

## 薯蓣皂苷元无定形固体分散体制备及体内外评价

刘 沛, 常金花, 康 凯, 薛禾菲, 王雨欣, 徐 林, 刘翠哲\*, 周剑宇\*

承德医学院 河北省神经损伤与修复重点实验室, 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000

**摘 要:** **目的** 制备薯蓣皂苷元无定形固体分散体 (diosgenin amorphous solid dispersion, Dio-ASD), 提高 Dio 溶出度和生物利用度。**方法** 应用分子模拟技术分析 Dio 与载体之间相互作用并通过抑晶实验验证, 构建 Dio 与载体混溶性曲线相图, 理论预测二者混溶性; 以 Soluplus 为载体, 应用共沉淀法制备 Dio-ASD; 通过溶出度测定、差示扫描量热分析 (differential scanning calorimetry, DSC)、X-射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRPD)、扫描电镜分析 (scanning electron microscopy, SEM)、傅里叶红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 对 Dio-ASD 进行体外评价; 采用 UPLC-MS/MS 方法测定大鼠体内 Dio 血药浓度, 计算药动学参数, 对 Dio-ASD 进行体内评价。**结果** 分子模拟结果显示 Soluplus 与 Dio 之间能形成疏水键和氢键相互作用, 结合能强于其他载体, 且 Soluplus 对 Dio 的抑晶作用最强。构建了混溶性曲线相图, Dio 与 Soluplus 在 25 °C 下的混溶性为 68.57%。与原料药相比, Dio-ASD 溶出度明显提高。物相表征结果显示, Dio 以无定形态存在于 Dio-ASD 中, Dio 和 Soluplus 之间存在相互作用。药动学结果表明大鼠 ig 给药后, Dio-ASD 的生物利用度较 Dio 提高了近 5 倍。**结论** 制备的 Dio-ASD 可以显著提高药物溶出度和大鼠体内生物利用度。

**关键词:** 薯蓣皂苷元; 无定形固体分散体; 分子模拟; 混溶性相图; 药动学

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)14-4323-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.14.012

## Preparation and evaluation of diosgenin amorphous solid dispersion *in vitro* and *in vivo*

LIU Pei, CHANG Jin-hua, KANG Kai, XUE He-fei, WANG Yu-xin, XU Lin, LIU Cui-zhe, ZHOU Jian-yu

Hebei Province Key Laboratory of Nerve Injury and Repair, Hebei Province Key Laboratory of Research and Development for Chinese Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, China

**Abstract: Objective** To prepare diosgenin amorphous solid dispersion (Dio-ASD) and improve the dissolution and bioavailability of Dio. **Methods** The interaction between Dio and carrier was analyzed by molecular simulation technology and verified by crystal suppression experiment. The phase diagram of the miscibility curve between Dio and carrier was constructed, and the miscibility of Dio and carrier was predicted theoretically. Dio-ASD was prepared by coprecipitation with Soluplus as carrier and was evaluated *in vitro* by dissolution assay, differential scanning calorimetry (DSC), X-ray powder diffraction (XRPD), scanning electron microscopy (SEM), and fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The plasma concentration of Dio in rats was determined by UPLC-MS/MS method, and the pharmacokinetic parameters were calculated to evaluate Dio-ASD *in vivo*. **Results** Molecular simulation results showed that hydrophobic and hydrogen interactions between Soluplus and Dio were formed, and the binding energy was stronger compared with other carriers. Soluplus had the strongest crystal suppression effect on Dio. The phase diagram of the miscibility curve was constructed and the miscibility between Dio and Soluplus at 25 °C was 68.57%. Compared with the bulk drug, the dissolution rate of Dio-ASD was significantly improved. The phase characterization results showed that Dio existed in

收稿日期: 2022-02-09

**基金项目:** 河北省高等学校科学技术研究项目 (QN2020241); 河北省高等学校科学技术研究项目 (QN2019167); 河北省高校重点学科建设项目 (冀教高 [2013] 4 号); 河北省科技厅“技术创新引导专项-科技工作会商”项目; 河北省神经损伤与修复重点实验室开放课题 (NJKF202102)

**作者简介:** 刘 沛 (1985—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为药物新剂型及药动学研究。Tel: (0314)2290629 E-mail: liupeipp123@163.com

**\*通信作者:** 刘翠哲 (1964—), 女, 博士, 博士生导师, 研究员, 研究方向为中药制剂现代化及中药药动学研究。

Tel: (0314)2517035 E-mail: liucuihexy@163.com

周剑宇 (1983—), 男, 博士, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为中药药效与物质基础研究。

Tel: (0314)2290076 E-mail: zhoujybucm@163.com

Dio-ASD in an amorphous state, and there was an interaction between Dio and Soluplus. The pharmacokinetics results showed that the bioavailability of Dio-ASD was nearly five times higher than that of Dio after intragastric administration to rats. **Conclusion** The prepared Dio-ASD can significantly improve drug dissolution and bioavailability in rats.

