

灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物的制备及其体外释放度评价

严红梅^{1,2}, 汪晶¹, 贾晓斌^{1,2*}, 张振海^{1*}, 孙娥¹

1. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 制备灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物, 以期达到增加药物溶出度的目的。方法 采用溶剂法制备灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物, 运用差示扫描量热法 (DSC)、扫描电镜法 (SEM)、X 射线粉末衍射法 (XRD) 和红外光谱 (IR) 等分析方法对其微观结构进行表征和分析, 并对其体外溶出行为进行考察, 研究灯盏乙素和胡椒碱的共无定型复合物的形成情况。结果 DSC 和 XRD 结果显示灯盏乙素与胡椒碱均以无定型形式存在, IR 谱图提示二者之间有分子间作用。体外溶出结果表明, 相较于灯盏乙素和胡椒碱, 复合物中二者在水中的累积溶出率均得到较大提高。结论 所制备的灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物能显著改善灯盏乙素和胡椒碱的溶出度, 所形成的药物-药物共无定型药物系统, 为提高难溶性药物的溶出速率和溶解度提供了一定的参考。

关键词: 灯盏乙素; 胡椒碱; 共无定型复合物; 表征; 溶出度; 溶剂法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)14-2082-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.14.011

Preparation of scutellarin-piperine co-amorphous complex and its *in vitro* release

YAN Hong-mei^{1,2}, WANG Jing¹, JIA Xiao-bin^{1,2}, ZHANG Zhen-hai¹, SUN E¹

1. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Jiangsu Province, Nanjing 210028, China

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective To prepare scutellarin-piperine co-amorphous complex, in order to improve their dissolution and solubility. **Methods** Scutellarin-piperine co-amorphous complex was prepared using solvent evaporation method. The microscopic structure and physicochemical properties of co-amorphous complex were analyzed using differential scanning calorimetry (DSC), scanning electron microscopy (SEM), X-ray powder diffraction (XRD), and infrared vibrational spectra (IR). And its *in vitro* release also was investigated. The formation of the co-amorphous complex in scutellarin and piperine was studied. **Results** DSC and XRD analysis suggested that scutellarin and piperine may be present as amorphous substance. IR results indicated molecular interactions between scutellarin and piperine. The *in vitro* release determination results of scutellarin-piperine co-amorphous complex showed accumulated dissolution rate of scutellarin and piperine could both be improved. **Conclusion** The drug-drug co-amorphous system can provide certain reference for insoluble drugs to improve their dissolution and solubility.

Key words: scutellarin; piperine; co-amorphous; characterization; *in vitro* release; solvent evaporation method

灯盏乙素 (scutellarin) 是菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. -Mazz. (灯盏花) 中活血化瘀的主要活性成分, 有抗氧化和抑制血小板聚集的作用, 在心、脑组织分布, 有利于治疗和预防心脑血管疾病。但研究表明, 灯盏乙素的溶解

性较差, 且在肝药酶的作用下, 药物容易发生代谢转化, 首关效应明显, 导致灯盏乙素口服生物利用度较低^[1]。

在药剂学研究中, 对于难溶性药物, 可以通过特定的方法将其由晶态形式转变成无定型形式, 以

收稿日期: 2015-03-04

基金项目: 江苏省社会发展科技支撑计划 (BE2010756)

作者简介: 严红梅, 博士研究生, 研究方向为中药药剂剂型研究。Tel: (025)85608672 E-mail: yanhongmei0716@163.com

*通信作者 贾晓斌 Tel/Fax: (025)85637809 E-mail: ji Xiaobinpharmacy@163.com

张振海 Tel/Fax: (025)83271102 E-mail: davidpharm@yeah.net

达到增加药物溶出速率和表观溶解度的目的^[2]。将2种水难溶性的晶体药物通过一定的方法制成药物-药物共无定型系统,能提高药物的稳定性和溶出速率^[3]。本实验考虑将灯盏乙素与另一种活性成分胡椒碱(piperine)通过溶剂法制备成共无定型药物,灯盏乙素具有一定酸性,可能会与胡椒碱通过分子间电荷作用,形成共无定型药物。一方面,药物以无定型形式存在,能改善其溶出度;另一方面,胡椒碱具有抑制细胞色素P450酶活性的作用,是已知的肝、肠内葡萄糖醛酸转移酶抑制剂,能有效抑制灯盏乙素的肝肠代谢。而且,与现行市售的酶抑制剂相比,胡椒碱来源于食物,具有安全低毒的独特优势^[4-5]。因此,将灯盏乙素与胡椒碱制备成共无定型复合物,可安全可靠地改善灯盏乙素的溶出度,抑制代谢,进而提高其生物利用度。

