

酸碱位移结合喷雾干燥法制备染料木素三元包合物体系

王明帅, 宁 夏, 刘华石, 王井侠, 段亚辉, 耿晨阳, 王伟明*

黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036

摘 要: **目的** 优选染料木素三元包合物的制备工艺, 并对其体外抗癌活性进行评价。**方法** 通过相溶解度及分子模拟对染料木素二元与三元包合物的溶解性和稳定性进行评价, 优选染料木素包合物的种类。通过处方和制备工艺研究, 确定三元包合物的处方组成和制备工艺。利用傅里叶变换红外光谱、X 射线粉末衍射、差示扫描量热法和扫描电子显微镜等对染料木素三元包合物进行表征, 采用人乳腺癌 MCF-7 细胞和人非小细胞肺癌 A549 细胞对染料木素三元包合物的抗癌活性进行考察。**结果** 染料木素三元包合物与二元包合物相比溶解度更高、稳定性更好。研究表明, 以处方染料木素与 HP- β -CD 物质的量比 (1:1.8), 加入染料木素-HP- β -CD 总质量 5% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) K30, 通过酸碱位移结合喷雾干燥法制备染料木素三元包合物, 染料木素的溶解度可达 8.8 mg/mL, 溶出度为 93%; 体外抗癌活性实验表明, 染料木素三元包合物能明显增强染料木素对 MCF-7 细胞和 A549 细胞的抑制作用。**结论** 优选工艺为酸碱位移结合喷雾干燥法制备染料木素三元包合物, 能明显提高染料木素的溶解性, 并显著增强染料木素对 MCF-7 细胞和 A549 细胞的抑制作用。

关键词: 染料木素; 酸碱位移; 喷雾干燥; 三元包合物; 抗癌活性; 相溶解度; 分子模拟; MCF-7 细胞; A549 细胞

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)07-2197-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.07.007

Preparation of genistein ternary inclusion complex by acid-base displacement combined with spray drying method

WANG Mingshuai, NING Xia, LIU Huashi, WANG Jingxia, DUAN Yahui, GENG Chenyang, WANG Weiming

Heilongjiang Academy of Chinese Medical Sciences, Harbin 150036, China

Abstract: **Objective** To optimize the preparation process of genistein ternary inclusion complex, and evaluate its anticancer activity *in vitro*. **Methods** The solubility and stability of binary and ternary inclusion complexes of genistein were evaluated by phase solubility and molecular simulation, and the type of genistein inclusion complex was preferred. Through the formulation and preparation process study, the formulation composition and preparation process of the ternary inclusion complex of genistein were determined. Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray powder diffraction, differential scanning calorimetry and scanning electron microscopy were used to characterize the formation of inclusion complex, and its anticancer activity of genistein ternary inclusion complex was investigated in human breast cancer MCF-7 cells and human non-small cell lung cancer A549 cells. **Results** The genistein ternary inclusion complex was more soluble and stable than the binary inclusion complex. The results showed that the ternary inclusion complex of genistein was prepared by acid-base displacement combined with spray drying with the prescription of genistein and HP- β -CD with molar ratio of 1:1.8, and 5% total amount of polyvinylpyrrolidone (PVP) K30 to genistein-HP- β -CD was added. The solubility of genistein was 8.8 mg/mL, and the dissolution was 93%. *In vitro* anticancer activity experiments showed that genistein ternary inclusion complexes could significantly enhance the inhibitory effect of genistein on MCF-7 cells and A549 cells. **Conclusion** The preferred process was acid-base displacement combined with spray drying to prepare ternary inclusion complexes, which could significantly improve the solubility of genistein and significantly enhance its inhibitory effect on MCF-7 cells and A549 cells.

Key words: genistein; acid-base displacement; spray drying process; ternary inclusion complex; anticancer activity; phase solubility; molecular simulation; MCF-7 cells; A549 cells

收稿日期: 2023-08-18

基金项目: 2022 年度黑龙江省“揭榜挂帅”科技攻关项目 (2022JBGS0010)

作者简介: 王明帅 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药新产品研发。E-mail: 1849921884@qq.com

*通信作者: 王伟明 (1966—), 女, 硕士研究生导师, 研究员, 从事中药新产品研发工作。E-mail: zyyjy@163.com

染料木素 (genistein, Gen) 即金雀异黄素, 为异黄酮类化合物^[1]。现代药理学实验表明, 具有抗氧化、抗肿瘤、抗骨质疏松、调血脂、清除自由基等生物活性, 且毒性较低, 不良反应较小, 因此作为天然抗癌产物而被广泛研究^[2-5]。但研究结果表明, 染料木素具有水溶性差、生物利用度较低等缺陷, 限制其在临床上的应用。

环糊精是一种优良载体, 可与疏水性药物分子形成包合物, 通常用于增加药物分子的溶解度和溶解速率^[6-8], 但由于成本、生产能力和毒性等多种原因, 导致药物配方中环糊精使用量有限^[9-12]。羟丙基- β -环糊精 (hydroxypropyl- β -cyclodextrin, HP- β -CD) 是在环糊精羟基上进行化学修饰产生的一种环糊精衍生物^[13], 其水溶性更强, 毒性更低^[14], 在低至中等剂量下, 被认为是口服和静脉注射无毒, 被广泛用于改善水溶性差药物的溶解度^[15], 是美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 推荐使用的增溶剂, 且多种上市药物中都有 HP- β -CD 存在^[16]。据报道, 染料木素与 HP- β -CD 包合物增强了染料木素的溶解度、稳定性、溶解速率和生物利用度^[17-18]。

