技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)10-1389-05

茴三硫 -2- 羟丙基 -β- 环糊精包合物制备工艺的研究

欧云国,黄 华
(重庆医科大学药学院药剂教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究茴三硫 -2- 羟丙基 -β- 环糊精(2-Hydroxypropyl-β-cyclodestrin,2-HP-β-CD)包合物制备工艺及 2-HP-β-CD 对茴三硫的增溶作用。方法:在单因数试验基础上,采用正交试验优化法,以包合率为指标,考察主客分子摩尔比、搅拌速度和搅拌时间等因素对制备包合物的影响;运用热分析法测定包合物中药物的溶解度并对包合物进行验证。结果:结果表明茴三硫 -2- 羟丙基 -β- 环糊精包合物对茴三硫具有明显的增溶作用。结论:经过包合后茴三硫包合物的溶解度是原料药 460 倍。

【关键词】茴三硫;包合物;溶解度;验证
【中国图书分类法分类号】R943 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-26

Complexation of anethol trithione with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin

OU Yun-guo, et al
(*Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the solubilization effect of 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (2-HP-β-CD) on anethol trithione and the complexation of anethol trithione with 2-HP-β-CD. *Methods*: On the basis of single factor experiment, the drug complexed rate was adopted as the index, to study the effects of factors like host-guest molar ratio, alcohol concentration, stiring rate and stiring time on the techniques of preparing anethol trithione-2-HP-β-CD; the inclusion complex was identificated and solubility was detected by diferential scanning calorimeter (DSC) methods. *Results*: 2-HP-β-CD can obviously enhance solubility of anethol trithione. *Conclusion*: The solubility of inclusion complex increased by 460 times when it was included by 2-HP-β-CD.

【Key words】Anethol trithione; Inclusion complex; Solubility; Identification

茴三硫(Anethol trithione),化学名为 5-(对-甲氧苯基)-1,2-二硫环戊-4-烯-3-硫酮,药理作用广泛,临床应用已有 50 年。茴三硫溶于氯仿和苯,略溶于乙醚、丙酮和乙醇,几乎不溶于水,目前国内上市产品均为固体口服制剂,虽然也能达疗效,但对于不能口服或吞咽困难的病人,服药不方便,采用普通片剂制备方法试制的片剂,溶出度很难达到要求。本试验采取 2-HP-β-CD 为包合材料[1],制备茴三硫的包合物,增加茴三硫的溶解度,为将茴三硫开发成注射剂进行初步研究。HP-β-CD 是 FDA 批准的第一个用于静脉注射的 β-CD 类衍生物,不但与 β-CD 一样对许多化合物具有优良的包合作用,提高被包合物质的溶解性和稳定性,而且高水溶性和提高被包合药物在生物体内的释放速度及生物利用度的优点,是低毒、安全、有效的药物增溶剂,用 2-HP-β-CD 作增溶剂可以避免使用有机溶剂、助溶剂和表面活性剂等赋形剂而带来的毒副作用。

作者介绍:欧云国(1978-),男,硕士,
研究方向:缓控释制剂方向。
通讯作者:黄 华,女,教授,E-mail:huangh60@tom.com。

1 仪器和材料

1.1 仪器

ZK-82B 真空干燥箱(上海市实验仪器总厂)、热重分析仪(NETZSCH)、spectrum one(PerkinElmer)、UV-3150(日本岛津)、DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司)、SHZ-88 台式水浴恒温振荡器(江苏太仓市实验设备公司)。

1.2 材料

茴三硫(重庆康刻尔制药有限公司,含量≥99.5%,批号:20070108 批)、2-HP-β-CD(陕西礼泉化工有限实业公司,分子量 1 425,含量 99.6%)、无水乙醇(重庆川东化工集团有限公司化学试剂厂,含量≥99.7%)。

2 方法与结果

2.1 包合物含量测定方法

2.1.1 检测波长的确定 精密称取茴三硫适量,加无水乙醇溶解并稀释制成每 1 ml 含 10 μg 的溶液。取此溶液在 200~600 nm 波长范围内扫描,扫描结果显示本品在 433 nm 波长处有最大吸收,而在此波长处 2-HP-β-CD 无吸收,不会干扰包合物含量测定,因此选择 433 nm 作为包合物含量测定的检测波长。