1 仪器与材料

DSC204 差示扫描量热仪,德国 Netzsch 公司; 6390LV 扫描电镜,日本电子公司; D8 型 X 射线衍射仪,德国 Bruker 公司; Agilent 1100 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司; ZRS-8G 型智能溶出试验仪,天津大学无线电厂。

灯盏乙素(批号 ZL20130811DZ,质量分数 $\geq 98\%$)、胡椒碱(批号 K130803,质量分数 $\geq 98\%$),西安开来生物工程有限公司;甲醇为色谱纯,水为高纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物的制备 按物质的量比 1:1 分别称取灯盏乙素和胡椒碱原料药,加一定量的 95%乙醇溶解并充分混匀,40 °C 减压蒸发除去溶剂,真空干燥,即得灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物,置干燥器内保存备用。

2.1.2 灯盏乙素与胡椒碱物理混合物的制备 按物质的量比 1:1 分别称取灯盏乙素和胡椒碱的于研钵中混合均匀,得灯盏乙素与胡椒碱物理混合物,保存备用。

2.2 体外溶出试验

2.2.1 色谱条件 灯盏乙素:色谱柱 Agilent HC-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(40:60); 检测波长 335 nm; 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μ L。理论塔板数以灯盏乙素峰计不低于 3 000^[6]。胡椒碱:色谱柱 Agilent HC-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相

为甲醇-水(75:25); 检测波长 328 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μ L。理论塔板数以胡椒碱峰计不低于 3 000^[7]。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取灯盏乙素对照品 6.63 mg,置于 10 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取对照品储备液 1.0 mL,置于 10 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,得灯盏乙素 66.30 μ g/mL 对照品贮备液。精密称取胡椒碱对照品 6.95 mg,置于 10 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取对照品贮备液 1.0 mL,置于 10 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,得胡椒碱 69.50 μ g/mL 对照品储备液。

2.2.3 线性关系考察 分别精密吸取灯盏乙素和胡椒碱对照品储备液 0.10、0.25、0.50、1.00、2.50 mL 分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。按上述色谱条件取样,HPLC 测定其对应的峰面积积分值(Y),将质量浓度(X)与Y值进行线性回归,得标准曲线回归方程分别为灯盏乙素: $Y=23.008 X+4.858 8$, $r=0.999 9$,线性范围 0.663~66.30 μ g/mL; 胡椒碱: $Y=38.309 X+3.685 8$, $r=0.999 8$,线性范围 0.695~69.50 μ g/mL。

2.2.4 药物的溶出度测定 精密称取灯盏乙素原料药、胡椒碱原料药、物理混合物和灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物,采用《中国药典》2010年版二部附录XC溶出度测定法中第二法,即桨法测定。转速 50 r/min,温度(37.0 \pm 0.5) °C,释放介质选择经脱气处理的蒸馏水,并分别于 5、10、20、30、45、60、120 min 取样 2 mL(同时补加同温度等量溶出介质),以 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液 20 μ L 进行 HPLC 测定,测定结果代入标准曲线计算质量浓度,并换算成累积溶出率,结果见图 1。

图 1-A 为灯盏乙素原料药、物理混合物以及灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物中灯盏乙素的体外溶出曲线,结果表明,将灯盏乙素与胡椒碱制备成共无定型复合物后,可明显提高其溶出速率和程度。图 1-B 反映的是胡椒碱的体外溶出情况,结果表明胡椒碱在共无定型复合物中的溶出较原料药也有明显改善。

2.3 固体分散体物相表征

2.3.1 电子扫描显微镜(SEM)观察 测试条件为真空镀金 70 s,用 SEM 观察灯盏乙素、胡椒碱、二者的物理混合物和灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物的表面和晶体结构,结果见图 2。扫描电镜下可

