

熊果酸共晶固体分散体的体外特性研究

祁雯^{1,2}, 施斌³, 黄雄伟⁴, 奚之骏², 姜嫣嫣^{1*}, 裴元英¹

1. 复旦大学药学院 药剂教研室, 上海 201203
2. 上海中医药大学附属龙华医院 药剂科, 上海 200032
3. 上海睿智化学研究有限公司, 上海 201318
4. 上海同济大学附属杨浦中心医院 药剂科, 上海 200090

摘要: 目的 采用共晶与固体分散体技术相结合策略, 筛选合适的载体材料制备熊果酸共晶的固体分散体, 更进一步提高熊果酸的溶解度、溶出度, 以更好地改善其生物利用度。方法 选择泊洛沙姆 188 (F68)、聚维酮 S630 (PVP-S630)、硬脂酸聚羟氧 (40) (S40) 和羟丙甲纤维素 (HPMC) 4 种载体材料, 采用溶剂法, 分别将原药、熊果酸-哌嗪共晶 (UA-PP) 与不同载体制成固体分散体。测定溶解度, 进行体外溶出实验, 比较并评价熊果酸制成共晶和固体分散体后改善生物利用度的潜力。结果 熊果酸共晶和熊果酸固体分散体均能增加熊果酸的溶解度和溶出度。共晶制成固体分散体后能进一步提高熊果酸的溶解度, 加快其体外溶出。结论 将熊果酸共晶制成固体分散体后其溶解度和溶出度显著优于熊果酸共晶和熊果酸固体分散体。

关键词: 熊果酸; 共晶; 固体分散体; 溶解度; 溶出度; 生物利用度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)20-2845-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.20.011

In vitro characteristic evaluation of ursolic acid co-crystal solid dispersions

QI Wen^{1,2}, SHI Bin³, HUANG Xiong-wei⁴, XI Zhi-jun², JIANG Yan-yan¹, PEI Yuan-ying¹

1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China
2. Department of Pharmacy, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
3. Simcere Pharmaceutical Group, Shanghai 201318, China
4. Department of Pharmacy, Yangpu District Central Hospital of Tongji University, Shanghai 200090, China

Abstract: Objective To use co-crystal and solid dispersion technology, screen a suitable carrier material to prepare ursolic acid (UA) co-crystal solid dispersion in order to improve the solubility and dissolution of UA. **Methods** UA and UA piperazine co-crystal (UA-PP) solid dispersions were prepared with solvent method by using four carriers, respectively. The solubility and *in vitro* dissolution of free drug, co-crystal, and solid dispersions were determined. **Results** The solubility of UA and UA-PP solid dispersions was significantly higher than free drug and its physical mixtures. Solid dispersion technology could further increase the solubility of UA-PP and accelerate its *in vitro* dissolution rate. The result laid the foundation for the development of a novel oral formulation of ursolic acid. **Conclusion** The co-crystal and solid dispersion technology could improve the solubility and dissolution of UA. The UA-PP solid dispersions show the best improvement in the solubility and dissolution of UA.

Key words: ursolic acid; co-crystal; solid dispersion; solubility; dissolution; bioavailability

熊果酸 (ursolic acid, UA), 又名乌索酸、乌苏酸, 属 α -香树脂醇型五环三萜类化合物。在自然界分布很广, 广泛存在于白花蛇舌草、女贞子、乌梅、夏枯草等植物中。熊果酸具有抗肝炎、抗肿瘤、

抗炎、抗病毒、调血脂、抗动脉粥样硬化及增强免疫等广泛的药理效应, 且毒性低、副作用少^[1], 临床前研究表明熊果酸口服制剂 (泰脂安胶囊) 对高脂模型动物及正常动物的降脂作用与非诺贝特及辛

收稿日期: 2013-04-27

基金项目: 上海市科委中药现代化专项 (10DZ1972600)

作者简介: 祁雯 (1982—), 女, 药师, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: 13818669046 E-mail: vivian_qv@hotmail.com

