

水飞蓟素-磺丁基- β -环糊精包合物的制备

周桂芝^{1,2}, 吴珏^{1,2}, 杨雪晗^{1,2}, 陈珍珍^{2,3}, 刘志宏^{2*}, 宋洪涛^{2*}

1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108

2. 联勤保障部队第九〇〇医院, 福建 福州 350100

3. 福建医科大学药学院, 福建 福州 350004

摘要: **目的** 制备高水溶性的水飞蓟素-磺丁基- β -环糊精包合物。**方法** 相溶解度法筛选环糊精包合材料, 确定包合类型; 正交试验法优选水飞蓟素包合物的工艺条件; 对其溶解度进行测定并使用显微镜法、红外光谱分析、X-射线衍射分析对包合物结构进行表征。**结果** 磺丁基- β -环糊精对水飞蓟素的增溶作用更强, 确定其为包合材料, 药物与环糊精按 1 : n 的方式进行包合; 正交试验优选出的最佳工艺为水飞蓟素与磺丁基- β -环糊精的物质的量比 1 : 8, 包合温度 60 °C, 包合时间 3 h; 溶解度、显微镜、红外光谱分析和 X-射线衍射分析的结果均显示已形成包合物, 且药物以非晶型或无定型存在于包合物中。**结论** 成功制备水飞蓟素-磺丁基- β -环糊精包合物, 其可显著提高水飞蓟素的溶解度, 为其临床应用提供了实验基础。**关键词:** 水飞蓟素; 磺丁基- β -环糊精; 相溶解度; 正交试验; 红外光谱分析; X-射线衍射分析

中图分类号: R283

文献标志码: A

文章编号: 0253 - 2670(2019)17 - 4100 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.17.014

Preparation of silymarin-SBE- β -CD inclusion complex

ZHOU Gui-zhi^{1,2}, WU Jue^{1,2}, YANG Xue-han^{1,2}, CHEN Zhen-zhen^{2,3}, LIU Zhi-hong², SONG Hong-tao²

1. School of Pharmacy, Fujian University of Chinese Traditional Medicine, Fuzhou 350108, China

2. 900 Hospital of the Joint Logistics Team, Fuzhou 350100, China

3. School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

Abstract: **Objective** The inclusion compound of silymarin-SBE- β -CD was prepared. **Methods** Phase solubility method was used to screen the inclusion materials of cyclodextrin and determine the type of inclusion. The technological conditions of silymarin inclusion complex were optimized by orthogonal design. The solubility of inclusion was determined and its structure was characterized by means of microscope, infrared spectrum analysis and X-ray diffraction analysis. **Results** Due to its higher solubilization effect on silymarin, SBE- β -CD was determined as inclusion material. The ratio of drug to cyclodextrin was coated in the mode of 1 : n . The process optimized by orthogonal design was as follow: molar ratio of silymarin to SBE- β -CD of 1 : 8, inclusion temperature of 60 °C, and inclusion time of 3 h. Microscope, infrared spectrum analysis and X-ray diffraction analysis showed that the inclusion compound was formed and the drug existed in the inclusion compound as amorphous. **Conclusion** The inclusion compound of silymarin-SBE- β -CD has been successfully prepared, which can significantly improve the solubility of the drug, and provide experimental basis for its clinical application.

Key words: silymarin; SBE- β -CD; phase solubility; orthogonal design; infrared spectrum analysis; X-ray diffraction analysis

水飞蓟素(silymarin, SM)是菊科药用植物水飞蓟果实的提取物,是天然的黄酮木脂素类化合物,主要成分有花旗松素(taxifolin, TF)、水飞蓟亭(silychristin, SC)、水飞蓟宁(silydianin, SD)、水飞蓟宾(silybin, SB)以及异水飞蓟宾(isosilybin,

ISB)^[1],在临床上治疗中毒性肝损伤、肝硬化、慢性肝炎疗效显著^[2],但其水溶性和脂溶性均较差,生物利用度只有 20%~40%^[3],使其临床应用受到限制。环糊精包合技术可显著提高药物的水溶性,药物制剂中常用的环糊精种类有 β -环糊精(β -CD)、

收稿日期: 2019-06-14

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2015J01491)

作者简介: 周桂芝(1995—),女,硕士研究生,研究方向为药物新剂型与制剂新技术。Tel: (0591)22859972 E-mail: 15750845362@163.com

*通信作者 刘志宏(1986—),男,硕士,主管药师,从事药剂学研究。Tel: (0591)22859459 E-mail: liuzh827@sina.cn

宋洪涛(1968—),男,博士,主任药师,从事中药学、药剂学、临床药学研究。Tel: (0591)22859459 E-mail: sohoto@vip.163.com