**Key words:** diosgenin; amorphous solid dispersion; molecular simulation; miscibility phase diagram; pharmacokinetics

薯蓣皂苷元(diosgenin, Dio)俗称皂素,广泛存在于豆科和薯蓣科植物中<sup>[1]</sup>,是一种植物自然合成的甾体皂苷元,属螺甾烷醇糖苷元。现代研究证实 Dio 具有抗癌、免疫调节、心血管保护、降血脂等多种药理作用<sup>[2]</sup>。然而, Dio 具有强疏水性( $\lg P$  5.7)和低水溶性(6.15 ng/mL),导致 Dio 的生物利用度较低<sup>[3]</sup>。为了提高其溶解性和生物利用度,目前有使用前体药物、纳米以及环糊精包合技术提高 Dio 口服生物利用度的报道<sup>[4-6]</sup>,但已有策略或工艺复杂或效果不佳, Dio 衍生物的制备需要多步合成操作,工艺较复杂;制备 Dio 环糊精包合物需要振荡 24 h 后干燥,制备时间较长;采用纳米混悬技术仅提高 Dio 生物利用度约 2 倍,效果不佳。因此,有必要开发一种简单有效的方法来提高 Dio 的生物利用度。最近,研究集中在无定形固体分散体(amorphous solid dispersion, ASD)上。ASD 中活性药物成分以无定形态分散于载体材料中,表面自由能大,其粒径减小,比表面积大,进而提高溶解度和溶出度<sup>[7]</sup>。且 ASD 是一种典型的过饱和给药系统,可显著提高游离药物浓度,远远超过其在胃肠道中的平衡溶解度<sup>[8]</sup>,通过浓度梯度赋予的驱动力,ASD 可促进药物被动转运通过肠膜,从而增加药物的吸收<sup>[9]</sup>。本研究应用分子模拟技术分析 Dio 与载体之间相互作用并通过抑晶实验验证,构建 Dio 与载体混溶性曲线相图,理论预测二者混溶性,制备薯蓣皂苷元无定形固体分散体(diosgenin amorphous solid dispersion, Dio-ASD),对其溶出行为和物相表征进行考察,最后对其进行药动学和稳定性研究。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司; Waters Acquity UPLC H-Class 型超高效液相色谱仪,沃特世科技有限公司; Sciex Triple Quad 5500 型系统质谱仪, AB Sciex 公司; RC806 型溶出试验仪,天津市天大天发科技有限公司; Sybyl 6.9.1 软件,美国 Tripos 公司; AutoDock 4.0 软件,美国 Molecular Graphics Laboratory 研究所; Materials Studio 软件,美国 Accelrys 公司; TA DSC-250 型差

示扫描量热分析仪,美国 TA 仪器/沃特世科技(上海)有限公司; Bruker Tensor 27 型傅里叶变换红外光谱仪,德国 Bruker 光谱仪器公司; Jeol-JSM-7500F 型扫描电子显微镜(SEM),日本电子株式会社; PW3040/60 X-射线粉末衍射仪,荷兰帕纳科公司。

### 1.2 材料

Dio 对照品,批号 111539-200001,中国食品药品检定研究院; Dio 原料药,批号 84414368E0,南京春秋生物工程有限公司; 聚乙烯己内酰胺-聚醋酸乙烯酯-聚乙二醇接枝共聚物(Soluplus)、羟丙基甲基纤维素 E30(hydroxy propyl methyl cellulose E30, HPMC-E30)、聚乙烯基-吡咯烷酮 K30(polyvinylpyrrolidone K30, PVP-K30)、普兰尼克(Pluronic-F68)、聚乙二醇 4000(polyethylene glycol 4000, PEG4000),巴斯夫股份公司; 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),天津市福晨化学试剂厂; 乙腈、甲醇,色谱级,北京迈瑞达科技有限公司; 乙腈、甲醇,质谱级,赛默飞公司; 娃哈哈纯净水,娃哈哈纯净水有限公司; 屈臣氏蒸馏水,屈臣氏集团; 其他试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

