

pH 值对注射剂的影响。

3.2 人参皂苷 R_{g_2} 注射液所用的人参皂苷 R_{g_2} 为 S 型与 R 型的等量异构体,本实验中人参皂苷 R_{g_2} 的测定,采用了 S 型与 R 型分别测定法。

3.3 应对最优工艺条件进行验证试验,以确保工艺的重复性和正确性,本研究最优工艺为 $A_1B_2C_3$,即选用 25% 1,2-丙二醇与 25% 聚乙二醇 400 为混合

助溶剂,不加抗氧剂,调节注射液 pH 值为 3.5~5.5。在实际人参皂苷 R_{g_2} 注射液配制过程中,基本上不用调 pH 值,其注射液 pH 值已在 3.5~5.5。

Reference:

- [1] Zhang Z W, Zhao Y J, Ye J M, et al. Effects of ginsenoside R_{g_2} on myocardial damage induced by endotoxin diffuse intravascular coagulation and hemorrheology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (9): 814-816.

羟丙基-β-环糊精对降香挥发油包合作用的研究

王 靖¹, 张铁军², 王文燕²

(1. 天津中医学院, 天津 300193; 2. 天津药物研究院, 天津 300193)

摘 要:目的 研究降香挥发油的羟丙基-β-环糊精包合物的制备方法及包合物的验证。方法 采用水溶液搅拌法制备降香挥发油的羟丙基-β-环糊精包合物,采用 HPLC 法测定降香挥发油和包合物的水溶液中反式-橙花叔醇,并经薄层色谱、差示热分析、相溶解度法、核磁共振、扫描电镜法对包合物进行验证。结果 降香挥发油已和羟丙基-β-环糊精形成包合物。结论 羟丙基-β-环糊精可以包合降香挥发油,使降香挥发油溶解度提高 41 倍。

关键词:降香;挥发油;羟丙基-β-环糊精;包合物

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2006)05-0700-04

Inclusion complex of volatile oil from *Lignum Dalbergiae Odoriferae* with hydroxypropyl-β-cyclodextrin

WANG Jing¹, ZHANG Tie-jun², WANG Wen-yan²

(1. Tianjin College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Key words: *Lignum Dalbergiae Odoriferae* (LDO); volatile oil; hydroxypropyl-β-cyclodextrin; inclusion complex

降香为豆科植物降香檀 *Dalbergia odorifera* T. Chen 树干和根的干燥心材,主产于海南,具有行气活血、止痛、止血的功能。常与丹参、川芎等组成复方,制成注射剂,用于心脑血管系统疾病的治疗,具有抗血栓形成的作用^[1]。降香主要成分为挥发油,且与其主治功效密切相关^[2]。但挥发油在水中溶解性差,且性质不稳定,易挥发、氧化变质。为了减少制剂过程中挥发油的损失,本实验采用羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD)对降香挥发油进行包合,通过正交试验对包合工艺进行优化,并对包合物进行验证,对包合前后挥发油的性质进行了研究。

1 仪器与材料

戴安液相色谱仪(P6801 泵, UVD170U 紫外检测器, ASI-100 自动进样器, Chromeleon 色谱工作站), Agilent 公司 HP-6890 气相色谱仪, DW-1

型无极直流恒速搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂), Lyo-0.4 冷冻干燥机, PB303-N 电子天平(METTLER TOLEDO), 日本理学标准型 TG-DTA 分析仪, BRUKER 400 MHz 超导核磁谱仪, HITACHI S-3500N 扫描电子显微镜。

橙花叔醇对照品(Sigma 公司, 顺反异构混合液), HP-β-CD(西安德立化工有限公司), 正十四醇(色谱标准, 天津市光复精细化工研究所), 降香药材产地为海南九龙山, 经鉴定符合《中国药典》2005 年版一部“降香”项下规定, 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 挥发油的提取: 称取粉碎粒度为 0.5~2 cm 的降香药材 100 g, 加 8 倍量水, 浸泡 12 h, 水蒸气蒸馏法提取挥发油, 收集挥发油经适量无水硫酸钠脱水,