*通信作者 姜嫣嫣 Tel: (021)51980077 E-mail: yanyanjiang@shmu.edu.cn

伐他汀相当,且无上述 2 种化学药物的肝、肾功能损害的副作用^[2]。因此具有广泛的开发前景。

但是熊果酸在化学结构上属于三萜类皂苷,存在着诸如水溶性差、有明显吸收外排、生物利用度低(熊果酸口服制剂生物利用度在 1% 以下^[3])等问题^[4]。研究表明,熊果酸溶出速度慢,以 0.5% 十二烷基硫酸钠水溶液作为溶出介质,2 h 累积溶出率小于 47%^[5];因生物利用度低,给药剂量较大(100 mg 左右),导致口服熊果酸及其制剂进入胃肠道刺激黏膜引起胃纳减少、恶心、呕吐等症状,患者依从性较差;将其开发成注射剂则依从性也较差。因此,开发一种能改善水溶性和提高生物利用度的熊果酸制剂尤为必要。目前提高药物生物利用度的方法主要是通过制剂手段来解决。在中国专利检索中,有将熊果酸制成豆磷脂纳米粒冻干粉针剂、氰基丙烯酸酯纳米粒冻干粉针剂、熊果酸聚乳酸纳米粒冻干粉针剂、脂微球制剂、磷脂复合物、滴丸、脂肪乳注射剂等。然而,采用上述方法往往工艺复杂、成本较高。相比之下,将难溶性药物制成固体分散体是一种提高生物利用度较为简便有效的手段^[5-7]。本课题前期选用了泊洛沙姆 188 (F68)、聚维酮 S630 (PVP-S630)、硬脂酸聚羟氧(40) (S40) 和羟丙甲纤维素 (HPMC) 4 种载体材料分别制备了不同比例的熊果酸固体分散体。结果表明 4 种载体材料均能不同程度地提高药物的溶解度和溶出度^[8]。

药物的固体形态种类主要有多晶型、盐、水合物或溶剂化物以及共晶 (co-crystal)。虽然共晶在 100 多年前就已发现,但直到 30 多年前才有较多报道^[9], Cambridge Structural Database (CSD) 收录的共晶仅 1 950 多种,远远低于其他固体形态的数量^[10]。所谓共晶是指通过非共价键作用力将药物和不同的客体分子(酸、碱或中性分子)按照控制的一定比例结合生成均一相的晶体单元,药物与客体分子以氢键、偶极-偶极、 π - π 相互作用等分子间作用力相结合。将药物制成共晶可以提高或改变药物的溶解度或溶出度,提高生物利用度;同时,共晶也可以提高化合物的物理化学稳定性、改变熔点、降低吸湿性、改善研磨性能、使便于制备纯化、实现缓控释、改善味觉和配伍性、改善药物的晶型、晶癖、流动性、可压性等^[11]。本项目筛选了熊果酸与多种客体分子(吡啶、烟酰胺、乙二胺、哌嗪等)的共晶,发现熊果酸-哌嗪共晶(UA-PP, 物质的量比为 1:1)制备简单易行,呈针状或棒状结晶,回收率

高,吸湿性小,毒性小。与熊果酸相比,该共晶在人工模拟肠液中的溶解度提高了近 3 倍,改善了生物利用度和治疗效果,是一种值得开发的共晶。

为了进一步提高制剂中熊果酸的溶解度和溶出度,增加其口服给药的吸收程度,本课题在前期实验筛选的熊果酸固体分散体的基础上,进一步采用 4 种载体材料制备 UA-PP 的固体分散体,并与熊果酸固体分散体比较,以探讨共晶与固体分散体技术结合更大程度提高药物溶解度和溶出度的潜力。

1 仪器与材料

德国 Fritsch pulverisette 6 单罐行星式高能球磨机;高效液相色谱系统 (SPD-10A、LC-10AT 检测器、HT-230A 柱温箱,日本岛津公司);DZF-6050 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);CQ50 超声波清洗器(上海超声波仪器厂);ZNCL-G 智能恒温磁力搅拌器(上海美强仪器设备有限公司);HZ-9611K 微电脑恒温振荡器(太仓市华利达实验设备有限公司);H1650 台式高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);瑞士 BUCHI R-200 旋转蒸发仪;SHZ-D (III) 循环水式真空泵(上海豫华仪器有限公司);D/max-rB 12 kW 旋转阳极靶 X 射线多晶衍射仪(日本理学电机);ZRS-8 智能溶出试验仪(天津大学无线电厂)。

熊果酸(批号 ZL20100613XGS,质量分数 98%,苏州宝泽堂医药科技有限公司);UA-PP(物质的量比为 1:1,上海睿智化学研究有限公司提供);F68 (BASF 公司);PVP-S630 (ISP technologies, INC);S40 (南京威尔化工有限公司);HPMC (上海卡乐康包衣有限公司);牛黄胆碱酸钠(阿拉丁试剂);卵磷脂 (DEGUSSA)。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 HPLC 分析与方法学评价

