

大黄酚复合物的制备方法研究

李红¹, 吴振^{2*}, 陈岗², 詹永², 谭红军²

¹重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121; ²重庆市中药研究院, 重庆 400065

摘要:为提高大黄酚(Chr)的水溶性和生物利用度,旨在找出一种适合大黄酚- β -葡聚糖超分子复合物(Chr- β -glu)的制备方法,为制剂加工和贮存研究提供依据。分别采用饱和溶液法、共研磨法、冷冻干燥法、电磁搅拌-喷雾干燥法(ES)和共沉淀法等方法制备 Chr- β -glu,以包封率、渗漏率和累积释放率为评价指标,选出最适合 Chr- β -glu 的制备方法。电磁搅拌-喷雾干燥法处理可以显著提高大黄酚- β -葡聚糖超分子复合物的平均包封率和累积释放率,明显优于其他方法;共沉淀法制备的 Chr- β -glu 的平均渗漏率最低,但与 ES 法制备相比没有显著性差异。采用电磁搅拌-喷雾干燥法制备的大黄酚- β -葡聚糖超分子复合物具有较高的包封率和稳定性,作为药物载体,其在医药、食品和日化工业中具有广泛的应用前景。

关键词: 大黄酚; 葡聚糖超分子复合物; 制备方法; 电磁搅拌-喷雾干燥法; 包封率

中图分类号: R932; TS201.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.4.019

Preparation of Inclusion Complex of Chrysophanol

LI Hong¹, WU Zhen^{2*}, CHEN Gang², ZHAN Yong², TAN Hong-jun²

¹Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China;

²Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

Abstract: To improve the solubility and bioavailability of chrysophanol (Chr) and provide the foundation for preparation, processing and storage of new formulations, five preparation methods of supermolecular inclusion complex of Chr and β -glucan (Chr- β -glu) were compared. The inclusion complex of Chr- β -glu prepared by saturated solution method, co-grinding method, freeze drying method, electromagnetic stirring-spray drying (ES) method and co-precipitation method, respectively, was compared based on the index of encapsulation efficiency, percolation rate and cumulative release rate. The results showed that the encapsulation efficiency and cumulative release rate of Chr- β -glu prepared by ES method was higher than samples prepared by other preparation methods. The percolation rate of Chr- β -glu prepared by co-precipitation method was lower than samples prepared by other preparation methods. However, the percolation rate was of no significant difference between ES method and co-precipitation method. The supermolecular inclusion complex of Chr and β -glucan had higher encapsulation efficiency and better stability. It will be widely applied in medicinal, food and daily chemical industries.

Key words: chrysophanol; glucan-supermolecular inclusion; preparation methods; electromagnetic stirring-spray drying methods; encapsulation efficiency

大黄酚(chrysophanol, Chr), 是大黄、虎杖、何首乌、决明子等中的一种蒽醌类活性成分, 化学名为 1,8-二羟基-3-甲基蒽醌, 具有抗菌、缩短血液凝固时间、兴奋神经、麻痹肌肉、止咳、利尿和抗癌作用。现代药理学研究表明, 大黄酚能延缓衰老, 能清除氧自由基, 增强抗氧化能力和改善学习记忆障碍等作用^[1]。但大黄酚在水中溶解度小、易氧化变质、味

苦、见光易分解、理化性质不稳定等缺点限制了其临床应用^[2,3], 因而没有适宜的剂型供临床应用。为此将大黄酚制成大分子复合物, 旨在提高其溶解度和稳定性, 掩盖不良气味, 为大黄酚的临床应用提供更好的实验基础。葡聚糖及其衍生物超分子复合物是小分子功效成分应用的新剂型之一, 能够显著改善小分子功效成分的溶解性和稳定性^[4,5]。国内外研究发现, 葡聚糖对小分子药物有一定的包和能^[4,6-8], 但均尚未见大黄酚与 β -葡聚糖复合物(Chr- β -glu)的缓释制剂制备工艺方面的报道, 为此本实验分别采用饱和溶液法、共研磨法、冷冻干燥