羟丙基- β -环糊精 (HP- β -CD)、2,6-二甲基- β -环糊精 (DM- β -CD)、磺丁基- β -环糊精 (SBE- β -CD), 本研究首先对环糊精的种类进行筛选, 最终选用 SBE- β -CD 作为包合材料。SBE- β -CD 是一种阴离子型高水溶性的环糊精衍生物, 能很好地与药物分子包合形成非共价复合物, 从而提高药物的稳定性, 与其他 β -CD 衍生物相比具有增溶效果强、肾毒性低、溶血作用小等优点^[4]。辉瑞开发的抗精神病药 Ziprasidone 注射剂就是以 SBE- β -CD 作为包合材料, 其分别于 2000 年和 2001 年获准在瑞典和美国上市^[5-6]。本研究以 SBE- β -CD 为包合材料成功制备了 SM 环糊精包合物, 并对 SM 的 5 个主要活性成分的包合率分别进行了测定, 以了解每个成分的包合情况。

1 仪器与材料

KQ-800KDE 型高功率数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); FD-2A 真空冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司); Agilent1200 型快速高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); DV215CD 型精密分析天平 (上海奥豪斯仪器有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (巩义市子华仪器有限责任公司); PHS-3C 型精密 pH 计 (上海雷磁科学仪器公司)。

SM 原料药 (批号 20180102, TF、SC、SD、SB、ISB 质量分数分别为 2.37%、11.74%、4.10%、34.54%、6.04%, 辽宁盘锦华成制药厂); TF (批号 16031335, 质量分数 98.0%)、SC (批号 16012001, 质量分数 98.0%)、SD (批号 16032031, 质量分数 98.0%)、SB (批号 15091631, 质量分数 98.0%)、ISB (批号 16032122, 质量分数 98.0%), 上海同田生物技术股份有限公司; HP- β -CD (批号 161202, 淄博千汇生物科技有限公司); β -CD (批号 20161206)、DM- β -CD (批号 20170730)、SBE- β -CD (批号 20190111), 山东滨州智源生物科技有限公司; 甲醇 (色谱纯, 上海科丰化学试剂有限公司); 纯化水 (实验室自制)。

2 方法与结果

2.1 SM 分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 高效液相色谱系统 (DAD 检测器), 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 柱温 40 $^{\circ}$ C, 进样量为 20 μ L, 检测波长为 288 nm, 以甲醇-0.05%磷酸水溶液为流动相, 体积流量为 1 mL/min, 进行梯度洗脱, 洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution programs

t/min	甲醇/%	0.05%磷酸水溶液/%
0	35	65
4	35	65
16	40	60
23	45	55
25	50	50
40	50	50

2.1.2 溶液的制备

(1) 供试品溶液: 取包合物约 180 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加少量甲醇超声溶解, 再加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

(2) 对照品溶液: 精密称取 TF、SC、SD、SB、ISB 对照品适量, 置于 100 mL 量瓶中, 加少量甲醇超声溶解, 再加甲醇稀释至刻度, 配制成质量浓度分别为 73.2、80.4、73.0、170.8、92.8 μ g/mL 的对照品溶液。

2.1.3 专属性考察 称取 SM 原料药 200 mg, 放置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声溶解之后, 再加甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密移取此溶液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加入 65%甲醇稀释至刻度, 即得供试品溶液。取适量空白溶剂、对照品溶液、供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件测定。结果见图 1, 表明空白溶剂对 SM 的测定无干扰。

2.1.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、2.0、2.5、5.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 配制成 TF 质量浓度为 0.7、1.5、3.0、6.0、12.0、15.1、18.8、37.4 μ g/mL; SC 质量浓度为 0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、16.1、20.1、40.2 μ g/mL; SD 质量浓度为 0.7、1.5、3.0、6.0、11.9、15.0、18.7、37.5 μ g/mL; SB 质量浓度为 1.7、3.4、6.8、13.7、27.3、34.2、42.7、85.4 μ g/mL; ISB 质量浓度为 0.9、1.8、3.7、7.4、14.8、18.6、23.2、46.4 μ g/mL 的混合对照品溶液, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 进样量为 20 μ L, 计算峰面积。峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 得各成分的线性回归方程, 结果见表 2。

2.1.5 精密度试验 分别配制低、中、高 3 个质量浓度的 5 种成分对照品溶液, TF 质量浓度分别为 1.5、6.0、15.1 μ g/mL, SC 质量浓度分别为 3.2、12.8、

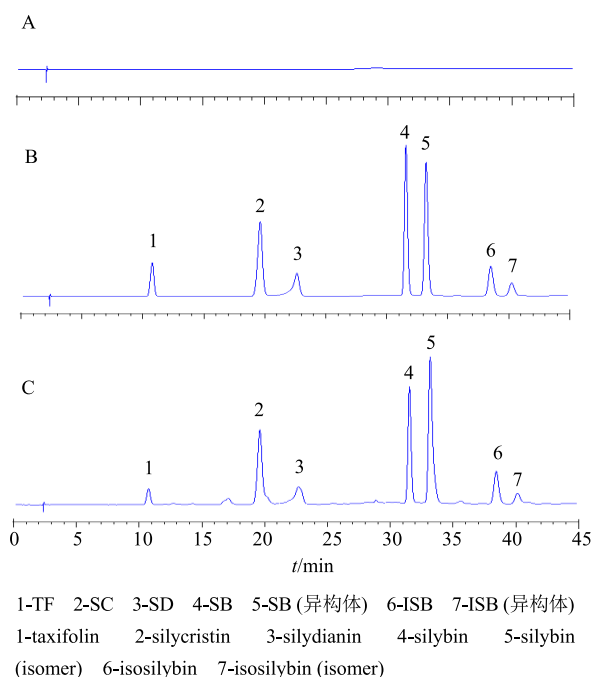


图 1 空白溶剂 (A)、对照品溶液 (B) 和供试品溶液 (C) HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank (A), standard (B), and sample (C)