2.1.1 分析方法 熊果酸和熊果酸固体分散体的 HPLC 定量测定和溶出度测定方法已在前期研究报告^[8]。色谱条件:色谱柱为 Thermo ODS-2 柱(150 mm×4.6 mm, 3.5 μ m);Phenomenex 预柱 C₁₈ (4.0 mm×3.0 mm, 3.5 μ m);流动相为乙腈-水(90:10,含 0.1%三氟乙酸);体积流量 1.0 mL/min;柱温 30 $^{\circ}$ C;检测波长 210 nm;进样量 20 μ L;保留时间 4.8 min。

熊果酸、UA-PP 和空白载体(4 种载体等比例混合物)的 HPLC 色谱图见图 1,结果表明空白载

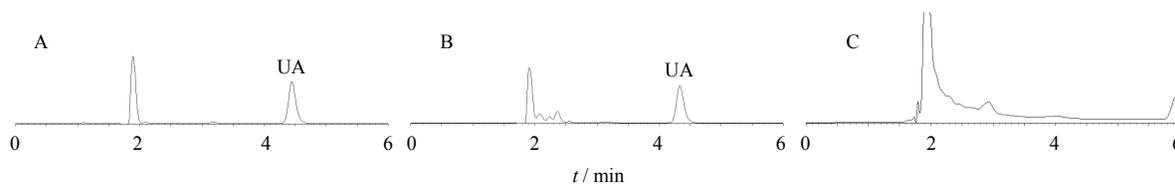


图1 UA(A)、UA-PP(B)及空白载体(C)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of UA (A), UA-PP (B), and blank carriers (C)

体对药物测定无干扰。

2.1.2 建立 UA-PP 定量测定和溶出度测定方法
精密称取干燥至恒定质量的 UA-PP 100 mg, 置 100 mL 量瓶以甲醇定容, 摇匀制得 1 mg/mL 的储备液, 精密吸取储备液用甲醇或溶出介质稀释, 配制一系列标准溶液, 进样 20 μ L 进行 HPLC 测定, 色谱条件同“2.1.1”项。以峰面积积分值 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 得 UA-PP 定量测定标准曲线方程为 $Y=8\ 468.0 X-2\ 598.4$, $r=1.000\ 0$, 线性范围 2.5~80 μ g/mL; 溶出度测定时的标准曲线方程为 $Y=8\ 110.1 X-1\ 465.4$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.25~8.0 μ g/mL。UA-PP 在 4 种载体中, 低、中、高 3 个质量浓度的回收率均在 99.13%~101.39%, $RSD < 1\%$; 日内、日间精密度 RSD 均 $< 2\%$ 。

2.2 固体分散体的制备

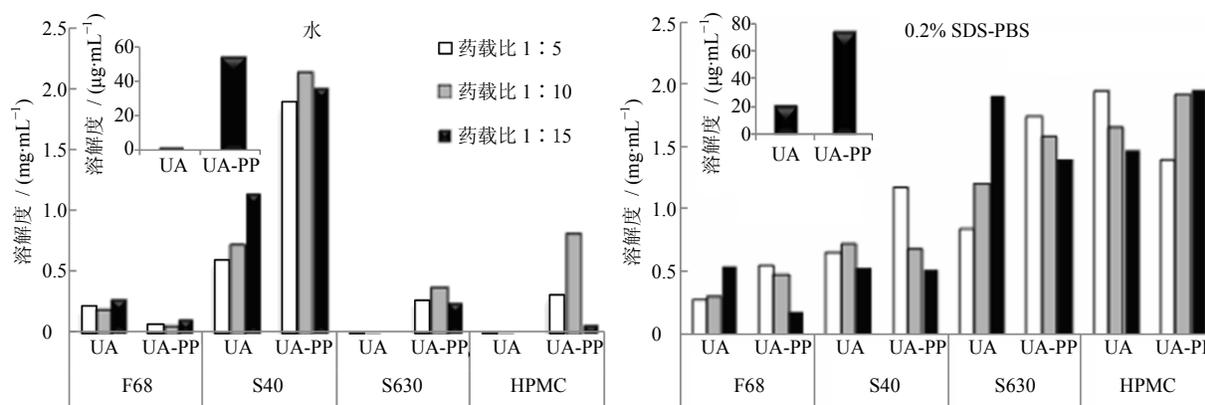
采用溶剂法制备固体分散体^[8]。分别称取熊果酸或 UA-PP 与不同比例的载体材料 (F68、S40、S630) 溶解于无水乙醇中, 80 $^{\circ}$ C 水浴中加热并磁力搅拌除去溶剂, 于真空干燥器中干燥过夜, 经球磨机粉碎后过 80 目筛, 即得。以 HPMC 为载体材料时, 采用无水乙醇-二氯甲烷 (1:1) 为溶剂制备固体分散体。另按比例称取熊果酸或 UA-PP 与已粉

