

鸦胆子油交联环糊精包合物的制备及其急性毒性研究

陈琳, 吴欢欢, 黄小丽, 宋先宏, 周云龙, 李晓梅, 胡荣*, 卜平
扬州大学医学院, 江苏 扬州 225000

摘要: 目的 制备鸦胆子油(BFO)交联环糊精(CDP)包合物(BFO-CDP-IC), 并通过急性毒性实验比较 BFO-CDP-IC 与市售 BFO 乳剂的安全性。方法 提取 BFO 及合成 CDP; 采用均质法制备 BFO-CDP-IC, 通过单因素试验及正交试验设计优化 BFO-CDP-IC 处方及制备工艺; 通过扫描电镜(SEM)法、红外光谱(FTIR)法、核磁共振(¹H-NMR)法验证 CDP 及 BFO-CDP-IC 的形成; HPLC 法测定 BFO-CDP-IC 中 BFO 的包封率; 通过小鼠急性毒性实验并与市售 BFO 乳剂进行比较, 考察其安全性。结果 BFO 得率为 17.3%; CDP 产率 49.26%, 交联度 8.47; BFO-CDP-IC 最佳包合工艺为 BFO 与 CDP 投料比 1:10, 包合温度 20 °C, 均质时间 6 min, 稀释 BFO 的乙醚用量 0.5 g; 经 SEM、FTIR 和 ¹H-NMR 表明了 CDP 及 BFO-CDP-IC 形成; HPLC 法测得 BFO 包封率达 80%, 载药量为 7.1%。BFO-CDP-IC 的半数致死量(LD₅₀)未测出, 安全性显著高于市售 BFO 乳剂(LD₅₀为 9.780 g/kg)。结论 制备的 BFO-CDP-IC 包封率高, 且与市售 BFO 乳剂相比毒性降低, 安全性高。**关键词:** 鸦胆子油; 交联环糊精; 包合物; 核磁共振; 红外光谱; 急性毒性试验

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)16-2843-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.16.011

Preparation and acute toxicity test of *Bruceae Fructus* oil and β -cyclodextrin polymer inclusion complexes

CHEN Lin, WU Huan-huan, HUANG Xiao-li, SONG Xian-hong, ZHOU Yun-long, LI Xiao-mei, HU Rong, BO Ping

School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225000, China

Abstract: Objective To prepare *Bruceae Fructus* oil (BFO) β -cyclodextrin polymer (CDP) inclusion complexes (BFO-CDP-IC), and investigate its safety by acute toxicity test. **Methods** BFO was extracted and CDP was prepared according to the literature, the IC of BFO with CDP (BFO-CDP) was prepared by homogenizing method and characterized by SEM, ¹H-NMR, and FT-IR. The optimum preparation process was determined by single factor test and L₉(3⁴) orthogonal test. Entrapment efficiency (EE) was determined by HPLC. Acute toxicity of BFO-CDP-IC was assessed by determining the number of deaths of ICR mice over gavage treatment for 2 weeks. The commercial emulsion of BFO (BFOE) was used as a reference. **Results** The extraction rate of BFO was 17.3%, the yield of CDP was 49.26%, and the degree of crosslinking was 8.47. The optimal conditions for preparation were as follows, ratio of BFO and CDP was 1:10, preparation temperature and time was 20 °C and 6 min, the amount of ether was 0.5 g. Additionally, the HPLC data showed that drug loading of complexes was 7.1%, and EE was 80%. In the acute toxicity test, the median lethal dose (LD₅₀) of BFOE was 9.78 g/kg. In contrast, all mice treated with IC survived even at the highest dosage (15.36 g/kg). **Conclusion** The prepared BFO-IC has high EE compared with commercially available BFOE, BFO-CDP polymer significantly decreased toxicity of BFO.

Key words: *Bruceae Fructus* oil; β -cyclodextrin polymers; inclusion complexes; ¹H-NMR; FT-IR; acute toxicity test

鸦胆子油(*Bruceae Fructus* oil, BFO)是从苦木科鸦胆子属植物鸦胆子 *Brucea javanica* (L.) Merr. 成熟果实中提取而得的油脂类物质。现代药理学研究表明 BFO 具有抗癌、抗病原体、抗氧化、抗胃溃

疡等作用。临床上将其制成 10% BFO 乳剂, 作为辅助抗肿瘤药物^[1-4], 用于治疗消化系统肿瘤。乳剂属于多相动力学不稳定分散体系, 在受热、受冷及长期储存过程中均能引起乳析和破裂, 渗漏的 BFO

收稿日期: 2016-03-04

基金项目: 研究生创新工程项目(CXLX_1441)

作者简介: 陈琳(1991—), 女, 在读硕士, 研究方向为药物制剂。Tel: 15716286564 E-mail: chenlin910107@163.com

*通信作者 胡荣(1957—), 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向为药物制剂。Tel: 18136229836 E-mail: phurong@163.com

