

• 制剂与质量 •

羟丙基- β -环糊精对紫杉醇的增溶作用及其分子包合机制研究张学农¹, 唐丽华¹, 阎雪莹², 张 强³

(1. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123; 2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040;

3. 北京大学药学院 药剂系, 北京 100083)

摘 要:目的 探讨环糊精包合物对紫杉醇的溶解作用及环糊精与药物之间的相互作用规律。方法 考察 β -环糊精和羟丙基- β -环糊精为包合材料对紫杉醇增溶作用的影响;¹H-NMR 探讨包合物形成时主客分子之间化学位移的相互作用。结果 包合物材料对包合物形成起主导作用, 羟丙基- β -环糊精对紫杉醇增溶作用明显优于 β -环糊精, 且增溶作用随其比例的增加而增大;¹H-NMR 分析显示羟丙基- β -环糊精与紫杉醇分子中芳香环的作用最显著。结论 羟丙基- β -环糊精能够有效地提高难溶性药物紫杉醇的溶解度。

关键词: 紫杉醇; 羟丙基- β -环糊精; 包合物

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)09-1317-04

Solubilization of hydroxypropyl- β -cyclodextrin to paclitaxel and its relative molecular inclusion mechanismZHANG Xue-nong¹, TANG Li-hua¹, YAN Xue-ying², ZHANG Qiang³

(1. College of Pharmacy, Suzhou University, Suzhou 215123, China; 2. Heilongjiang University

of Traditional Chinese Medicine, Haerbin 150040, China; 3. Department of Pharmaceutics,

School of Pharmaceutical Science, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Objective** To investigate the solubilization effect of macromolecular paclitaxel with cyclodextrin and mechanism between inclusion complex and drugs. **Methods** The influence effects on paclitaxel solubility were studied with β -cyclodextrin (β -CD) and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) as inclusion carriers. The chemical shifts of hydrogen atom in host and guest molecules were also investigated with ¹H-NMR. **Results** The form of inclusion complex was responsible by host molecules and the enhancement solubility of paclitaxel in HP- β -CD was larger than that in β -CD and increased with the ratio increasing. The benzene ring in the molecular of HP- β -CD and paclitaxel showed the most significant effect. **Conclusion** The solubility of dissolved paclitaxel is improved by hydroxypropyl- β -cyclodextrin.

Key words: paclitaxel; hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD); inclusion complex

紫杉醇(paclitaxel)于1992年由美国FDA批准治疗卵巢癌、乳腺癌和非小细胞肺癌(NSCLC),其作用机制是通过刺激导管素的聚合,促进微管双聚体装配成微管,并致使微管超稳定而抑制微管网动力学重组,最终使细胞增殖停止在有丝分裂期的G₂/M阶段^[1]。由于紫杉醇口服几乎不吸收,目前临床应用的紫杉醇注射液是以50%聚氧乙烯醚(35)蓖麻油无水乙醇溶液制成的无色黏稠溶液,使用时用生理盐水或5%葡萄糖注射液稀释后静脉滴注。聚氧乙烯醚(35)蓖麻油易引起过敏反应和低血压。有关报道制备成微乳、脂质体和包合物减少紫杉醇

注射液过敏反应,增大紫杉醇溶解性。本实验选择羟丙基- β -环糊精(hydroxypropyl- β -cyclodextrin, HP- β -CD)作为包合材料,利用其易溶于水,毒性低,无溶血性等特点^[2~4]。本实验通过探讨HP- β -CD在不同浓度、温度和主客分子比例对紫杉醇增溶作用的影响,揭示包合物形成机制和主客分子之间的最佳物质的量比例,为制备紫杉醇包合物前体物提供科学依据。

1 仪器与试剂

HP 1100 型高效液相色谱系统,可变紫外检测器,HP3395 型积分仪(美国安捷伦公司);德国

收稿日期: 2006-11-12

基金项目: 江苏省科技厅社会发展资助项目(BS200522);江苏省高新技术产业发展资助项目(JHB05-46);苏州大学医学发展基金资助项目(EE132503)

作者简介: 张学农(1962—),男,河南西平人,教授,博士生导师,主要研究方向为药物新技术与新剂型。

Tel: (0512)66998348 E-mail: zhangxuenong@suda.edu.cn zhangxuenong@163.com

Christ Alpha2 型真空冷冻干燥仪; INVO500 型核磁共振仪(美国瓦里安公司); TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂); 精密电子天平(北京塞多利斯天平有限公司)。

