

- [13] 欧阳平, 张高勇, 康保安, 等. 苦叶七中类黄酮提取的动力学及相关热力学研究[J]. 中成药, 2004, 26(12): 991-995.
- [14] 张艳丽, 符华林, 卢朝成, 等. 内部沸腾法提取槐米中的芦丁及其动力学和热力学研究[J]. 中成药, 2015, 37(4): 895-898.
- [15] 陈晓光, 韦藤幼, 彭梦微, 等. 丹参酚酸B减压内部沸腾法提取的动力学及相关热力学研究[J]. 高校化学工程学报, 2011, 25(6): 961-965.

鸦胆子油 β -环糊精包合物的制备

刘帅, 沈新宇, 杨长水, 刘岐*
(扬州大学医学院, 江苏扬州 225000)

摘要: 目的 制备鸦胆子油 β -环糊精包合物。方法 均质法制备包合物后, 应用扫描电子显微镜 (SEM)、差示扫描量热仪 (DSC)、傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR) 进行表征。以包封率为评价指标, 投料比 (β -环糊精-鸦胆子油)、包合温度、均质时间为影响因素, Box-Behnken 法优化制备工艺。然后, 通过急性毒性试验考察所得包合物安全性。结果 鸦胆子油可进入 β -环糊精空腔中, 包合物制备成功。最佳条件为投料比 8.22 : 1; 包合温度 55 $^{\circ}\text{C}$; 均质时间 5.5 min; 包合物包封率 62%。在 15.60 g/kg 剂量下, 包合物无明显毒性。结论 将鸦胆子油制成 β -环糊精包合物后, 可提高其安全性。

关键词: 鸦胆子油; β -环糊精包合物; 制备; SEM; DSC; FTIR; Box-Behnken 法; 急性毒性试验

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)08-1732-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.08.012

Preparation of β -cyclodextrin inclusion compound of *Brucea javanica* oil

LIU Shuai, SHEN Xin-yu, YANG Chang-shui, LIU Qi*

(Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225000, China)

KEY WORDS: *Brucea javanica* oil; β -cyclodextrin inclusion compound; preparation; SEM; DSC; FTIR; Box-Behnken method; acute toxicity test

鸦胆子油因其良好的抗肿瘤活性而受到广泛关注^[1-4], 但其难溶于水, 而且刺激性较强^[5], 极大限制了临床应用^[6], 目前市面上其剂型以口服乳剂和软胶囊为主。研究表明, 环糊精包合物具有增加难溶性药物溶解度、减少药物刺激性等优点^[7-9]; 鸦胆子苦醇是从鸦胆子中提取得到的一种苦木内酯类化合物, 具有抗胰腺癌、前列腺癌等活性^[10-12]。本实验将制备鸦胆子油 β -环糊精包合物, 通过 Box-Behnken 法进行优化, 应用 SEM、FTIR、DSC 进行表征, 并考察其安全性。

1 仪器与材料

1.1 仪器 剪切乳化均质机 (上海标本模型厂); DSC8500 差示扫描量热仪 (美国 PerkinElmer 公司); Tensor27 傅里叶变换红外光谱仪 (德国 Bruker 公司); S-4800 场发射扫描电子显微镜 (日本 Hitachi High-Technologies 公司); D8 Advance 多晶 X 射线衍射仪 (德国 Bruker-AXS 公司); Waters e2695 高效液相色谱仪、Waters 2998 PDA 检测器 (美国 Waters 公司)。

1.2 材料 鸦胆子 (亳州市仁和堂药业有限公司)。鸦胆子苦醇 (中国食品药品检定研究院, 批

收稿日期: 2017-07-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21502165)

作者简介: 刘帅 (1992—), 女, 硕士生, 研究方向为药物制剂。Tel: 18252718799, E-mail: 645896340@qq.com

*通信作者: 刘岐 (1983—), 男, 硕士生导师, 研究方向为药物制剂。Tel: 13665200137, E-mail: liuqi@yzu.edu.cn

号 140208, 含有量 $\geq 98\%$); 鸦胆子油口服乳剂 (广州白云山明兴制药有限公司, 国药准字 Z44021325)。石油醚 (60 ~ 90 °C)、 β -环糊精 (国药集团化学试剂有限公司)。SPF 级小鼠 60 只, 体质量 17 ~ 22 g, 雌雄各半, 由扬州大学比较医学中心提供, 许可证号 SCXK (苏) 2010-0004。