毒性很大,对胃肠黏膜和血管壁的刺激也很严重。

环糊精(cyclodextrin, CD)是由 α -1,4葡萄糖苷键连接的环状低聚糖,其独特的笼状结构可以包含药物分子形成包合物,此时药物分子被包含于CD分子空腔中,具有很高的分散度,同时由于CD外部多羟基的亲水性,使包合物具有良好的可润湿性,从而达到对难溶药物的增溶效果,能显著改善药物的理化性质^[5-9]。本实验中所用的交联环糊精(环糊精聚合物,CDP)是一种将CD和环氧氯丙烷(EP)交联得到的聚合物。实验证明该聚合物易溶于水^[10],当小分子药物与该类聚合物复合后,能使药物的溶解度增加、稳定性提高、毒副作用降低、药代动力学改善^[11]。本实验研制了BFO-CDP包合物(BFO-CDP-IC),并对其进行了表征,通过急性毒性试验测定其半数致死量(LD₅₀),并与市售BFO乳剂进行安全性比较。

1 仪器与材料

磁力搅拌器,上海沪西分析仪器厂;剪切乳化均质机,上海标本模型厂;Tensor27傅里叶变换红外光谱(FTIR)仪、AVANCE600核磁共振仪,德国Bruker公司;S-4800场发射扫描电子显微镜(SEM),日本Hitachi High-Technologies公司;Waters e2695高效液相色谱仪、Waters 2998 PDA检测器,美国Waters公司。

BFO,实验室自制;鹅胆子苦醇,中国食品药品检定研究院,批号140208,质量分数 $\geq 98\%$;BFO乳剂,广州白云山明兴制药有限公司,批号0114101412; β -环糊精(β -CD)、EP、NaOH和其他试剂均购自国药集团化学试剂公司。清洁级ICR小鼠120只,雌雄各半,体质量18~22 g。购自扬州大学比较医学中心,许可证号SCXK(苏)2010-0004。

2 方法与结果

2.1 BFO的提取

将鹅胆子仁用万能粉碎机粉碎后,用滤纸包好,置于索氏提取器中,以石油醚(沸程60~90℃)为提取溶剂,液料比6:1,水浴回流提取,直到提取液无色为止^[12],BFO得率为17.3%。以《中国药典》2015年版记载方法对本实验中所提BFO的理化性质进行测定,其色草绿,澄明,油状,味苦,有油脂香。密度0.900 g/mL;折光率1.470;酸值8.142 6 mg KOH/g;皂化值197.0 mg KOH/g;过氧化值6.038 3 mmol/kg;碘值0.991 7 g 碘/g。

2.2 CDP的合成及其表征

2.2.1 CDP的合成 将15.76 g NaOH加入32 mL H₂O中,搅拌至溶解后称取20 g β -CD加入,搅拌至溶液澄清。将9.64 mL的EP加入溶液中,搅拌24 h,冷却至室温。用透析法除去盐后,将透析后的溶液用旋转蒸发仪蒸发至黏稠状,加入无水乙醇析出白色固体,滤过,真空干燥,即得到CDP^[13],反应产率为49.26%。根据苯酚-硫酸法测定水解液中葡萄糖的量,算出聚合物的交联度为8.47。

2.2.2 CDP的表征

(1) SEM法:分别取少量 β -CD、CDP均匀固定于样品台上,导电胶粘样、喷金镀膜后置于SEM中观察其表面形态特征。由于EP的交联作用致使两者晶格排列发生变化,产生形态学差异^[14]。如图1所示, β -CD与CDP的电镜行为有明显不同。 β -CD表面疏松,而CDP表面光滑,可能是在与EP聚合过程中形成了多个支化点,因此得到了具有较好机械强度、良好稳定性的产物^[15]。与聚合前相比,CDP的表面形态产生了显著变化,说明CDP的形成。

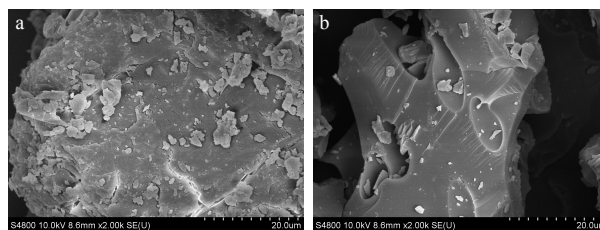


图1 β -CD(a)和CDP(b)的SEM图

Fig. 1 SEM pictures of β -CD (a) and CDP (b)

(2) FTIR法:分别取 β -CD、CDP适量,与KBr充分混合研磨,置于压片机中压片。扫描波数范围设定为4 000~400 cm⁻¹,于相同条件下对两者进行测定。比较两者-OH、-CH₂、C-O-C键吸收峰强度变化,判断是否成功合成CDP。

CD聚合反应过程为CD外部O-H键断裂,与EP键合,此过程中-OH减少,同时引入碳链和仲-OH,因此可以通过观察FTIR和¹H-NMR图谱中羟基和质子峰的强弱或化学位移(δ)来判断是否合成CDP^[16]。

