基于傅里叶变换红外光谱技术快速测定磺丁基 -β- 环糊精钠的平均取代度

王晓锋#，许　凯#，张　靖，王会娟，肖新月，杨　锐*
（中国食品药品检定研究院，国家药品监督管理局药用辅料质量研究与评价重点实验室，北京 100050）

摘要：首先利用核磁共振波谱法测定磺丁基 -β- 环糊精钠（SBE-β-CD）样品的平均取代度（DS），作为 DS 标准值。然后，采集 β- 环糊精（β-CD）和 SBE-β-CD 的红外光谱并进行峰归属解析，以确定检测波数和对照波数。依据朗伯 - 比尔定律，建立检测波数和对照波数的吸光度比值与 DS 标准值的线性关系。最后，对建立的基于红外光谱技术测定 DS 的方法进行评价。结果显示，检测波数为约 1 204 cm^{-1}，对照波数为约 1 081 cm^{-1}；吸光度比值与 DS 间的线性关系良好。外部佐证结果显示，基于红外光谱法测得的 DS 与由核磁共振波谱法获得的 DS 标准值基本一致，不同型号红外光谱仪测得的 DS 结果也基本一致，为环糊精衍生物的 DS 测定提供了理论基础。

关键词：磺丁基 -β- 环糊精钠；平均取代度；红外光谱；吸光度比值
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)09-1322-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.09.014

Rapid Determination of Average Degree of Substitution of Sulfobutyl Ether β-Cyclodextrin Sodium by Fourier Transform Infrared Spectroscopy

WANG Xiaofeng#, XU Kai#, ZHANG Jing, WANG Huijuan, XIAO Xinyue, YANG Rui*
(*NMPA Key Lab. for Quality Research and Evaluation of Pharmaceutical Excipients, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050*)

ABSTRACT: The average degree of substitution (DS) of sulfobutyl ether β-cyclodextrin sodium (SBE-β-CD) was measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy, which was taken as the standard value of DS. Then, the infrared spectra of β-cyclodextrin (β-CD) and SBE-β-CD were collected and analyzed by peak assignment to determine the detection wavenumber and the control wavenumber. The linear relationship between the absorbance ratio of the detection wavenumber to the reference wavenumber and the standard value of DS was established according to Lambert-Beer law. Finally, the established DS determination method based on infrared spectroscopy was evaluated. The results showed that the detection wavenumber was about 1 204 cm^{-1}, and the control wavenumber was about 1 081 cm^{-1}. And the linear relationship between absorbance ratio and DS was good. The external corroboration results showed that the DS measured by infrared spectroscopy was basically consistent with the standard value of DS obtained by nuclear magnetic resonance spectroscopy, and the DS results measured by different types of infrared spectrometers were basically the same, which provided a theoretical basis for DS determination of cyclodextrin derivatives.

Key words: sulfobutyl ether β-cyclodextrin sodium; average degree of substitution; infrared spectrum; absorbance ratio

β- 环糊精（β-cyclodextrin，β-CD）是一种环状寡糖，由 7 个以 α-1,4 糖苷键连接的脱水葡萄糖单元组成[1]。β-CD 分子中每个手性脱水葡萄糖单元都是刚性椅式构象，从而形成了空心截锥形状，空心截锥腔内相对疏水、腔外相对亲水[1—2]。β-CD 分子可通过非共价相互作用将疏水性药物分子或

#对文章贡献等同。
收稿日期：2022-04-13
作者简介：王晓锋(1992—)，女，硕士，从事药用辅料质量控制和安全性研究。
许　凯(1993—)，男，本科，从事药用辅料质量控制和安全性研究。
通信作者：杨　锐(1978—)，男，副研究员，从事药用辅料质量控制和安全性研究与新型药用辅料开发。
E-mail：yangr@nifdc.org.cn