2 方法

2.1 鸦胆子油提取 采用索氏提取法提取, 以石油醚 (60 ~ 90 °C) 为提取溶剂, 液料比 6 : 1, 加热至微沸, 提取至提取液无色, 回收溶剂, 计算提油率 (提油率 = $\frac{W_{\text{油}}}{W_{\text{鸦胆子}}} \times 100\%$)^[13]。

2.2 β -环糊精包合物制备^[14] 采用均质法。称取适量 β -环糊精置于烧杯中, 磁力搅拌 (60 °C、400 r/min) 下配制饱和水溶液, 滴加 50% 鸦胆子油-乙醚液均质 5 min 后, 置于 4 °C 冰箱中冷藏过夜, 抽滤沉淀, 真空干燥, 即得^[15]。

2.3 包封率测定 色谱条件^[13] 为 Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相甲醇 : 水 (6 : 4); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 220 nm; 柱温 30.0 °C; 进样量 20 μ L。将鸦胆子苦醇用甲醇稀释至 25 ~ 400 μ g/mL, 按上述条件测定, 并绘制标准曲线。然后, 测定 β -环糊精空白样品溶液、鸦胆子油甲醇溶液、游离鸦胆子油乙醚溶液中鸦胆子苦醇含量, 计算包封率, 公式为 包封率 = $\frac{W_{\text{包}}}{W_{\text{总}}} =$

$\frac{(W_{\text{总}} - W_{\text{游}})}{W_{\text{总}}}$, 其中 $W_{\text{总}}$ 为总投药量, $W_{\text{包}}$ 为被包入

β -环糊精的鸦胆子油量, $W_{\text{游}}$ 为未包入 β -环糊精游离在外的鸦胆子油量。

2.4 制备工艺优化 根据前期单因素试验结果及相关文献报道^[16-18], 选择投料比 (β -环糊精 : 鸦胆子油)、包合温度、均质时间作为影响因素, 包封率为评价指标, 采用 Box-Behnken 法进行优化。

2.5 表征

2.5.1 扫描电子显微镜 (SEM) 利用 SEM 观察 β -环糊精和包合物的形态特征。

2.5.2 差示扫描量热仪 (DSC) 取鸦胆子油、 β -环糊精、物理混合物、包合物适量, 进行 DSC 分析^[19], 升温速度 10 °C/min, 温度范围 20 ~ 300 °C。

2.5.3 傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR) 取鸦胆子油、 β -环糊精、物理混合物、包合物样品, 加入适量 KBr 混合均匀, 压制成片, 在 4 000 ~ 400 cm^{-1}

范围内测定其红外特征。

2.6 急性毒性试验 60 只小鼠随机分成 6 组 (包合物、口服乳剂各 3 组), 每组 10 只, 雌雄各半。按等比稀释法配制不同质量浓度的相应溶液, 分别灌胃给药 (剂量比 1 : 0.8, 最高剂量 15.60 g/kg, 最低剂量 6.39 g/kg), 观察小鼠反应, 连续 14 d, 并对死亡小鼠进行肉眼尸检, Bliss 法计算半数致死量 (LD₅₀)^[20]。

3 结果

3.1 鸦胆子油提油率 所得鸦胆子油呈草绿色, 有清香, 味苦, 提油率为 9.8%。

3.2 线性关系考察 以质量浓度 (X) 对峰面积 (Y) 进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 36\ 935X + 445\ 912$, $R^2 = 0.999\ 2$, 在 25 ~ 400 μ g/mL 范围内线性关系良好。色谱图见图 1。