而包合物增溶的另一个方向是与亲水性聚合物配合, 亲水性聚合物具有协同作用, 能增加包合物稳定性^[19-23]。本研究为解决染料木素水溶性差的问题, 采用相溶解度实验与分子模拟探究三元与二元包合物的增溶效果, 并对制备工艺、体外抗癌活性进行系统性研究, 对包合物进行表征为开发染料木素抗癌药物提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

SD-1500 型喷雾干燥机, 上海沃迪智能装备股份有限公司; BP-10 型电子天平, 德国赛多利斯公司; LC-20A 型高效液相色谱, 日本岛津公司; HS-DSC-101 型差示扫描量热仪, 上海和晟仪器科技有限公司; Smartlab9 型 X 射线衍射仪, 日本理学株式会社; Apreo 2 型扫描电子显微镜 (SEM), 美国赛默飞世尔科技公司; RC-806 型溶出仪, 天津市天大天发科技有限公司; Spectrum Two 型红外光谱仪, 美国 Perkin Elmer 公司; H97 型磁力搅拌器, 上海尚普仪器设备有限公司。

1.2 材料

染料木素对照品, 批号 111704-201302, 质量分数 99.1%, 中国食品药品检定研究院; 羟丙基-

环糊精 (HP- β -CD)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) K30, 上海阿拉丁试剂公司; 非小细胞肺癌 A549 细胞, 上海细胞资源库; 人乳腺癌 MCF-7 细胞, 武汉普诺赛生命科技有限公司; 细胞计数试剂盒 CCK-8, 批号 G021-1-2, 南京建成生物工程研究所; 氢氧化钠、盐酸, 西陇科学股份有限公司; 其他均为实验室分析级试剂。

2 方法与结果

2.1 染料木素测量方法

2.1.1 色谱条件 采用配有光电阵列二极管和自动进样器的岛津 LC-20A 进行分析。采用 Krmasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 μ m, 5 μ m); 流动相采用 0.05% 磷酸水溶液-甲醇 (3 : 7); 柱温 30 $^{\circ}$ C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μ L; 检测波长为 260 nm。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取染料木素 14.27 mg, 加甲醇定容至 100 mL 量瓶中, 得染料木素对照品储备液, 再取染料木素对照品储备液 4.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 得染料木素对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取染料木素三元包合物 75 mg, 加甲醇稀释至 50 mL, 再取 4 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度, 即得供试品溶液。

2.1.4 辅料空白溶液 取适量的 HP- β -CD 与 PVP K30 用甲醇溶解、稀释定容, 即得辅料空白溶液。

2.1.5 专属性 取对照品溶液、供试品溶液及辅料空白溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 所得色谱图见图 1, 结果表明辅料及溶剂不会干扰目标成分的测定, 表明该分析方法专属性良好。

2.1.6 线性关系考察 精密称取染料木素对照品 15.65 mg 至 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 稀释至刻度, 即得 313 μ g/mL 的对照品储备液。精密量取对

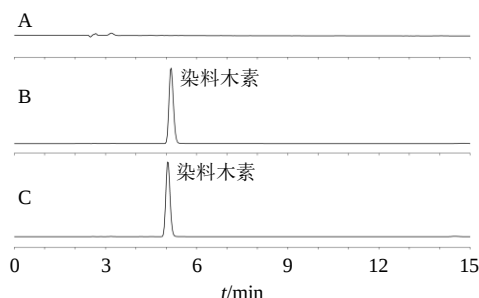


图 1 辅料空白溶液 (A)、染料木素对照品溶液 (B) 和供试品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of excipient blank solution (A), genistein reference substance solution (B) and test solution (C)

照品储备液,用甲醇稀释制成染料木素质量浓度分别为 0.500 8、2.504、12.520、156.500、313.000 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,以染料木素峰面积(Y)与质量浓度(X)作图,绘制标准曲线,得回归方程为 $Y=74\,393\,X+40\,262$, $R^2=0.999\,8$,结果表明染料木素在 0.500 8~313.000 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.7 精密度试验 取“2.1.3”项下染料木素三元包合物供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,计算进样精密度,结果显示染料木素峰面积的 RSD 为 0.79%。

2.1.8 稳定性试验 取染料木素三元包合物供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、6、8、10、12、24 h 取样测定,测得染料木素峰面积的 RSD 为 0.91%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.9 重复性试验 按照“2.1.3”项下方法制备染料木素三元包合物供试品溶液 6 份,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定三元包合物中染料木素含量,结果其 RSD 为 1.45%,结果表明该方法重复性良好。

2.1.10 加样回收率试验 取染料木素三元包合物 9 份,精密称定,分别按样品中染料木素含量添加对照品(添加标准 80%、100%、120%各 3 份),测得染料木素的平均加样回收率为 99.66%,RSD 为 1.77%,结果表明该方法加样回收率良好。

2.2 相溶解度实验

精密称取 10 mg 染料木素(过量)加入分别含有 0~14 mmol/L 的 10 mL HP- β -CD 水溶液中混合均匀,另制备含有 5%的 PVPK30 的三元混合溶液。样品在恒温摇床中以 $(37.0\pm0.5)^\circ\text{C}$ 、150 r/min 的条件下放置 72 h 后取出,5 000 r/min 将样品离心 15 min,收集上清液,通过微米过滤器($0.45\,\mu\text{m}$)滤过,并稀释。以溶解度为纵坐标,HP- β -CD 浓度为横坐标绘制溶解度相图。在物质的量比 1:1 的假设下,计算络合效率和稳定性常数(K_s)^[24-26]。

$$\text{络合效率} = m/(1-m)$$

$$K_s = m/S_0(1-m)$$

S_0 为不存在 HP- β -CD 时的固有溶解度, m 代表溶解相图上的线性斜率

根据染料木素的溶解度相图可知,染料木素可与 HP- β -CD 形成可溶性包合物,且溶解度随 HP- β -CD 浓度的增加呈线性增长(图 2)。根据 Higuchi 方程可知,染料木素与 HP- β -CD 的相关性可归类为线性图(AL)类型,而染料木素的斜率为 0.035,远

