

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.10.8

超声波法制备阿苯达唑包合物工艺研究

吴 蕾,刘红云,张 莉,吴 昊,许世富

(安徽省兽药饲料监察所,合肥 230091)

[收稿日期] 2020-06-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 10-0057-06 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 采用超声波法制备阿苯达唑- β -环糊精包合物,用正交设计法筛选最佳工艺,经相溶解度图研究、熔点测定、紫外光谱分析及溶解度测定等对包合物的形成进行检验。包合反应最佳条件为:阿苯达唑与 β -环糊精(β -CD)与比率为 1:2,超声时间 40 min, β -CD 水溶液浓度 8%,此工艺条件下包合物性质稳定,重现性好。结果证明,采用超声波法可制备阿苯达唑- β -环糊精包合物,方法简便,工艺稳定,并可明显改善阿苯达唑水溶性。

[关键词] 阿苯达唑; β -环糊精;包合物

Preparation of Albendazole - β - Cyclodextrin Inclusion Complex

WU Lei, LIU Hong-yun, ZHANG Li, WU Hao, XU Shi-fu

(Anhui Institute of Veterinary Drug and Feed Inspection, Hefei 230091, China)

Abstract: ABZ - β - CD was prepared by ultrasonication, and an orthogonal design was selected for optimum preparation procedure. Inclusion complex were identified by phase solubility analysis, melting point, ultraviolet spectrum and solubility detect. The optimum preparation procedure was: the ratio of host/guest molecules was 1:2, inclusion time was 40 min, β - CD concentration was 8%. the inclusion complex can be prepared by the ultrasonication and it's solubility can be increased significantly. The preparation method is simple and stable.

Key words: albendazole; β - cyclodextrin; inclusion complex

阿苯达唑(Albendazole,以下简称 ABZ)系苯并咪唑类衍生物,是一种人兽共用的广谱抗蠕虫药,对多种寄生虫具有高度活性。作为兽药使用时,由于其在水中不溶^[1]而限制了该品种新剂型的发展,目前一般以片剂或者预混剂形式应用。 β -环糊精(以下简称 β -CD)具有内疏水、外亲水的特殊结构,分子空腔大小适中、无毒,可容纳客分子,从而相对提高难溶物质的水溶性、稳定性及生物利用

度^[2],其性质安全无毒,不引起免疫反应,口服后可在肠道中参与机体代谢,体内不累积,且生产成本低,是一种广泛应用于食品、制药等领域的常见辅料^[3-4]。本文以超声波法制备阿苯达唑 β -CD包合物,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法,以包合率、包合物得率为综合指标对包合工艺进行优选,通过相溶解度法研究考察包合物中主客体分子之间的包合物物质的量之比,并考察包合物的溶解度、紫外光谱

吸收、熔点等物理性质,旨在为兽用新剂型的开发提供技术思路。

1 仪器与试剂

TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),KS4000 控温震荡摇床(德国 IKA),KS500 超声波清洗器(宁波科生仪器厂),D3000 高效液相色谱仪(美国赛默飞),WRR 熔点仪(上海申光仪器仪表有限公司),RCZ-8 W溶出度仪(天津天大天发科技有限公司),VD23 减压干燥箱(德国 BINDER),IQ7000 超纯水仪(美国密理博公司),BT125D 电子天平(德国赛多利斯),HJ-4A 磁力搅拌器(常州国宇仪表

厂)。阿苯达唑(河北美荷药业有限公司), β -环糊精(国药集团试剂有效公司),甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 高效液相检测包合物中阿苯达唑含量方法的建立

2.1.1 检测波长的选取

取 ABZ 对照品加 4% 乙酸甲醇(2:50, V:V, 下同)溶解,在波长 200~400 nm 范围内扫描,ABZ 在波长 296 nm 处有最大吸收峰,空白辅料在此波长处无吸收,不干扰 ABZ 的测定,因此选定 296 nm 作为检测波长。紫外吸收见图 1。