健康雄性 SD 大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号为 SCXK2016-0006。所有动物均暴露于温度为( $22 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度为( $50 \pm 1$ )%,光/暗周期为 12 h/12 h 的环境中。大鼠在实验前自由食用标准鼠粮和无菌水,禁食 12 h。所有动物相关方案均经承德医学院动物伦理实验委员会批准(批准号: NO.CDMULAC-20180410015)并符合《国家实验动物使用法》的要求。

## 2 方法与结果

### 2.1 Dio-ASDs 载体的选择

**2.1.1 分子模拟技术对 Dio-ASD 载体的选择** 首先,利用 Sybyl 6.9.1 软件的 Sketch Molecule 模块构建载体的初始三维结构;其次,通过 Minimize 模块,采用 Powell 能量梯度法,选取 AMBER7 FF99 力场和 Gasteiger-Hucel 电荷,能量梯度为 20.93 J/mol,收敛梯度为 50 J/mol,最大迭代次数为 10 000,对候选载体进行几何优化和分子力学优化,获得所有分子能量最低时的优势构象。采用 AutoDock 4.0 软

件包进行分子对接, AutoDock 4.0 具有 AutoGrid 和 AutoDock 2 个程序。首先, 采用 AutoGrid 程序计算化合物中各种类型原子的格点能量; 其次, 采用 AutoDock 程序以药物分子为配体, 候选载体分别为受体进行半柔性对接, 在进行分子对接过程中, 配体保持柔性、受体则保持刚性状态; 参数设置如下:

最大迭代次数为 15 000, 最大运算步数为 3000, 运算次数为 100, 最大群体大小为 300, 栏格分辨率为 0.2 nm; 最后, 根据配体的不同构象、方向、位置及能量对各种结合模式进行评分并排序。结果见图 1。