得淡黄色挥发油,备用。

2.2 降香挥发油的 HP- β -CD 包合物包含工艺条件的选择:采用正交试验筛选制备包合物的最佳工艺条件。以挥发油和 HP- β -CD 的用量比、HP- β -CD 的浓度、包含温度为影响因素,以包合物得率、油利用率为指标进行综合评价,确定包合物的最佳制备工艺条件:降香挥发油与 HP- β -CD 的体积质量比为 1:30,HP- β -CD 的质量浓度为 0.1 g/mL,包含温度为 30 ℃。

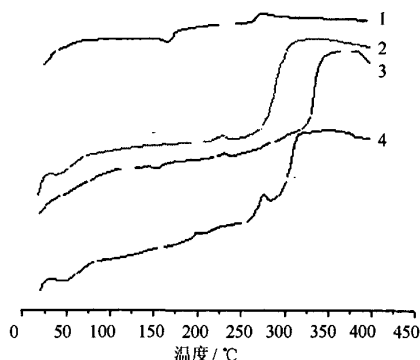
2.3 降香挥发油的 HP- β -CD 包合物的制备:称取 HP- β -CD 30 g,置于 500 mL 烧杯中,加 300 mL 水溶解,转移至三颈瓶中,置于 30 ℃ 水浴中,在剧烈搅拌的条件下,逐滴缓慢滴加入 1.0 mL 降香挥发油,密封瓶口,继续搅拌 2 h,室温静置过夜。0.22 μ m 微孔滤膜滤过,冷冻干燥,即得。

2.4 降香挥发油的 HP- β -CD 包合物的验证

2.4.1 薄层色谱法:取降香挥发油包合物(约含降香挥发油 6 μ L)加适量乙醚分 3 次洗涤,滤过,合并滤液,挥去乙醚,残渣加无水乙醇 1 mL 使溶解,作为包合物乙醚洗涤液。洗涤后的包合物在干燥条件下挥去乙醚,加水溶解,用适量乙醚分 3 次萃取,合并乙醚萃取液,挥去乙醚,残渣加无水乙醇 1 mL 使溶解,作为包合物提取液。另取降香挥发油,加无水乙醇制成 6 μ L/mL 的溶液,作为对照品溶液。吸取上述 3 种溶液各 2 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙醚-三氯甲烷(7:2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105 ℃ 加热至斑点显色清晰。降香挥发油包合物乙醚洗涤液无斑点,降香挥发油包合物提取液和降香挥发油对照品溶液斑点完全一致,结果说明降香挥发油已被 HP- β -CD 包合。挥发油在包合前后的斑点数量及颜色均一致,表明挥发油在包合前后的化学组成未发生明显改变。

2.4.2 差示热分析:测试条件:以 Al_2O_3 为参比,以 10 ℃/min 的升温速率在室温至 400 ℃ 对样品进行差示热分析。降香挥发油、HP- β -CD、降香挥发油与 HP- β -CD 的机械物理混合物及 HP- β -CD 对降香挥发油的包合物的差示热分析,结果见图 1。由 DTA 曲线可以看出,降香挥发油在 169 ℃ 有 1 个吸热峰,在 275 ℃ 有 1 个放热峰;HP- β -CD 在 230 ℃ 有 1 个弱放热峰;二者的机械物理混合物在 158 ℃ 有 1 个吸热峰,在 230 ℃ 有 1 个放热峰,是降香挥发油和 HP- β -CD 的峰的叠加;降香挥发油与 HP- β -CD 的包合物在 203 ℃ 和 277 ℃ 有两个放热峰,与以上 3

