程计算出包合物中右旋龙脑的质量分数。

2.2 包含方法的筛选^[10]

2.2.1 右旋龙脑乙醇溶液的制备 称取右旋龙脑0.589 g, 溶于20 mL无水乙醇中, 即得右旋龙脑乙醇溶液。

2.2.2 β -环糊精饱和水溶液的制备 按照右旋龙脑与 β -环糊精以1:7.4的投料比, 称取 β -环糊精4.358 g, 溶于100 mL蒸馏水中, 即得 β -环糊精饱和水溶液。

2.2.3 饱和水溶液法包合 将右旋龙脑乙醇溶液缓慢滴入 β -环糊精饱和水溶液中, 固定转速40 r/min, 45 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌1 h。取出, 放入冰箱冷藏24 h, 真空抽滤, 并以少量无水乙醇洗涤, 再用少量醋酸乙酯洗涤3次, 冷冻干燥24 h, 研碎, 过80目筛, 即得白色粉末状包合物。

2.2.4 超声法包合 将右旋龙脑乙醇溶液缓慢滴入 β -环糊精饱和水溶液中, 45 $^{\circ}\text{C}$ 下超声处理1 h。取出放入冰箱冷藏24 h, 真空抽滤, 并以少量无水乙醇洗涤, 再用少量醋酸乙酯洗涤3次, 冷冻干燥24 h, 研碎, 过80目筛, 即得白色粉末状包合物。

2.2.5 胶体磨法包合 将右旋龙脑乙醇溶液缓慢滴入 β -环糊精饱和水溶液中, 固定转速21 r/min, 研磨1 h。取出放入冰箱冷藏24 h, 真空抽滤, 并以少量无水乙醇洗涤, 再用少量醋酸乙酯洗涤3次, 冷冻干燥24 h, 研碎, 过80目筛, 即得白色粉末状包合物。

2.2.6 包合效果比较 分别测定以上3种方法制得的包合物中右旋龙脑的质量分数, 计算得率和包合率, 按照综合评分=(得率 $\times 0.3$ +包合率 $\times 0.7$) $\times 100$ 计算, 结果见表1。

得率=包合物收得量/(包含材料投入量+右旋龙脑投入量) $\times 100\%$

包合率=包合物中右旋龙脑的质量/右旋龙脑投入量 $\times 100\%$

表1 不同包含方法效果的比较
Table 1 Comparison of different inclusion methods

包含方法	包含率/%	得率/%	综合评分
饱和水溶液法	85.01	77.91	82.88
超声法	91.88	82.82	89.16
胶体磨法	92.24	79.52	88.42

可以看出,3种包含方法中,饱和水溶液制备的右旋龙脑包合物的得率和包含率均比较低,胶体磨法制得的包合物包含率虽然较高,但是得率较低,这样在实际生产应用中原料回收率不高,从经济角度上来说不是很好,而采用超声法制备的包合物的包含率和得率均能得到一个较高的水平。根据综合评分,较优的包含方法是超声法。

2.3 正交设计优化右旋龙脑的超声包含条件

2.3.1 试验设计与结果 在单因素试验预试验的基础上,为了综合考虑多因素相互作用对右旋龙脑包合物得率和包含率的影响,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计对右旋龙脑包合物的制备条件进行优化,因素水平见表2,试验设计和方差分析结果见表3、4。

表 2 因素水平
Table 2 Factors and levels

水平	因素		
	A投料比	B反应时间/min	C反应温度/℃
1	1 : 4	60	40
2	1 : 6	80	60
3	1 : 8	100	70

表3 正交设计结果
Table 3 Results of orthogonal design

试验号	A	B	C	空白	包含率/%	得率/%	综合评分
1	1	1	1	1	68.76	85.33	73.73
2	1	2	2	2	65.78	83.32	71.04
3	1	3	3	3	65.00	83.12	70.44
4	2	1	2	3	96.72	88.39	94.22
5	2	2	3	1	95.91	88.22	93.60
6	2	3	1	2	93.90	88.90	92.40
7	3	1	3	2	94.61	72.55	87.99
8	3	2	1	3	92.97	70.75	86.30
9	3	3	2	1	90.41	70.32	84.38
K_1	215.21	255.94	252.43	251.71			
K_2	280.22	250.94	249.64	251.43			
K_3	268.67	247.22	252.03	250.96			
k_1	71.74	85.31	84.14	83.90			
k_2	93.41	83.65	83.21	83.81			
k_3	89.56	82.41	84.01	83.65			
R	21.67	2.90	0.93	0.25			