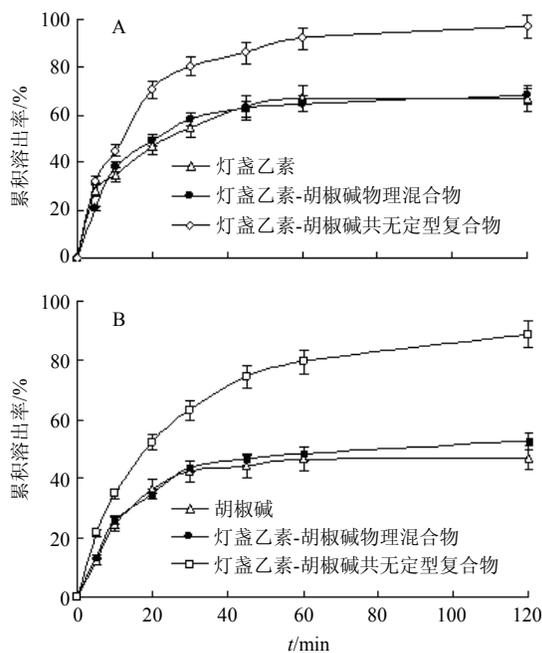


图 1 灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物和物理混合物中灯盏乙素 (A)、胡椒碱 (B) 在水中的溶出曲线 (n = 6)

Fig. 1 Dissolution curves of scutellarin (A) and piperine (B) in co-amorphous complex and physical mixture in water (n = 6)

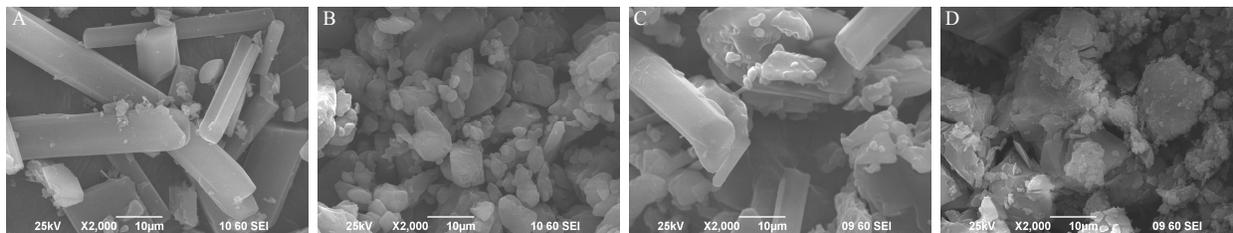


图 2 灯盏乙素 (A)、胡椒碱 (B)、灯盏乙素-胡椒碱物理混合物 (C) 和灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物 (D) 的 SEM 图

Fig. 2 SEM images of scutellarin (A), piperine (B), physical mixture (C), and scutellarin-piperine co-amorphous complex (D)

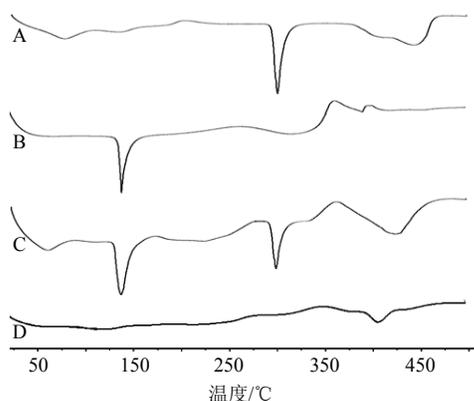


图 3 灯盏乙素 (A)、胡椒碱 (B)、物理混合物 (C) 和灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物 (D) 的 DSC 图

Fig. 3 DSC curves of scutellarin (A), piperine (B), physical mixture (C), and scutellarin-piperine co-amorphous complex (D)

见灯盏乙素原料药 (图 2-A) 具有明显的晶形特征, 呈长针状结晶, 胡椒碱原料药 (图 2-B) 多呈椭球型, 偶见不规则块状物, 表面光滑, 物理混合物 (图 2-C) 中可见灯盏乙素和胡椒碱的特征, 而灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物 (图 2-D) 呈不规则颗粒状, 已不见 2 种原料药的特征。