碎过 80 目筛的载体材料混合, 得物理混合物, 以便进行对照实验。

2.3 熊果酸、UA-PP 以及各种固体分散体的溶解度测定

取过量熊果酸、UA-PP 及其固体分散体, 分别置 50 mL 具塞锥形瓶中, 加 20 mL 蒸馏水或含 0.2% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (0.2% SDS-PBS), 于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中振荡 24 h (振荡频率 110 r/min), 测定各样品的溶解量, 以比较溶解度的相对大小。溶解度测定结果的比较见图 2, 熊果酸固体分散体溶解度数据来自本课题组最近的报道^[8]。由图 2 插图中可知, 熊果酸被制成 UA-PP 后, 在水中的溶解度由 1.7 μ g/mL 提高到 55.3 μ g/mL; 在 0.2% SDS-PBS 中溶解度由 23.3 μ g/mL 提高到 75.6 μ g/mL, 表明难溶性药物熊果酸可通过共晶制备技术提高其溶解度。

将熊果酸、UA-PP 分别与不同比例的 F68、S40、S630 和 HPMC 制成的固体分散体可进一步大幅度提高药物的溶解度。在水中, 除 F68 外, 不同比例的 UA-PP 固体分散体的溶解度均显著大于熊果酸固体分散体的溶解度; 含有 SDS 表面活性剂的溶剂提高了药物的溶解度, 除 HPMC 外, UA-PP 与 3



插图为 UA 和 UA-PP 分别在水和 0.2% SDS-PBS 中的溶解度

illustrations show solubilities of UA and UA-PP in water and 0.2% SDS-PBS

图2 UA 和 UA-PP 与 4 种载体制得的固体分散体在 2 种溶剂中的溶解度比较

Fig. 2 Solubilities of solid dispersions prepared by UA and UA-PP with four carriers in two solvents

载体以 1 : 5 比例制得的固体分散体在 0.2% SDS-PBS 中溶解度显著高于原药固体分散体溶解度。

总体来看, UA-PP-S40 固体分散体在水中的溶解度最高。此外, 本实验还发现溶解度并不总是随着载体比例的提高而增加, 各药物-载体以 1 : 5 比例制备的固体分散体的溶解度并不显著低于更高比例固体分散体的溶解度。

2.4 X 射线衍射法 (XRD) 分析

分别取 UA-PP、UA-PP 与载体 (1 : 5) 物理混

合物和 UA-PP 固体分散体约 10 mg, 铺平于 XRD 样品盘上, 置于仪器检测台上进行检测分析。测试条件: 滤波 Ni, Cu K α , 高压强度 40 kV, 管流 40 mA, 以 2θ 角 $4^\circ/\text{min}$ 扫描 $2.5^\circ\sim 40^\circ$, 闪烁探测器。分析软件: MDI Jade 软件。XRD 测定结果见图 3。其中 UA-PP 的结晶衍射峰明显, 4 种物理混合物亦出现微弱的 UA-PP 结晶衍射峰, 固体分散体中 UA-PP 的特征结晶峰消失或不显著, 峰形和载体一致, 提示药物可能以无定形态或分子状态分散在载体中。