部分疏水性药物分子包裹在空心截锥腔内，形成主客体型包合物，可作为增溶剂和稳定剂以提高药物溶解度、溶解速率和（或）稳定性[2]。然而，由于β-CD用于注射给药时会引起严重的红细胞溶血和致命的肾毒性[3—4]，严重限制了其应用。为了降低β-CD的毒性作用以及保留或提高β-CD的功能性，使其可用于注射给药途径，研究者开发了许多经化学修饰的β-CD，包括不同取代基和不同平均取代度（average degree of substitution，DS）的β-CD衍生物[1]。其中，磺丁基-β-环糊精钠（sulfobutyl ether β-cyclodextrin sodium，SBE-β-CD）就是β-CD家族中的一类衍生物，是一种新型药用辅料。SBE-β-CD作为注射用辅料时，不仅表现出良好的体内安全性[5]，而且能显著提高对难溶性药物的增溶能力和对部分非常不稳定药物的稳定性，应用前景广阔[6]。目前，SBE-β-CD已被应用于多种制剂，例如曾被美国FDA批准用于治疗重症新冠肺炎患者的瑞德西韦制剂，其关键辅料之一就是SBE-β-CD[7—8]。

SBE-β-CD中磺丁基（SBE）基团的取代反应可发生在β-CD脱水葡萄糖单元（见图1A）的2位、3位和6位羟基上，其中与6位羟基更易发生取代反应[9]。SBE-β-CD的典型结构见图1B。由于SBE取代基的数量和位置可能会因分子而异，因此，SBE-β-CD是不同取代度化合物组成的复杂混合物。SBE-β-CD中SBE基团的取代情况只能用DS来表示[10]，即每个β-CD骨架上SBE基团的平均个数。ZIA等的研究发现不仅SBE基团的烷烃链能够协同增加环糊精空腔与客体分子间的相互作用，从而使SBE-β-CD具备更强的增溶能力，而且DS的高低能够影响中性分子与SBE-β-CD的结合常数[11]。PIÑEIRO等的研究发现瑞德西韦与SBE-β-CD（DS=5）的结合弱于SBE-β-CD（DS=6）与SBE-β-CD（DS=7）[8]。此外，也有研究表明SBE-β-CD的DS越大，发生人红细胞溶血的程度就越弱[3]。因此，SBE-β-CD的DS不仅影响功能性，也与安全性密切相关，在SBE-β-CD被应用于药物之前，非常有必要测定其DS。

目前，已有多种分析方法测定SBE-β-CD的DS，包括液相色谱串联蒸发光散射检测器（LC-ELSD）法、液相色谱-质谱（LC-MS）法、毛细管电泳串联紫外检测器（CE-UV）法和氢核磁共振波谱（^{1}H NMR）法等[12]。其中，LC-ELSD、LC-MS和CE法是根据不同取代度化合物所占权重比，也就是峰面积百分比计算DS。然而，已有研究表明，SBE-β-CD中不同取代度化合物的ELSD响应、MS响应和UV响应均随SBE基团数量的增加而降低[12—13]。因此，由于不同取代度化合物的信号响应差异，致使LC-ELSD、LC-MS和CE-UV法测得的DS值偏高，而且由这些方法测得的DS与SBE-β-CD的功能性和安全性之间的关系也受到质疑[1]。^{1}H NMR法是一种独立的测定方法，通过计算SBE-β-CD中

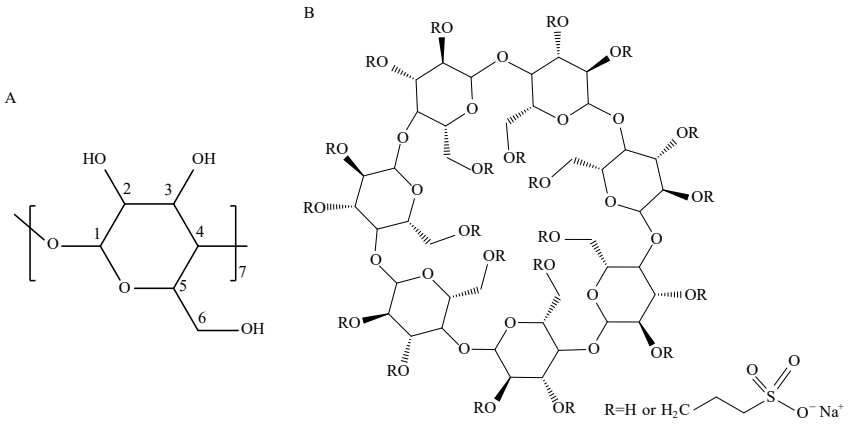


图1 β-CD脱水葡萄糖单元（A）和SBE-β-CD（B）的典型结构

Fig.1 Typical Structures of Dehydrated Glucose Unit of β-CD (A) and SBE-β-CD (B)