表4 方差分析
Table 4 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	均方	F值	显著水平
A	731.198	2	365.599	7 538.124	$P<0.01$
B	12.777	2	6.388	131.722	$P<0.01$
C	1.514	2	0.757	15.608	
空白(误差)	0.097	2	0.048	1.000	

$$F_{0.05}(2,2)=19.00 \quad F_{0.01}(2,2)=99.00$$

可见投料比、反应时间对右旋龙脑包合物的得率和包含率的综合评分影响的差异显著,反应温度

对综合评分影响的差异不显著。影响右旋龙脑包合物的得率和包含率的综合评分的各因素主次关系

为：投料比>反应时间>反应温度。综合上述分析结果，得出右旋龙脑包合物最佳制备工艺参数为A₂B₁C₁，即右旋龙脑与β-环糊精投料比为1:6，反应时间为60 min，反应温度为40 ℃。

2.3.2 验证试验 按最佳工艺条件制备3批右旋龙脑-β-环糊精包合物进行验证，见表5。

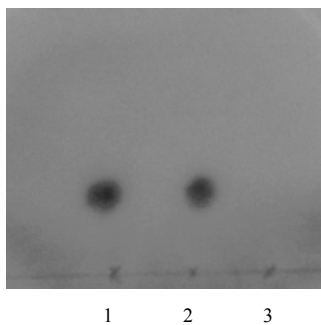
表5 验证试验结果

Table 5 Results of verification test

试验号	包合率/%	得率/%
1	96.76	88.89
2	96.85	90.18
3	95.98	88.59

2.4 包合物的鉴定

2.4.1 薄层色谱法鉴别^[11-12] 称取右旋龙脑-β-环糊精包合物100 mg，置具塞离心管中，加醋酸乙酯10 mL，超声处理15 min，2 500 r/min离心10 min，倾出上清液，作为醋酸乙酯提取液。残渣加无水乙醇10 mL，超声处理15 min，2 500 r/min离心20 min，倾出上清液，作为无水乙醇提取液。取右旋龙脑对照品10 mg，加醋酸乙酯10 mL溶解，作为对照品溶液。吸取上述3种溶液各5 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以正己烷-乙醚（8:2）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以5%香草醛浓硫酸试液，在105 ℃烘至斑点显色清晰，见图1。可见在无水乙醇提取液色谱中，在与对照品溶液色谱相对应的位置上，均出现相同的蓝紫色斑点，而在醋酸乙酯提取液色谱中，则没有出现蓝紫色斑点。可见右旋龙脑已被β-环糊精包合，包合物确已经形成，并且包合前后主成分没有发生变化。



1-无水乙醇提取液 2-对照品溶液 3-醋酸乙酯提取液

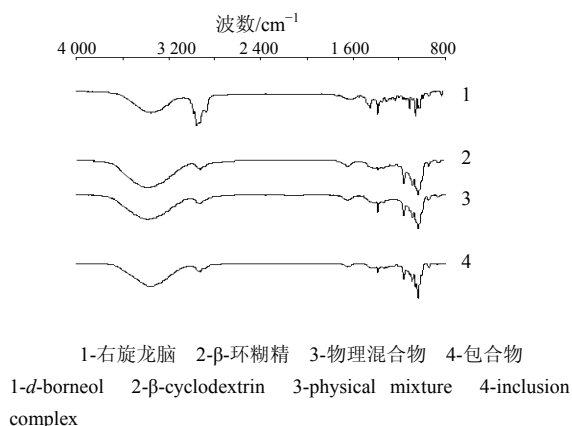
1-ethanol extract 2-reference substance solution 3-ethyl acetate extract