如图2所示,与 β -CD相比,CDP的红外吸收光谱在3 400~3 300 cm⁻¹处的吸收减弱,而1 100~1 000 cm⁻¹左右-OH伸缩振动吸收变弱,这说明-OH的伸缩振动和平面弯曲也有所降低,这和EP与 β -CD上-OH交联反应使-OH减少有关;在2 920 cm⁻¹左右的吸收峰是-CH和-CH₂的伸缩振动,CDP在此

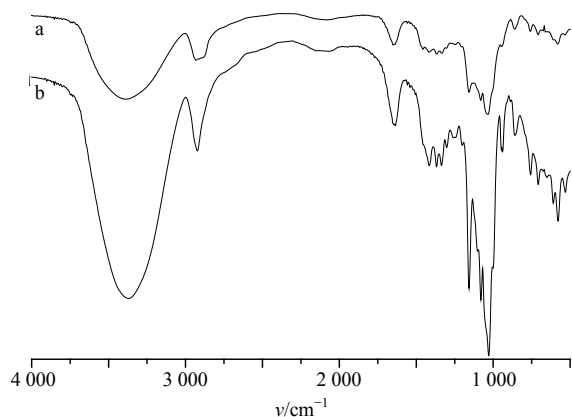


图 2 β -CD (a) 和 CDP (b) FTIR 谱图
Fig. 2 FTIR spectra of β -CD (a) and CDP (b)

处的吸收峰增强,且在 $1\ 450\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现了 -CH 的弯曲振动,这进一步说明 EP 和 β -CD 反应; CDP 经过交联聚合后仍保留了 β -CD 的 C-O-C 和 C-O 键,因此,在 CDP 中 -OH 的减少, $-\text{CH}_2$ 和 -CH 链增长,极性较 β -CD 降低且保留了 β -CD 的原有空腔结构。

(3) $^1\text{H-NMR}$ 法: 分别取适量 β -CD、CDP,以重水 (D_2O) 为溶剂分别溶解,测定它们的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图。 $^1\text{H-NMR}$ 法是一种运用较为广泛的分析检测和验证的方法,如图 3 所示,图中 $\delta\ 3.55\sim 4.00$ 的吸收峰为 β -CD 氢的化学位移, $\delta\ 4.02$ 、 3.97 (双峰) 为 β -CD 与 EP 发生交联反应后出现的新峰,说明发生了交联反应从而出现了新的羟基峰; $\delta\ 5.15$ (单峰) 为碳链上 -OH 的峰,因此证明已成功合成 CDP。EP 与 CD 反应之后,会在 $\delta\ 3.0\sim 4.0$ 出现新峰,和 CD 原有的峰重叠,所以出现谱图上的峰形。

2.3 BFO-CDP-IC 的制备及其表征

2.3.1 BFO-CDP-IC 的制备 精密称取 10 g CDP 置于烧杯中,加蒸馏水溶解,以 300 r/min 速度边均质边缓慢滴加 1.7 mL BFO 乙醚溶液,室温条件下均质 6 min 使成糊状,真空干燥,即得。

2.3.2 单因素考察

(1) 主客体分子 BFO 与 CDP 投料比的影响: 主客体分子的投料比是影响包封率的关键因素,本实验分别采用质量为 2、4、6、8、10、12 g 的 CDP 对 BFO 进行包合,其他工艺参数设置为包合温度 $20\ ^\circ\text{C}$,均质时间 6 min,稀释 BFO 的乙醚用量为 0.5 g。结果表明,当 CDP 用量为 10 g 时,包封率最高。因此在正交设计中,将 CDP 的投料量设定为 8、10、12 g。

(2) 包合温度的影响: 保持其他条件不变,分

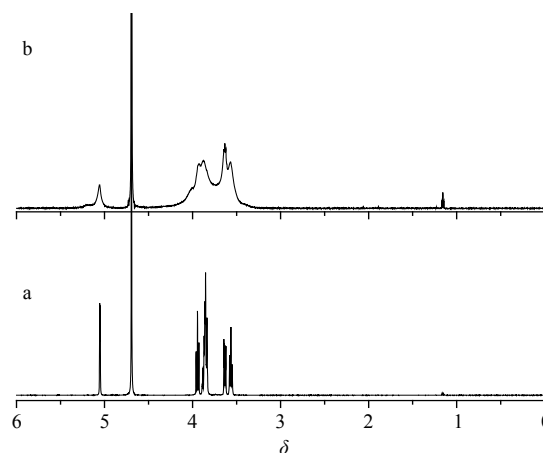


图 3 β -CD (a)、CDP (b) 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图
Fig. 3 $^1\text{H-NMR}$ spectra of β -CD (a) and CDP (b)

别在 20 、 30 、 40 、 50 、 $60\ ^\circ\text{C}$ 条件下对 BFO 进行包合,结果表明在 $20\sim 40\ ^\circ\text{C}$,随着温度的升高,包封率增加明显,当温度高于 $40\ ^\circ\text{C}$ 以后,包封率升高不明显。考虑到 BFO 受热不稳定,温度升高易导致其挥发,影响 BFO 的包封率。综合考虑将正交温度定为 20 、 30 、 $40\ ^\circ\text{C}$ 。