SBE 基团内部 2 个亚基质子与 β-CD 单元糖苷质子的信号比值即可得到 DS，测定结果准确[1]。然而，由于 β-CD 单元的糖苷质子信号响应低，不易控制积分范围，并且检测成本高，大部分 SBE-β-CD 生产企业不愿使用 ^{1}H NMR 法测定 DS 值。

本研究旨在开发傅里叶变换红外光谱（Fourier transform infrared spectroscopy，FTIR）技术测定 SBE-β-CD 的 DS，达到不仅能降低检测成本和难度，而且能保证检测结果准确性的目的，也期望可为其他环糊精衍生物的 DS 测定提供理论基础。

1　仪器与试药

Avance Neo 600 型 NMR 波谱仪（美国 Bruker 公司）；Spotlight 100 型 FTIR 仪和 Spotlight 400 型 FTIR 仪（美国 PerkinElmer 公司），均含光谱采集软件和光谱定量软件；2T 小型压片机（英国 Specac 公司）。

SBE-β-CD 样品（分别购于 5 家企业，共 9 批，分别编号为 1 ～ 9；其中编号 1、2、7 购于企业 A，编号 3、8 购于企业 B，编号 4、6 购于企业 C，编号 5 购于企业 D，编号 9 购于企业 E）；β-CD 样品（中国食品药品检定研究院，含量 89.0%，批号 100317-202005）；溴化钾（KBr，红外光谱用，德国 Merck 公司，批号 B1673907）；水为氘代水。

2　方法与结果

2.1　样品设计

^{1}H NMR 法：9 批 SBE-β-CD 样品（编号 1 ～ 9）均作为测试样品。

FTIR 法：5 批 SBE-β-CD 样品（编号 1 ～ 5）作为标准样品，其余 4 批 SBE-β-CD 样品（编号 6 ～ 9）作为验证样品。

2.2　^{1}H NMR 图谱的采集和 DS 的测定

分别取 SBE-β-CD 样品约 15 mg，置 5 mm 的 NMR 管中，加入氘代水 0.7 ml 溶解，混匀，保存待测。使用 NMR 波谱仪，按欧洲药典（EP 10.0）收载的 SBE-β-CD 质量标准项下的 ^{1}H NMR 方法设置仪器参数，采集 SBE-β-CD 样品的 ^{1}H NMR 图谱，并按式①计算 DS。

$$DS=\frac{7\times A_1}{4\times A_2}\qquad 式①$$

式中，A_1 是 SBE 基团（−O-CH_2-**CH_2**-**CH_2**-CH_2-SO_3−）的内部亚甲基质子（以粗体表示）信号峰面积；A_2 是由糖苷基（−O-**CH**-O−）质子（以粗体表示）信号峰面积。

SBE-β-CD 样品 6 的 ^{1}H NMR 典型图谱结果见图 2。根据式①测得编号 1 ～ 9 的 SBE-β-CD 样品的 DS 值分别为 4.7、6.0、6.3、6.7、6.9、6.1、6.2、6.3、6.7，作为 DS 标准值。

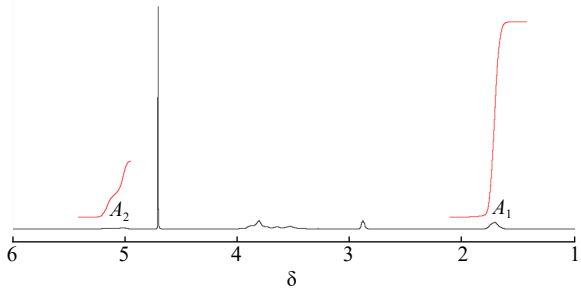


图 2　SBE-β-CD 样品 6 的典型 ^{1}H NMR 谱图

Fig.2　Typical ^{1}H NMR Spectrum of No.6 SBE-β-CD Sample

2.3　FTIR 的光谱采集和 DS 测定

2.3.1　KBr 压片的制备

在干燥环境（相对湿度 <10%）下，分别取 SBE-β-CD 和 β-CD 样品适量，与干燥的 KBr 粉末一起研磨，加入的样品量需满足朗伯 - 比尔定律，即各样品在检测波数和对照波数下的吸光度值应在 0.3 ～ 0.7，不要求对具体样品量进行控制。然后使用小型压片机在 9 800 N 的压力下压制混合粉末 20 s，即可制得透明的 KBr 压片。每个样品平行制备 3 份 KBr 压片。