表 2 各成分线性方程

Table 2 Linear equation of various constituents

成分	线性方程	r	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
TF	$Y=57.85 X-14.38$	0.999 9	0.7~36.6
SC	$Y=52.62 X-19.45$	0.999 6	0.8~40.2
SD	$Y=37.28 X-74.96$	0.997 5	0.7~36.5
SB	$Y=51.02 X-3.837$	0.999 9	1.7~85.4
ISB	$Y=52.46 X-4.900$	0.999 9	0.9~46.4

20.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SD 质量浓度分别为 3.0、11.9、18.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SB 质量浓度分别为 6.8、34.2、85.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ISB 质量浓度分别为 3.7、14.8、23.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每个质量浓度连续进样 5 次, 测定并计算其质量浓度, 得日内精密性; 以后连续 5 d 测定并计算质量浓度, 即得日间精密性。结果表明, 日间和日内精密性相对标准偏差均小于 2%, 该方法精密性良好。

2.1.6 重复性试验 称取原料药 200 mg, 按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件随机进样, 依各成分峰的保留时间、峰面积计算各自 RSD 分别为 1.7%、1.3%、1.8%、2.5%和 2.6%, 结果均小于 3%, 说明方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取供试品 (批号 20190415) 溶

液, 于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 取样测定, 测得 TF、SC、SD、SB、ISB 峰面积 RSD 分别为 0.64%、1.26%、0.84%、1.34%、0.61%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取含有量已知供试品 (批号 20190508) 6 份, 每份约 60 mg (TF、SC、SD、SB、ISB 质量分数分别为 3.35、21.28、11.65、53.45、10.03 mg/g), 置于 100 mL 量瓶中, 精密加入一定量对照品, 在“2.1.1”项下色谱条件测定, 计算加样回收率。结果 TF、SC、SD、SB、ISB 平均加样回收率分别为 98.76%、98.65%、99.52%、99.88%、98.96%, RSD 分别为 0.96%、0.97%、0.72%、0.68%、1.03%。

2.1.9 含量测定 精密称取 SM 原料药, 置于 100 mL 量瓶中加入甲醇溶解并用其稀释至刻度, 经 0.45 μm 的微孔滤膜滤过后, 取 20 μL 续滤液, 进样测定。结果见表 3。

表 3 SM 各成分的质量分数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Content of each component of silymarin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

成分	质量分数/%
TF	2.37 ± 0.01
SC	11.74 ± 0.07
SD	4.10 ± 0.02
SB	34.54 ± 0.27
ISB	6.04 ± 0.02

2.1.10 平衡溶解度的测定 在 pH 1.2 的盐酸溶液、蒸馏水 (pH 5.6)、pH 7.5 PBS、0.1% SDS、0.5% SDS 以及 1.0% SDS 溶剂中加入过量 SM 原料药粉末, 制备成过饱和溶液, 每种溶剂平行制备 3 个样品, 于 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、100 r/min 的恒温水浴中机械振荡 24 h, 取样, 并经孔径为 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 滤去初滤液, 取 20 μL 进样, 测得续滤液中 SM 各有效成分的含量, 将测定的 3 个样品取平均值, 计算其各成分在各溶剂中的溶解度, 结果见表 4。

2.2 环糊精包合物的制备

2.2.1 环糊精包合材料的筛选 参照 Higuchi 等^[7]的方法, 分别称取 β -CD 113.4 mg、HP- β -CD 140.3 mg、DM- β -CD 133.3 mg、SBE- β -CD 216.2 mg 置于 100 mL 量瓶中, 少量纯化水超声溶解后, 用纯化水稀释至刻度, 即得 1 mmol/L 的标准液。分别量取 0、2、4、6、8、10 mL 各标准液置于 10 mL 量瓶中, 纯化水稀释至刻度, 制成梯度浓度溶液, 将过量 SM 原料药加入上述各梯度浓度溶液中, 在 37°C ,

表 4 SM 原料药在不同介质中的溶解度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Solubility of silymarin in different mediums ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