(3) 均质时间的影响: 保持其他条件不变,将均质时间分别设为 3、6、9、12、15 min,考察均质时间对 BFO 包封率的影响。结果表明,当均质时间为 6 min 时,所得包封率最高。6 min 后随着均质时间延长包封率下降,可能是因为 CDP 分子空穴大,均质时间延长易导致 BFO 从空腔析出,因此正交试验中将均质时间设定为 3、6、9 min。

(4) 稀释 BFO 的乙醚用量的影响: 保持其他条件不变,改变稀释 BFO 的乙醚用量,将溶液中稀释 BFO 的乙醚用量分别设为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 g,考察其对 BFO 包封率的影响。随着稀释 BFO 的乙醚用量的增加包封率逐渐升高,但稀释 BFO 的乙醚用量过高时,也会导致包封率降低,故将正交试验中稀释 BFO 的乙醚用量设定为 0.3、0.4、0.5 g。

2.3.3 HPLC 定量测定方法的建立

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Symmetry C_{18} 柱 ($250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$),流动相为甲醇-水 ($5:5$),体积流量为 $0.8\ \text{mL/min}$,柱温为 $(25\pm 5)\ ^\circ\text{C}$,进样量 $40\ \mu\text{L}$,检测波长为 $220\ \text{nm}$ 。对照品、BFO-CDP-IC 供试品及空白样品的色谱图见图 4。

(2) 对照品溶液的配制: 精密称取鸦胆子苦醇对照品 4 mg,溶于 10 mL 甲醇,配制成 $0.4\ \text{mg/mL}$ 鸦胆子苦醇的对照品储备液。

(3) BFO 供试品溶液的配制: 精密称取 5 g BFO

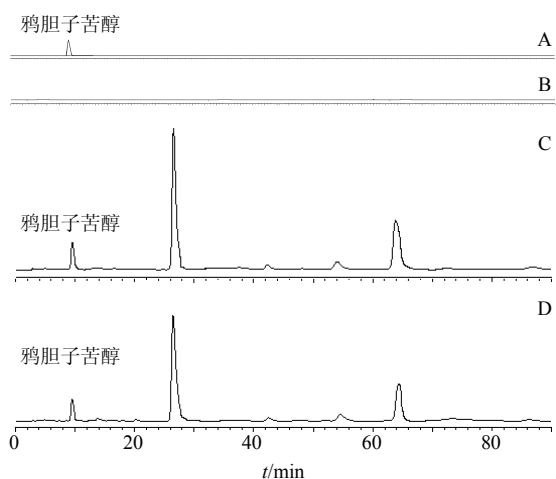


图 4 鸦胆子苦醇对照品 (A)、CDP 空白样品 (B)、BFO (C) 和 BFO-CDP-IC (D) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of brusatol reference substance (A), blank sample of CDP (B), BFO (C), and BFO-CDP-IC (D)

于 10 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，得 0.5 g/mL 的 BFO 供试品溶液。

(4) BFO-CDP-IC 供试品溶液的配制：精密称取 BFO-CDP-IC 1.0 g 于 10 mL 量瓶中，加乙醚至刻度，置于超声波清洗机中超声 1 h 后，离心 5 min，取上层，回收乙醚，加入甲醇定容至 1 mL，得解包合 BFO-CDP-IC 供试液。

(5) 空白样品溶液的制备：按照 BFO-CDP-IC 处方比例，不加鸦胆子油，按“2.3.1”项下方法制备阴性供试品，按“2.3.3 (4)”项方法制得空白样品溶液。

(6) 线性关系考察：精密吸取适量对照品储备液，用甲醇稀释至质量浓度分别为 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 mg/mL，分别进样 40 μ L，记录色谱图及峰面积。以质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归，得鸦胆子苦醇标准曲线方程： $Y=1 \times 10^7 X+987\ 534$ ， $r=0.999\ 8$ ，表明鸦胆子苦醇在 0.025~0.4 mg/mL 线性关系良好。

(7) 精密度试验：分别精密移取“2.3.3 (2)”项下的鸦胆子苦醇对照品储备液 0.1、0.2、0.4 mL，置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，得质量浓度分别为 4.0、8.0、16.0 μ g/mL 的鸦胆子苦醇对照品溶液，按“2.3.3 (1)”项下色谱条件注入液相色谱仪，每个质量浓度分别重复进样 6 次，以考察精密度。结果表明不同质量浓度下鸦胆子苦醇峰面积的 RSD 值分别为 1.37%、1.44%、1.04%，表明该方法精密度良好。

(8) 重复性试验：分别按“2.3.3 (3)”和“2.3.3 (4)”项方法制备 BFO 供试品溶液 (0.1 g/mL) 和 BFO-CDP-IC 供试品溶液，各 6 份，按“2.3.3 (1)”项下色谱条件注入液相色谱仪，考察该方法的重复性。结果表明 2 种样品中鸦胆子苦醇的 RSD 值分别为 1.06%、0.98%，表明该方法重复性良好。