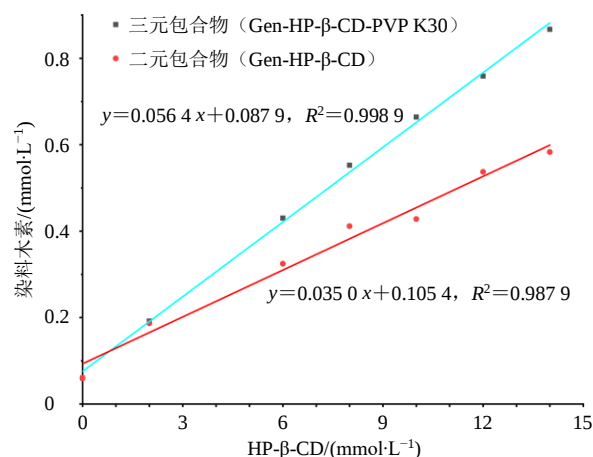


图 2 二元 (Gen-HP- β -CD) 和三元 (Gen-HP- β -CD-PVP K30) 溶解度相图

Fig. 2 Binary (Gen-HP- β -CD) and ternary (Gen-HP- β -CD-PVP K30) solubility phase diagrams

小于 1,由此可知,1 分子染料木素与 1 分子 HP- β -CD 形成包合物,或者说两者的化学计量数之比为 1:1。在二元包合物中加入三元物质 PVP K30 溶解度进一步增加,并且与染料木素的浓度呈线性相关。HP- β -CD 二元体系增加了 7.2 倍,HP- β -CD 与 PVP K30 形成的三元体系溶解度增加了 10.8 倍。二元体系与三元体系的 K_s 和络合效率值分别为 $397.3\,\text{mol}^{-1}$ 、3.63%及 $635.76\,\text{mol}^{-1}$ 、5.98%。在二元包合物中加入 PVP K30 导致 K_s 和络合效率显著提高。PVP K30 作为三元物质的存在通过外部黏附到环糊精表面来增强稳定性,并有助于形成可能导致更高 K_s 值的共包合物。 K_s 值小于 $100\,\text{mol}^{-1}$ 会产生不稳定的药物/环糊精包合物,而大于 $1\,000\,\text{mol}^{-1}$ 的 K_s 值可能会有阻碍影响药物吸收。

2.3 分子对接研究

β -CD 晶体结构的 X 射线晶体学结构从蛋白质晶体数据库(PDB)检索,PDB: 1BFN。利用 PyMol 获得 β -CD 的坐标文件^[27-29]。在 β -环糊精的伯羟基上添加了 4 个 2-羟丙基,采用 AutoDock 1.5.6 版用于添加缺失的氢,计算 Gasteiger 电荷并生成 pdbqt 文件。在 Chem Draw Ultra6.0 软件中绘制配体 PVP K30^[30-32],分配了适当的 2D 取向。通过 PM3 方法最小化,并将其保存为 pdbqt 格式。通过 AutoDock 1.5.6 使用拉马克遗传算法进行筛选,并使用对接日志选择最佳结合构象。使用 PyMol 化工具 4.0 进行交互^[33-36]。

为了在分子水平上证明 PVP K30 有利于增加染料木素包合物的溶解度,利用 AutuDock 进行分

子对接。分子对接技术,可以准确地推测 2 个分子的优势构型。

为保证结构的合理性,采用拉马克遗传算法(Lamarckian genetic algorithm, LGA)进行分子对接。当 2 个分子形成稳定包合物时,所产生的优势构象主要取决于,结合位点的残基的数量。分子对接结果如图 3 所示。对接结果表明,染料木素位于 HP- β -CD 疏水腔的宽开口处,一部分位于腔中,另一部分位于腔外。染料木素的酚羟基和环糊精的羟丙基生成氢键,而色原酮上的羰基和 7-位酚羟基分别与 HP- β -CD 的吡喃葡萄糖苷氧原子形成了氢键,产生大量的范德华力,这些范德华力证明了包合物的形成。

采用染料木素二元包合物进一步与 PVP K30 进行分子对接,结果表明,染料木素和羰基基团与三元包合物中的吡喃葡萄糖苷氧原子产生了相互作用证明三元包合物比二元包合物更加稳定,分子模拟结果仍需其他具体表征结果进行验证。