2.1.2 标准曲线制备及精密度试验 精密称取茴三硫适量,加无水乙醇溶解并稀释制成浓度分别为 4、8、12、16、20 μg/ml 的标准溶液。取此标准溶液在 433 nm 处测吸收度。根据吸收度和浓度绘制标准曲线,得回归方程 Y=0.048 5X-0.004 5,r^2=1。同时测定日间精密度和日内精密度,测得日内精密度为 0.89%(n=5),日间精密度为 1.65%(n=5)。

2.1.3 回收率试验 精密称取茴三硫 20 mg 置 100 ml 棕色容量瓶中,分别加入适量 2-HP-β-CD,加入无水乙醇振摇并稀释至刻度,摇匀,取 5 ml 置 100 ml 的棕色容量瓶中,加入无水乙醇稀释至刻度,在 433 nm 处测各点吸收值,根据线性方程,计算茴三硫回收率,得回收率平均值为 99.86%,RSD=0.69%(n=6)。

2.2 包合物的制备

2.2.1 方法的筛选[2]

2.2.1.1 溶液-搅拌法 称取 2-HP-β-CD2.80 g,置 50 ml 烧杯中,加纯化水 15 ml 溶解,置恒温磁力搅拌器中恒温 37 ℃搅拌溶解,称取茴三硫 0.48 g,用适量无水乙醇加热使溶解,以缓慢的速率(1 ml/2 min)滴加到 2-HP-β-CD 水溶液中,滴加结束后,恒温 37 ℃搅拌 1 h,再在室温下搅拌 4 h,冷藏静置后过滤,将滤液蒸至黏稠状时,真空干燥,过 80 目筛,平行制备 3 份,置干燥器备用。

2.2.1.2 球磨机研磨法[3] 称取 2-HP-β-CD2.80 g,加入纯化水 2 ml 溶解,称取茴三硫 0.48 g,用适量无水乙醇溶解,加入 2-HP-β-CD 水溶液中,放入球磨机,旋转 2 h,取出,真空干燥,过 80 目筛,平行制备 3 份,置干燥器备用。

2.2.1.3 冷冻干燥法 称取 2-HP-β-CD2.80 g,置 50 ml 烧杯中,加纯化水 15 ml 溶解,置恒温磁力搅拌器中恒温 37℃搅拌,称取茴三硫 0.48 g,用适量无水乙醇加热使溶解,以缓慢的速率(1 ml/2 min)滴加到 2-HP-β-CD 水溶液中,滴加结束后,恒温 37 ℃搅拌 1 h,再在室温下搅拌 4 h,冷藏静置后过滤,将滤液蒸去无水乙醇,浅盘冷冻干燥,过 80 目筛,平行制备 3 份,置干燥器备用。

2.2.1.4 包合物样品分析 分别称取 3 种方法制备的包合物适量,置 50 ml 棕色容量瓶中,加水超声使溶解,用 0.45 μm 滤膜过滤,取适量置 25 ml 棕色容量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,测吸收度,根据标准曲线方程,计算茴三硫的浓度,并分别对 3 个样品作 DSC。本试验以包合率和收率为考察指标,用以下公式计算[4]:

收率=所得包合物的量/(2-HP-β-CD 投料量+茴三硫投料量)

包合率=1-[$\triangle H_{包合物}$×100]/[$\triangle H_{茴三硫}$×(DC)/100]

式中$\triangle H_{包合物}$为包合物的热焓值,$\triangle H_{茴三硫}$为茴三硫的热焓值,DC 为药物的含量。

3 种方法制备的样品的收率及包合率见表 1。

由表 1 可知,球磨机研磨法的收率要高于其他两种方法,球磨机研磨法和冷冻干燥法的包合率相差不大,但冷冻干燥法能耗大,因此本试验以球磨机研磨法作正交优化试验。

2.2.2 正交优化试验[5]