溶液	溶解度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)				
	TF	SC	SD	SB	ISB
pH 1.2 盐酸	51.98 $\pm$ 5.29	41.17 $\pm$ 8.90	13.22 $\pm$ 6.12	11.73 $\pm$ 1.55	7.90 $\pm$ 1.08
蒸馏水 (pH 5.6)	69.48 $\pm$ 3.34	53.62 $\pm$ 4.18	17.99 $\pm$ 6.68	14.84 $\pm$ 3.31	8.99 $\pm$ 2.26
pH 7.5 PBS	122.50 $\pm$ 2.48	218.02 $\pm$ 4.59	145.78 $\pm$ 9.11	90.83 $\pm$ 3.59	50.71 $\pm$ 1.03
0.1% SDS	122.15 $\pm$ 2.62	253.20 $\pm$ 5.61	160.68 $\pm$ 0.12	140.43 $\pm$ 2.03	79.35 $\pm$ 0.30
0.5% SDS	128.57 $\pm$ 1.16	269.38 $\pm$ 0.21	172.36 $\pm$ 6.67	191.78 $\pm$ 5.96	146.94 $\pm$ 5.75
1.0% SDS	127.57 $\pm$ 2.50	594.72 $\pm$ 3.34	249.96 $\pm$ 0.46	1 429.88 $\pm$ 5.42	352.19 $\pm$ 1.14

100 r/min 水浴振荡 24 h。静置后, 8 000 r/min 离心 7 min, 取上清液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 将续滤液稀释 10 倍进样。以各环糊精的浓度为横坐标, SM 浓度为纵坐标作图, 得到相溶解度图, 见图 2。

结果表明 TF、SC、SD 3 种成分在不同浓度环糊精下的溶解度差别较小, SB 与 ISB 在其溶解度大小为 $\text{SBE-}\beta\text{-CD} > \text{DM-}\beta\text{-CD} > \text{HP-}\beta\text{-CD} > \beta\text{-CD}$, 故在以下实验中采用 SBE- β -CD 作为载体制备包合物。

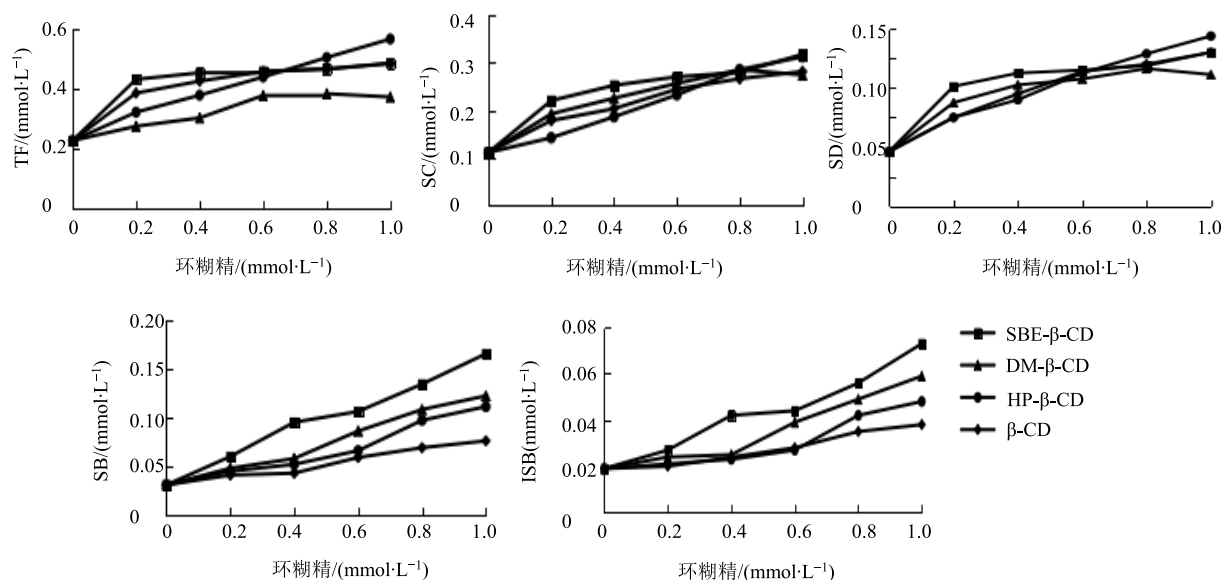


图 2 SM 在不同浓度环糊精下的溶解度

Fig. 2 Solubility of silymarin at different concentrations of cyclodextrin

SM 各成分在 SBE- β -CD 溶液的相溶解度见图 3, 各成分的浓度随 SBE- β -CD 溶液浓度的增加而呈非线性增加, 表明 SBE- β -CD 在该浓度范围内药物与环糊精形成的是 1 : n ($n > 1$) 的包合物。

2.2.2 包合物的制备 采用冷冻干燥法制备包合物, 称取适量的 SBE- β -CD, 溶于一定量的纯化水中, 制备成 SBE- β -CD 水溶液, 称取 SM 原料药适量, 加入少量的无水乙醇超声溶解, 在一定温度下, 缓慢滴加到 SBE- β -CD 水溶液中, 磁力搅拌一定时间后, 静置, 再置于离心机中 8 000 r/min 离心 10 min, 过 0.45 μm 的微孔滤膜后, 取续滤液于 4 $^{\circ}\text{C}$