个样品的峰不同,表明形成一种新的物相,降香挥发油已被包合。



1-降香挥发油 2-HP- β -CD
3-降香挥发油与 HP- β -CD 机械物理混合物
4-降香挥发油的 HP- β -CD 包合物
1-volatile oil from LDO 2-HP- β -CD 3-mixture of volatile oil from LDO and HP- β -CD 4-inclusion complex of volatile oil from LDO hydroxypropyl- β -cyclodextrin

图 1 差示热分析图谱

Fig. 1 Differential thermal analysis patterns

2.4.3 相溶解度法

色谱条件与系统适用性:色谱柱:Diamonsil C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-水(85:15);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μ L。理论板数按反式-橙花叔醇峰计算应不低于 4 000,反式-橙花叔醇峰与其他峰的分度度不小于 1.5。

对照品溶液的制备:精密量取反式-橙花叔醇对照品 10 μ L,置 10 mL 量瓶中,加 85% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加 85% 甲醇至刻度,摇匀。精密量取 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加 85% 甲醇至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

供试品溶液的制备:称取包合物约 13 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加 85% 甲醇溶解并稀释至刻度,作为供试品溶液。

线性关系考察:准确吸取反式-橙花叔醇对照品溶液 5、10、15、20、25、30 μ L 注入液相色谱仪,在上述色谱条件下测定,以进样量为横坐标,反式-橙花叔醇峰峰面积为纵坐标,得线性回归方程 $Y = 780.29 X + 4.6081$, $r = 0.9999$ 。表明反式-橙花叔醇在 $1 \times 10^{-6} \sim 6 \times 10^{-4}$ μ L 与峰面积呈良好的线性关系。

精密度试验:精密吸取同一供试品溶液,连续进样 6 次,按上述色谱条件测定峰面积,以反式-橙花叔醇计,RSD 为 0.99%。

稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样,按上述色谱条件测定峰面积,以反式-橙花叔醇计,RSD 为 1.98%,结果表明,供试品溶液在 24 h 内稳定。

重现性试验:同一批样品,按供试品溶液的制备方法平行制备 6 份,按上述色谱条件测定峰面积,计算反式-橙花叔醇体积分数,其 RSD 为 1.68%。

加样回收率试验:精密称取包合物约 6.0、7.0、8.0 mg 各 3 份于 10 mL 量瓶中,分别加入 0.1 μ L/mL 橙花叔醇对照品 1.2、1.0、0.8 mL,加 85% 甲醇稀释至刻度,按上述色谱条件测定,计算加样回收率,结果反式-橙花叔醇的加样回收率为 102.62%,RSD 为 1.31%。

相溶解度曲线绘制:配制 0、2、4、8、10、12、14、16 mg/mL 的 HP- β -CD 水溶液 25 mL,分别加入过量的降香挥发油,超声 20 min,静置,取下部溶液稀释至适当浓度,采用液相色谱法测定反式-橙花叔醇。以 HP- β -CD 的浓度为横坐标,以反式-橙花叔醇的浓度为纵坐标作图,得相溶解度曲线,见图 2。该曲线表明随着 HP- β -CD 浓度的增加,反式-橙花叔醇浓度也增加,说明降香挥发油已被 HP- β -CD 包合,在水中溶解度不断增加。求出该曲线的回归方程 $Y=0.09163X+3.502\times 10^{-5}$, $r=0.9965$ 。说明反式-橙花叔醇和 HP- β -CD 形成包合物的物质的量组成为 1:1^[3],可计算出包合稳定性常数 K 为 $2508^{[4]}$ 。

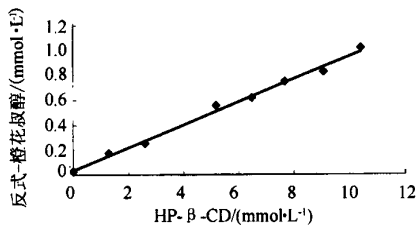


图 2 相溶解度曲线

Fig. 2 Phase solubility curve

反式-橙花叔醇的测定及溶解度变化:由以上可以得出反式-橙花叔醇在水中的溶解度是 2.39×10^{-5} mol/L,当 HP- β -CD 的浓度为 10.4 mmol/L 时,反式-橙花叔醇的溶解度 9.81×10^{-4} mol/L,反式-橙花叔醇的溶解度在包合后比包合前提高 41 倍。