2.2.2.1 正交设计 由单因素试验可知,影响包合率的因素主要是主客分子摩尔比、搅拌速度、搅拌时间和乙醇浓度,因此本试验采取 $L_9(3^4)$因素 3 水平正交优化试验,以包合率为考察指标,表头设计见表 2。

2.2.2.2 正交优化试验结果与分析,结果见表 3

由表 3 可以看出,通过直观分析及方差分析,因素 A、B、C、D 对包合均有显著性的影响,影响包合的因素的主次顺序为 D>A>B>C,其中 A 因素:K_3>K_2>K_1,B 因素:K_2>K_3>K_1,C 因素:K_2>K_3>K_1,D 因素:K_1>K_2>K_3,最佳制备工艺为 $A_3B_2C_2D_1$,即包合摩尔比为 4:1,搅拌速度为 400 r/min,搅拌时间为 1 h,乙醇浓度为 5%。

2.2.2.3 验证实验 按正交优化试验得到的最佳处方 $A_3B_2C_2D_1$ 制备 5 批样品,同法测定包合率以验证该包合物制备方法的重现性及处方工艺的合理性,结果制得样品的包合率为 85.61%±1.25%,均高于试验设计中 9 种处方工艺,证明 $A_3B_2C_2D_1$ 为最佳制备工艺。

2.2.3 物理混合物制备 以正交试验得到的优化

处方分别称取茴三硫和 2-HP-β-CD 适量，混合均匀，过 80 目筛，置干燥器备用。

2.3 包合物鉴别

2.3.1 相溶解度试验

2.3.1.1 相溶解度试验[4] 取 25 ml 棕色容量瓶，分别加入不同量的 2-HP-β-CD，加纯化水适量，配制成浓度为 1%~20%溶液，再分别加入过量的茴三硫，置恒温水浴振荡器中，在试验设定的不同温度下，恒温，连续振荡 7 d，将混悬液离心 10 min，取上清液用 0.45 μm 滤膜过滤，续滤液用无水乙醇稀释至适宜的浓度，在 433 nm 处测定吸收值，同时在不加入 2-HP-β-CD 的水溶液中，也加入过量的茴三硫，同法平行操作。以 2-HP-β-CD 的浓度为横坐标，以药物的摩尔浓度为纵坐标，绘制不同温度下的相溶解度图，见图 1。

由图 1 可知，茴三硫的溶解度随着 2-HP-β-CD 的浓度的增大而增大，而且随着温度的升高，溶解度也相应的增加。由于茴三硫脂溶性较大，相溶解图表现为 A_P 模式[6]。

2.3.1.2 包合表观稳定常数的测定及包合过程中热力学参数的测定[7] 分别对不同温度的相溶度曲线作线性回归，求得回归方程的斜率和截距，根据公式 $Ks=slope/S_0(1-slope)$，求得不同温度的茴三硫-2-HP-β-CD 包合物表观包合物常数（S_0 为不存在 2-HP-β-CD 的情况下茴三硫的饱和溶解度，slope 为线性回归方程的斜率）。根据公式 $\triangle G=-RTlnKs$ 计算不同温度下包合反应的吉布斯自由能变化 $\triangle G$，再根据范特霍夫方程 $lnKs=-\triangle H/RT+\triangle S/R$，以 lnKs 对 1/T 作线性回归，由回归方程的斜率（$\triangle H/R$）与截距（$\triangle S/R$），即可求得包合过程中的焓变（$\triangle H$）与熵变（$\triangle S$）。包合表观稳定常数的测定及包合过程热力学参数的计算结果见表 4。

由表 4 可以看出随着温度升高，其相对的包合表观稳定常数就相应降低，表明过度升温不利于包合物的形成，所以在制备包合物时，应选择适宜的温度。从 $\triangle H$、$\triangle S$ 和 $\triangle G$ 的数值来看，均为负值，$\triangle S$ 和 $\triangle G$ 为负值表明包合反应是自发进行的放热反应。