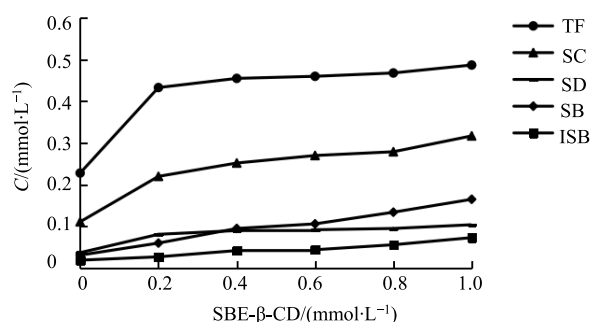


图 3 SM 各成分在不同浓度 SBE- β -CD 溶液中的溶解度

Fig. 3 Solubility of different components of silymarin in different concentrations of SBE- β -CD solution

冰箱中冷藏 4 h, 冷阱 ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) 预冻 5~6 h, 再置于冷冻干燥机中干燥 24 h, 研磨过 80 目筛, 即得。对其包封率和包合物得率进行测定。

包封率 = 包合物中的药物含量 / 总投药量

包合物得率 = 包合物的质量 / (环糊精投入量 + 投药量)

2.2.3 单因素考察 以包封率为考察指标, 考察物质的量比、包合时间、包合温度对环糊精包合物的影响。

(1) 物质的量比: 通过“2.2.1”项研究结果可知, SBE- β -CD 在 0~1 mmol/L 内药物与环糊精形成 1 : n ($n > 1$) 的包合物, 故选用物质的量比为 1 : 6、1 : 8、1 : 10、1 : 12 进行考察, 见图 4。结果表明, 随着 SM 与 SBE- β -CD 物质的量比增加, 各成分的包封率呈现出先上升后下降的趋势, 故选用 1 : 6、1 : 8、1 : 10 进行后续的正交试验。

(2) 包合温度: 本课题首先考察了 40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ 对其包合的影响 (图 5), 但发现当包合温度为 70 $^{\circ}\text{C}$ 时, SM 药物出现不稳定的状态, 故选用 40、50、60 $^{\circ}\text{C}$ 进行后续的正交试验。

(3) 包合时间: 考察包合时间 3、4、5、6 h 对环糊精包合的影响。结果表明, 包合率并没有因为包合时间的增加而增加 (图 6), 时间对环糊精包合的影响较小, 考虑制剂工艺的耗时, 选择 3、4、5 h

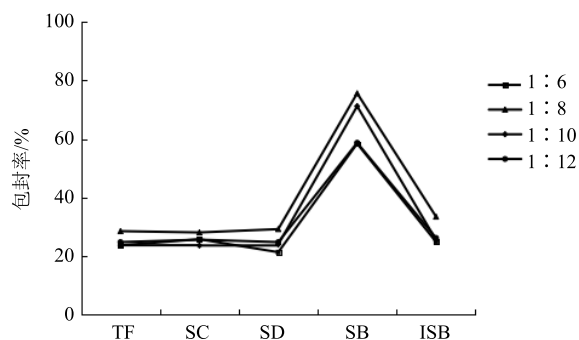


图 4 物质的量比对环糊精包合的影响

Fig. 4 Effect of molar ratio on cyclodextrin inclusion

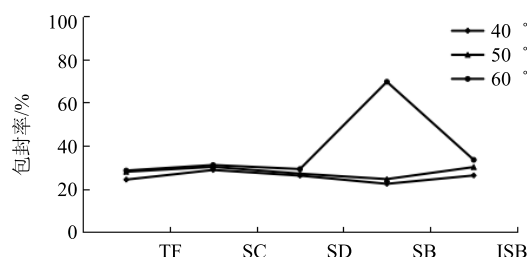


图 5 包合温度对环糊精包合的影响

Fig. 5 Effect of inclusion temperature on cyclodextrin inclusion

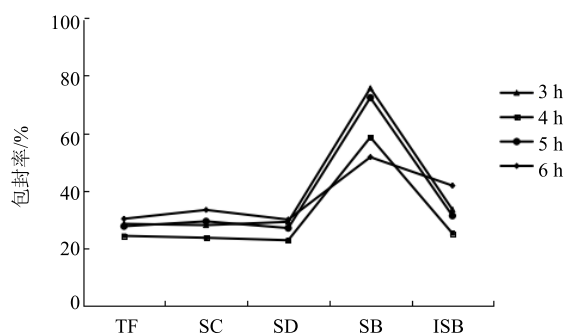


图 6 包合时间对环糊精包合的影响

Fig. 6 Effect of inclusion time on cyclodextrin inclusion

进行后续的正交试验。

2.2.4 正交试验 考察指标为包封率和包合物得率, 考虑因素为主客分子的物质的量比 (A)、包合温度 (B) 及包合时间 (C), 依据 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 各因素水平设计见表 5, 实验结果见表 6, 方差分析结果见表 7。

SM 5 种成分包封率的权重系数^[8]分别为 0.03、0.15、0.04、0.51、0.07, 包合得率的权重系数为 0.2, 综合评分 = (TF 包封率 / 最高 TF 包封率) $\times$ 0.03 $\times$ 100 + (SC 包封率 / 最高 SC 包封率) $\times$ 0.15 $\times$ 100 + (SD 包封率 / 最高 SD 包封率) $\times$ 0.04 $\times$ 100 + (SB 包封率 / 最高 SB 包封率) $\times$ 0.51 $\times$ 100 + (ISB 包封率 / 最高 ISB 包封率) $\times$ 0.07 $\times$ 100 + (包合得率 / 最高包合得率) $\times$ 0.2 $\times$ 100。