图1 右旋龙脑包合物的薄层色谱图

Fig. 1 TLC chromatogram of *d*-borneol inclusion

2.4.2 傅里叶红外光谱法鉴别^[12] 取右旋龙脑、β-

环糊精、物理混合物（与两者投料比一致）和包合物各适量，与KBr混合，用玛瑙研钵研磨均匀，压片，在相同条件下测定，扫描波数范围为4 000~800 cm⁻¹。结果见图2。可以看出，在2 900~3 200 cm⁻¹右旋龙脑的-CH₃的伸缩吸收峰处，以及由于存在-C(CH₃)₃出现振动耦合导致在1 386 cm⁻¹处-CH₃的面内弯曲振动峰发生了分裂而出现的双峰处，包合物与物理混合物、右旋龙脑以及β-环糊精存在较大差异，进一步证实了右旋龙脑与环糊精形成了新的物相。



1-右旋龙脑 2-β-环糊精 3-物理混合物 4-包合物

1-*d*-borneol 2-β-cyclodextrin 3-physical mixture 4-inclusion complex

图2 右旋龙脑包合物的傅里叶红外光谱图

Fig. 2 Fourier IR spectroscopy of *d*-borneol inclusion complex

2.4.3 X射线粉末衍射法鉴别^[12] 取右旋龙脑、β-环糊精、物理混合物（与两者投料比一致）和包合物各适量，于X射线粉末衍射仪中进行测定。测试条件：Cu-K_α辐射，LynxExe阵列探测器，管电压为40 kV，管电流为40 mA，扫描步长0.02°，扫描速度17.7 s/步，扫描角度范围为5°~55°。结果见图3。可以看出，物理混合的衍射峰实为右旋龙脑与β-环糊精衍射峰的叠加，但由于β-环糊精的屏蔽作用，右旋龙脑的峰有所下降。右旋龙脑与β-环糊精直接混合后，其晶型没有发生改变，仍保持各自的晶型特点，未构成新的晶体。而包合物则不再是两者图谱的简单叠加，而是显现一种新的谱形，右旋龙脑与β-环糊精原来的衍射峰消失或者减弱，在2θ=5.410 4°、7.401 1°、14.235°、16.143 6°、17.949 6°、19.057 8°处出现了新的衍射峰，在17.621 2°处明显弱于混合物，并且右旋龙脑在8.406 7°、15.261 2°处的衍射峰在包合物图谱中没有出现，证明右旋龙脑与β-环糊精形成了包合物，且晶型发生了显著变化，也表明包合物的形成不是简单的物理混合，而是形成了一种新的物相。

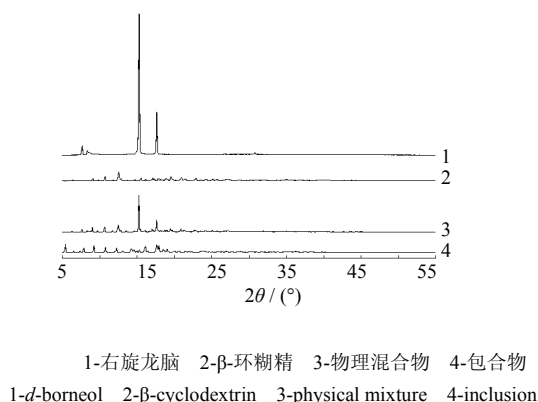


图3 右旋龙脑包合物的X射线衍射图谱

Fig. 3 XRD patterns of *d*-borneol inclusion complex

3 讨论

右旋龙脑具有较强的挥发性,因此,包合反应的温度不可过高,温度过高可造成右旋龙脑挥发损失。包合温度在40℃为宜。

右旋龙脑水溶性较差,无法直接置于β-环糊精的饱和水溶液中进行包合,故应选择合适有机溶剂。右旋龙脑易溶于甲醇、乙醇、乙醚、醋酸乙酯、丙酮等有机溶剂,考虑到制剂和生产操作过程的安全性,选择乙醇作为右旋龙脑的溶媒^[13]。在制备过程中,考虑到包合物表面可能还有残留的未包合的龙脑,因此需要选择合适的洗涤液。要求该洗涤液既能把包合物中的未包合的龙脑清洗干净,又不会破坏包合物的稳定性。故本实验采用醋酸乙酯作为洗涤液。