(9) 稳定性试验：分别按“2.3.3 (3)”和“2.3.3 (4)”项方法制备 BFO 供试品溶液 (0.1 g/mL) 和 BFO-CDP-IC 供试品溶液，在室温下放置 0、2、6、8、12、24 h 后，按“2.3.3 (1)”项下色谱条件注入液相色谱仪，考察各供试品溶液稳定性。结果表明，2 种供试品溶液不同时间下测定的鸦胆子苦醇峰面积 RSD 分别为 0.40%、0.47%，表明 24 h 内 2 种供试品溶液稳定性良好。

(10) 加样回收率试验：精密吸取按“2.3.3 (4)”项下方法配制的已测定鸦胆子苦醇量的 BFO-CDP-IC 供试品溶液 9 份，每份各 1 mL，分别精密加入一定量的鸦胆子苦醇对照品溶液（相当于鸦胆子苦醇 0.025、0.050、0.100 mg），混匀，分为低、中、高 3 组，每组 3 份，按“2.3.3 (1)”项下条件注入液相色谱仪，重复测定 3 次，取峰面积平均值，计算质量浓度、回收率和 RSD 值。测得鸦胆子苦醇加样回收率平均值为 99.67%，RSD 为 1.64%，3 个质量浓度的回收率符合定量测定要求，表明该方法加样回收率良好。

(11) 包封率的测定：精密称取 5 g BFO 于 10 mL 容量瓶中，甲醇定容至刻度，得 0.5 g/mL 的 BFO 供试品溶液。精密称取 BFO-CDP-IC 1.0 g 于 10 mL 量瓶中，置于超声波清洗机中超声 1 h 后，2 000 r/min 离心 5 min，浓缩至 1 mL，得解包合后的 BFO-CDP-IC 供试液。分别进样 40 μ L，记录色谱图及峰面积。按照下式计算 BFO-CDP-IC 的包封率及载药量。经 HPLC 法测得 BFO 中指标成分鸦胆子苦醇的量推算得 BFO-CDP-IC 中 BFO 的包封率为 80%，载药量为 7.1%。

$$\text{包封率} = W_{\text{包}} / W_{\text{投}} = (W_{\text{投}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{投}}$$

$$\text{载药量} = (W_{\text{投}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}}$$

$W_{\text{投}}$ 为总投药量， $W_{\text{包}}$ 为包入的 BFO 量， $W_{\text{游}}$ 为游离的 BFO 量， $W_{\text{总}}$ 为 BFO-CDP 包合物质量

2.3.4 BFO-CDP-IC 制备工艺优化 根据单因素考察试验及相关文献报道^[17-19]，选取主客体分子 BFO 与 CDP 投料比 (A)、包合温度 (B)、均质时间 (C) 及稀释 BFO 的乙醚用量 (D) 4 个因素进行考察，

以包封率为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计筛选 BFO-CDP-IC 最佳工艺参数。因素水平、试验设计及结果见表 1, 方差分析见表 2。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B/°C	C/min	D/g	包封率/%
1	1 : 8 (1)	20 (1)	3 (1)	0.3 (1)	65.75
2	1 : 8 (1)	30 (2)	6 (2)	0.4 (2)	72.89
3	1 : 8 (1)	40 (3)	9 (3)	0.5 (3)	69.43
4	1 : 10 (2)	20 (1)	6 (2)	0.5 (3)	80.53
5	1 : 10 (2)	30 (2)	9 (3)	0.3 (1)	75.33
6	1 : 10 (2)	40 (3)	3 (1)	0.4 (2)	70.27
7	1 : 12 (3)	20 (1)	9 (3)	0.4 (2)	72.83
8	1 : 12 (3)	30 (2)	3 (1)	0.5 (3)	66.12
9	1 : 12 (3)	40 (3)	6 (2)	0.3 (1)	73.14
K_1	208.07	219.11	202.14	214.22	
K_2	226.13	214.34	226.56	215.99	
K_3	212.09	212.84	217.59	216.08	
R	18.06	6.27	24.42	1.86	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	59.938	2	81.771	$P < 0.05$
B	7.146	2	9.749	
C	101.722	2	138.775	$P < 0.01$
D	0.733	2		

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

对考察指标进行直观分析及方差分析, 结果显示 4 个影响因素中对 BFO-CDP-IC 包封率的影响大小顺序为 $C > A > B > D$, 优组合为 $A_2B_1C_2D_3$, 优选出的最佳包合工艺为 BFO 与 CDP 投料比 1 : 10, 包合温度 20 °C, 均质时间 6 min, 稀释 BFO 的乙醚用量 0.5 g。