紫杉醇由北京四环制药厂提供, β -CD(M_v 为 1 480)由广东省郁南县环糊精厂提供, HP- β -CD(M_v 为 1 680)由西安德立生物化工有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 紫杉醇的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件: Hypersil ODS 2 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, 大连依利特分析仪器有限公司); 流动相: 甲醇-乙腈-水(25:40:38), 用前经 0.22 μ m 滤膜滤过, 混合后超声混匀备用; 检测波长为 227 nm。

2.1.2 标准曲线的制备^[5]: 精密称取紫杉醇适量, 加乙醇溶解制成 500 μ g/mL 贮备液。精密吸取 0.1、0.25、0.5、0.75、1.0、1.5 mL 紫杉醇贮备液置 10 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 混匀, 依次进样 25 μ L, 测峰面积值。以紫杉醇峰面积对质量浓度进行回归, 得标准曲线方程 $C = 3.9557 \times 10^{-4}A + 0.31947$, $r = 0.9974$, 线性范围为 10~150 μ g/mL。

2.1.3 测定^[5]: 取供试品溶液 1.0 mL 置于 10 mL 离心管中, 加入 3 mL 叔丁基甲醚, 涡旋 1 min, 离心, 分离上清液, 重复萃取 3 次。合并萃取液, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴下氮气吹干, 加入流动相 1 mL 溶解后, 取 25 μ L 进样, 测定峰面积。将供试品色谱峰中紫杉醇峰面积代入标准曲线方程, 计算紫杉醇的质量浓度。

2.2 环糊精对紫杉醇的增溶作用

2.2.1 包合材料的选择: 分别取 β -CD 和 HP- β -CD 适量, 比例分别为 5%~60%, 配成 10 mL 溶液, 加入紫杉醇贮备液 200 μ L, 置 25 $^{\circ}$ C 恒温振荡器上振荡 48 h, 转移至 10 mL 西林瓶中, -60 $^{\circ}$ C 冷冻、真空干燥, 加流动相 5 mL, 涡旋 1 min, 12 000 r/min 离心, 上清液滤过, 超声 10 min, 进样 10 μ L 测定, 记录峰面积, 计算紫杉醇的浓度。结果见图 1。可见比例为 8% 的 β -CD 对紫杉醇增溶作用最为显著, 随着包合材料比例增大, 紫杉醇溶解度基本恒定, 最大溶解度为 74.32 μ mol/L。随着包合材料 HP- β -CD 比例在 10%~50% 的增加, 紫杉醇的溶解度相应增加, 其最大溶解度可达到 305.67 μ mol/L, 约为 β -CD 增溶作用的 4 倍。

2.2.2 温度对紫杉醇溶解性的影响: 取紫杉醇适量, 加无水乙醇配制成 2 mg/mL 溶液作为储备液。分别取 HP- β -CD 加蒸馏水配制成 0.2×10^{-3} 、 $4 \times$

10^{-3} 、 6×10^{-3} 、 8×10^{-3} 、 1×10^{-2} mol/L。分别取不同浓度的同种溶液 1 mL, 分别加入紫杉醇储备液 20 μ L, 涡旋 30 s 混匀, 置 25、30、35、40 $^{\circ}$ C 恒温振荡器中振荡 5 d, 将溶液置 -60 $^{\circ}$ C 真空干燥, 分别加入 1 mL 蒸馏水, 0.22 μ m 滤膜滤过, 溶液进样 25 μ L, HPLC 法测定溶液中紫杉醇的浓度。见图 2。结果表明, 温度对 HP- β -CD 包合紫杉醇的作用的影响较大。其中 30 $^{\circ}$ C 下 HP- β -CD 对紫杉醇增溶作用最大, 其次为 35 $^{\circ}$ C, 而 25 $^{\circ}$ C 和 40 $^{\circ}$ C 下包合作用最小。