2.4.4 核磁共振:将降香挥发油、HP- β -CD、包合物分别溶于氘水中,于 400 MHz 超导核磁谱仪上测试氢谱。将包合物图谱放大与降香挥发油的图谱进行比较,见图 3。挥发油部分的化学位移明显向低场移

动,并且自旋系统发生变化,偶合常数改变,图谱的峰形有很大的变化。将包合物图谱与 HP- β -CD 的图谱进行比较,见图 4。包合物图谱中,HP- β -CD 的峰形也有变化,偶合常数发生变化。说明降香挥发油已被 HP- β -CD 包合。

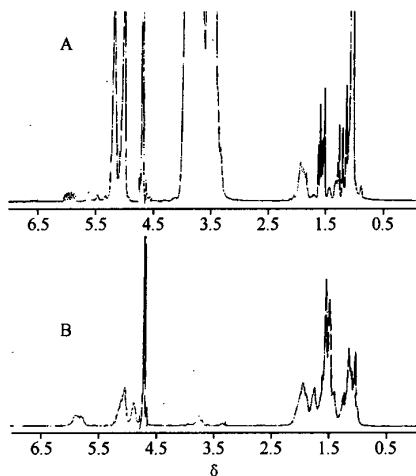


图 3 降香包合物(A)与挥发油(B)的¹H-NMR峰形比较

Fig. 3 Comparison of ¹H-NMR peak shape between inclusion complex (A) and volatile oil (B) from LDO

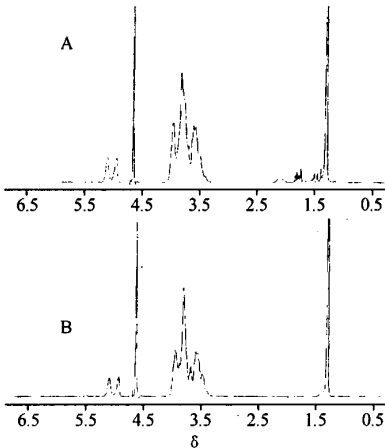


图 4 包合物(A)与 HP- β -CD (B)的¹H-NMR峰形比较

Fig. 4 Comparison of ¹H-NMR peak shape between inclusion complex (A) and HP- β -CD (B)

2.4.5 扫描电镜:将 HP- β -CD 和包合物分别用扫描电子显微镜进行观察,电镜照片见图 5,结果显示包合前后物相形态发生了较大改变,从一个方面证明了包合物的形成。

2.5 包合前后降香挥发油气相色谱图比较

2.5.1 色谱条件与系统适用性:HP-1 石英毛细管柱(30 mm $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 mm);升温程序:初始温度 90 $^{\circ}$ C,保持 3 min 后以 30 $^{\circ}$ C/min 升温到 214



图5 HP-β-CD (A)和包合物(B)的扫描电镜照片

Fig. 5 Scanning electron microscope photograph of HP-β-CD (A) and inclusion complex (B)

℃,保持6 min后,再以40℃/min升温到218℃,再保持55 min;检测器温度:250℃;气化室温度:250℃;柱前压:2 068 0 Pa;载气:N₂;进样方式:直接进样;理论板数按反式-橙花叔醇计算应不低于50 000。