2.3.5 BFO-CDP-IC 的表征

(1) SEM 法: 对 CDP 和 BFO-CDP-IC 样品经导电胶粘样、喷金镀膜后置于场发射扫描电镜中观察其表面形态特征。图 5-a、b 分别为 CDP、BFO-CDP-IC 的 SEM 图, 它们显示了 2 种不同物质的表面形态学特征^[20]。从图 5-a、b 中可以明显看出 CDP 和 BFO-CDP-IC 的区别。CDP 表面光滑, 而 BFO-CDP-IC 表面有很多小孔, 且能看到油滴状物质, 说明 BFO-CDP-IC 的形成, BFO 被包进 CDP 的空腔。

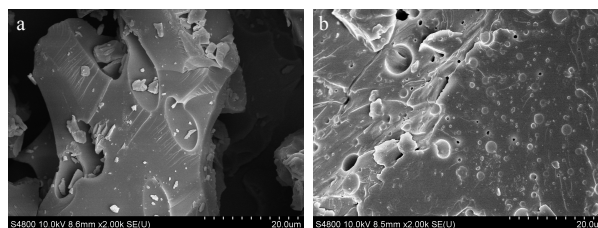


图 5 CDP (a) 和 BFO-CDP-IC (b) 的 SEM 图

Fig. 5 SEM pictures of CDP (a) and BFO-CDP-IC (b)

(2) FTIR 法: 分别取 BFO、CDP、BFO 与 CDP 两者的物理混合物以及 BFO-CDP-IC 适量, 与 KBr 混合, 压片, 在扫描波数为 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 测定其 FTIR 图。图 6 为 BFO、CDP、BFO 与 CDP 物理混合物以及 BFO-CDP-IC 的 FTIR 谱图。通过 FTIR 法可以有效地验证客体分子与 CD 是否产生包合作用, 在包合物中可以观察到与包合之前客体分子的不同之处^[21]。BFO 主要成分为油酸, 在 BFO 中其量高达 63.3%, 在图 6-a 其 FTIR 谱图里可以观察到油酸的特征吸收峰, 在图 6-a 中可以看到 3007 cm^{-1} 处的吸收峰为油酸上的烯烃 C-H 伸缩振动, 1700 cm^{-1} 左右的吸收峰为油酸的 C=O 峰。图 6-b 中在 $3400 \sim 3300 \text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为 O-H 的伸缩振动, 在 2920 cm^{-1} 左右的吸收峰是 -CH 和 -CH₂ 的伸缩振动。以上特征吸收峰在 BFO 与 CDP 的物理混合物的 FTIR 谱图中均能找到。但是在图 6-d 中, CDP 的特征吸收峰均能找到, 而油酸上的吸收峰有的发生变化, 有的甚至消失, 例如在 3007 cm^{-1} 处的 C-H 伸缩振动, 在包合物的红外谱图中就完全消失^[22]。

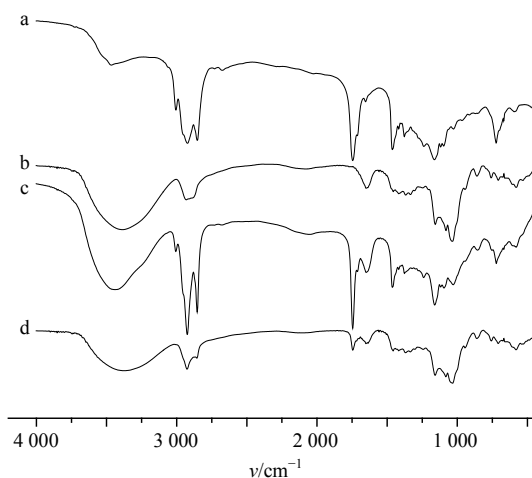


图 6 BFO (a)、CDP (b)、BFO 与 CDP 物理混合物 (c) 和 BFO-CDP-IC (d) 的 FTIR 谱图

Fig. 6 FTIR spectra of BFO (a), CDP (b), physical mixture (c), and BFO-CDP-IC (d)

油酸原有的特征吸收峰应该在 1 700 cm⁻¹ 左右, 而包合物中 C=O 的吸收峰却在 1 745 cm⁻¹。氢键的形成使电子云密度平均化, 从而使伸缩振动频率降低, 但包合物中 C=O 的吸收峰没有降低反而升高, 说明 BFO 的 C=O 没有和 CDP 的 -OH 形成氢键, 而是在环糊精的空腔内部。另外游离羧酸的 C=O 键频率出现在 1 760 cm⁻¹ 左右, 在固体或液体中 C=O 键频率出现在 1 700 cm⁻¹, 和 FTIR 谱图相符, 由此可以判断进入到空腔内的 BFO 是游离分散的状态, 也能进一步说明 BFO 在空腔内部, BFO 的 C=O 吸收应该为二聚体的 C=O 吸收峰。