2.3.2 差示扫描量热法 (DSC) 分析 测试条件为铝坩埚; 气氛为氮气; 升温速率 10.00 °C/min; 升温范围为 25~400 °C。分别对灯盏乙素、胡椒碱、二者的物理混合物和灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物进行 DSC 分析, 结果见图 3。DSC 结果显示灯盏乙素原料药 (图 3-A) 在 301.49 °C 处有一尖锐的吸热峰, 该峰为其特征峰, 胡椒碱原料药 (图 3-B) 在 138.10 °C 处有一特征吸热峰, 二者的物理混合物 (图 3-C) 中灯盏乙素和胡椒碱的特征峰均可见, 灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物 (图 3-D) 中未见二者的特征吸热峰, 提示灯盏乙素和胡椒碱可能以共无定型形式存在。

2.3.3 X 射线粉末衍射法 (XRD) 分析 测试条件为 Cu 靶 (40 kV, 40 mV); 步进扫描 0.01°/步; 扫

描范围 5°~70°; 扫描速率 4°/min, 结果见图 4。XRD 图谱结果显示, 灯盏乙素 (图 4-A) 在 5°~30° 有多个强的结晶特征衍射峰; 胡椒碱 (图 4-B) 在 12°~30° 也有多个明显的结晶衍射峰; 物理混合物 (图 4-C) 的谱线中灯盏乙素和胡椒碱的结晶衍射峰强度减弱, 原因可能是二者在被研磨的过程中发生了部分晶形的变化, 但主要的特征衍射峰仍然存在, 说明简单的物理混合并未改变药物的结晶形式; 而在灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物 (图 4-D) 的谱线中, 二者的多个明显的结晶特征峰几乎消失, 说明灯盏乙素和胡椒碱可能以非晶型形态共存。

2.3.4 傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 分析 采用 KBr 压片法测定 FTIR, 将样品与 KBr 在干燥环境下混合制片后, 分辨率为 4 cm⁻¹, 4 000~500 cm⁻¹ 全谱扫描, 结果见图 5。由 FTIR 的结果可见, 灯盏

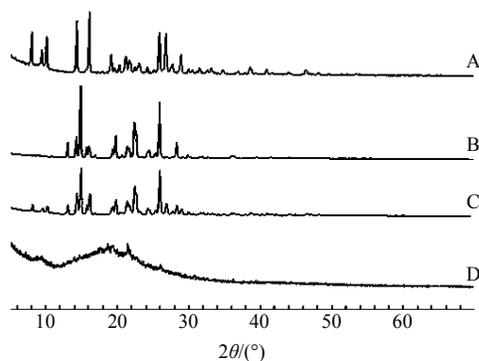


图 4 灯盏乙素 (A)、胡椒碱 (B)、物理混合物 (C) 和灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物 (D) 的 XRD 图

Fig. 4 XRD of scutellarin (A), piperine (B), physical mixture (C), and scutellarin-piperine co-amorphous complex (D)

乙素和胡椒碱的物理混合物(图 5-C)的 FTIR 图中可见二者的一些主要峰位,部分峰位发生强度的变化可能是因为重叠作用或者共研磨导致。灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物仍可见一小部分 2 种原料药的峰位,但主要峰位均发生了部分变化,灯盏乙素在 $3\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 左右的羟基伸缩振动峰及 $1\ 750\ \text{cm}^{-1}$ 左右的羰基特征吸收峰消失,胡椒碱在 $1\ 710\ \text{cm}^{-1}$ 左右羰基特征吸收峰减弱,从灯盏乙素和胡椒碱的分子结构上看,二者有形成氢键的基础,所以灯盏乙素与胡椒碱之间可能存在非共价键缔合。

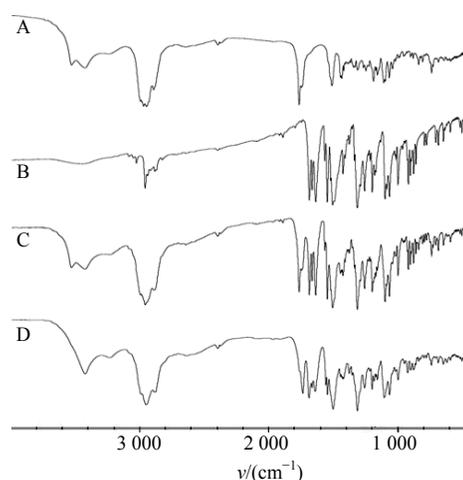


图 5 灯盏乙素 (A)、胡椒碱 (B)、物理混合物 (C) 和灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物 (D) 的 FTIR 图

Fig. 5 FTIR patterns of scutellarin (A), piperine (B), physical mixture (C), and scutellarin-piperine co-amorphous complex (D)