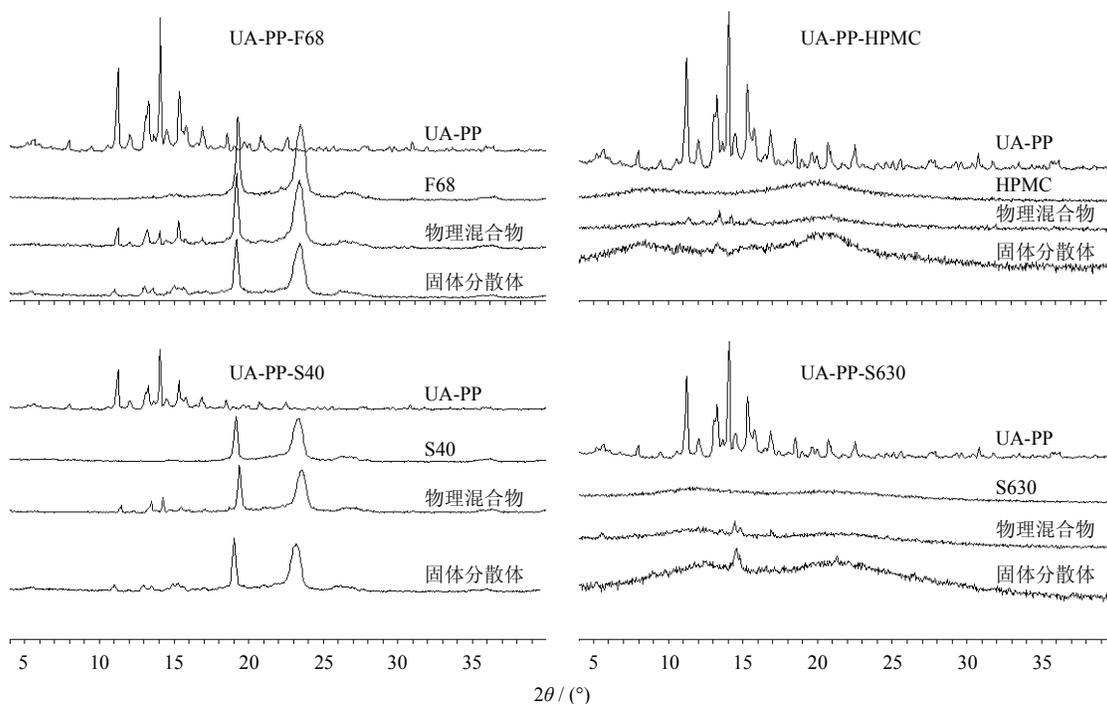


图 3 X 射线衍射图谱

Fig. 3 X-ray diffraction patterns

2.5 体外溶出度测定

2.5.1 溶出介质 分别采用 3 种溶出介质进行溶出度测定。溶出介质 A 为含 0.2% SDS PBS 缓冲液 (pH 6.8); 溶出介质 B 和 C 分别为按照《美国药典》(USP33-NF28) 配制空腹和饱腹肠液。

空腹肠液 (溶出介质 B): 模拟饥饿状态小肠液 (Fasted state simulated intestinal fluid, SIF-Fa)。溶液 A: 称取氢氧化钠 1.74 g、二水磷酸二氢钠 17.49 g 和氯化钠 30.93 g 溶于 5 L 水, 摇匀。用 1 mol/L 氢氧化钠或 1 mol/L 盐酸调节 pH 6.5。溶液 B: 将 3.3 g 牛黄胆碱酸钠加入到 500 mL 溶液 A 中, 摇匀。溶液 C: 用二氯甲烷溶解卵磷脂, 使其质量浓度为 100 mg/mL, 量取 11.8 mL 到溶液 B 中, 摇匀。用旋转蒸发仪在 40°C , 25 kPa 条件下除去溶液中的

二氯甲烷, 冷却至室温后加溶液 A 至 2 L。

饱腹肠液 (溶出介质 C): 模拟饱食状态小肠液 (Fed state simulated intestinal fluid, SIF-Fe)。溶液 A: 称取氢氧化钠 4.04 g、冰醋酸 8.65 g 和氯化钠 11.874 g 溶于 1 L 水, 摇匀。用 1 mol/L 氢氧化钠或 1 mol/L 盐酸调节到 pH 5.0。溶液 B: 将 6.6 g 牛黄胆碱酸钠加入到 200 mL 溶液 A 中, 摇匀。溶液 C: 用二氯甲烷溶解卵磷脂, 使其质量浓度为 100 mg/mL, 量取 23.632 mL 到溶液 B 中, 摇匀。用旋转蒸发仪在 40°C , 25 kPa 条件下除去溶液中的二氯甲烷, 冷却至室温后加溶液 A 至 800 mL。

2.5.2 溶出度测定 按照《中国药典》2010 年版二部中溶出度浆法测定法, 分别精密称取熊果酸、UA-PP、熊果酸固体分散体和 UA-PP 固体分散体 (相

当于原药 25 mg) 测定溶出度。温度为 (37±0.5) °C, 转速为 100 r/min, 于不同时间点取样 3 mL, 经 0.8 μm 滤膜滤过, 滤液用甲醇稀释 5 倍, HPLC 法定量测定。同时补充同温介质 3 mL。