2.3.2 差示热分析（DSC） 对茴三硫、2-HP-β-CD、茴三硫-2-HP-β-CD 包合物、茴三硫与 2-HP-β-CD 物理混合物进行差示热分析，加热速度为 10 K/min，升温范围为 0~400 ℃，测定气体为空气。茴三硫、2-HP-β-CD、茴三硫-2-HP-β-CD 包合物及茴三硫与 2-HP-β-CD 物理混合物的 DSC 图谱见图 2。

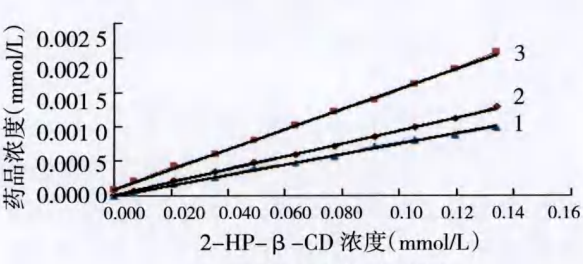
由图 2 可知，茴三硫原料在 110.30 ℃有一尖锐吸热峰，2-HP-β-CD 原料在 355.02 ℃有一尖锐吸热峰，分别与自身的熔点基本一致；茴三硫与 2-HP-β-CD 物理混合物的图谱只表现为茴三硫与 2-HP-β-CD 两种图谱的叠加，表明两种物料只是简单的机械混合；但茴三硫-2-HP-β-CD 包合物的图谱中，茴三硫原料峰明显消失，表明茴三硫分子经包合作

表 1 茴三硫-2-HP-β-CD 的收率及包合率

制备方法	包合率(%)	收率(%)
溶液—搅拌法	52	80
球磨机研磨法	65	96
冷冻干燥法	62	82

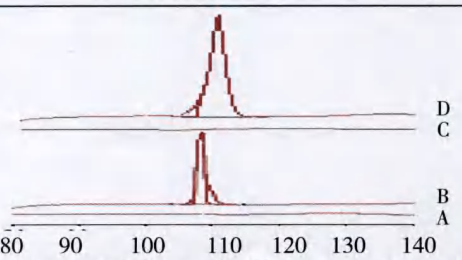
表 2 因素和水平

水平	A 主客分子摩尔比	B 旋转速度(r/min)	C 旋转时间(h)	D 乙醇浓度(%)
1	1∶2	200	0.5	5
2	1∶1	400	1	15
3	2∶1	600	1.5	25



1. 25℃；2. 37℃；3. 45℃

图 1 不同温度下不同浓度 2-HP-β-CD 对茴三硫的增溶相图



A. 2-HP-β-CD 原料；B. 茴三硫与 2-HP-β-CD 物理混合物；C. 茴三硫-2-HP-β-CD 包合物；D. 茴三硫原料

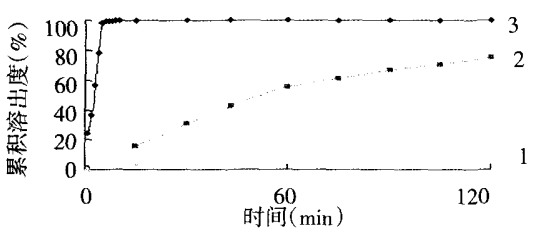
图 2 DSC 图谱

表 3 $L_9(3^4)$正交试验结果

试验数	因素				包合率(%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	62.19
2	1	2	2	2	68.58
3	1	3	3	3	55.28
4	2	1	2	3	57.53
5	2	2	3	1	76.57
6	2	3	1	2	60.68
7	3	1	3	2	66.37
8	3	2	1	3	63.69
9	3	3	2	1	79.67
K_1	62.02	62.03	62.19	72.81	
K_2	64.93	69.61	68.59	65.21	
K_3	69.91	65.21	66.07	58.83	
R	7.89	7.58	6.41	13.98	