由方差分析结果可知, 物质的量比、包合温度对包合结果的影响比包合时间大。综合分析结果, 为了缩短生产周期, 合理降低成本, 确定最佳包合工艺为 $A_2B_3C_1$, 即 SM 与 SBE- β -CD 的物质的量比为 1 : 8, 包合温度 60 $^{\circ}\text{C}$, 包合时间 3 h。取 SM 3 份, 按最佳包合工艺制备 3 批包合物 (批号 20190415、20190508、20190518), TF 的包封率为 28.18% ($n=3$, RSD=2.13%)、SC 的包封率为 26.56% ($n=3$, RSD=2.17%)、SD 的包封率为 28.55% ($n=3$, RSD=0.87%)、SB 的包封率为 72.95% ($n=3$, RSD=4.87%)、ISB 的包封率为

表 5 SBE- β -CD 包含 SM 因素水平

Table 5 Level of SBE- β -CD inclusion silymarin factor

水平	因素		
	A	B/ $^{\circ}\text{C}$	C/h
1	1 : 6	40	3
2	1 : 8	50	4
3	1 : 10	60	5

表 6 L₉(3⁴) 正交试验方案及结果
Table 6 L₉(3⁴) Orthogonal test protocol and results

试验号	A	B	C	包封率/%					包合物得率/%	综合评分
				TF	SC	SD	SB	ISB		
1	1	1	1	18.58	13.63	21.14	20.94	15.32	55.16	41.04
2	1	2	2	26.76	33.86	18.35	27.88	28.27	81.35	63.96
3	1	3	3	26.89	26.93	28.30	41.00	30.57	79.43	71.15
4	2	1	2	21.26	22.03	21.76	33.67	24.33	76.98	60.67
5	2	2	3	27.20	29.39	26.62	55.66	32.56	81.28	82.77
6	2	3	1	28.54	28.09	29.23	75.62	33.49	85.98	97.44
7	3	1	3	14.76	21.33	24.03	19.53	24.89	75.22	63.65
8	3	2	1	22.08	21.81	24.82	47.95	26.15	79.79	71.74
9	3	3	2	25.81	26.43	27.87	70.42	31.76	81.17	91.25
K ₁	75.93	70.33	80.39							
K ₂	89.28	86.66	85.12							
K ₃	83.02	91.24	82.72							
R	13.36	20.91	4.73							

表 7 方差分析结果
Table 7 Variance analysis results

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	差异性
A	771.59	2	385.80	10.01	P<0.10
B	1 495.38	2	747.69	19.39	P<0.10
C	9.85	2	4.93	0.13	P>0.10
误差	77.09	2	38.55		
合计	2 353.92	8			

27.79%($n=3$, RSD=3.29%), 包合物得率为 85.34% ($n=3$, RSD=2.13%)。结果表明, 该 SM 的包合工艺条件稳定, 具有重复性和可操作性。

2.3 包合物的验证

2.3.1 包合物平衡溶解度的测定 取过量的 SM 包合物, 按照“2.1.10”项下方法测定其平衡溶解度, 结果见表 8。由表 8 可知, 将 SM 制成包合物之后, 其在不同介质中的溶解度均有所提高, 故采用包合技术可显著提高难溶性药物 SM 的溶解度。

2.3.2 显微镜法 分别取 SM 原料药、SBE- β -CD、物理混合物(称取处方量的药物与载体, 研细, 以等量递加法充分混合后过 80 目筛, 即得)和包合物粉末少许, 置于载玻片上, 然后将载玻片置于显微镜物镜下, 调节放大倍数为 20 $\times$ 40, 分别对各样品图像采集, 结果见图 7。结果显示, 在 SM 原料药、SBE- β -CD、SM 和 SBE- β -CD 的物理混合物的显微镜视野中, 几种物质单独游离存在, 而在 SM 环糊精包合物的显微镜视野中, 看不到游离的药物和

表 8 SM 包合物在不同介质中的溶解度 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 8 Solubility of silymarin inclusion complex in different mediums ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

溶液	溶解度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
	TF	SC	SD	SB	ISB
pH 1.2 盐酸	101.07	186.65	30.53	167.01	62.53
蒸馏水 (pH 5.6)	113.86	222.87	40.71	215.67	69.43
pH 7.5 PBS	225.48	980.76	324.51	1 407.96	374.92
0.1% SDS	234.11	1 114.85	366.40	2 171.89	625.37
0.5% SDS	337.07	1 589.14	594.24	3 091.56	1 263.46
1.0% SDS	376.21	1 786.07	742.57	3 083.07	1 346.89