由于熊果酸或其共晶的固体分散体在水中的溶解度不能满足溶出试验的漏槽条件, 根据熊果酸及 UA-PP 固体分散体在含 0.2% SDS 的 PBS 中的溶解度测定结果, 各固体分散体在 900 mL 此介质中均

能达到漏槽条件, 故本研究选用 0.2% SDS PBS 作为溶出介质。为了更好地模拟药物在人体内的溶出环境, 本实验另按照《美国药典》(USP33-NF28) 配制了空腹和饱腹肠液, 以此作为溶出介质作进一步比较。

熊果酸、UA-PP 及其相应的 4 种固体分散体的溶出曲线见图 4。以 F68 为载体制备的固体分散体在不同介质中的体外溶出曲线见图 5。

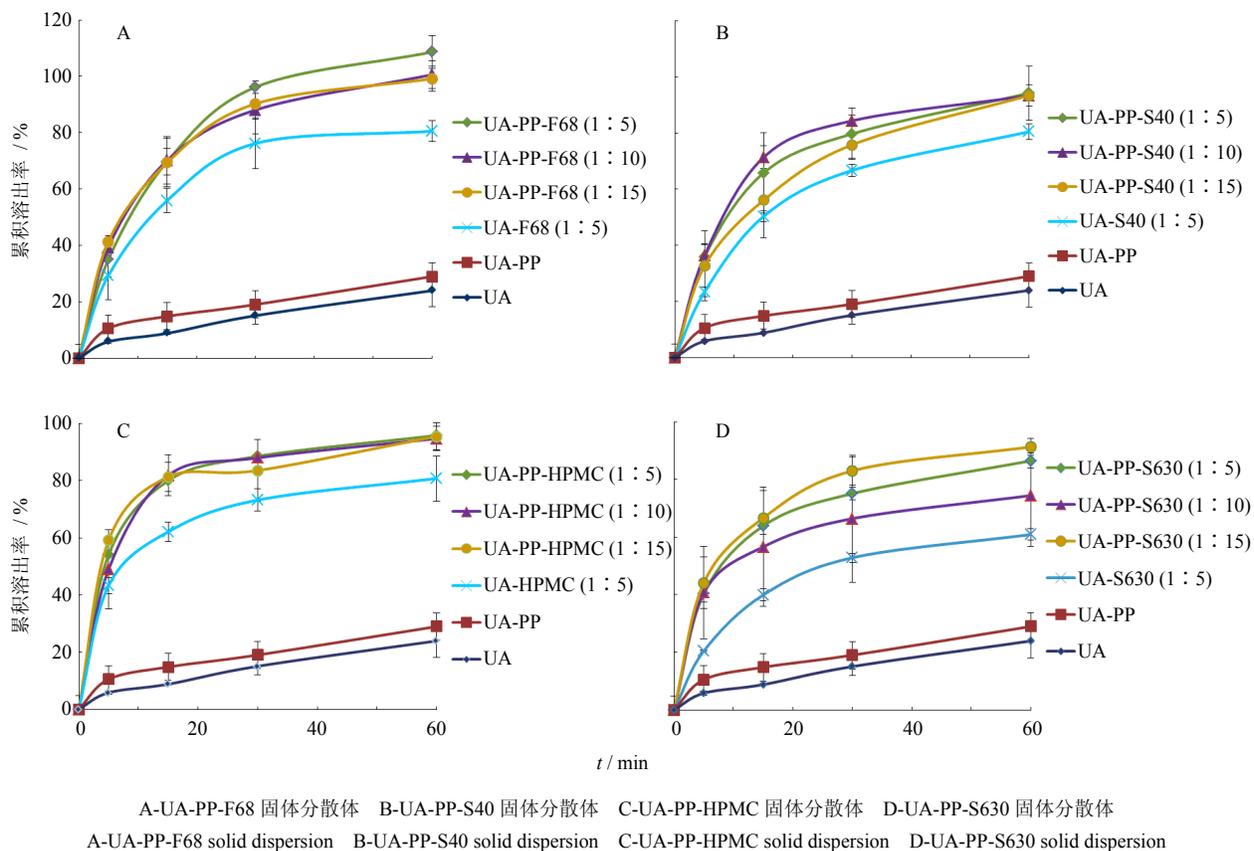


图 4 体外溶出曲线

Fig. 4 *In vitro* dissolution curves

熊果酸和 UA-PP 的 60 min 累积溶出率分别为 23.95%和 28.97%, UA-PP 制成固体分散体后, 体外溶出度大大提高, 载体对提高药物溶出度的顺序为 F68>HPMC>S40>S630; 各载体比例对溶出度的影响存在差异, F68、S40、HPMC 和 S630 于 30 min 最高溶出度比例分别是 1:5、1:10、1:10 和 1:15, 而 4 种载体以 5 倍比例制成的固体分散体溶出度与更高比例固体分散体溶出度相比没有很大差异。同时考虑到 F68 具有一定的抑制 P 糖蛋白 (P-gp) 外排作用^[12-13], 故选择载体 F68, 药物与载体的比例为 1:5 制备的固体分散体进行不同介质中溶出度的比较实验。

从图 5 可见, 在 0.2% SDS PBS 中 UA-PP 能加快熊果酸原药的溶出, UA-PP 固体分散体的溶出显著优于熊果酸固体分散体。原药及原药的共晶在空腹肠液中的溶出非常差, 60 min 溶出量不到 2%。原药制成固体分散体后能显著增加其在空腹肠液中的溶出, 但仍不到 20%, 而共晶制成固体分散体后其溶出达到 87.9%, 显著高于熊果酸固体分散体。相似的趋势也在饱腹肠液的溶出试验显示, 共晶固体分散体的 60 min 溶出度达到 75.8%, 而原药固体分散体仅仅溶出 25.1%。