2.3.2　FTIR 的光谱采集

采用 Spotlight 100 型 FTIR 仪，采集波段为 4 000 ～ 400 cm^{-1}，分辨率为 4 cm^{-1}，扫描次数为 4 次。在室温下，首先以 KBr 空白压片为参比，扣除背景值。然后，分别扫描样品的 KBr 压片，取平均光谱作为样品的 FTIR 谱图。

β-CD 和 SBE-β-CD（编号 1）样品的红外光谱如图 3 所示，2 种样品均显示了糖类物质的特征谱带：约 3 400 cm^{-1}（O-H 伸缩振动）、约 2 935 cm^{-1}（C-H 伸缩振动）、约 1 653 cm^{-1}（O-H 弯曲振动）等[14]。

SBE-β-CD 光谱与 β-CD 光谱对比，约 1 204 cm^{-1} 处的谱带仅出现在 SBE-β-CD 光谱中，该谱带是 $-SO_3$ 基团的特征谱带。SBE-β-CD 的特征吸收谱带及其对应的基团见表 1。

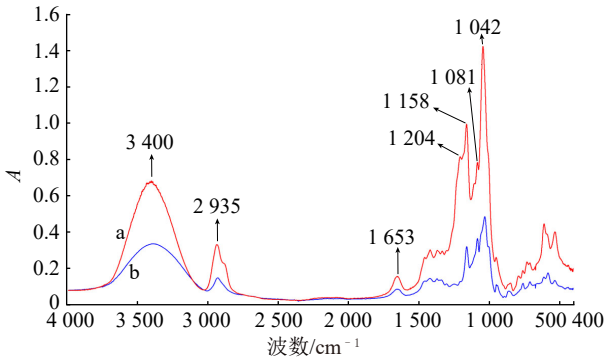


图 3 SBE-β-CD 样品 1（a）和 β-CD 样品（b）的 FTIR 图谱

Fig.3 FTIR Spectra of No.1 SBE-β-CD Sample (a) and β-CD (b)

表 1 SBE-β-CD 样品 1 的 FTIR 谱图的主要吸收带归属

Tab.1 The Main Absorption Bands of FTIR Spectrum of No.1 SBE-β-CD Sample

波数/cm^{-1}	归属
3 400	O-H伸缩振动
2 935	C-H伸缩振动
1 653	O-H弯曲振动
1 204	SO_3对称伸缩振动
1 158	C-O振动
1 081	氧桥反对称伸缩振动
1 042	C-O振动

2.3.3 DS 的测定

2.3.3.1 DS 测定的原理

根据朗伯 - 比尔定律，按式②和③计算检测波数约 1 204 cm^{-1} 和对照波数约 1 081 cm^{-1} 处的吸光度（A_{1204}、A_{1081}）。

$$A_{1204}=\varepsilon_{1204}\times l\times c_{SBE} \qquad 式②$$

$$A_{1081}=\varepsilon_{1081}\times l\times c_{CD} \qquad 式③$$

式中，ε_{1204} 和 ε_{1081} 是相应基团在特定波数下的摩尔吸光系数，为常数；l 是样品厚度；c_{SBE} 和 c_{CD} 分别是 SBE 基团和 β-CD 骨架的摩尔浓度。

进一步结合式②和式③，可得式④：

$$A_R=\frac{A_{1204}}{A_{1081}}=\frac{\varepsilon_{1204}\times l\times c_{SBE}}{\varepsilon_{1081}\times l\times c_{CD}}=\varepsilon\frac{c_{SBE}}{c_{CD}} \qquad 式④$$