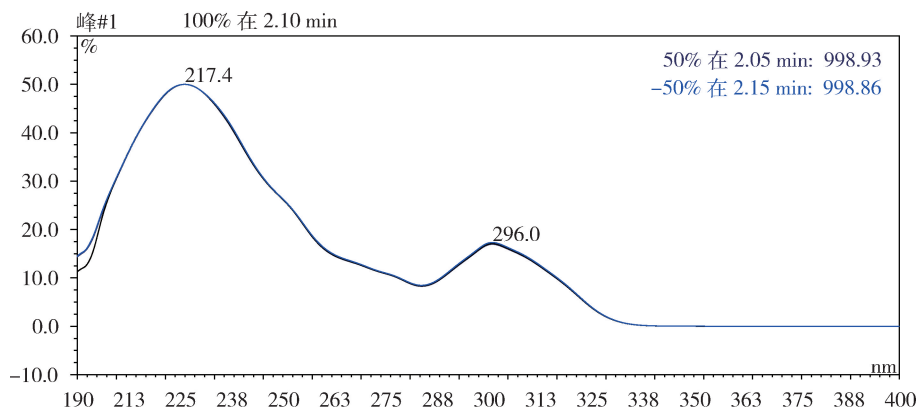


图 1 ABZ 紫外吸收图

Fig 1 UV-absorption spectrum of ABZ

2.1.2 色谱条件

色谱柱为 eclipse Plus C18 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m),柱温 25 $^{\circ}$ C,流动相为乙腈-甲醇-水(56:28:18, V:V),流速 1 mL/min,检测波长 296 nm,进样量 10 μ L,外标法定量。ABZ 标准溶液色谱图见图 2。

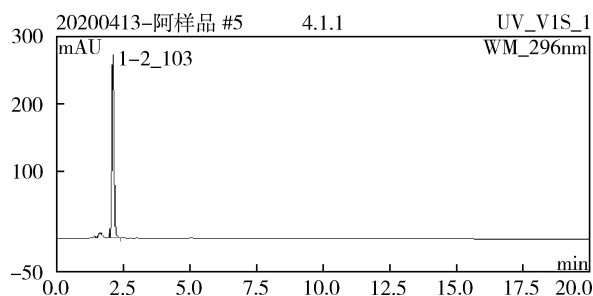


图 2 ABZ 对照品 HPLC 图

Fig 2 HPLC chromatograms of ABZ

2.1.3 标准曲线

精密称取 ABZ 对照品 20 mg,用 4% 乙酸甲醇溶解并定容于 50 mL 量瓶中,得浓度为 400 μ g/mL 的母液。分别从母液中移取 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mL 置 100 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,得浓度分别为 4.0、8.0、20.0、40.0、80.0 μ g/mL 的对照品溶液。精密吸取 10 μ L 上述溶液,进样测定。由 ABZ 峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.8876X - 0.8627$, $r = 0.9992$,表明 ABZ 在 4.0~80.0 μ g/mL 线性关系良好。

2.1.4 精密度试验

取质量浓度为 20.0 μ g/mL ABZ 对照品溶液,按照色谱条件重复进样 5 次,得色谱图按峰面积积分计算 RSD 为 0.88% ($n = 5$)。

2.1.5 供试品溶液的制备

精密称取干燥包合物

0.2 g 至 50 mL 量瓶中,加入 2 mL 冰醋酸、10 mL 甲醇,超声 20 min,放冷至室温后甲醇定容至刻度,0.45 μm 滤膜过滤,进样。

2.1.6 回收率试验 取适量 ABZ-β-CD(按 ABZ 与 β-CD 物质的量之比 1:1)加蒸馏水至刻度,共 18 份,分成 3 组,每组 6 份,每组分别加入不同量的 ABZ 对照品溶液配制成质量浓度分别为 3.42、10.16、40.63 μg/mL 的低、中、高 3 种质量浓度样品溶液,涡旋混合均匀后按照前述供试品的制备方法进行处理后进样 10 μL,由测定的峰面积计算测得量,并分别计算回收率为 95.23%、96.17%、100.02%,RSD 为 0.36%、0.48%、0.43%(n=6)。