总之, 药物的溶出趋势在 0.2% SDS PBS、空腹肠液和饱腹肠液中基本相同, 为 UA-PP-F68>UA-

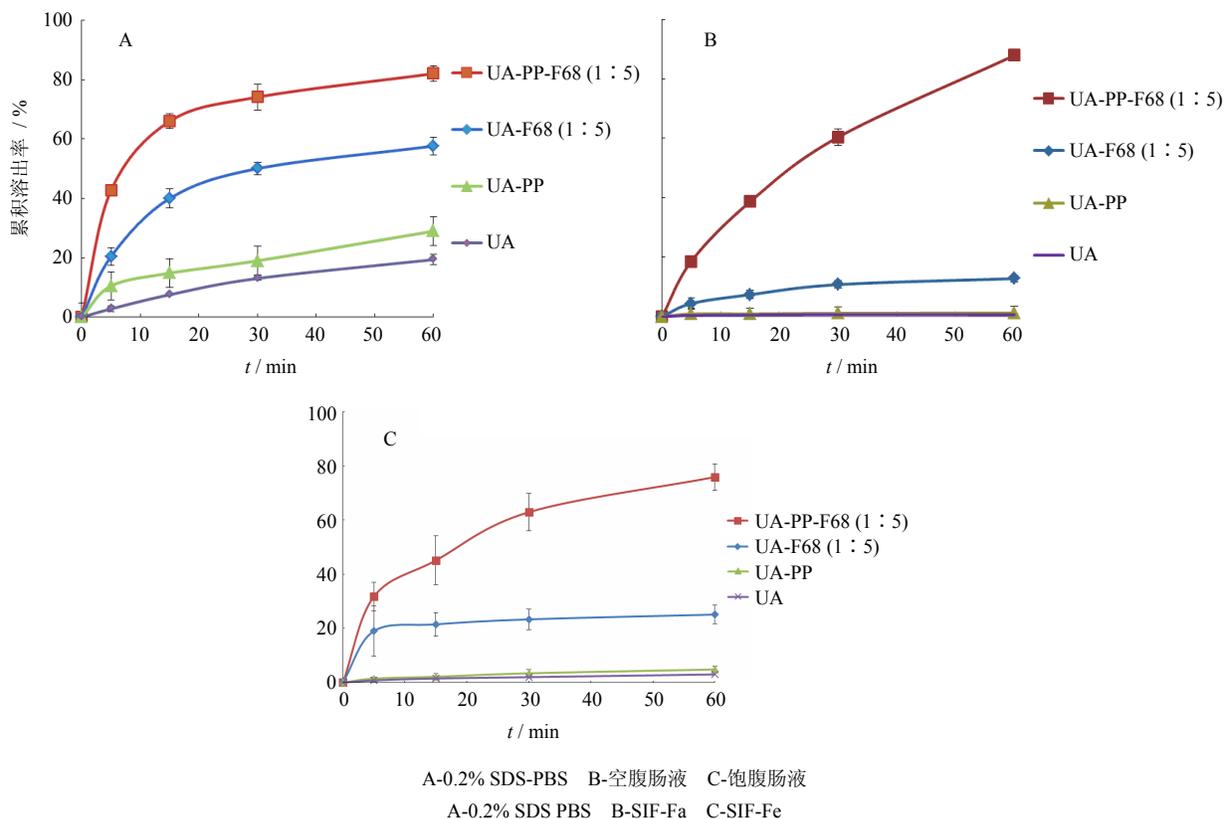


图 5 F68 制备的固体分散体在不同介质中的体外溶出曲线

Fig. 5 *In vitro* dissolution curves of F68 solid dispersion in different media

F68>UA-PP>UA。这为以后体外预测体内药物的溶出与释放提供依据。

3 讨论

为了更好地提高制剂中熊果酸的溶解度和溶出度，增加其口服吸收的程度，利用前期实验制备的 UA-PP，采用与固体分散体相结合的技术，制备 UA-PP 固体分散体，并与原药及原药固体分散体进行比较，发现本实验所用 4 种载体制备的固体分散体，均能大大增加熊果酸的溶解度和体外溶出度，其中以熊果酸共晶固体分散体为最佳。

从增加溶解度与体外溶出度的效果看，HPMC 或 S40 作为载体制成固体分散体，对增加熊果酸的溶解度和体外溶出度的总体效果优于 F68 和 S630。但是从制备难易的角度上，由于 HPMC 不溶于乙醇，必须用乙醇-二氯甲烷 (1:1) 的混合溶剂溶解，制备工艺复杂，且成品质地较硬，不易粉碎，收率低，不利于工业化生产。同时由于熊果酸不仅水溶性差且有明显的吸收外排作用，而 F68 除了能增加其溶解度和溶出度（其增加熊果酸溶出的程度亦优于 HPMC、S40 与 S630），还具有一定抑制 P-gp 外排的作用^[12-13]，可能更有利于提高其口服生物利用度。

综上所述，熊果酸原药的溶出效果非常差，将共晶制成固体分散体后，其溶解度与溶出度显著优于原药固体分散体，显示出共晶与固体分散体技术相结合的优越性。鉴于 F68 具有一定抑制 P-gp 外排的作用，本课题选用 F68 为载体，药物与载体比例为 1:5 所制备的固体分散体进行后续的体内实验研究。

参考文献

- [1] 陈武, 熊筱娟, 李开泉. 乌索酸的化学、药理及临床研究 [J]. 宜春医学, 2001, 13(2): 123-126.
- [2] 孙梅, 单建贞, 张国平, 等. 泰脂安胶囊治疗高脂血症脂肪肝的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(7): 616-619.
- [3] 程晓华. 熊果酸体外吸收及代谢机制的研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2007.