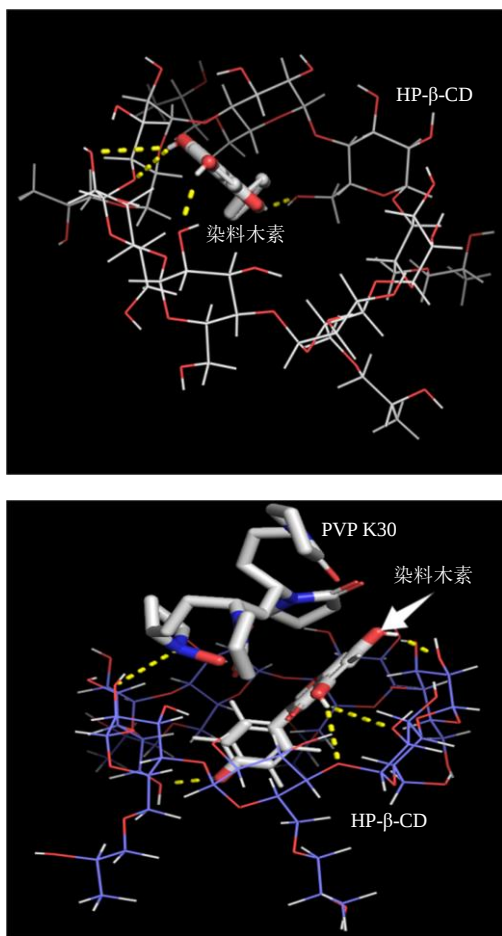


图 3 二元和三元分子对接图

Fig. 3 Binary and ternary molecular docking diagram

2.4 包合物的制备

2.4.1 酸碱位移结合喷雾干燥法制备包合物 取 25 mL 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液,加入 270 mg 的染料木素与 2.7 g 的 HP- β -CD 超声 40 min 促进包合,在 40 °C, 900 r/min 条件下将相同物质的量的盐酸 PVP K30 溶液加入染料木素溶液中,继续搅拌 30 min,采用相对分子质量 100 的透析袋除盐,得到包合物溶液。采用喷雾干燥法得到干燥包合物(喷雾参数为进风温度 200 °C,出风温度 85 °C,风速 60 Hz,撞针间隔 3 s)。

2.4.2 喷雾干燥法制备包合物 将处方量染料木素溶于无水乙醇,加入 HP- β -CD 与 PVP K30,超声 40 min 促进包合,在 40 °C、900 r/min 条件下继续搅拌 30 min,将所得溶液喷雾干燥(喷雾参数为进风温度 120 °C,出风温度 60 °C,风速 60 Hz,撞针间隔 3 s)得到包合物。

2.4.3 球磨法制备包合物 取处方量的染料木素与 HP- β -CD 及 PVP K30,置于球磨罐中在 500 r/min 下干磨 3 h,加入 50 倍量的纯化水继续研磨 2 h,将得到的混悬液,利用喷雾干燥法干燥(喷雾参数为进风温度 200 °C,出风温度 85 °C,风速 60 Hz,撞针间隔 3 s)。

2.5 溶解度研究

取染料木素及包合物与物理混合物在 37 °C,将过量的样品加入含有 10 mL 蒸馏水的西林瓶中,振摇 3 h。将样品溶液以角速度 10 000 r/min 离心(离心半径 100 mm),取上清液,过 0.45 μ m 微孔滤膜,稀释。使用定量 HPLC 分析染料木素含量,平行 3 份。结果如表 1 所示,染料木素在物理混合物和包合物中的溶解度显著提高,在只有染料木素存在时饱和溶解度为 2 μ g/mL,与文献报道相同^[37],在物理混合物和三元包合物中,物理混合物水溶性比纯染料木素增加 10 倍 [(20.23 $\pm$ 3.23) μ g/mL],而酸碱位移法制备的三元包合物的溶解度达到了 8.8 mg/mL。染料木素在三元包合物中的显著高溶解度

表 1 染料木素及包合物的溶解度

Table 1 Solubility of genistein and inclusion complexes

样品	溶解度/(mg·mL ⁻¹)
染料木素	0.002
三元包合物1(酸碱位移)	8.860
三元包合物2(球磨法)	0.350
三元包合物3(单纯喷雾干燥)	0.600
三元物理混合物	0.020

是由于和 HP- β -CD 及 PVP K30 形成了三元包合物。并且使用的酸碱位移结合喷雾干燥法相比于其他方法溶解度更高,推测一部分染料木素可能以盐的形式存在。相比二元包合物,三元包合物由于表面活性剂的添加,有助于降低染料木素和水之间的界面张力提高染料木素的溶解度。Zafar 等^[18]使用染料木素、HP- β -CD、TPGS 制了三元包合物,其溶解度比纯染料木素高 48 倍。

2.6 三元包合物的表征

2.6.1 差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 分析 使用差示扫描量热仪测定 HP- β -CD、PVPK30、染料木素、染料木素三元包合物、三元物理混合物的热特性。将样品放入铝坩埚中,以空白铝坩埚为基准,在氮气吹扫的条件下,10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温,扫描 0~400 $^{\circ}\text{C}$,研究样品热性能。结果如图 4 所示,染料木素、HP- β -CD、PVPK30、物理混合物、三元包合物的 DSC 谱图,可以观察到,由于水分子的蒸发会在 70~130 $^{\circ}\text{C}$ 产生较宽吸收峰,染料木素在 298.8 $^{\circ}\text{C}$ 处有明显的特征吸收峰,而 PVP K30 与 HP- β -CD 的为无定型物质不存在明显吸收峰。物理混合物由于染料木素的含量较少会在 298.8 $^{\circ}\text{C}$ 出现较弱的吸收峰,三元包合物中染料木素被包被在疏水腔内因此特征吸收峰消失。因此染料木素的 DSC 图谱可以为包合物的形成提供很好的证据。

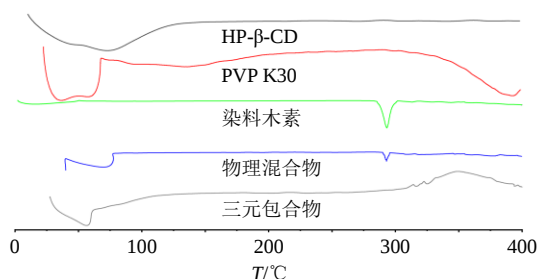


图 4 染料木素、PVP K30、HP- β -CD、物理混合物、三元包合物的 DSC 图谱

Fig. 4 DSC spectra of genistein, PVP K30, HP- β -CD, physical mixture and ternary inclusion complex