(3) ¹H-NMR 法: 以 D₂O 为溶剂分别溶解 CDP 和 BFO-CDP-IC, 测定它们的 ¹H-NMR 谱图。如图 7 所示, CDP 中质子受 BFO 的影响均发生明显的位移 (表 3), 并且在包合物的 ¹H-NMR 谱图中 BFO 中油酸部分质子的化学位移和 CDP 重合, 但是也有所显示, 而其他大部分的峰都清楚的显示出来, 部分峰发生位移^[23]。在 BFO-CDP-IC 的 ¹H-NMR 谱图中出现了 6 组新的化学位移, 其中高场区 δ 0.88~2.26 出现的 5 组新峰是油酸 α-H 以外其他的质子, 而 δ 5.31 出现的新峰是油酸上的 α-H。以上证据都能证明 CDP 中含有 BFO。除此以外, 还可以通过 CDP 的化学位移变化说明 BFO 已经包覆进入 CDP

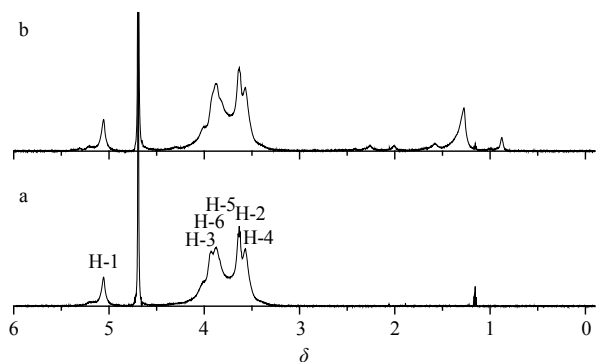


图 7 CDP (a) 和 BFO-CDP-IC (b) 的 ¹H-NMR 谱图
Fig. 7 ¹H-NMR spectra of CDP (a) and BFO-CDP-IC (b)

表 3 CDP 包含 BFO 前后 ¹H-NMR 化学位移

Table 3 ¹H-NMR chemical shifts for CH protons of CDP alone and in complex of BFO

组别	δ 值					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
CDP	5.055	3.633	3.950	3.563	3.852	3.885
BFO-CDP-IC	5.062	3.630	3.926	3.570	3.829	3.875
Δδ	0.007	-0.003	-0.024	0.007	-0.023	-0.010

的空腔内。包合物的 ¹H-NMR 谱图中可以看出 CDP 的化学位移发生了明显的变化。

首先, BFO 和 CDP 空腔内的 H-3、H-5 作用, 使得其化学位移均发生了变化, 向低场移动, 说明客体分子进入了空腔内部, 且客体分子插入较深, 甚至位于空腔小口端的 H-6 也发生化学位移。同时其他峰也都有所不同, 位于 CDP 分子空腔外部的 H-1、H-2、H-4 也发生化学位移, 这进一步证明 BFO 已经进入到 CDP 内, 形成了目标包合物。

2.4 急性毒性实验

小鼠 120 只, 随机分为 12 组, 每组 10 只, 雌雄各半, BFO-CDP-IC 和 BFO 乳剂各 6 组。在预试验及参考文献报道^[24]的基础上选 1 : 0.8 为剂量比, 最高剂量为 15.76 g/kg, 最低剂量为 6.29 g/kg, 按等比稀释法配制不同质量浓度的 BFO-CDP-IC 和 BFO 乳剂, 将其分别一次性 ig 给药后观察动物反应, 连续观察 14 d, 并对死亡小鼠进行肉眼尸检, 记录病变情况, 试验结果用 Bliss 法计算半数致死量 (LD₅₀)。

运用 Bliss 法计算 BFO 乳剂的 LD₅₀ 值 (表 4)。BFO 乳剂的 LD₅₀ 值为 9.780 g/kg, BFO-CDP-IC 观察期内供试组小鼠未见有死亡, 仅在给药后出现蜷缩少动、呼吸急促等症状, 但一段时间之后即恢复正常, 说明在 15.36 g/kg 的剂量下是安全的。以上结果表明, BFO-CDP-IC 的安全性明显高于市售 BFO 乳剂。

表 4 BFO 乳剂的 LD₅₀ 和置信区间 (CI) (n = 10)

Table 4 LD₅₀ and confidence interval for BFOE (n = 10)

剂量/(g·kg ⁻¹)	log 剂量 (x)	死亡只数	死亡率/%	回归概率 (y)	LD ₅₀ /(g·kg ⁻¹)	95% CI/(g·kg ⁻¹)
15.36	1.186 4	10	100	6.556 4	9.779 9	8.521 3~11.214 0
12.29	1.089 6	7	70	5.787 6		
9.83	0.992 6	5	50	5.017 6		
7.86	0.895 4	2	20	4.246 6		
6.29	0.798 6	1	10	3.478 4		

3 讨论

本实验成功制备 CDP, 并以 CDP 为药物载体, 制备 BFO-CDP-IC, 通过 SEM、FTIR、¹H-NMR 对包合物进行表征, 结果表明包合物制备成功。经 HPLC 法测得 BFO 中鸦胆子苦醇量为 2 mg/g, 测得 BFO-CDP-IC 的包封率为 80%, 载药量为 7.1%。以包封率为考察指标通过正交试验优化制备工艺参数, 确定最优工艺参数为 CDP 与 BFO 投料比为 10:1 (质量比), 包含温度 20 °C, 均质时间 6 min, 稀释 BFO 的乙醚用量为 0.5 g。通过急性毒性实验将 BFO-CDP-IC 的安全性上市售 BFO 乳剂进行比较, 通过实验测得上市售 BFO 乳剂的 LD₅₀ 为 9.780 g/kg, 而 BFO-CDP-IC 的 LD₅₀ 未测出, 由此可见 BFO-CDP-IC 的安全性显著高于上市售 BFO 乳剂。