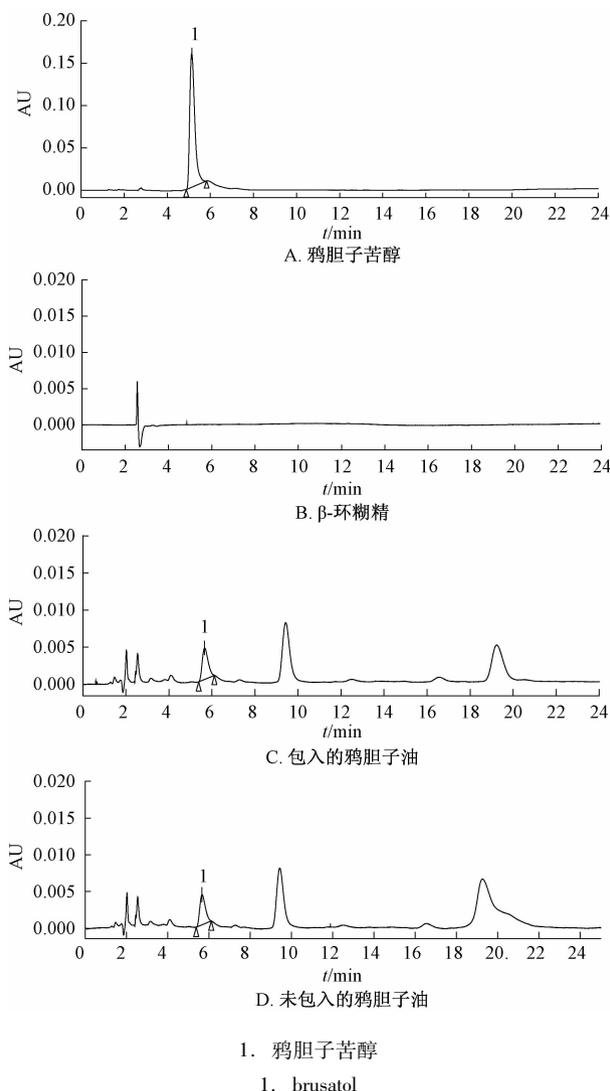


图 1 鸦胆子苦醇 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of brusatol

3.3 Box-Behnken 法 预实验结果显示, 随着投料比 (A) 增加包封率 (Y) 逐渐升高, 在 8 : 1 时达到最高, 大于 8 : 1 后变化程度不大, 故将投料比设定为 7 : 1、8 : 1、9 : 1; 包合温度 (B) 在 20 ~ 50 ℃ 范围内时, 随着其增加包封率明显升高, 高于 50 ℃ 后变化程度不大, 考虑到鸦胆子油受热不稳定, 故将包合温度设定为 30、40、50 ℃; 均质时间 (C) 在 3 ~ 5 min 范围内时, 随着其增加包封率明显升高, 大于 5 min 后变化程度不大, 故将均质时间设定为 4、5、6 min。因素水平见表 1, 试验设计及结果见表 2。

表 1 因素水平
Tab. 1 Factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
A 投料比	7 : 1	8 : 1	9 : 1
B 包合温度/℃	30	40	50
C 均质时间/min	4	5	6

表 2 试验设计及结果
Tab. 2 Design and results of tests

试验号	A	B	C	Y 包封率/%	预测值/%
1	-1	-1	0	49.9	50.0
2	1	-1	0	56.8	58.0
3	-1	1	0	57.2	56.0
4	1	1	0	58.2	58.0
5	-1	0	-1	51.7	51.8
6	1	0	-1	57.2	56.3
7	-1	0	1	53.2	54.1
8	1	0	1	59.6	59.5
9	0	-1	-1	56.2	55.9
10	0	1	-1	56.4	57.5
11	0	-1	1	58.3	57.2
12	0	1	1	61.4	61.7
13	0	0	0	62.8	61.3
14	0	0	0	61.9	61.3
15	0	0	0	60.3	61.3
16	0	0	0	59.9	61.3
17	0	0	0	61.7	61.3

然后, 采用 Design-Expert 8.0.5 软件对表 2 数据进行多元回归拟合, 得到回归方程为 $Y = -356.095 + 76.285A + 2.54B + 12.675C - 0.1475AB + 0.225AC + 0.0725BC - 4.225A^2 - 0.015725B^2 - 1.6725C^2$, 方差分析见表 3。由表可知, 该回归方程拟合度良好, 各因素影响程度依次为投料比 > 包合温度 > 均质时间。