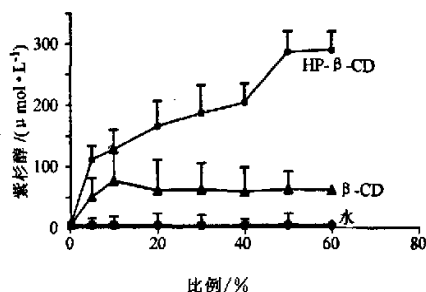


图1 紫杉醇在水、 β -CD 和 HP- β -CD 溶液中的溶解度

Fig. 1 Paclitaxel solubility in pure water, β -CD, and HP- β -CD solution

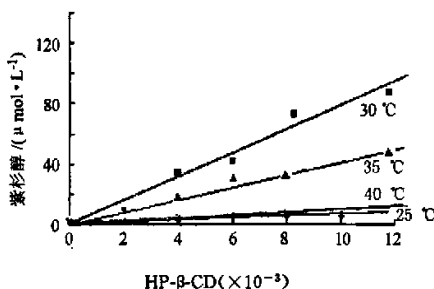
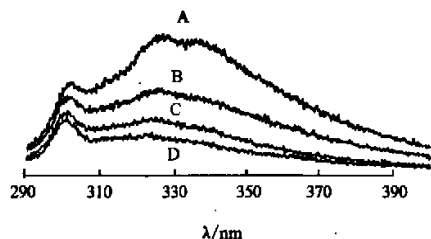


图2 不同温度下紫杉醇在 HP- β -CD 溶液的溶解度

Fig. 2 Paclitaxel solubility in HP- β -CD solution at different temperatures

2.2.3 紫杉醇浓度对增溶的影响: 取 HP- β -CD 适量, 制成 0.01 mol/L 溶液。分别取该溶液 0.1、5、10 mL 置量瓶中, 加入 2 mg/mL 紫杉醇贮备液 0.100 mL, 加水至刻度, 使含 HP- β -CD 浓度分别为 0.1×10^{-3} 、 5×10^{-3} 、 1×10^{-2} mol/L。将溶液置 30 $^{\circ}$ C 恒温振荡器中振荡 24 h, 冷却, 用 0.22 μ m 滤膜滤过, 置荧光扫描仪中。扫描条件: 激发波长为 270 nm, 发射光谱范围为 290~400 nm, 激发和发射波狭缝均为 3 nm, 分别对 4 种溶液进行扫描, 见图 3。紫杉醇分子结构中 C_{14} 位侧链含有苯环, 有荧光特性。从图中分析可知, 紫杉醇最大发射波长为 302 nm 和 327.2 nm, 其中最大发射波长为 327.2 nm, 且与浓度具有良好的相关性。



A-水 B-D-HP-β-CD 1×10^{-3} , 5×10^{-3} , $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
A-water B-D-HP-β-CD 1×10^{-3} , 5×10^{-3} , $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 3 紫杉醇在 HP-β-CD 溶液中的荧光扫描曲线

Fig. 3 Fluorescence curve of paclitaxel in HP-β-CD solution

2.3 包合作用的机制

2.3.1 HP-β-CD 对紫杉醇的增溶作用: 配制比例为 10%、20%、30%、40%、50%、60% 的溶液, 分别取 1 mL, 加入紫杉醇贮备液 200 μL, 置 30 ℃ 下, 40 r/min 振荡 48 h, 冷冻干燥, 加水 1 mL, 涡旋 30 s, 3 000 r/min 离心、用 0.22 μm 滤膜滤过后, 进样 20 μL, 以甲醇-水 (30 : 70) 为流动相, 体积流量为 2 mL/min, 测定峰面积, 并计算。HP-β-CD 对紫杉醇的增溶作用见表 1。可以看出, 随着主分子 HP-β-CD 的比例增大, 对紫杉醇的增溶作用明显增强, 当其比例达到 40%~60% 时, 可使紫杉醇溶解度增大 1 000~9 000 倍, 即紫杉醇溶解度达到 0.5~4.4 mol/L。由于 HP-β-CD 的比例达 40% 以上, 其溶液的黏度太大, 流动相差, 不宜作机体注射用, 比较适合的比例为 20% 以下。

表 1 HP-β-CD 对紫杉醇增溶作用

Table 1 Enhancement of paclitaxel solubility by HP-β-CD

HP-β-CD/%	紫杉醇质量浓度/(mg · L ⁻¹)	增溶倍数
空白	0.42 ± 0.02	
10	28.3 ± 5.8	67.4
20	41.6 ± 8.9	100
30	122 ± 27	290
40	414 ± 71	1 035
50	845 ± 46	2 113
60	3 785 ± 341	9 012

2.3.2 最佳物质的量比例的测定: 分别取 2.34 mmol/L 紫杉醇贮备液 200 μL, 按照 1 : 40、1 : 50、1 : 60、1 : 80、1 : 100 比例称取配成 1 mL 溶液, 将紫杉醇和 HP-β-CD 混合后, 涡旋 30 s, 置 30 ℃ 恒温水浴中振荡 24 h, 真空冷冻干燥。取适量加乙醚洗涤 3 次, 干燥, 测定载药量和收率, 结果见表 2。可见, 随着主客分子比例的增大, 紫杉醇溶解度也相应增大, 结合 HP-β-CD 用量, 制成紫杉醇包合物的载药量应大于 1.5%, 即综合考虑溶解度和载药量, 主客分子物质的量比应控制在 1 : 50~1 : 60 为宜。