2.6.2 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 分析 使用 FTIR 光谱仪分析前,将各个样品与 KBr 在红外灯下置于玛瑙研钵中充分研磨,在 4 000~400 cm^{-1} 的波数范围内扫描,扫描分辨率为 2 cm^{-1} 。通过 FTIR 对染料木素、PVP K30、HP- β -CD、物理混合物、三元包合物进行分析,结果如图 5 所示。HP- β -CD 的光谱有

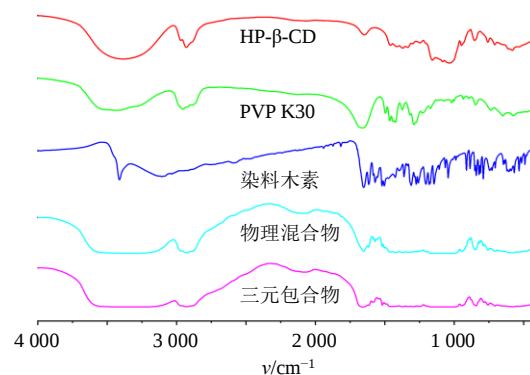


图 5 染料木素、PVP K30、HP- β -CD、物理混合物、三元包合物的 FTIR 图

Fig. 5 FTIR spectra of genistein, PVP K30, HP- β -CD, physical mixture and ternary inclusion complexes

3 402.43 cm^{-1} O-H 处的伸缩震动吸收带,1 647 cm^{-1} 处的弯曲振动,1 026.72 cm^{-1} 处的 C-O-C 伸缩振动峰。而 PVP K30 在 2 954.01 cm^{-1} 处有 C-H 伸缩振动,1 664.10 cm^{-1} 处的 C-O 伸缩振动,1 286.51 cm^{-1} 处存在 C-N 伸缩振动。染料木素在 3 413.68 cm^{-1} 的-OH 伸缩振动峰,1 650.03 cm^{-1} 处存在 C=O 伸缩振动,在 1 617.02、1 518.69 cm^{-1} 处呈现苯环的骨架振动峰。三元物理混合物的 FTIR 光谱中显示出,染料木素、HP- β -CD 和 PVP K30 的特征波段在 2 928.21 cm^{-1} 显示出 PVP K30 的 C-H 振动,以及 HP- β -CD 的 3 042.43 cm^{-1} 处的 O-H 伸缩振动。染料木素三元包合物的红外谱峰均属于 HP- β -CD 与 PVP K30,而染料木素在 1 650.03 cm^{-1} 处羰基峰和 1 430~1 600 cm^{-1} 处苯环峰消失,推测染料木素的羰基和芳香环可能被包裹在 HP- β -CD 的疏水腔内,在 1 652.38 cm^{-1} 处的 O-H 氢键吸收峰可能为包合过程中产生的。

2.6.3 X 射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRPD) 分析 使用 X 射线衍射仪测定染料木素、三元包合物、三元物理混合物的 XRPD 衍射图,XRPD 测试参数:在电压 40 kV,电流 40 mA,测试范围 5 $^{\circ}$ ~90 $^{\circ}$,步距 0.02,靶材是 Cu 靶。结果如图 6 所示,采用 XRPD 分析染料木素、物理混合物、染料木素三元包合物的晶体结构,纯染料木素在 7.8 $^{\circ}$ 、13 $^{\circ}$ 、14.6 $^{\circ}$ 、18.2 $^{\circ}$ 、22.8 $^{\circ}$ 、25.0 $^{\circ}$ 、26.6 $^{\circ}$ 、36.4 $^{\circ}$ 、40.4 $^{\circ}$ 显示出多个尖锐的晶体衍射峰证明染料木素的晶体结构,而物理混合物在 7.6 $^{\circ}$ 、17.9 $^{\circ}$ 、22.4 $^{\circ}$ 、26.4 $^{\circ}$ 存在染料木素的峰值说明物理混合物只是单个成分的叠加,而包合物中染料木素的特征峰值消失,只剩下类似 HP- β -CD 的吸收峰推测三元包合物形成了非晶

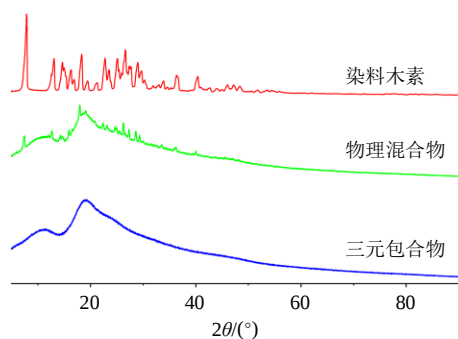


图 6 染料木素、物理混合物、三元包合物的 XRPD 图谱

Fig. 6 XRPD pattern of genistein, physical mixture and ternary inclusion complex

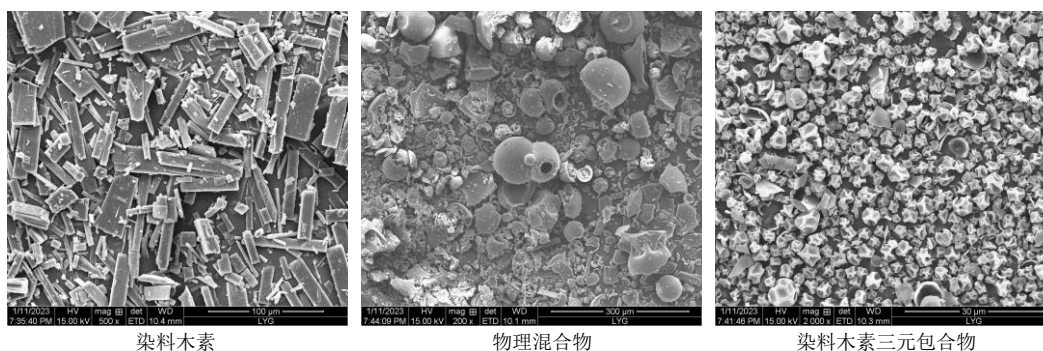


图 7 染料木素、物理混合物、三元包合物的 SEM 图谱

Fig. 7 Scanning electron microphotographs of genistein, physical mixture and ternary inclusion complex