表 4 茴三硫-2-HP-β-CD 包合物的包合表观稳定常数和热力学参数

温度(℃)	相溶度图方程	r	Ks	△G(KJ/mol)	△H(KJ/mol)	△S(KJ/mol)
25	y=0.014 5x+1E-04	0.999 5	10 509	-23.02		
37	y=0.009 3x+2E-05	0.999 5	6 258	-22.68	-31.67	-0.029
45	y=0.007 5x+4E-06	0.999 1	4 723	-22.44		



1. 原料药;2. 茴三硫与 2-HP-β-CD 物理混合物;3. 茴三硫-2-HP-β-CD 包合物

图 3 茴三硫的累积溶出度图

用进入 2-HP-β-CD 的空腔结构内,形成包合物。

2.3.3 溶解度测定 称取过量的茴三硫(约 20 mg)、茴三硫与 2-HP-β-CD 物理混合物和茴三硫-2-HP-β-CD 包合物(相当于 20 mg 茴三硫)分别置 25 ml 棕色量瓶内,加纯化水配成过饱和溶液,于 25 ℃恒温水浴振荡器(50 r/min)平衡 1 d,振荡结束后将混悬液离心 10 min,取上清液用 0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液用无水乙醇稀释适当倍数,于 433 nm 处测吸收度,根据标准曲线方程,计算得到茴三硫、茴三硫-2-HP-β-CD 包合物、茴三硫与 2-HP-β-CD 物理混合物分别在水中的溶解度。测得茴三硫原料的饱和溶解度为 0.39 mg/L,而制成包合物的溶解度为(179.40±1.26)mg/L,物理混合物的溶解度为(6.24±1.46) mg/L, 包合物的溶解度增大约 460 倍,物理混合物仅增大约 16 倍, 结果表明形成包合物后可以显著增加茴三硫的溶解度。

2.4 累积溶出度的测定 参照《中华人民共和国药典》2005 年版附录溶出度测定法,分别精密称取茴三硫(20 mg),茴三硫与 2-HP-β-CD 物理混合物和茴三硫-2-HP-β-CD 包合物(各相当于 20 mg 茴三硫)各 6 份,以 1 000 ml 纯化水为溶出介质,温度 37 ℃±0.5 ℃,采用转篮法,转速为 100 r/min,从药物接触溶出介质时起计时,包合物每 1 min 取样 1 次,其它每 15 min 取样 1 次,每次分别取样 2 ml,同时立即补加等量同温度的溶出介质,样品置 25 ml 棕色量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度,摇匀,于 433 nm 处测定吸收值,根据标准曲线方程计算茴三硫的累积溶出百分率。茴三硫、茴三硫-2-HP-β-CD 包合物及茴三硫与 2-HP-β-CD 物理混合物的溶出度图谱见图 3。

从图 3 可以看出茴三硫与 2-HP-β-CD 包合物及茴三硫与 2-HP-β-CD 物理混合物都显示了相对于原料药的较高的溶出速率,但是,物理混合物增加的幅度没有包合物显著,茴三硫与 2-HP-β-CD 包合物在第 5 min 基本溶出完毕,茴三硫与 2-HP-

β-CD 物理混合物和茴三硫在 120 min 也没有全部溶出,结果表明茴三硫与 2-HP-β-CD 形成包合物后可以显著地提高茴三硫的溶出速率。

3 讨 论

相溶度图表明,随着 2-HP-β-CD 的浓度的增加,茴三硫的浓度也相应的增加,但是随着温度升高,包合表观稳定常数降低,包合物稳定性降低,不利于包合物的形成;由正交优化试验得最佳包合工艺,形成的包合物经 DSC 鉴定、溶解度和累积溶出度测定,证明形成了包合物,溶解度比原料药提高了近 460 倍,溶出速率也较原料药有大幅度提高,为把茴三硫开发成注射剂提供研究基础,同时也大大提高口服固体制剂的溶出速率。

由 △G、△H、△S 的数值表明,包合反应是自发进行的,虽然从相溶度图上看,提高温度可以提高药物的溶解度,其原理可能是温度增加,主客分子运动速度增加,两者碰撞的几率加大,表面上看对包合率及包合速率度具有增强作用,但是包合反应在进行到一定程度后便是包合和解包合之间的平衡,温度提高,对解包合作用也是有利的,并且从表观稳定常数上看,温度越高,其数值越低,表明形成的包合物稳定性不高,从热焓值上看,由于其值小于零,表明为放热反应,温度增加过多,反而对包合反应不利。所以,在制备包合物时,选择恰当的温度对包合反应是十分重要的。