2.1.7 稳定性试验 取“2.1.4”项下的溶液 1 份,室温下放置,按照前述色谱条件分别在 12、24、36、48、60、72 h 进样分析,峰面积 RSD 为 0.65%,表明供试品溶液在 72 h 内稳定。

2.1.8 重复性试验 取同一样品,按“2.1.5”制备 5 份供试品,按照色谱条件进样分析,峰面积 RSD 为 0.56%。

2.2 包合物制备方法研究

2.2.1 不同制备方法的比较

2.2.1.1 饱和溶液法 精密称取一定量的 ABZ 至 50 mL 乙醇-丙酮(1:1,V:V)中,55℃恒温搅拌,另称取 β-CD 适量至 50 mL 蒸馏水中,55℃恒温搅拌溶解,缓慢滴入前液,滴定完成后,溶液均相透明,恒温 55℃搅拌 5 h,置 4℃冰箱放置 12 h,抽滤,用 60℃的乙醇-丙酮(1:1,V:V)洗涤未包含的主药,60℃减压干燥,得包合物。平行制备 3 份,包含率为 41.12%±0.35%,包合物得率为 79.34%±0.75%(n=3)。

2.2.1.2 超声波法 精密称取 β-CD 适量,加入适量 55℃的超纯水中制成不同浓度的水溶液,精密称取 ABZ 适量,加入 50 mL 乙醇-丙酮(1:1,V:V),55℃恒温搅拌使溶解,按规定比例将 β-CD 水溶液缓缓滴入 ABZ 溶液中。设置条件,超声,冷至室温,4℃冷藏 12 h,抽滤,用 60℃的乙醇-丙酮(1:1,V:V)洗涤,60℃减压干燥,得包合物。平行制备 3 份,包含率为 61.12%±0.35%,包合物收率

为 89.02%±0.75%(n=3)。
通过以上试验比较发现,超声波法制备的包合物包含率较高,故选择超声波法制备阿苯达唑包合物。

2.2.2 包合物制备工艺优化

2.2.2.1 正交设计 根据预试验结果及参考文献,初步判断影响 β-CD 包含率的主要因素为主客分子的投料摩尔比(A)、超声时间(B)及 β-CD 水溶液浓度(C)等^[5]。本试验以包含率、得率的综合评分作为评价指标,每个因素各取 3 个水平,采用 L₉(3⁴)正交表进行正交试验,因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素与水平表

Tab 1 The factor and level of orthogonal test			
水平	因素		
	投料比 (ABZ:β-CD) A	超声时间 /min B	β-CD 水溶液浓度/% C
1	1:1	30	8
2	1:1.5	40	10
3	1:2	50	12

2.2.2.2 包合物的制备 精密称取 β-CD 适量,加入适量 50℃的超纯水中制成不同浓度的水溶液,精密称取 ABZ 适量,加入 50 mL 乙醇-丙酮(1:1,V:V),60℃恒温搅拌使溶解,按规定比例将 β-CD 缓缓滴入 ABZ 溶液中。设置条件,超声,冷至室温,4℃冷藏 12 h,抽滤,用 60℃的乙醇-丙酮(1:1,V:V)洗涤,60℃减压干燥,得包合物。

2.2.2.3 包含率、包合物得率的测定 包含率、包合物得率的具体计算公式如下:

包含率 = 包合物中 ABZ 量 / ABZ 投入量 × 100%

包合物得率 = 包合物质量 / (β-CD 加入质量 + ABZ 加入质量) × 100%

2.2.2.4 综合评价 由参阅文献所知,包含率是衡量包合效果的重要指标^[6],包含率越高,包合效果越好,对稳定性的提高起关键作用,故权重系数定为 0.6;而得率在实际生产中具有重要意义,在投入量一定的情况下,得率越高,包含率越高,权重系数定为 0.4。包含率_{max}、得率_{max}分别是试验中各指