收稿日期: 2015-07-13 接受日期: 2015-10-10

基金项目: 重庆市卫生局中医药科研课题(ZY20132075); 重庆市基本科研业务费资助项目(JA-15-14); 重庆市基本科研业务费资助项目(2015cstc-jbty-01911)

* 通讯作者 Tel: 86-23-89029055; E-mail: wuzhen985@126.com

法、电磁搅拌-喷雾干燥法(ES)和共沉淀法等方法制备 Chr- β -glu,以包封率(Encapsulation efficiency, EE)、渗漏率(Percolation rate, PR)和累积释放率(Cumulative release rate, CR)为评价指标,选出最适合 Chr- β -glu 的制备方法。旨在提高其溶解度和稳定性,掩盖不良气味,减少其对胃的刺激性,为大黄酚的应用提供更好的实验基础。

1 材料与仪器

高效液相色谱仪,日本 Shimadzu 公司;SHZ-D(III)旋转水式真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;SD-1500 实验型喷雾干燥机,上海沃迪科技有限公司;R-124 旋转蒸发仪,瑞典 BUCHI 公司;CP-224S 电子天平,德国赛多利斯。

大黄酚标准品(Chr, HPLC \geq 98%,南京奥多福尼生物科技有限公司);酵母 β -葡聚糖(朗深系生物技术有限公司);其它化学试剂均为国产分析纯;所用水为双蒸水,所用溶液均自行配制。

2 实验方法

2.1 Chr 测定方法及方法学考察

2.1.1 色谱条件

采用日本岛津公司 LC-20A 高效液相色谱仪,色谱柱为 C₁₈ Hypersil BDS (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)。检测波长:254 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;流动相甲醇-0.1% 磷酸(65:35);流速 1.2 mL/min,进样量:20 μ L。

2.1.2 线性关系考察

精密称取 Chr 对照品适量,加甲醇溶解,制成 400 μ g/mL 的 Chr 对照品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件分别进样 2、5、10、15、20 μ L。以峰面积的积分值(y)对进样质量浓度(x)进行线性回归,得回归方程 $y = 1206.8x - 6026.2$, $R^2 = 0.9998$ 。表明 Chr 在 40 ~ 400 μ g/mL 与峰面积积分值线性关系良好。

2.1.3 精密度试验

制备低、中、高浓度的 Chr 溶液, HPLC 测定,同日内测 5 次及每天测 1 次、连续测 5d,计算日内与日间精密度。其平均 RSD 分别为 1.20%、0.81%、0.57% 和 1.85%、1.05%、1.28%,表明精密度符合方法学要求。

2.1.4 重复性试验

取同一 Chr 对照品,平行制备 6 份样品,在上述

色谱条件下进行分析,计算 Chr 含量质量分数的 RSD 值分别为 0.65%、1.42%、0.80%、1.61%、1.75%,均小于 3%,结果表明方法重复性良好。

2.1.5 回收率试验

精确称取 0.03 mg 大黄酚,共 6 份,与不同浓度的 5 种复合物样品溶液混合, HPLC 测定 Chr 浓度,回收率均在 95% ~ 105% 内,且 RSD 值小于 2.0%,表明本方法具有良好的准确度。

2.2 Chr- β -glu 制备方法

2.2.1 饱和溶液法

葡聚糖溶液的预处理方法为:将 β -glu 溶于适量去离子水中,80 $^{\circ}$ C 搅拌溶解 1 h 使其充分溶解成为澄清透明的溶液;大黄酚的预处理方法为:称取规定量的 Chr 置于 50% 乙醇中,30 $^{\circ}$ C 回流或者搅拌加热使药物完全溶解。在搅拌和加热条件下,向葡聚糖溶液中加入大黄酚溶液,搅拌 12 h 后,静置。将滤液进行抽真空干燥,得 Chr- β -glu 固体粉末。