式中，A_R 是 A_{1204} 和 A_{1081} 的比值，ε 为常数。

由于 DS 表示每个 β-CD 分子上 SBE 基团的平均个数，因此可以表示为式⑤。

$$DS=\frac{n_{SBE}}{n_{CD}}=\frac{c_{SBE}}{c_{CD}} \qquad 式⑤$$

结合式④和式⑤可得式⑥。

$$A_R=\varepsilon\times DS \qquad 式⑥$$

由此表明吸光度比值 A_R 与 DS 成正比，这是量化 DS 的基础。同时，由于基于的是吸光度比值 A_R，因此可忽略样品 KBr 压片的厚度变化而带来的误差。

2.3.3.2 DS 测定波数的选择

检测波数对应的吸光度应仅随取代度的变化而变化，对照波数对应的吸光度应不因取代度的变化而变化。在 SBE-β-CD 光谱中，约 1 204 cm^{-1} 处的谱带是 $-SO_3$ 基团的特征谱带，而且与其他基团的吸收波数几乎无重叠，因此，将该波数作为检测波数。而对于对照波数，可以选择由 β-CD 骨架产生的吸收波数，虽 β-CD 骨架有多个特征吸收波数，但由于 β-CD 骨架和 SBE 基团的吸收波数可能重叠，如 β-CD 骨架和 SBE 基团中 C-O 振动产生的吸收波数均在 1 042 cm^{-1} 左右，因此仍应谨慎选择用于量化的对照波数。β-CD 骨架中的氧桥键是 β-CD 特有的结构，不会因发生 SBE 基团取代而产生变化。因此，将氧桥键伸缩产生的吸收波数 1 081 cm^{-1} 作为对照波数。

2.3.3.3 DS 测定用标准曲线

谱带高度比或谱带峰面积比均可用来计算 A_R。然而，由于在 SBE-β-CD 光谱图中，约 1 204 cm^{-1} 和约 1 081 cm^{-1} 处的谱带与相邻谱带未完全分离，无法实现准确积分，因此，本研究采用这 2 处的谱带高度计算 A_R。同时，在计算谱带高度时，需要选择稳定的基线以降低样品 KBr 压片差异等因素可能引入的误差。

经筛查后发现，由 β-CD 骨架引入的波谷 1 129 cm^{-1} 稳定性好，受外界因素干扰小，因此，

确定波谷 1 129 cm^{-1} 为基点，通过该基点绘制一条水平直线作为基线。A_{1204} 和 A_{1081} 的计算方式和基线见图 4。

通过计算得到 5 个 SBE-β-CD 标准样品的 A_R，再将其与相应的 DS 标准值进行拟合，发现 DS 为 4.7 ～ 6.9 时，A_R 与 DS 线性关系良好，A_R=0.522×DS－1.389（R^2=0.996 6）。

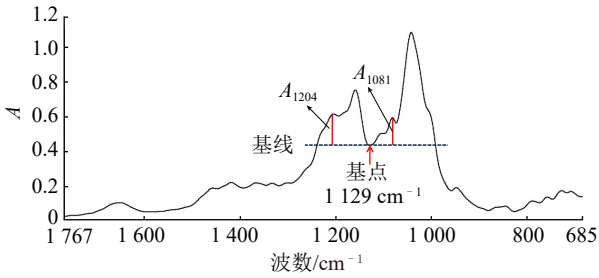


图 4　A_{1204} 和 A_{1081} 的计算方式和基线绘制

Fig.4　Calculation Method and Baseline Drawing of A_{1204} and A_{1081}

2.3.4　FTIR 方法评估

本研究设计了 2 种方法来评估所开发的 FTIR 法。第 1 种：将 FTIR 法和 ^{1}H NMR 法测定的样品 DS 值进行比较。首先，将利用 FTIR 法测得的标准样品和验证样品的 A_R 均代入标准曲线方程（A_R=0.522×DS－1.389），计算得到所有样品的 DS 值；然后，将这些计算得到的 DS 值与 ^{1}H NMR 法测得的 DS 标准值进行比较。结果显示，FTIR 和 ^{1}H NMR 法测得的 DS 值的误差绝对值最大为 0.1，说明建立的 FTIR 法可靠。第 2 种：比较不同 FTIR 仪测得的样品 DS 值差异。首先，在不同实验室的 Spotlight 400 型 FTIR 仪上建立标准曲线方程（A_R=0.598×DS－1.681，R^2=0.997 4）；随后，在该仪器上测定标准样品和验证样品的 A_R，从而计算得到样品的 DS 值，并与标准曲线方程（A_R=0.522×DS－1.389）计算得到的 DS 值进行比较。结果显示，2 台 FTIR 仪测得的 DS 值最大相差 0.1，表明建立的 FTIR 法在不同 FTIR 仪之间具有可转移性。