加,从而增加了三元包合物的水溶性和溶解速率。SEM 观察结果与 XRD 分析结果一致,表明染料木素与 HP-β-CD 和 PVP K30 形成的三元包合物处于无定型状态,并证实了染料木素和 HP-β-CD 的包合作用。

2.7 溶出度研究

使用溶出仪评估三元包合物的释放度,该研究在溶出装置中进行,使用 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液(PBS)作为溶出介质。准确称量样品,并将其置于含有 900 mL 容器中,温度保持在 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,研究过程中将桨设置在 75 r/min。在固定的时间间隔(5、15、30、60、90、120 min)取出 5 mL 试样,并补加等量缓冲液。样品过 $0.45\ \mu\text{m}$ 的微孔滤膜,稀释,并使用定量 HPLC 分析测定染料木素含量,以建立染料木素、不同制备方式三元包合物的释放曲线。

如图 8 所示,从图中可以看出三元包合物的累积溶出度效果高于物理混合物。在 30 min 时的溶出度酸碱位移法为 93.02%,喷雾干燥法 88.92%,球磨法 70.05%,最终的溶出度也表明酸碱位移结合喷雾干燥的制备方式更好,酸碱位移结合喷雾干燥法

型无定型化合物。

2.6.4 SEM 分析 使用 Apreo 2 型扫描电子显微镜测定染料木素、三元包合物、三元物理混合物的形态,使用溅射涂覆机单元用薄金钼层涂覆样品,并在加速电压下分析表面形貌。结果如图 7 所示,从染料木素 SEM 图中可以看出,染料木素为规则的棒状晶体,物理混合物为各种物质的简单堆积,各物质结构清晰可见,染料木素仍为棒状结晶。而染料木素三元包合物中,染料木素的结构消失且粒径明显减小,比单独的染料木素、HP-β-CD 和 PVP K30 的粒径要小得多,粒径的减小导致颗粒表面积的增加。

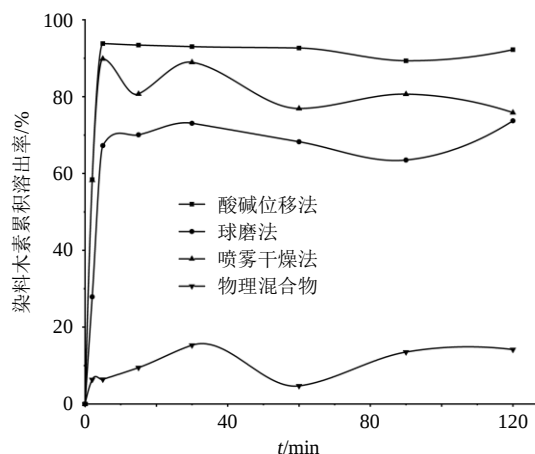


图 8 不同制备方式三元包合物的溶出度

Fig. 8 Dissolution of different preparation methods of ternary inclusion complex

制备的包合物表现出更好的溶出特性,推测部分染料木素以盐的形式存在,因此,比其他制备方式溶出度更高,染料木素的三元包合物比物理混合物溶出度更高,可能因染料木素被包被在环糊精疏水腔内,形成了氢键;增加了药物的湿润性等原因。

2.8 包封率

考察包合物处方对三元包合物包封率的影响,

固定染料木素-HP- β -CD 的物质的量比为 1:1.8, 考察 PVP K30 的加入量对包封率的影响。分别加入染料木素-HP- β -CD 总质量 1%、3%、5%、7% 的 PVP K30, 考察三元包合物的包封率。在 PVP K30 的加入量在 1%、3% 时, 包合物溶液会出现明显的浑浊, 离心后, 透析袋除盐, 测定包合物中染料木素的包封率为 55%、65%, 在 5%、7% 的加入量时, 包合物溶液澄清, 离心, 除盐, 测定包合物中染料木素的包封率分别为 94%、96%, 相差不大。所以最终选择 5% 的 PVPK30 加入量。

2.9 体外抗癌实验

2.9.1 细胞培养 取 A549、MCF-7 细胞, 使用各自完全培养基, 在 5% CO₂、(37.0±0.5) °C 的 CO₂ 培养箱中进行传代培养。

2.9.2 CCK-8 法测定细胞活性 使用 CCK-8 法测定染料木素原料药与三元包合物的抗癌活性, 将癌细胞接种到 96 孔板中, 细胞密度保持在 5×10^3 个/

孔、每孔 100 μ L, 在 37 °C、5% CO₂ 下培养 24 h 使细胞贴壁。点入 100 μ L 不同浓度的药物, 相同条件培养 48 h, 加入 100 μ L 10% 的 CCK-8 试剂, 继续培养 2 h, 利用酶标仪在 450 nm 下测定吸光度(A) 值, 通过公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

采用 CCK-8 法测定染料木素与其三元包合物对 MCF-7 细胞株和 A549 细胞株的细胞毒性。结果如表 2 所示, 染料木素及其三元包合物对 MCF-7 和 A549 细胞均有抑制作用, 且均具有浓度相关性。与染料木素单独处理组相比, 染料木素三元包合物对细胞活力的抑制作用明显增强。染料木素的 IC₅₀ 为 135.5 μ mol/L (A549 细胞) 和 209.9 μ mol/L (MCF 细胞), 而染料木素三元包合物的 IC₅₀ 为 201.9 μ mol/L (MCF 细胞) 和 91.89 μ mol/L (A549 细胞), 实验结果表明, 所形成的染料木素三元包合物增强了染料木素对癌细胞的抑制作用。