2.2.2 共研磨法

葡聚糖和大黄酚的预处理方法如 2.2.1 所示;在加热的条件下,充分研磨二者溶液混合物,过滤。将滤液进行抽真空干燥,得 Chr- β -glu 固体粉末。

2.2.3 冷冻干燥法

葡聚糖和大黄酚的预处理方法如 2.2.1 所示;在搅拌和加热条件下,向葡聚糖溶液中加入大黄酚溶液,搅拌 12 h 后,静置,将滤液进行冷冻干燥,得 Chr- β -glu 固体粉末。

2.2.4 电磁搅拌-喷雾干燥法(ES)

葡聚糖和大黄酚的预处理方法如 2.2.1 所示;在搅拌和加热条件下,向葡聚糖溶液中加入大黄酚溶液,搅拌 12 h 后,静置。将滤液进行喷雾干燥,得 Chr- β -glu 固体粉末。喷雾干燥的工艺参数:蠕动泵流速:1.2 mL/min,进口温度 90 $^{\circ}$ C,喷雾流量 300 mL/h。

2.2.5 共沉淀法

称取定量 Chr 溶解于盛有 50% 乙醇的烧杯中,然后加入 1 g β -glu,80 $^{\circ}$ C 下磁力搅拌(200 rpm)1 h,反应结束后冷却至室温,在冰箱中冷藏 24 h,过滤,抽真空干燥至恒重。

2.3 评价指标测定

2.3.1 包封率

制备得到复合物后,体系搅拌均匀,用移液管精密移取 5 mL 混悬液至 10 mL 量瓶中,加甲醇(色谱

纯)至刻度;超声振荡后,用有机微孔滤膜过滤, HPLC 测滤液中 Chr 含量,EE(%)的计算公式为:

$$EE(\%) = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100\%$$

式中: M_1 为大黄酚初始投入量, M_2 为大黄酚沉淀量。

2.3.2 渗漏率

将不同方法制得的大黄酚复合物倒入测定瓶中,4℃下低温保存,一段时间后(5~25 d)分别准确移取 1 mL 溶液于离心管中,离心(1000 rpm,每次 20 s)6 次后分离沉淀,用甲醇溶解沉淀,定容,HPLC 测滤液中 Chr 含量,计算出游离药物的浓度并按下式计算复合物的 PR:

$$PR(\%) = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100\%$$

式中: W_1 为大黄酚包封量, W_2 为贮存一定时间后的包封量。

2.3.3 累积释放率

参考《中国药典》2010 年版溶出度测定第一法并略作修改,测定所得体系的体外释药特性。具体实施方法为:取 900 mL 含 0.5% 十二烷基硫酸钠的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液置于溶出杯中,加热,待其温度恒定在(37±0.5)℃后,分别精密称取 Chr 原药 5 mg、各种包合物(相当于原药 5 mg)置溶出杯中,调节转速为 100 rpm,分别于 5~200 min 取样(同时补充等量同温溶液介质),样品经 0.45 μm 滤膜过滤,采用 HPLC 测定,计算各采样点时样品中的药物浓度和累积释放率。同批样品测定 6 份,结果取平均值。

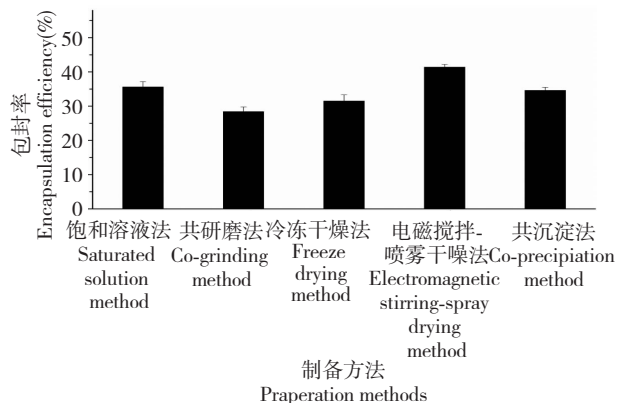


图 1 不同方法制备大黄酚超分子复合物的包封率
Fig. 1 Encapsulation efficiency of the inclusion complex of Chr-β-glu prepared by different methods