参考文献

- [1] 穆大成, 朱文武, 刘劲军. 鸦胆子油乳辅助治疗肺癌胸腔积液的效果观察 [J]. 临床合理用药, 2012, 5(1B): 24-25.
- [2] 胡梦玮, 姚杨伟, 王海琴. 鸦胆子油乳剂对 43 例肺癌化疗患者疗效及免疫功能的影响 [J]. 实用肿瘤杂志, 2011, 26(3): 306-308.
- [3] 田春桃, 韩利艳. 鸦胆子油对肝癌细胞 SMMC-7721 增殖抑制作用 [J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(4): 654-656.
- [4] 陈钢, 张晓, 卢刚, 等. 鸦胆子油微囊-原位凝胶的制备及体外释药机制的研究 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1306-1309.
- [5] 李春艳. 浅谈 β-环糊精在药物制剂中的应用 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(9): 53-54.
- [6] 赵红红, 阎克里, 刘焕蓉. 氧化分解白术挥发油与羟丙基-β-环糊精包合工艺的研究 [J]. 中草药, 2015, 46(12): 1768-1773.
- [7] 夏海建, 张振海, 蒋俊, 等. 雷公藤红素环糊精与油自组装小珠载药系统的制备及其体外评价 [J]. 中草药, 2013, 44(19): 2672-2676.
- [8] 李颖, 曾茂贵, 郑笈, 等. 星点设计-效应面法优化鱼腥草挥发油-β-环糊精包合物的制备工艺 [J]. 中草药, 2014, 45(13): 1855-1862.
- [9] 杨建文, 任晓亮, 戚爱棣. 环糊精及其衍生物在中药提取中的应用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 208-213.
- [10] Gidwani B, Vyas A. Synthesis, characterization and application of epichlorohydrin-β-cyclodextrin polymer [J]. *Colloids Surf B*, 2014, 114: 130-137.
- [11] 龚敏阳. β-环糊精及其衍生物在中药制剂中的研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(S1): 90.
- [12] 欧阳辉桂, 张彬, 周武, 等. 鸦胆子油的提取工艺研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(3): 1426-1428.
- [13] Zhang W, Chen M, Diao G W. Preparation and electrochemical behavior of water-soluble inclusion complex of ferrocene with β-cyclodextrin polymer [J]. *Electrochim Acta*, 2011, 56(14): 5129-5136.
- [14] Zhang XL, Huang J, Chang P R, et al. Structure and properties of polysaccharide nanocrystal-doped supramolecular hydrogels based on cyclodextrin inclusion [J]. *Polymer*, 2010, 19(51): 4398-4407.
- [15] 金文英, 刘海玲. β-环糊精交联聚合物的合成及表征 [J]. 桂林工学院学报, 2005, 25(3): 339-341.
- [16] Liu H H, Cai X Y, Wang Y, et al. Adsorption mechanism-based screening of cyclodextrin polymers for adsorption and separation of pesticides from water [J]. *Water Res*, 2011, 45(11): 3499-3511.
- [17] 高振坤, 王兰. 姜黄素羟丙基-β-环糊精包合物的制备及其性质研究 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1951-1956.
- [18] 张生潭, 张帆, 汪铁山, 等. 正交试验优选春砂仁挥发油羟丙基-β-环糊精包合工艺 [J]. 中国药房, 2011, 22(3): 225-227.
- [19] 李仲谨, 杨威, 陈玉苗, 等. 薄荷油-β-环糊精聚合物微球包合物的制备与表征 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 271-274.
- [20] Chadha R, Saini A, Gupta S, et al. Encapsulation of rifampicin by natural and modified β-cyclodextrins: characterization and thermodynamic parameters [J]. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2010, 67(1): 109-116.
- [21] Zhang X L, Huang J, Chang P R, et al. Structure and properties of polysaccharide nanocrystal-doped supramolecular hydrogels based on cyclodextrin inclusion [J]. *Polymer*, 2010, 51(19): 4398-4407.
- [22] Periasamy R, Kothainayaki S, Rajamohan R, et al. Spectral investigation and characterization of host-guest inclusion complex of 4,4'-methylene-bis (2-chloroaniline) with beta-cyclodextrin [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 114: 558-566.
- [23] Zhao R, Tan T, Sandström C. NMR studies on puerarin and its interaction with beta-cyclodextrin [J]. *Biol Phys*, 2011, 37(1): 387-400.
- [24] 刘晓旭, 倪睿, 刘建平. 鸦胆子油脂质体的制备及其药效学评价 [J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(1): 37-40.