表 2 染料木素原料药及其三元包合物对 MCF-9、A549 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 2 Effects of genistein raw materials and their ternary inclusion complexes on survival rate of MCF-9 and A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	MCF-7 细胞存活率/%				
	10 μ mol·L ⁻¹	100 μ mol·L ⁻¹	250 μ mol·L ⁻¹	500 μ mol·L ⁻¹	1 000 μ mol·L ⁻¹
染料木素原料药	94.47±0.56	58.44±0.67	34.84±0.05	18.45±1.00	10.43±0.41
染料木素三元包合物	89.05±1.00*	48.36±0.85***	27.44±0.86**	8.63±1.06***	4.76±0.77**

组别	A549 细胞存活率/%				
	10 μ mol·L ⁻¹	100 μ mol·L ⁻¹	250 μ mol·L ⁻¹	500 μ mol·L ⁻¹	1 000 μ mol·L ⁻¹
染料木素原料药	96.81±2.65	90.36±6.61	50.56±8.74	18.03±5.90	9.72±2.31
染料木素三元包合物	95.80±2.88	81.74±6.80*	41.62±8.47**	14.37±3.07	2.31±0.09*

与原料药组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs compared with raw material group.

3 讨论

水溶性差是限制药物开发与应用的主要原因之一[38]。大量的抗癌药物为不溶性或脂溶性物质, 给药物开发带来很大不便。HP- β -CD 是 β -CD 衍生物, 与 β -CD 相比具有更高的溶解度和更低的肠外毒性。有一定亲脂性的染料木素分子能被捕获到 HP- β -CD 的疏水腔中, 本研究, 通过相溶解度实验及分子模拟证明三元包合物增溶效果及稳定性高于二元包合物。对三种包合效果较好的制备工艺进行考察, 酸碱位移结合喷雾干燥法制备的三元包合物溶解度更高 (8.8 mg/mL)。体外抗癌研究中, 三元包合物具有更高的抗癌活性, 与之前报道一致, 含有 HP- β -CD 的包合物增加了染料木素抑制细胞生

长的能力。可能由于包合物形成增加了染料木素的溶解度及细胞膜的透过性。另一种原因可能是 HP- β -CD 的存在也可增强染料木素抗癌活性, 最近的一项研究报道, HP- β -CD 可以通过诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞来破坏胆固醇稳态和抑制慢性粒细胞白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) 细胞增殖。综上所述酸碱位移结合喷雾干燥制备三元包合物为染料木素的开发提供了新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang H, Murphy P A. Isoflavone content in commercial soybean foods [J]. *J Agric Food Chem*, 1994, 42(8): 1666-1673.

- [2] Messina M, Messina V. Increasing use of soy foods and their potential role in cancer prevention [J]. *J Am Diet Assoc*, 1991, 91(7): 836-840.
- [3] Zhu Y Y, Yao Y, Shi Z X, *et al.* Synergistic effect of bioactive anticarcinogens from soybean on anti-proliferative activity in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells *in vitro* [J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1557.
- [4] Choi E J, Kim T, Lee M S. Pro-apoptotic effect and cytotoxicity of genistein and genistin in human ovarian cancer SK-OV-3 cells [J]. *Life Sci*, 2007, 80(15): 1403-1408.
- [5] Arcoraci V, Atteritano M, Squadrito F, *et al.* Antiosteoporotic activity of genistein aglycone in postmenopausal women: Evidence from a post-hoc analysis of a multicenter randomized controlled trial [J]. *Nutrients*, 2017, 9(2): 179.
- [6] Cheng Q C, Qin W, Yu Y H, *et al.* Preparation and characterization of PEG-PLA genistein micelles using a modified emulsion-evaporation method [J]. *J Nanomater*, 2020, 2020: 3278098.
- [7] Aditya N P, Shim M, Lee I, *et al.* Curcumin and genistein coloaded nanostructured lipid carriers: *In vitro* digestion and antiprostata cancer activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(8): 1878-1883.
- [8] Bera H, Chekuri S, Sarkar S, *et al.* Novel pimoziide- β -cyclodextrin-polyvinylpyrrolidone inclusion complexes for Tourette syndrome treatment [J]. *J Mol Liq*, 2016, 215: 135-143.
- [9] Qiu N, Li X B, Liu J D. Application of cyclodextrins in cancer treatment [J]. *J Inclusion Phenom Macrocycl Chem*, 2017, 89(3): 229-246.
- [10] Loftsson T. Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of water-soluble polymers [J]. *Pharmazie*, 1998, 53(11): 733-740.
- [11] Loftsson T, Friðriksdóttir H. The effect of water-soluble polymers on the aqueous solubility and complexing abilities of β -cyclodextrin [J]. *Int J Pharm*, 1998, 163(1/2): 115-121.
- [12] Asbahr A C C, Franco L, Barison A, *et al.* Binary and ternary inclusion complexes of finasteride in HP β CD and polymers: Preparation and characterization [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(7): 2718-2723.
- [13] Qiu N, Zhao X, Liu Q M, *et al.* Inclusion complex of emodin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation, physicochemical and biological properties [J]. *J Mol Liq*, 2019, 289: 111151.
- [14] Lateh L, Kaewnopparat N, Yuenyongsawad S, *et al.* Enhancing the water-solubility of curcuminoids-rich extract using a ternary inclusion complex system: Preparation, characterization, and anti-cancer activity [J]. *Food Chem*, 2022, 368: 130827.
- [15] Ding X Z, Zheng M K, Lu J M, *et al.* Preparation and evaluation of binary and ternary inclusion complexes of fenofibrate/hydroxypropyl- β -cyclodextrin [J]. *J Inclusion Phenom Macrocycl Chem*, 2018, 91(1): 17-24.
- [16] Qiu N, Li X B, Liu J D. Application of cyclodextrins in cancer treatment [J]. *J Inclusion Phenom Macrocycl Chem*, 2017, 89(3): 229-246.
- [17] Zafar A, Alruwaili N K, Imam S S, *et al.* Formulation of genistein-HP β cyclodextrin-poloxamer 188 ternary inclusion complex: Solubility to cytotoxicity assessment [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(12): 1997.
- [18] Zafar A, Alruwaili N K, Imam S S, *et al.* Formulation of ternary genistein β -cyclodextrin inclusion complex: *In vitro* characterization and cytotoxicity assessment using breast cancer cell line [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2022, 67: 102932.
- [19] 苏行, 刘慧芳, 刘泽莹, 等. 丹参活性部位丹参二萜醌羟丙基- β -环糊精包合物的制备工艺研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(10): 3132-3140.
- [20] Jafar M, Ali S, Ghonaim H. Improved solubility and dissolution rate of ketoprofen by beta cyclodextrin ternary complexes incorporating hydrophilic polymers [J]. *Int J Drug Deliv Technol*, 2017, 7(1): 45-51.
- [21] Suvarna V, Kajwe A, Murahari M, *et al.* Inclusion complexes of nateglinide with HP- β -CD and L-arginine for solubility and dissolution enhancement: Preparation, characterization, and molecular docking study [J]. *J Pharm Innov*, 2017, 12(2): 168-181.
- [22] Lateh L, Kaewnopparat N, Yuenyongsawad S, *et al.* Enhancing the water-solubility of curcuminoids-rich extract using a ternary inclusion complex system: Preparation, characterization, and anti-cancer activity [J]. *Food Chem*, 2022, 368: 130827.
- [23] Marcolino A I P, Macedo L B, Nogueira-Librelotto D R, *et al.* Preparation, characterization and *in vitro* cytotoxicity study of dronedarone hydrochloride inclusion complexes [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 100: 48-61.
- [24] Li N, Wang N, Wu T N, *et al.* Preparation of curcumin-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex by cosolvency-lyophilization procedure to enhance oral bioavailability of the drug [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2018, 44(12): 1966-1974.
- [25] Hu L D, Zhang H L, Song W H, *et al.* Investigation of