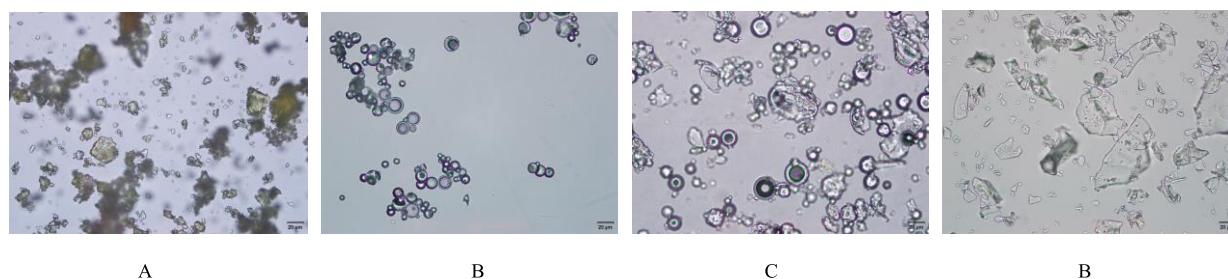


图 7 SM 原料药 (A)、SBE-β-CD (B)、物理混合物 (C) 和包合物 (D) 的显微镜图

Fig. 7 Microscopy of silymarin power (A), SBE-β-CD (B), physical mixture (C) and silymarin inclusion complex (D)

SBE-β-CD, 而是以一种新的物质形态存在, 由此可初步判断 SM 与 SBE-β-CD 已形成包合物。

2.3.3 红外光谱分析 分别称取 SM 原料药、载体、物理混合物、包合物少许, 与溴化钾 (约 200 mg) 于玛瑙研钵中, 在红外光灯下混合研磨均匀后, 压片测定, 进行红外光谱扫描, 结果见图 8。由图可知, SM 于 $3\,450\text{ cm}^{-1}$ 处出现的酚羟基 (Ar-OH) 峰 (原料药的特征峰之一), 包合物的红外图谱中未见 SM 特征吸收峰, 其主要显示 SBE-β-CD 的特征峰, 但包合物与物理混合物的图谱存在一定的差异, 包合物中有 4 个峰发生蓝移 σ : $2\,881.63$ 、 $1\,507.12$ 、 $1\,459.18$ 、 $1\,422.45\text{ cm}^{-1}$; 有 4 个峰发生红移 σ : $2\,938.78$ 、 $1\,640.10$ 、 $1\,373.47$ 、 $1\,330.61\text{ cm}^{-1}$; 且增加了 2 个峰 σ : $1\,204.08$ 、 951.02 cm^{-1} 。物理混合物的红外图谱叠加了衰减的 SM 特征峰和 SBE-β-CD 特征峰, 主要表现出 SBE-β-CD 的特征峰。结果显示, 包合物与物理混合物图谱相比, 峰的位移与强度均发生了变化, 且有新的吸收峰产生, 证明 SM 与 SBE-β-CD 形成了包合物。

2.3.4 X-射线衍射法 取 SM、SBE-β-CD、物理混

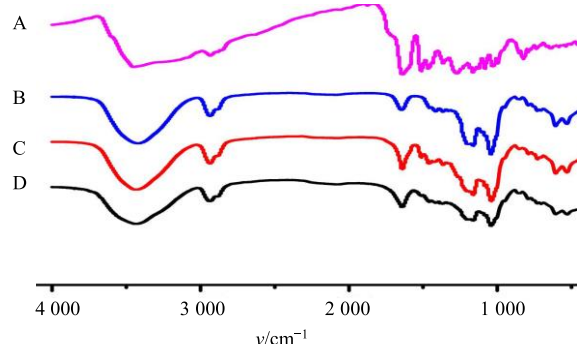


图 8 SM 原料药 (A)、SBE-β-CD (B)、物理混合物 (C) 和包合物 (D) 的红外光谱图

Fig. 8 Infrared spectroscopy of silymarin power (A), SBE-β-CD (B), physical mixture (C) and silymarin inclusion complex (D)

合物以及 SM-SBE-β-CD 包合物粉末进行 X-射线衍射分析, 工作条件: CuKα 靶, 石墨单色器衍射单色化, 管电压 50 kV, 管电流 20 mA, 结果见图 9。由图可知, SM 原料药在 $18\sim 32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处有连续的结晶衍射峰, SBE-β-CD 无结晶峰, 物理混合物中原料药的结晶峰有一定的减弱, 但依然可见, 包合物中原料药的结晶峰消失, 说明在包合物中药物可能以非晶型或无定型的形式存在, 推测药物被包合进 SBE-β-CD 中。

3 讨论

5 种指标性成分的对照品溶液在 $200\sim 400\text{ nm}$ 内的紫外光谱扫描结果显示, 其最大吸收波长在 288 nm , 而 SBE-β-CD 在此波长处无吸收, 不干扰测定。故将检测波长定为 288 nm 。

SB 和 ISB 均有一对异构体, 参考文献报道^[9]及 SM 胶囊 (Legalon[®], 德国马博士药厂) 的质量标准 (JX20030199), 在含量测定时 SB 和 ISB 的峰为其异构体的 2 个峰相加。