3 结果与分析

3.1 不同制备方法对超分子包合物包封率的影响
用 5 种不同的方法制备大黄酚超分子复合物,用前所述方法进行包封率的测定,结果见图 1。

3.2 不同制备方法对超分子包合物渗漏率的影响
将不同方法制备的大黄酚超分子复合物在 4℃保存,按照所述方法进行渗漏率的测定,结果见图 2。

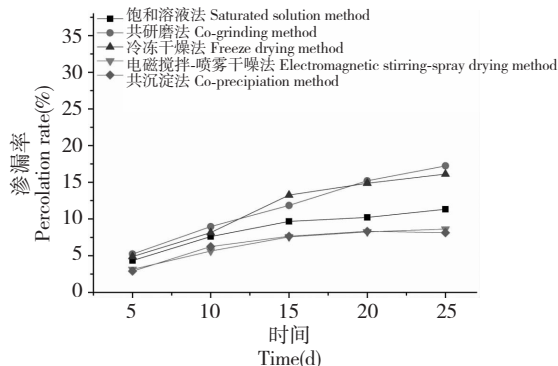


图 2 不同方法制备大黄超分子复合物的渗漏率
Fig. 2 Percolation rate of the inclusion complex of Chr-β-glu prepared by different methods

3.3 不同制备方法对超分子包合物累积溶出量的影响

将不同方法制备的大黄酚超分子复合物在 4℃保存,按照所述方法进行累积溶出量的测定,结果见图 3。

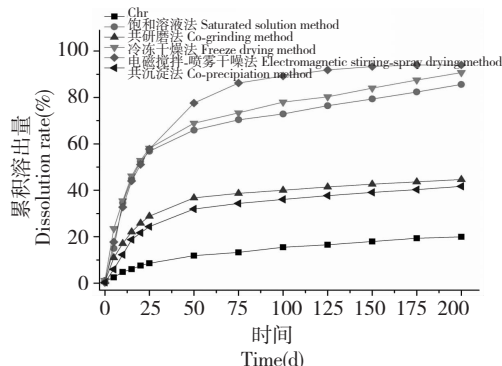


图 3 不同方法制备大黄超分子复合物的累积溶出量
Fig. 3 Dissolution profiles of the inclusion complex of Chr-β-glu prepared by different methods

聚糖复合物系指在非质子传递溶剂中,天然活性成分与聚糖以一定配比,通过电荷迁移或极性相互作用而形成的较为稳定的化合物或络合物。聚糖

复合物的形成能改善天然活性成分的水溶性,增强机体对天然活性成分的吸收,提高其生物利用率^[4,9]。评价聚糖复合物质量的指标有外观、粒径分布、包封率和渗漏率等;稳定性也是制备聚糖复合物过程中需要考虑的另一个重要因素。本实验通过评价5种制备方法(饱和溶液法、共研磨法、冷冻干燥法、电磁搅拌-喷雾干燥法和共沉淀法)对Chr- β -glu的包封率、渗漏率和累积溶出量的影响,揭示了葡聚糖超分子复合物的包封率和稳定性与制剂处方和制备方法密切相关。

电磁搅拌-喷雾干燥法制备的Chr- β -glu的包封率和累积溶出量显著高于其它4种制备方法,共沉淀法制备的Chr- β -glu的包封率略低于ES方法。陈海生等^[10]采用共沉淀法制备纳米级的磁性葡聚糖微球,使免疫纳米磁性葡聚糖微球具有天然活性,获得了较好的效果。尽管如此,本实验通过共沉淀法制备的Chr- β -glu的平均渗漏率和最低,但与ES法制备相比没有显著性差异。与其它方法相比,共研磨法和共沉淀法制备的Chr- β -glu的平均累积溶出量最低。