标的最大值,综合评分按下列公式计算:

综合评分 = (包含率/包含率_{max}) × 0. 6 + (得率/得率_{max}) × 0. 4

2. 2. 2. 5 正交试验结果及数据分析 按正交试验方案,进行 9 组试验,每组平行 3 次,计算相关指标的平均值。正交试验结果及直观分析见表 2。

表 2 正交实验结果
Tab 2 The results of orthogonal test

NO	投料比 A	超声时间 B	β - CD 浓度 C	包含率/%	得率/%	综合评分
1	1	1	1	26. 3%	45. 18%	46. 96%
2	1	2	2	32. 6%	68. 79%	64. 21%
3	1	3	3	36. 4%	65. 97%	66. 60%
4	2	1	2	18. 9%	79. 65%	55. 90%
5	2	2	3	47. 9%	73. 95%	81. 61%
6	2	3	1	20. 8%	81. 33%	58. 55%
7	3	1	3	23. 3%	64. 01%	52. 86%
8	3	2	1	61. 3%	85. 19%	100. 00%
9	3	3	2	17. 4%	82. 36%	55. 70%
k1	59. 26%	51. 91%	68. 50%			
k2	65. 35%	81. 94%	58. 60%			
k3	69. 52%	60. 28%	67. 02%			
R	10. 26%	30. 03%	9. 90%			

根据正交试验的结果及极差直观分析可知,影响包含效果的顺序为 B > A > C,进一步方差分析可知,因素 B 对包含工艺有极显著影响,因素 A 和 C 对包含工艺有显著影响。因此,确定最佳包含工艺为 A₃B₂C₁,即 ABZ 与 β - CD 投料比为 1: 2,超声时间 40 min,β - CD 水溶液浓度 8% 为最优包含条件。

2. 2. 2. 6 工艺验证试验 按正交试验筛选出的最佳工艺条件 A₃B₂C₁进行验证,结果见表 3,可看出正交试验所确定的 ABZ - β - CD 包含工艺稳定。

表 3 正交验证试验结果

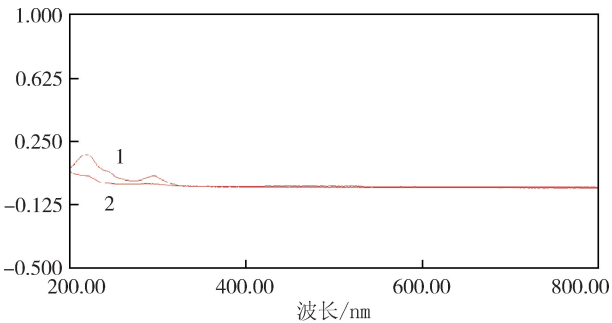
Tab 3 The verification results of orthogonal test

NO	包含率/%	得率/%	综合评分/%
1	62. 0	86. 2	71. 68
2	65. 3	85. 5	73. 38
3	63. 4	86. 1	72. 48

2. 3 包合物的验证

2. 3. 1 紫外光谱扫描 称取适量 ABZ - β - CD 包

合物、β - CD,分别溶于水中,在室温下于 200 ~ 800 nm 进行扫描,结果见图 3。可以看出 ABZ - β - CD 包合物在 290 nm 附近有较强吸收,β - CD 在 200 ~ 800 nm 基本无吸收,说明包合物已经形成。



1: ABZ - β - CD 包合物; 2: β - CD

图 3 紫外吸收比较图

Fig 3 UV spectrum

2. 3. 2 相溶解度的测定 精密称量 β - CD 粉末适量,分别配制成浓度为 2、4、8、10、14、16 mmol/L 的 β - CD 水溶液,精密量取上述溶液各 10 mL,至