2.4 稳定性考察

在加速试验(40 °C、相对湿度 75%)条件下,将适量灯盏乙素、胡椒碱、物理混合物(1:1)和共无定型复合物(1:1)密封放置 6 个月后测定灯盏乙素和胡椒碱的量,结果见表 1。稳定性考察的结果表明,在加速试验条件下,共无定型复合物中灯盏乙素和胡椒碱的损失率很小,稳定性好。

表 1 6 个月后无定型复合物中灯盏乙素和胡椒碱的量 (n = 6)

Table 1 Content of scutellarin and piperine in co-amorphous complex after 6 months (n = 6)

样品	灯盏乙素/%		胡椒碱/%	
	0 个月	6 个月	0 个月	6 个月
灯盏乙素	98.34 ± 0.56	98.02 ± 0.63	—	—
胡椒碱	—	—	98.61 ± 0.72	98.26 ± 0.65
灯盏乙素-胡椒碱物理混合物	37.46 ± 0.35	37.41 ± 0.32	60.95 ± 0.58	60.71 ± 0.61
灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物	37.51 ± 0.37	37.44 ± 0.41	60.89 ± 0.54	60.80 ± 0.49

3 讨论

将药物以无定型形态高度分散于各种性质的载体材料中形成药物-聚合物无定型系统是常用的提高难溶性药物溶出度的方法,但这一系统中聚合物的加入量会随药物量的增加而增加,最终导致给药剂量较大,且药物-载体不相容,粉碎困难,流动性和可压性都较差,不利于制剂成型^[8-9]。药物-药物共无定型系统由 2 个活性药物组成,通过共研磨、球磨或淬火冷却的方法制备,2 种药物之间还可能通过分子间作用,实现对无定型状态的稳定化。常

用的制备方法淬火冷却法在加热过程中可能会破坏药物本身的结构,球磨法与低温研磨法能保持药物性质的相对稳定,但操作时间较长,因此可以考虑采用溶剂法,操作简单,时间短,在快速减压蒸干的过程中会使无定型更完全^[3]。

本研究采用溶剂法制备了灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物,通过对其微观结构进行物相表征,证实灯盏乙素与胡椒碱确实均以无定型形式存在,二者形成了共无定型药物,且体外溶出试验结果显示,当灯盏乙素与胡椒碱形成共无定型复合物后,

能显著改善 2 种药物的累积溶出率。因此, 药物-药物共无定型系统适用于难溶性药物, 用以改善其溶出速率和表观溶解度, 进一步提高其生物利用度。另外, 所制备的共无定型复合物中, 胡椒碱对灯盏乙素肝肠代谢的抑制作用以及制剂的稳定性还有待后续进一步研究。

参考文献

- [1] 朱丽伟, 刘晓谦, 冯 京, 等. 灯盏乙素及其衍生物灯盏乙素乙酯在大鼠体内的药代动力学的比较 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 3373-3377.
- [2] Lobmann K, Laitinen R, Grohganz H, *et al.* Coamorphous drug systems enhanced physical stability and dissolution rate of indomethacin and naproxen [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(5): 1919-1928.
- [3] 姚 静, 时念秋, 王杏林. 共无定型药物系统的研究进展 [J]. 药学学报, 2013, 48(5): 648-654.
- [4] 金 鑫. 原人参二醇-胡椒碱脂质立方液晶纳米粒的构建及其吸收特性的多元化评价 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [5] 曾晓会. 胡椒碱对姜黄素代谢和调脂效应的影响 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2009.
- [6] 王 馨, 鸭 乔, 杨熊明, 等. 2 个灯盏细辛新品种的选育 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1831-1835.
- [7] 郑 琴, 郝伟伟, 杨 明, 等. 镇痛灵方分煎与合煎液中有效成分的比较研究 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1957-1960.
- [8] Gao B, Sun C S, Zhi Z Z, *et al.* Preparation of two poor water soluble drugs-nanoporous ZnO solid dispersions and the mechanism of drug dissolution improvement [J]. *Acta Pharm Sin*, 2011, 46(11): 1399-1407.
- [9] Shrivastava A R, Ursekar B, Kapadia C J. Design, optimization, preparation and evaluation of dispersion granules of valsartan and formulation into tablets [J]. *Curr Drug Deliv*, 2009, 6(1): 28-37.