2.5.2 内标液的制备:取十四醇适量,称定,加无水乙醇制成2 mg/mL的溶液,即得。

2.5.3 包合前的挥发油溶液的制备:将10 μL降香挥发油加入1 mL内标溶液中,摇匀,即得。

2.5.4 包合后的挥发油溶液的制备:取包合物适量,加水溶解后,用水蒸气蒸馏法回提油,收集挥发油,同上法配制,即得。

2.5.5 图谱对比:所得色谱图基本相同。包合前后,降香挥发油气相色谱峰的组成没有发生变化,说明HP-β-CD对降香挥发油的包合不会引起挥发油性质的改变。

3 讨论

3.1 HP-β-CD是由β-环糊精(β-CD)与1,2-环氧丙烷缩合而成,β-CD是由7个葡萄糖通过α-1,4糖苷键连接而成的环状低聚糖化合物,在β-CD葡萄糖的C₂、C₃、C₆位上3个羟基原子不同程度地被1,2-环氧丙烷取代,形成取代度不同的HP-β-CD同系物,一般情况下,HP-β-CD是混合物^[5]。其立体结构是具有两端开口的环状中空圆筒状分子结构,葡萄糖残基上的羟丙基主要分布在腔的外围,糖苷键氧原子位于腔体中部,因此,腔内疏水,腔外亲水,在分子空穴内可以包合大小和形状与空穴相适应的疏水性分子,以增加该物质在水中的溶解度。

3.2 对于包合单体化合物,可以用核磁共振分析包合物的结果^[6,7],但对于包合混合物,由于成分多,结

构没有全部确定,无法分析包合物结构,明确各基团之间化学位移的变化和相互作用,只能通过化学位移总体变化和峰形的变化来判断是否形成包合物。

3.3 扫描电子显微镜可以直接观察到包合物及其原料的微观结构,由于晶格排列发生变化,HP-β-CD、包合物所观察到的形态不同,有文献报道^[8],用不同的包合方法包合同一物质,电镜图谱结果也不一样,仅用扫描电镜一个方法不足以证明包合物的形成,应当结合其他方法共同验证,该方法仅作为辅助说明。

3.4 通过相溶解度曲线可以计算出包合后比包合前反式-橙花叔醇溶解度提高了41倍,能够反应出降香挥发油的溶解度被大大的提高了,同时,降香挥发油的利用率得到极大的提高,节省了原料,促进资源保护;降香挥发油经HP-β-CD包合后,为白色固体粉末,其稳定性、抗氧化性、在水中的溶解度均得到极大地提高,可以更好的保证制剂的疗效。

References:

- [1] Zhu L, Guo J X, Leng H W, et al. The influence of volatile oil of Jiangxiang to the thrombus formation and the activity of thrombolytic t-PA and plasminogen activator [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1992, 14 (4): 30.
- [2] Wang B X. *Modern Pharmacology and Clinic of Chinese Traditional Medicine* (现代中药药理与临床) [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Translation and Publishing Corporation, 2004.
- [3] Tu J S, Wang P. Study on inclusion complex of Nifedipine with β-cyclodextrin [J]. *Chin J Pharm*, 1996, 27 (12): 539-542.
- [4] Yang C Q, Wang J, Zhu M Y. Study on the inclusion compound of cinnarizine with hydroxypropyl-β-cyclodextrin [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2004, 24 (1): 9-11.
- [5] Pitha J, Pitha J. Amorphous water soluble derivatives of cyclodextrins: nontoxic dissolution enhancing excipients [J]. *J Pharm Sci*, 1985, 74 (9): 987-990.
- [6] Chen L, Chao J B, Ma L H. Studies on norfloxacin with HP-β-cyclodextrin inclusion complexes [J]. *Chin J Magn Resonance* (波谱学杂志), 2000, 17 (3): 203-210.
- [7] Chen L, He F C, Meng D S. Study of (S)-ketoprofen-β-cyclodextrin inclusion compound [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2004, 13 (2): 136-138.
- [8] Mura P, Fauci M T, Parrini P L, et al. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of ketoprofen-cyclodextrin binary systems [J]. *Int J Pharm*, 1999, 179: 117-128.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话:(022)27474913 23006821

传真:23006821

联系人:陈常青