- inclusion complex of cilnidipine with hydroxypropyl- β -cyclodextrin [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(4): 1719-1724.
- [26] Wang L, Jiang X H, Xu W J, *et al.* Complexation of tanshinone II_A with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Effect on aqueous solubility, dissolution rate, and intestinal absorption behavior in rats [J]. *Int J Pharm*, 2007, 341(1/2): 58-67.
- [27] Mura P, Bettinetti G P, Cirri M, *et al.* Solid-state characterization and dissolution properties of naproxen-arginine-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin ternary system [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 59(1): 99-106.
- [28] Liao Y H, Zhang X F, Li C L, *et al.* Inclusion complexes of HP- β -cyclodextrin with agomelatine: Preparation, characterization, mechanism study and *in vivo* evaluation [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 147: 415-425.
- [29] Garg A, Ahmad J, Hassan M Z. Inclusion complex of thymol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) in polymeric hydrogel for topical application: Physicochemical characterization, molecular docking, and stability evaluation [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2021, 64: 102609.
- [30] Michalska P, Wojnicz A, Ruiz-Nuño A, *et al.* Inclusion complex of ITH12674 with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation, physical characterization and pharmacological effect [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 157: 94-104.
- [31] Alshehri S, Imam S S, Hussain A, *et al.* Formulation of piperine ternary inclusion complex using β CD and HPMC: Physicochemical characterization, molecular docking, and antimicrobial testing [J]. *Processes*, 2020, 8(11): 1450.
- [32] Geng Q Q, Xie J C, Wang X, *et al.* Preparation and characterization of butachlor/(2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin inclusion complex: Improve soil mobility and herbicidal activity and decrease fish toxicity [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(46): 12198-12205.
- [33] Imam S S, Alshehri S, Alzahrani T A, *et al.* Formulation and evaluation of supramolecular food-grade piperine HP β CD and TPGS complex: Dissolution, physicochemical characterization, molecular docking, *in vitro* antioxidant activity, and antimicrobial assessment [J]. *Molecules*, 2020, 25(20): 4716.
- [34] Miletic T, Kyriakos K, Graovac A, *et al.* Spray-dried voriconazole-cyclodextrin complexes: Solubility, dissolution rate and chemical stability [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 98(1): 122-131.
- [35] Ren X Y, Qian H Y, Tang P X, *et al.* Preparation, characterization, and properties of inclusion complexes of balofloxacin with cyclodextrins [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2019, 20(7): 278.
- [36] Sherje A P, Kulkarni V, Murahari M, *et al.* Inclusion complexation of etodolac with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and auxiliary agents: Formulation characterization and molecular modeling studies [J]. *Mol Pharm*, 2017, 14(4): 1231-1242.
- [37] Cheng Q C, Qin W, Yu Y H, *et al.* Preparation and characterization of PEG-PLA genistein micelles using a modified emulsion-evaporation method [J]. *J Nanomater*, 2020, 2020: 3278098.
- [38] Gidwani B, Vyas A. A comprehensive review on cyclodextrin-based carriers for delivery of chemotherapeutic cytotoxic anticancer drugs [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 198268.

[责任编辑 郑礼胜]