通过相溶解度法实验发现, SBE-β-CD 与 SM 的物质的量比约为 6:1, 远大于二者 1:1 的包合比。这样的结果与文献报道^[10]中多个难溶性药物与

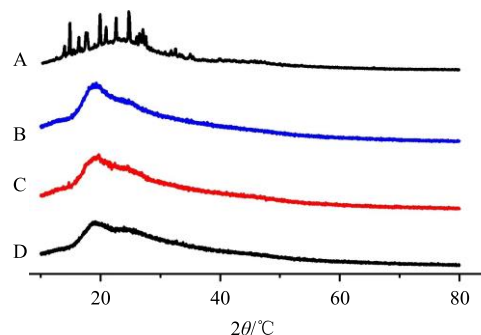


图 9 SM 原料药 (A)、SBE-β-CD (B)、物理混合物 (C) 和包合物 (D) 的 X-射线衍射图

Fig. 9 X-ray diffraction pattern of silymarin power (A), SBE-β-CD (B), physical mixture (C) and silymarin inclusion complex (D)

β -CD 包合实验的结果相似,提示可以通过对包合工艺参数和条件的优化来减少环糊精的用量。

本研究用 HPLC 法分别测定 TF、SC、SD、SB 和 ISB 的包合率,能够更加真实、准确地反映其各有效成分的包合情况^[11]。SM 的包合效果主要由各有效成分的包合率及包合物得率反映,因此,综合评分中根据各有效成分的药效作用强弱及含量多少确定其权重系数^[8],SB 的含量最高,药效作用也最强,即 TF、SC、SD、SB、ISB 的包合率所占权重系数分别为 0.03、0.15、0.04、0.51 和 0.07,包合物得率的权重为 0.2。综合包合率及包合物得率评价包合工艺,多方面多指标评价包合工艺。5 个有效成分中除主要活性成分 SB 外其他 4 个成分的包合率低且相差不大的原因可能是它们的相对分子质量比较接近,都在 482 左右,推测进入环糊精分子空腔时各成分之间会存在竞争。5 个有效成分的极性相差不大(SD>TF>ISB>SC=SB),环糊精分子的空腔是呈疏水性的,极性小的药物更容易被包合;药物的含量越高,包合上的机率也会越大,SB 的含量是 SC 的 3 倍多,其他 3 种成分的含量也远低于 SB,因此,SB 的竞争能力会强于其他 4 个成分。

药物分子进入环糊精空腔后,其结晶性会降低甚至失去;同时环糊精分子本身也会因包合了药物分子而使自身的晶体状态、空间结构及特定位置等发生改变,因此可通过显微镜或扫描电镜来观察包合前后环糊精或药物的形态变化^[12-13],从而初步判断是否形成了包合物。通过红外光谱法和 X-射线衍射法测定结果,可进一步确定 SM 包合进入 SBE- β -CD 空腔内形成了包合物,而非单纯的吸附结合作用。

参考文献

- [1] Surai P F. Silymarin as a natural antioxidant: An overview of the current evidence and perspectives [J]. *Antioxidants*, 2015, 4(1): 204-247.
- [2] Javed S, Kohli K, Ali M. Reassessing bioavailability of silymarin [J]. *Altern Med Rev*, 2011, 16(3): 239-249.
- [3] Sonali D, Tejal S, Vaishali T, et al. Silymarin-solid dispersions: Characterization and influence of preparation methods on dissolution [J]. *Acta Pharm*, 2010, 60(4): 427-443.
- [4] 谷福根,高永良,崔福. 磺丁基醚- β -环糊精及其在药剂学中的应用 [J]. 中国新药杂志, 2004, 13(1): 15-19.
- [5] FDA psychopharm acological drug sadvisory committee briefing document for ziprasidone mesylate for intramuscular injection [EB/OL]. [2001-02-15]. http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3685b2_01_p_fizer.pdf.
- [6] Wang W, Guo Q L, You Q D, et al. The anticancer activities of wogonin in murine sarcoma S180 both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(6): 1132-1137.
- [7] Higuchi T, Connors K A. Phase solubility techniques [J]. *Adv Anal Chem Instr*, 1965, 4: 117-212.
- [8] 陈娇,余姣,江敏瑜,等. 基于多指标权重分析和正交设计法对三七跌打损伤软膏提取工艺的探究 [J]. 中药材, 2017, 40(2): 412-415.
- [9] 徐静涵,薛芸,王彦,等. 核壳型色谱柱-高效液相色谱法快速分离检测水飞蓟素中 7 种非对映异构体 [J]. 化学与生物工程, 2017, 34(6): 65-70.
- [10] 蒋娟,陈萌萌,王淼,等. 泊沙康唑-磺丁基- β -环糊精包合物的制备 [J]. 沈阳大学学报, 2016, 33(7): 519-524.
- [11] 周晶,李玲,崔冬雪,等. 正交试验法优选葛根复方中挥发油的 β -环糊精包合工艺 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1): 105-108.
- [12] Michalska P, Wojnicz A, Ruiz-Nuno A, et al. Inclusion complex of ITH12674 with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation, physical characterization and pharmacological effect [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.09.072.
- [13] 郭涛,王志远,宋洪涛,等. 大蒜油 2-羟丙基- β -环糊精包合物的制备与鉴定 [J]. 解放军药学学报, 2006, 22(2): 91-94.