响应面分析见图 2。由此确定, 最优工艺为投

料比 8.22 : 1; 包合温度 55 ℃; 均质时间 5.5 min; 包合物包封率为 62%。

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
方程	198.66	9	22.07	12.21	0.0017
A	49.00	1	49.00	27.11	0.0012
B	18.00	1	18.00	9.96	0.0160
C	15.12	1	15.12	8.37	0.0232
AB	8.70	1	8.70	4.81	0.0643
AC	0.20	1	0.20	0.11	0.7477
BC	2.10	1	2.10	1.16	0.3166
A ²	75.07	1	75.07	41.53	0.0004
B ²	10.41	1	10.41	5.76	0.0475
C ²	11.78	1	11.78	6.52	0.0380
残差	12.65	7	1.81	—	—
失拟项	6.93	3	2.31	1.61	0.3202
纯误差	5.73	4	1.43	—	—
总和	211.31	16	—	—	—

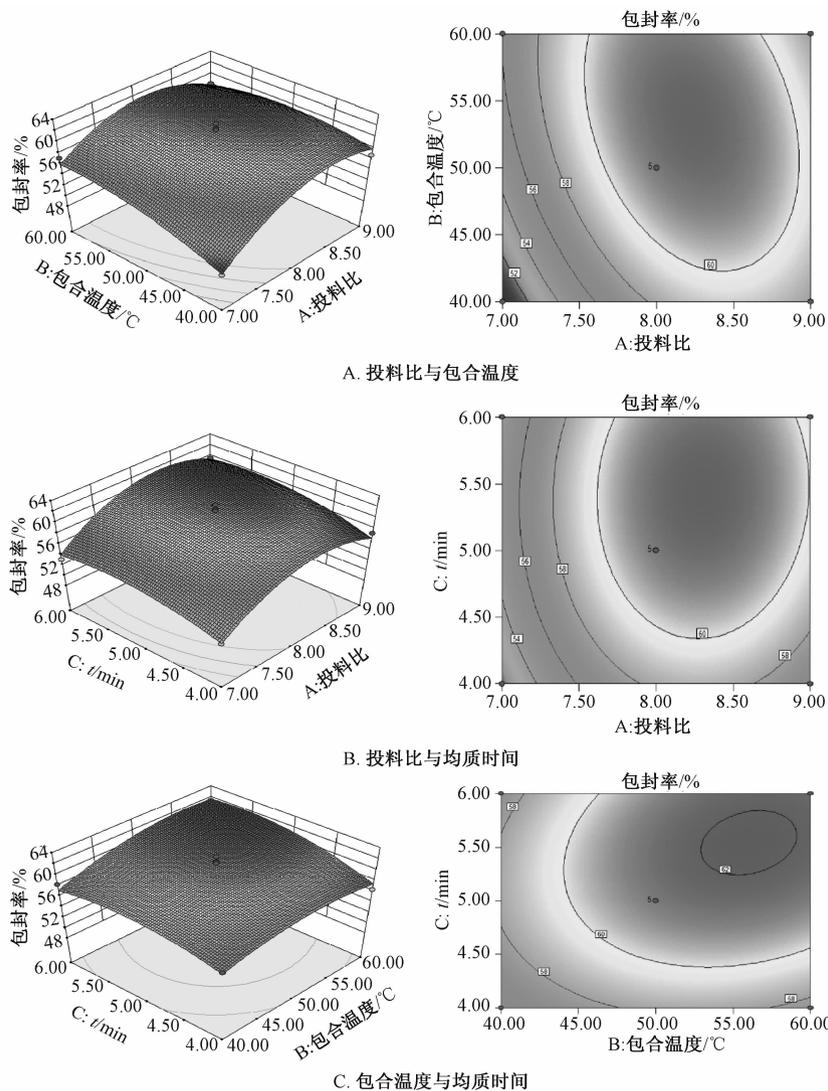
3.4 表征

3.4.1 SEM 图 3 可知, β-环糊精为块状物, 并带有细碎颗粒; 包合物为表面光滑的块状结晶, 表明包合后 β-环糊精形态发生改变, 形成包合物。

3.4.2 DSC 图 4 可知, 鸦胆子油、β-环糊精分别在 178、121 ℃ 处有一吸收峰; 物理混合物吸收峰是鸦胆子油、β-环糊精吸收峰的叠加; 在包合物中, 鸦胆子油吸收峰消失, 仅在 125 ℃ 处有一弱吸收峰, 表明其进入 β-环糊精空腔中, 吸收峰被后者所屏蔽, 形成了包合物。