- [4] Liao Q F, Yang W, Jia Y, et al. LC-MS Determination and pharmacokinetic studies of ursolic acid in rat plasma after administration of the traditional Chinese medicinal preparation Lu-Ying extract [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2005, 125(6): 509-515.
- [5] 赖玲, 杨光, 杨昕. 熊果酸固体分散体的制备与体外溶出度测定 [J]. 医药导报, 2005, 21(6): 517-518.

- [6] 陈超, 周福军, 刘时乔, 等. 固体分散技术在中药制剂中的应用 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(4): 279-282.
- [7] 陈周全, 魏伟峰. PEG6000 为载体的熊果酸固体分散体水分测定的研究 [J]. 海峡药学, 2009, 21(10): 15-18.
- [8] 祁雯, 陈明, 姜妈妈, 等. 四种熊果酸固体分散体的体外特性研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(2): 108-111.
- [9] Tiekink E, Vittal J J. *Frontiers in Crystal Engineering* [M]. Chichester: Wiley, 2005.
- [10] Shan N, Zaworotko M. Co-crystals of duloxetine and cox-inhibitors for the treatment of pain [J]. *Drug Discov Today*, 2008, 13(9/10): 440-446.
- [11] 高缘, 祖卉, 张建军. 药物共晶研究进展 [J]. 化学进展, 2010, 22(5): 829-835.
- [12] Zhu S, Huang R, Hong M, *et al.* Effects of polyoxyethylene(40)stearate on the activity of P-glycoprotein and cytochrome P450 [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 37(5): 573-580.
- [13] Li M, Si L, Pan H, *et al.* Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: Assessed *in vitro* by everted gut sac and *in situ* by improved intestinal perfusion [J]. *Int J Pharm*, 2011, 403(1/2): 37-45.