3　讨论

本研究采用 FTIR 技术，依据朗伯 - 比尔定律，利用 SBE-β-CD 分子中 SBE 基团和 β-CD 骨架的特征吸收谱带，建立了 SBE-β-CD 样品 DS 的定值原理。需强调的是，选择的基线对于是否能获得具有良好线性关系的 A_R 和 DS 方程非常重要。经评估可知，所开发的 FTIR 方法可靠、通用。相比于 LC-ELSD 法、LC-MS 法和 CE-UV 法的定值不准确，以及 ^{1}H NMR 法的操作难度大、成本高的缺点，所建立的 FTIR 法不仅保证了检测结果的准确性，而且大幅降低了检测成本和难度，适用范围广，可提高企业监测 SBE-β-CD 样品 DS 的可及性，同时也为其他环糊精衍生物的 DS 值测定提供了参考。

参考文献：

[1] SZENTE L, SZEMAN J, SOHAIDA T. Analytical characterization of cyclodextrins: history, official methods and recommended new techniques [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, **130**: 347-365.

[2] SZEJTLI J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry [J]. *Chem Rev*, 1998, **98**(5): 1743-1754.

[3] RAJEWSKI R A, TRAIGER G, BRESNAHAN J, *et al*. Preliminary safety evaluation of parenterally administered sulfoalkyl ether beta-cyclodextrin derivatives [J]. *J Pharm Sci*, 1995, **84**(8): 927-932.

[4] FRANK D W, GRAY J E, WEAVER R N. Cyclodextrin nephrosis in the rat [J]. *Am J Pathol*, 1976, **83**(2): 367-382.

[5] MALANGA M, FEJŐS I, VARGA E, *et al*. Synthesis, analytical characterization and capillary electrophoretic use of the single-isomer heptakis-(6-*O*-sulfobutyl)-beta-cyclodextrin [J]. *J Chromatogr A*, 2017, **1514**(36): 127-133.

[6] STELLA V J, RAJEWSKI R A. Sulfobutylether-beta-cyclodextrin [J]. *Int J Pharm*, 2020, **583**(11): 119396.

[7] GARRIDO P F, CALVELO M, BLANCO-GONZÁLEZ A, *et al*. The lord of the nanorings: cyclodextrins and the battle against SARS-CoV-2 [J]. *Int J Pharm*, 2020, **588**(16): 119689.

[8] PIÑEIRO Á, PIPKIN J, ANTLE V, *et al*. Remdesivir interactions with sulphobutylether-β-cyclodextrins: a case study using selected substitution patterns [J]. *J Mol Liq*, 2022, **346**(2): 117157.

[9] KHAN A R, FORGO P, KEITH J S, *et al*. Methods for selective modifications of cyclodextrins [J]. *Chem Rev*, 1998, **98**(5): 1977-1996.

[10] FRANCIS G R. Cyclodextrins: sulfobutylether-cyclodextrins. Structure, degree of substitution and functional performance [M]. America: Nova Science Publishers, 2015: 293-320.

[11] ZIA V, RAJEWSKI R A, STELLA V J. Thermodynamics of binding of neutral molecules to sulfobutyl ether beta-cyclodextrins (SBE-beta-CDs): the effect of total degree of substitution [J]. *Pharm Res*, 2000, **17**(8): 936-941.

[12] GRARD S, ELFAKIR C, DREUX M. Analysis of sulfobutyl ether-beta-cyclodextrin mixtures by ion-spray mass spectrometry and liquid chromatography-ion-spray mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2001, **925**(1/2): 79-87.

[13] LUNA E A, BORNANCINI E R, THOMPSON D O, *et al*. Fractionation and characterization of 4-sulfobutyl ether derivatives of cyclomaltoheptaose (beta-cyclodextrin) [J]. *Carbohydr Res*, 1997, **299**(3): 103-110.

[14] YUAN C, LIU B G, LIU H. Characterization of hydroxypropyl-beta-cyclodextrins with different substitution patterns via FTIR, GC-MS, and TG-DTA [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, **118**(4): 36-40.

广告索引

封二：Sievers 分析仪（威立雅）

封三：天津市天大天发科技有限公司

封底：苏州海顺包装材料有限公司

中彩插 1：鲁南厚普制药有限公司

中彩插 2：《中国医药工业杂志》征订信息

1376 页：公益广告