3.4.3 FTIR 图 5 可知, β-环糊精特征吸收峰主要在 2 928、1 645、1 032 cm^{-1} 等处, 鸦胆子油特征吸收峰在 3 475、2 925、1 650、1 456 cm^{-1} 等处, 物理混合物兼有鸦胆子油、β-环糊精特征峰, 包合物特征峰更加趋向于主体分子 β-环糊精。均可观察到四者在 2 926 cm^{-1} 附近出现亚甲基反对称伸缩振动峰, 但在包合物中其峰强被明显削弱。此外, 鸦胆子油中 1 371、1 456 cm^{-1} 附近饱和 C-H 键面内的弯曲振动峰在包合物中也被明显削弱, 表明鸦胆子油进入 β-环糊精的疏水性空腔中。

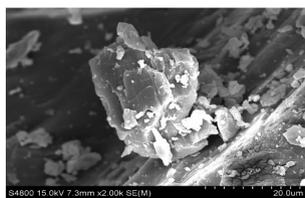
3.5 急性毒性试验 表 4 可知, 鸦胆子油口服乳剂的 LD₅₀ 为 9.93 g/kg。给予包合物灌胃后, 小鼠在 14 d 观察期内均无死亡, 仅出现收缩成团、活动量明显减少的现象, 3 h 后即恢复正常, 表明在最高剂量 (15.60 g/kg) 下是安全的。



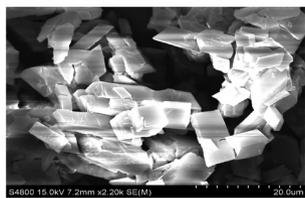
注：左图均为响应面图，右图均为等高线图

图2 各因素响应面图

Fig. 2 Response surface plots for various factors



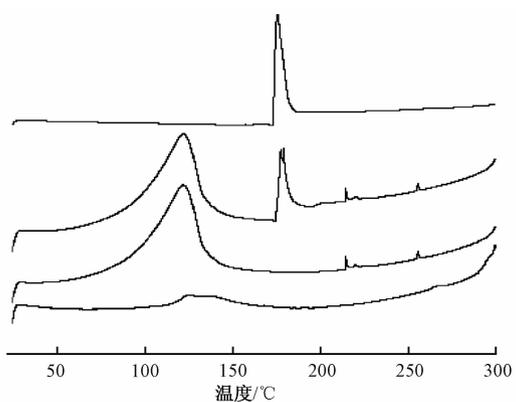
A. β-环糊精



B. 包合物

图3 样品 SEM 图

Fig. 3 SEM images for samples



注：由上至下，依次为鸭胆子油、物理混合物、β-环糊精、包合物

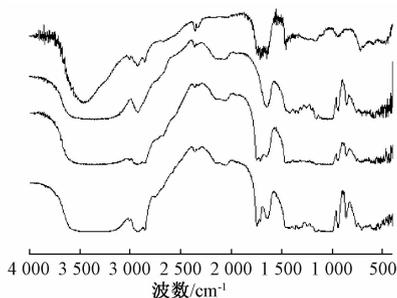
图4 样品 DSC 曲线

Fig. 4 DSC curves for samples

表4 鸦胆子油口服乳剂急性毒性试验结果 (n=10)

Tab. 4 Results of acute toxicity tests for oral emulsion of *Brucea javanica* oil (n=10)

剂量/(g·kg ⁻¹)	log 剂量	死亡数/只	死亡率/%	回归概率	LD ₅₀ /(g·kg ⁻¹)	95% CI/(g·kg ⁻¹)
15.60	1.193 1	10	100	6.557 7		
12.48	1.096 2	7	70	5.787 6		
9.98	0.999 2	5	50	5.016 1	9.933 6	8.656 5 ~ 11.389 0
7.99	0.902 6	2	20	4.248 6		
6.39	0.805 5	1	10	3.477 4		