50 mL 离心管中,分别加入过量的 ABZ 粉末,密封,超声 10 min,涡旋混合 1 min,然后置于 30 ℃ 恒温振荡器中振荡 72 h,静置 12 h,上清液经 0.46 μm 滤膜过滤,以 4% 乙酸甲醇稀释,按 2.1 项方法测定,以 β -CD 浓度 (mmol/L) 为横坐标,ABZ 的浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为纵坐标,绘制相溶解度图(图 4)。结果显示,ABZ 的质量浓度随 β -CD 质量浓度的增加而呈非线性增加,其相溶解度图为典型的 A_p 型^[7],表明 ABZ- β -CD 在该质量浓度内药物与环糊精形成 1:n($n>1$) 的包合物。

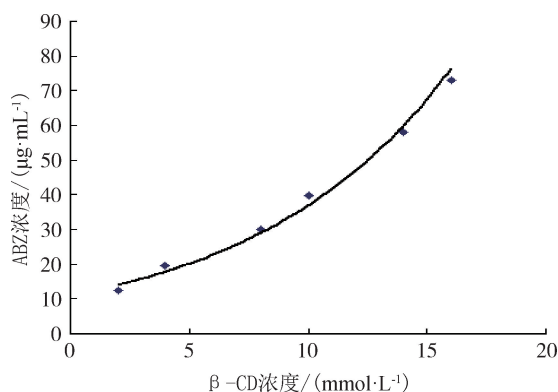


图 4 ABZ- β -CD 相溶解度图

Fig 4 Phase solubility diagram of ABZ- β -CD

2.3.3 包合物在水中表观溶解度的测定 称取 ABZ- β -CD 包合物,置 25 mL 量瓶中,加水至刻度,25 ℃ 振荡平衡 48 h,形成 ABZ- β -CD 包合物的过饱和溶液。移取上述溶液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液测定,计算包合物质量浓度和表观溶解度。结果 ABZ- β -CD 包合物在水中的表观溶解度为 15 mg/mL ,比阿苯达唑在水中溶解度至少提高 20 倍。

2.3.4 熔点测定 对 ABZ、 β -CD、ABZ- β -CD 包合物以及 ABZ 和 β -CD 物理混合物进行熔点测定。结果显示,ABZ 熔点为 209~212 ℃, β -CD 熔点为 193~196 ℃,ABZ- β -CD 包合物熔点为 229~235 ℃,ABZ 和 β -CD 物理混合物熔点为 205~220 ℃。由此可见,包合物熔点与 ABZ、 β -CD、物理混合物熔点明显不同,这也可以说明包合物为新的物相。

3 讨论

3.1 检测波长的确定 本实验建立了 HPLC 检测 ABZ 的分析方法,该方法简便易行,专属性强,回收率稳定,出峰时间短,可用于包合物中 ABZ 的定量测定。阿苯达唑对照品溶液在 200~400 nm 内的紫外光谱扫描结果显示,其最大吸收波长在 296 nm,而 β -CD 在此波长处无吸收,不干扰测定。故本文将检测波长定为 296 nm。

3.2 主药溶解介质的确定 阿苯达唑水溶性极差,在丙酮、乙醇、氯仿中也仅是微溶。有文献报道^[8]将阿苯达唑溶于甲酸后再用乙醇溶解,但由于 β -CD 在酸性环境中会发生解离,会极大降低包合物的得率。许爱霞等^[9]采用 55 ℃ 的丙酮:乙醇 (1:1, V:V) 混合溶剂作为主药的溶解介质。

3.3 制备方法的确定 包合物的制备方法一般有饱和水溶液法、研磨法、喷雾干燥法、冷冻干燥法等。方法的选择需要考虑多个因素,如包合物的包合率、得率、方法的普适性、成本、放大效应等。冷冻干燥、喷雾干燥、研磨法均需特殊的设备,饱和水溶液法搅拌时间过长,费时费力。超声波法则较为简便快速。有报道称,超声处理可以提供更高的物理作用力,利于包合过程的形成^[10]。在 2.2.1.1 项中,本文参考文献^[8]采用逆向搅拌法考察饱和和溶液法的实验指标,发现饱和溶液法较为费时,滴加速度慢(平均 1 mL/min),含药溶液 50 mL 滴加完成需 1 h 左右,且还需长时间搅拌,预实验包合率也仅为 41%,远低于超声波法,故在本试验中采用设备简便易得的超声波法制备 ABZ- β -CD 包合物并采用正交设计优化制备工艺。在后续研究中,将研究工业化生产适用方法如喷雾干燥或研磨法,进一步提高生产效率。