表 2 紫杉醇与 HP-β-CD 包合的最佳物质的量比例

Table 2 Physical characteristics of paclitaxel inclusion complex with different host-guest ratio

比 例	溶解度/(mmol · L ⁻¹)	载药量/%	回收率/%
1 : 40	0.32 ± 0.10	2.11 ± 0.36	85.44 ± 4.81
1 : 50	0.48 ± 0.13	2.04 ± 0.46	88.12 ± 6.03
1 : 60	0.88 ± 0.22	1.86 ± 0.13	90.69 ± 5.98
1 : 80	0.96 ± 0.35	1.44 ± 0.20	89.03 ± 6.13
1 : 100	1.21 ± 0.17	1.12 ± 0.22	91.54 ± 5.09

2.3.3 ¹H-NMR 化学位移的测定: 分别以氘水 (D₂O) 和氘化甲醇 (CD₃OD) 为溶剂溶解 HP-β-CD、紫杉醇、紫杉醇与 HP-β-CD 混合物以及紫杉醇包合物样品, 以 500 MHz 测定 4 种物质的 ¹H-NMR 谱图, 计算化学位移值, 结果见表 3.4。HP-β-CD 中质子受紫杉醇的影响均发生了明显的位移, 其中以 HP-β-CD 中的 H-3、5、6、6' 的化学位移较为显著, 提示紫杉醇分子中的芳香基团进入环糊精的空穴时, 由于其空间位阻较大, 导致紫杉醇结构芳香环以外的质子与 HP-β-CD 的外侧质子之间发生相互作用。

表 3 紫杉醇-HP-β-CD 形成包合物前后 HP-β-CD 化学位移的变化

Table 3 ¹H-NMR Chemical shift of HP-β-CD before and after inclusion complex with paclitaxel

质子	δ(HP-β-CD)	δ(包合物)	Δδ
1-H	5.127	5.044	-0.083
2-H	3.403	3.321	-0.082
3-H	3.946	3.863	-0.083
4-H	3.420	3.426	-0.006
5-H	3.815	3.735	-0.080
6, 6'-H	3.733	3.650	-0.083
CH ₂	3.770	3.686	-0.004
CH ₃	1.119	1.128	-0.009

3 讨论

包合材料对紫杉醇的增溶作用与形成包合物有一定的相关性。β-CD 和 HP-β-CD 均具有增溶作用, 但是 25 ℃ 条件下 β-CD 的溶解度仅为 1.85%, 受自身的溶解度的限制, 其增溶作用明显低于后者。其增溶作用一方面受机械力和溶剂效应的作用, 紫杉醇部分基团进入环糊精母核分子空穴中, 使其溶解度增加; 另一方面环糊精具有一定的水溶性和润湿性, 在紫杉醇分子表面形成水化膜, 使溶解度增大。由于 HP-β-CD 本身毒性小, 几乎无溶血性, 可制备供口服和注射用药物制剂, 综合考虑选择 HP-β-CD 作为紫杉醇包合材料为宜。同时, 包合物形成和紫杉醇增溶作用均受温度影响。一定温度可加速紫杉醇的分子运动速度, 降低主分子外层亲水基团对其疏水基团的排斥力, 使疏水部分更容易进入环糊精疏水内腔中形成包合物。

表4 紫杉醇-HP- β -CD 形成包合物前后紫杉醇化学位移的变化

Table 4 $^1\text{H-NMR}$ Chemical shift of paclitaxel before and after inclusion complex with paclitaxel

质子	δ (游离紫杉醇)	α (包合物中紫杉醇)	$\Delta\delta$
Ar-ph	8.108	8.026	-0.082
Bo-ph	7.854	7.777	-0.077
Ap-ph	7.674	7.600	-0.074
Am-ph	7.580	7.574	-0.006
Bp-ph	7.533	7.474	-0.059
Co-ph	7.467	7.403	0.064
Bm-ph	7.451	7.364	-0.087
Cm-ph	7.422	7.364	-0.077
Cp-ph	7.292	7.345	-0.078
10-H	6.437	6.214	-0.085
13-H	6.129	6.161	0.032
3'-H	5.643	5.646	0.003
5-H	4.977	4.991	-0.006
2'-H	4.729	4.767	0.038
7-H	4.304	4.315	-0.011
20a-H	4.178	4.191	0.013
20b-H	4.161	4.187	0.026
3-H	3.828	3.825	0.003
2'-OH	3.807	3.820	-0.013
6a-H	2.454	2.460	-0.006
4-OAc	2.352	2.360	0.081
10-OAc	2.160	2.167	0.075
14a-H	2.234	2.255	-0.021
6b-H	1.969	2.001	0.032
18-Me	1.901	1.909	-0.018
19-Me	1.650	1.658	0.118
17-Me	1.144	1.149	0.005