与其它方法相比,电磁搅拌-喷雾干燥法制备的Chr- β -glu具有明显的优势,高温电磁搅拌处理使大黄酚充分溶解于有机液体体系,ES制备得到的Chr- β -glu粉末大多为液滴经膨胀产生的空心颗粒,为Chr的经肠胃道给药剂型以及保健食品的设计提供新的思路。国内外研究发现,葡聚糖是一类活性强、毒副作用低的良好的大分子赋形剂和包合物载体,其中酵母葡聚糖分子具有空心、多孔、2~4微米的球形空穴结构,该空穴结构可能通过弱相互作用力,实现葡聚糖对Chr的包合作用^[11]。Soto等^[12]研究了酵母葡聚糖复合物的制备方法及其对利福平(rifampicin)的载药能力,结果发现该载药体系可以提供利福平的抗菌活性。

4 结论

本实验选用适合脂溶性药物的5种不同方法制备了大黄酚葡聚糖复合物,并对其进行了质量评价。从以上5种方法制备大黄酚葡聚糖复合物实验中可知,电磁搅拌-喷雾干燥法明显优于其他方法,该方法为进一步研究大黄酚葡聚糖复合物奠定了实验基础。

参考文献

1 Chen QH(陈琼华), Dai HS(戴汉松), Su XL(苏学良).

- Study on Chinese *Rhubarb* XXXI: Improved methods for systematic isolation of anthraquinone derivatives from *Rhubarb*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2001, 13: 58-60.
- 2 Yan CL (严春临), Zhang J (张季), Zhang DS (张丹参), et al. Study on preparation of chrysophanol microcapsule and its *in vitro* release behavior. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2011, 3: 7-10.
- 3 Wang YL (王永利), Zhang MM (张明媚), Li WS (李维爽), et al. Preparation and quality evaluation of chrysophanol liposome. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2011, 9: 825-827.
- 4 Zhao M (赵梅), Wang XD (王晓东), Wang X (王晓), et al. Application of supramolecular inclusion technique in pharmaceutical development. *Shandong Sci* (山东科学), 2012, 25: 103-107.
- 5 Xiong S, Melton LD, Eastal AJ, et al. Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulated in glucan gel. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 6201-6208.
- 6 Bordenave N, Hamaker BR, Ferruzzi MG, et al. Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in foods. *Food Function*, 2014, 5(1): 18-34.
- 7 Vetvicka V, Volny T, Saraswat-Ohri Sujata, et al. Glucan and resveratrol complex - Possible synergistic effects on immune system. *Biomedical Papers (Olomouc)*, 2007, 151(1): 41-46.
- 8 Soto ER, Mueller C, Gao GP, et al. Encapsulation of Nanoparticles within Glucan Microparticles for Drug Delivery. *Abstr Pap Am Chem Soc*, Washington: American Chemical Society, 2010. 240.
- 9 Tang Q (唐勤), Gu Y (顾勇), Li N (李纳), et al. *In vivo* pharmacokinetics of curcumin-phospholipid complex-chitosan microspheres in rats. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2013, 44: 1939-1943.
- 10 Chen HS(陈海生), Zhang HY(张华英), Zhang BJ(陈宝俊), et al. Preparation method of nano-magnetic dextran microspheres. CN200710176211.0, 2007-10-23.
- 11 Wu C, Chu B, Kuang L, et al. Synthesis of β -1,3-glucan esters showing nanosphere formation. *Carbohydr Polym*, 2013, 98: 807-812.
- 12 Soto E, Kim YS, Lee J, et al. Glucan particle encapsulated rifampicin for targeted delivery to macrophages. *Polymers*, 2010, 2: 681-689.