3.4 包合物的鉴定 本文在制备包合物后经相溶解度研究、熔点测定、紫外吸收光谱的测定证明包合物形成了新的物象,而不是 β -CD 与 ABZ 的简单混合。相溶解度研究证明,ABZ 与 β -CD 相溶解度图为典型的 A_p 型,说明有可溶性的包合物形成,且包合比是 1:n。与正交试验筛选出的主客体摩尔比 1:2 吻合。

参考文献:

- [1] 徐晓弘, 翟所迪. 阿苯达唑固体分散物制备及体外溶出特性研究[J]. 中国药学杂志, 2002, 37 (4): 283 - 286.
- Xu X H, Zhai S D. Studies on preparation and dissolution of albendazole solid dispersions[J]. Chin Pharm J, 2002, 37 (4): 283 - 286.
- [2] 毕开顺. 环糊精包合物技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 126 - 138.
- Bi K S. Technology of cyclodextrin inclusion [M]. Beijing: People's Health Press, 2007: 126 - 138.
- [3] Swami G, Mamman K, Pandey M, *et al.* Preparation and characterization of domperidone - β - cyclodextrin complexes prepared by kneading method [J]. Int J Adv Pharm Sci, 2010, 1 (1): 68 - 74.
- [4] Yano H, Kleinebudde P. Improvement of dissolution behavior for poorly water - soluble drug by application of cyclodextrin in extrusion process: comparison between melt extrusion and wet extrusion [J]. AAPS Pharm SciTech, 2010, 11 (2): 885 - 893.
- [5] 高振坤, 王 兰. 姜黄素羟丙基 - β - 环糊精包合物的制备及其性质研究[J]. 中草药, 2012, 43 (10): 1951 - 1956.
- Gao Z S, Wang L. Preparation of curcumine - hydroxypropyl - β - cyclodextrin inclusion complex and its properties [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2012, 43 (10): 1951 - 1956.
- [6] 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]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33 (7): 519 - 524.
- Jiang J, Chen M M, Wang M, *et al.* Preparation of sulfobutyl ether - β - cyclodextrin inclusion complex [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2016, 33 (7): 519 - 524.
- [7] Higuchi T, Connors KA. Phase solubility techniques [J]. Adv Anal Chem Instr, 1965, 4: 117 - 212.
- [8] 刘 梦, 赵 军, 王建华, 等. 环糊精对阿苯达唑的包合作用及其包合物的制备[J]. 中国新药杂志, 2014, 23 (23): 2806 - 2811.
- Liu M, Zhao J, Wang J H, *et al.* Inclusion effect of cyclodextrin and preparation of the albendazole - β - cyclodextrin inclusion complex [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2014, 23 (23): 2806 - 2811.
- [9] 许爱霞, 翟所迪. 阿苯达唑 - β - 环糊精包合物的制备和体外溶出度考察[J]. 华西药理学杂志, 2001, 16 (2): 109 - 111.
- Xu A X, Zhai S D. Studies on preparation and dissolution *in vitro* of albendazole β - cyclodextrin inclusion complex [J]. West China J Pharm Sci, 2001, 16 (2): 109 - 111.
- [10] 李萍, 舒婷, 丛方地, 等. 超声波法制备肉桂醛 - β - 环糊精包合物的研究[J]. 中国食品添加剂, 2016, 9: 82 - 89.
- Li P, Shu T, Cong F D, *et al.* Study on the preparation of innamal dehyde - β - cyclodextrin inclusion complex by ultrasonic method [J]. China Food Additives, 2016, 9: 82 - 89.

(编辑:李文平)