包合物中质子的化学位移是主客分子相互作用的结果,由于紫杉醇的相对分子质量较大,其空间构象复杂,根据计算机程序模拟环糊精母核和紫杉醇萜环分子模型,紫杉醇萜环跨度大于环糊精母核的内腔直径,紫杉醇分子不能完全进入环糊精空穴中。结合 HP- β -CD 对紫杉醇增溶曲线两者相互作用形成的包合物无固定比例可以推断,主客分子之间没

有固定的包合比例,不能形成恒定结合常数的包合物,故其包合物形成的空间结构尚不能用现有信息对计算分子模型作出准确的推论。结合紫杉醇包合前后质子化学位移的改变,间接地推断紫杉醇被包合的部位为紫杉醇的3个芳香环,对照紫杉醇包合前后质子信号,3个芳香环质子的化学位移均明显,提示可能是芳香环随机进入主分子的亲水空穴中,且3个芳香环基团分别被不同的环糊精所包合^[6,7]。此外,由于紫杉醇立体空间较大,芳香环插入环糊精内腔后受环糊精外层亲水羟基的作用,结果导致主客分子的质子发生不同程度的位移,其中紫杉醇萜环上-CH₃和-OAc位移较为明显,从而提示主客分子之间相互作用在侧链形成包合可能性。

References:

- [1] Rao S, Orr G A, Chaudhary A G, *et al.* Characterization of taxol-binding site on the microtubule-2-(mazidobenzoyl) taxol photolabels a peptide (acid 217-213) of tubulin [J]. *Biol Chem*, 1995, 270(35): 20235-20238.
- [2] Bodor N, Drustur J, Wu W. Effect of cyclodextrins on the solubility and stability of a novel soft corticosteroid, loteprednol etabonate [J]. *Pharmazie*, 2000, 55(3): 206-209.
- [3] Zhang X N, Zhang Q. Research progress of taxanes and its clinical application [J]. *Foreign Med Sci; Sect Pharm* (国外医学:药学分册), 2002, 29(6): 321-324.
- [4] Uekama K, Hieda Y, Hirayama F, *et al.* Stabilizing and solubilizing effects of sulfolbutyl ether beta-cyclodextrin on prostaglandin E1 analogue [J]. *Pharm Res*, 2001, 18 (11): 1578-1585.
- [5] Zhang X N, Tang L H, Yan X Y, *et al.* Preparation of Paclitaxel for injection and its hypersusceptibility test [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2005, 25(1): 32-34.
- [6] He L, Wang G L, Zhang Q. An alternative paclitaxel microemulsion formulation: hypersensitivity evaluation and pharmacokinetic profile [J]. *Int J Pharm*, 2003, 250(1): 45-50.
- [7] Lee S, Seo D H, Kim H, *et al.* Investigation of inclusion complexation of paclitaxel by cyclononacosakis-(1-2)-(β -D-glucopyranosyl), by cyclomaltoheptaoses (β -cyclodextrins) [J]. *Carbohydrate Res*, 2001, 334(2): 119-126.

痰热清氯化钠注射液指纹图谱的研究

宋汉敏¹, 刘乃强¹, 刘素梅², 聂桂华¹

(1. 河南省食品药品检验所, 河南 郑州 450003; 2. 河南省兽药监察所, 河南 郑州 450008)

摘要:目的 建立痰热清氯化钠注射液的指纹图谱。方法 采用 HPLC-ELSD 法检测痰热清注射液中非挥发性成分,以黄芩苷对照品为参照,标定共有峰,计算相对保留时间和相对峰面积比值,确定 10 批样品之间的相似度。结果 在全面方法学研究的基础上,对 10 批痰热清氯化钠注射液进行检测分析,HPLC 指纹图谱有 16 个共有峰,其相对保留时间及相对峰面积比值均符合要求。结论 建立的指纹图谱可作为痰热清氯化钠注射液质量评价的重要依据之一。