实验通过饱和水溶液法、超声法和研磨法制备包合物。在超声波法中,必须注意控制超声温度和超声时间。在饱和水溶液法中,应该一边振荡一边缓慢地滴加右旋龙脑的乙醇溶液,以保证右旋龙脑和环糊精充分包合。在使用研磨法时,先加水 and 环糊精研匀后,一边研磨一边缓慢滴加右旋龙脑的乙醇溶液^[14]。

本实验通过3种方法的对比结果可以看出,超声法制备包合物的包合率较饱和水溶液法和研磨法高,可能是由于超声温度的升高、超声功率的增大,使右旋龙脑分子热运动加剧,会促进右旋龙脑分子向β-环糊精疏水空腔中运动,由此包合率提高^[15]。虽然饱和水溶液法具有适用于中试等优点,但制成的饱和溶液黏度高,不利于主客分子运动,从而导致包合率低^[16]。而研磨法制备包合物时,由于右旋

龙脑与β-环糊精不能充分接触,影响了包合的进行,从而使得包合率和载药量低,且研磨法需手动操作,费时又耗力。故本实验采用超声法来制备包合物,工艺简单、操作方便、实用性较强。

参考文献

- [1] 刘志伟,张晨. 右旋龙脑的应用及生产方法 [J]. 广州化工, 2006, 34(2): 13-14.
- [2] 罗忠生,龙光远,彭招兰,等. 右旋龙脑加工技术的研究 [J]. 江西林业科技, 2003(1): 11-12.
- [3] 吴莉,龚金红,刘扬,等. 冰片-β-环糊精包合物理化性质及稳定性研究 [J]. 抗感染药学, 2008, 5(4): 217-221.
- [4] 宋永芳,罗嘉梁. 高纯度右旋龙脑的制备研究 [J]. 林产化学与工业, 2003, 23(3): 11-14.
- [5] 郭丽蓉,周莉玲. 冰片-β-环糊精、羟丙基-β-环糊精包合物的制备及稳定性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 7-10.
- [6] 肖衍宇,平其能. 冰片-β-环糊精包合物对磷酸川芎嗪在小鼠血浆及脑组织分布的影响 [J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(5): 412-415.
- [7] 秦冬彦,宋洪涛,郭涛,等. 冰片-β-环糊精包合物的稳定性考察 [J]. 中草药, 2000, 31(4): 255-257.
- [8] 汤关龙,李进华,冯自力. 环糊精包合物在药剂学上的应用进展 [J]. 中国药房, 1991, 2(5): 34-35.
- [9] Li J F, Wei Y X, Ding L H, et al. Study on the inclusion complexes of cryptotanshinone with β-cyclodextrin and hydroxypropyl-β-cyclodextrin [J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2003, 59:2759-2766.
- [10] 张玮,龚金红,张学农. 冰片-β-环糊精包合物的制备及鉴定 [J]. 中成药, 2008, 30(9): 1391-1394.
- [11] 宋洪涛,郭涛,赵明宏,等. 冰片-β-环糊精包合物的理化性质考察 [J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(4): 249-252.
- [12] 罗媛,郑林,兰燕宇,等. 菊黄上清含片中冰片-β-环糊精包合物的制备工艺 [J]. 贵阳医学院学报, 2010, 35(2): 137-139.
- [13] 邹霞,徐睿来. 饱和水溶液法制备冰片-β-环糊精包合物的工业研究 [J]. 实用临床医学, 2009, 10(12): 6-8.
- [14] 邹新城. 艾叶挥发油-β-环糊精包合物的制备及其稳定性的研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2010.
- [15] 韩光,李景华,刘蕾,等. 超声法制备穿心莲内酯-β-环糊精包合物的研究 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(7): 582-585.
- [16] 章建芳. 九里香叶总黄酮-羟丙基-β-环糊精包合物的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010.