注:由上至下,依次为鸦胆子油、β-环糊精、包合物、物理混合物

图5 样品 FTIR 图

Fig. 5 FTIR image for samples

4 讨论

鸦胆子油交联环糊精包合物与市售乳剂相比具有较高的安全性^[13]。交联环糊精是通过交联反应制备的具有特殊基团的环糊精,它在保留环糊精相关性质的同时,又具有高分子聚合物的特点,但也存在价格较高等问题。本实验发现,β-环糊精有着易溶于水、包合性能好、方便易得的优点,故以其为包合材料进行实验,发现所得鸦胆子油包合物的安全性高于市售乳剂,而且与交联环糊精相当,适合大规模生产使用。

参考文献:

[1] 刘昊寰,张彬,周武,等. 鸦胆子油的抗肿瘤活性[J]. 南昌大学学报(工科版), 2017, 39(1): 22-26.
 [2] 马青松,庞玉新,杨全,等. 鸦胆子的药理作用和抗肿瘤机制研究进展[J]. 贵州农业科学, 2015, 43(2): 137-140.
 [3] Tung M H, Duc H V, Huong T T, et al. Cytotoxic compounds from *Brucea mollis*[J]. *Sci Pharm*, 2012, 81(3): 819-831.
 [4] Ramli R A, Pudjiastuti P, Tjahjandari T S, et al. Alkaloids from the roots of *Stemona javanica* (Kunth) Engl. (Stemonaceae) and their anti-malarial, acetylcholinesterase inhibitory and cytotoxic activities [J]. *Phytochem Lett*, 2015, 11(6): 157-162.

[5] 钱先中,王冬雪,仵利军,等. 中成药制剂抗肿瘤作用的应用分析[J]. 中医药导报, 2017, 23(7): 61-63, 66.
 [6] 王奇,芦柏震. 鸦胆子及其制剂的药理作用与临床应用[J]. 海峡药学, 2012, 24(1): 48-50.
 [7] 叶仰祥,严雪黎. β-环糊精包合技术在中药挥发油制剂中的应用研究[J]. 医学综述, 2010, 16(24): 3793-3796.
 [8] 沈海民,纪红兵,武宏科,等. β-环糊精的固载及其最新研究进展[J]. 有机化学, 2014, 34(8): 1549-1572.
 [9] 丁立秀. β-环糊精包合物的合成与分析应用[D]. 兰州: 兰州大学, 2010.
 [10] 谭亚芳,李娟,胡树枝,等. 鸦胆子苦醇抑制人前列腺癌 DU145 细胞生长及作用机制[J]. 广西植物, 2015, 35(3): 431-436.
 [11] 陈果,李蔚,李小惠. 鸦胆子苦醇抑制人非小细胞肺癌 A549 细胞转移的机制[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(16): 3897-3899.
 [12] 周中流,梁燕君,黄诗瑶,等. 鸦胆子属植物苦木内酯类化合物的研究进展[J]. 中成药, 2013, 35(5): 1040-1046.
 [13] 陈琳,吴欢欢,黄小丽,等. 鸦胆子油交联环糊精包合物的制备及其急性毒性研究[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2843-2849.
 [14] 张壮丽,王亚飞,荣晓哲,等. 鱼腥草挥发油羟丙基-β-环糊精包合物的制备[J]. 中成药, 2017, 39(5): 926-933.
 [15] 单冬媛,裴英,孟晴,等. 穿心莲内酯固体分散体的制备[J]. 中成药, 2017, 39(4): 719-723.
 [16] 牟会荣,陈昆,王晓岚,等. 正交试验法与响应面法在桑叶黄酮提取工艺优化中的应用和比较[J]. 江苏科技大学学报(自然科学版), 2016, 30(1): 88-93.
 [17] 陈帅,王慧竹,钟方丽,等. 响应面法优化白藜芦醇β-环糊精包合物的制备工艺[J]. 食品工业科技, 2015, 36(9): 255-260.
 [18] 俞娟,刘劲松,王刚,等. 响应面法优化马兰多糖提取工艺研究[J]. 中成药, 2015, 37(1): 222-225.
 [19] 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 Macro*, 2010, 67(1-2): 109-116.
 [20] 刘晓旭,倪睿,刘建平. 鸦胆子油脂质体冻干粉制备及其药效学评价[J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(1): 37-40.