有机溶剂对包合作用的影响是双向的[8]。客分子加入到主分子中时,要求客分子处于分子状态,这样有利于客分子能最大限度地进入主分子地空腔结构内。对于在水中溶解度不好或者在水中不溶的药物而言,有机溶剂的加入就是保证客分子能处于分子状态,有利于包合反应地进行,但是有机溶剂量太大时,虽然能保证客分子处于分子状态,但同时有机溶剂对已经形成的包合物也会起到解包合地作用,把客分子不断地从主分子中洗脱出来,并且有机溶剂可能和客分子相互竞争主分子,这样就降低了 2-HP-β-CD 包合率,因此,选择适当的有机溶剂浓度对包合反应是十分重要的。对于特别难溶的需要加入大量的有机溶剂的药物,可以采取增加适当的温度、搅拌等措施,不断地以适当的速率将有机溶剂从系统中除去,从而在包合的过程中不断地降低有机溶剂的浓度以促进包合反应的进行。

2-HP-β-CD 是 β-CD 的一种水溶性的衍生物,在 β-CD 分子中葡萄糖 2 位引入亲水基团 2 一羟丙基,破坏了 β-CD 本身分子内部形成氢键的能力,在保留了优良的包合能力的同时,还消除了 β-CD 的一些不良物理化学性质和毒性,而且溶解度得到相当大的提高(常温下能达到 75%)。2-HP-β-CD 与药物形成包合物后,药物的溶解度加大,其原理可能是 2-HP-β-CD 保证了药物在溶出早期阶段有充分的亲水环境,这在本试验中累积溶出度试验上得到证明。另外包合物的结晶形式及颗粒大小也对药物的溶解度有显著的影响。

4 结 论

本试验表明 2-HP-β-CD 能大幅度提高茴三硫的溶解度及溶出速率,为把茴三硫开发成注射剂提供研究基础,从而避免在注射剂中使用有机溶剂之类的助溶剂、潜溶剂等,提高用药的安全性及用药范围;同时把包合物制备成口服固体制剂,也大大提高口服固体制剂的溶出速率。

参 考 文 献

[1] 谢伯泰,杨国武,谢薇梅.羟丙基-β-环糊精特性及其在医药领域中的应用与安全性[J].国外医药——合成药、生化药、制剂分册,2002,23(5):302-306.

[2] 陆 彬.药物新剂型与新技术[M].第 2 版.北京:人民卫生出版社,2005.187-300.

[3] 李 萍,陈 善,丁建新,等.荜茇提取物-β-环糊精包合物制备工艺的研究[J].解放军药学学报,2006,22(3):183-187.

[4] Dollo G,Le C P,Chollet M,et al. Improvement in solubility and dissolution rate of 1,2-Dithiole-3-thiones upon complexation with b-Cyclodextrin and its hydroxypropyl and sulfobutyl ether-7 derivatives [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences,1999,88(9):889-895.

[5] 崔翰明,王建伟,刘春艳,等.双硒唑烷的羟丙基-β-环糊精包合物的制备和包合过程热力学参数的测定[J].中国新药杂志,2006,15(2):106-110.

[6] Higuchi T,Connors K A.Phase-solubility techniques[J]. Adv Anal Chem Instrum,1965,4(2):117-212.

[7] 王璐璐,郑稳生.莫诺苯脲与 β-环糊精及羟丙基-β-环糊精包合作用的研究[J]. 中国药学杂志, 2006,41(7):529-532.

[8] Josef P,Teruhiko H.Effects of ethanol on formation of inclusion complexes of hydroxypropylcyclodextrins with testosterone or with methyl orange[J]. International Journal of Pharmaceutics,1992,80(1-3):243-251.

(责任编辑:冉明会)