根据 Dio 与载体分子间相互作用及界面氢键分布, 氢键 (绿色虚线) 和疏水作用 (粉色虚线) 是

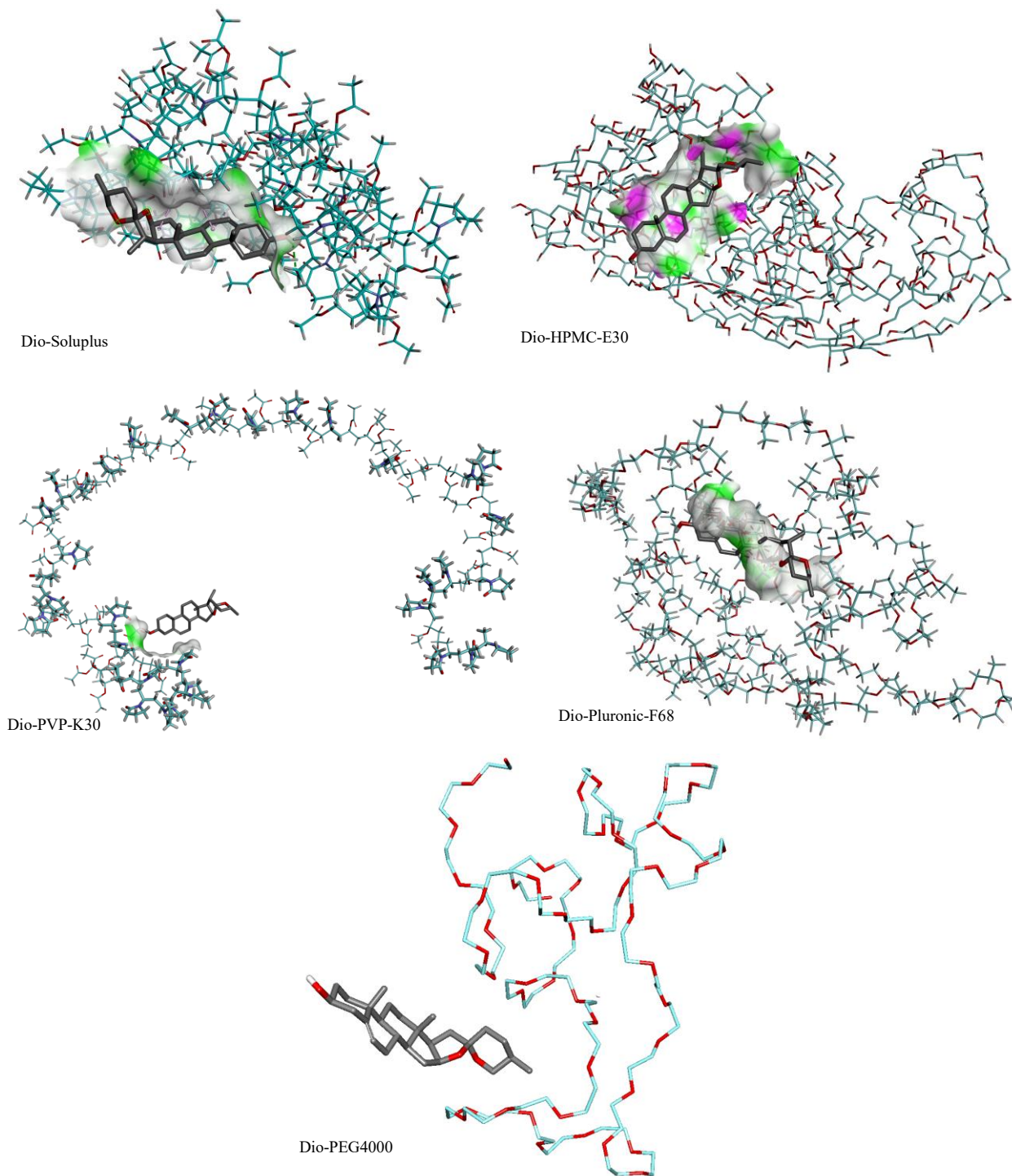


图 1 Dio 与不同载体分子对接示意图

Fig. 1 Schematic diagrams of molecular docking between Dio and different carrier molecules

Dio 和 Soluplus 之间形成的主要作用。Dio 与 HPMC-E30 之间只形成氢键, 不形成疏水作用, 导致其结合能低于 Soluplus。与 HPMC-E30 和 Soluplus 相比, Dio 与 PVP-K30、Pluronic-F68、PEG4000 之间没有氢键和疏水作用, 导致它们的结合能较低。计算出的结合能值 Soluplus ( $-28\ 550\ \text{J/mol}$ ) > HPMC-E30 ( $-27\ 503\ \text{J/mol}$ ) > PVP-K30 ( $-27\ 334\ \text{J/mol}$ ) > Pluronic-F68 ( $-24\ 034\ \text{J/mol}$ ) > PEG4000 ( $-23\ 493\ \text{J/mol}$ )。因此, 虽然 Soluplus 可以与 Dio 形成较强的相互作用, 但从结合能值来看效果并不显著, 下一步将通过实验进行验证。

**2.1.2 不同聚合物对 Dio 超饱和溶液结晶抑制作用的考察** 精密称取 27 mg Dio 溶于最少量的无水乙醇中, 超声溶解, 使成均一待结晶的超饱和溶液, 用以模拟超饱和药物体系。精密称取 162 mg 聚合物溶于 900 mL 水中, 平衡一段时间, 将上述超饱和和药物溶液迅速加入聚合物溶液中。以不加聚合物的溶液为对照, 介质保持在  $37\ ^\circ\text{C}$  下, 转速为 50 r/min, 分别于 5、10、15、20、30、60、90、120、150、180、210、240 min 时取样 5 mL, 并迅速补液 5 mL, 过  $0.45\ \mu\text{m}$  微孔滤膜, 弃去初滤液, 取续滤液进行 HPLC 测定, 实验重复 3 次。为避免因温度降低引起的任何药物结晶发生, 取样的溶液一直在  $37\ ^\circ\text{C}$  下保温。通过分子模拟可知, 与其它几种载体相比, Soluplus 可以与 Dio 形成更强的氢键相互作用, 应该能够有效抑制 Dio 结晶, 通过抑晶实验来验证模拟结果。

由图 2 显示, Dio 在无载体的溶出介质中快速沉淀, 5 min 后质量浓度低于检测限。Pluronic-F68 和 PEG4000 在 240 min 内均不能抑制 Dio 在过饱和溶液中的结晶, PVP-K30 的结晶抑制作用很弱。HPMC-E30 具有一定的结晶抑制作用, 虽然 Dio 在最初的 15 min 内迅速沉降在含有 HPMC-E30 的介质中, 但仍可以保持一定的质量浓度。Soluplus 对结晶的抑制作用最强, 在含有 Soluplus 的过饱和溶液中, Dio 的逐渐沉降和高质量浓度持续了 4 h。结果表明, 在过饱和溶液中, 抑制结晶能力的大小顺序为 Soluplus > HPMC-E30 > PVP-K30 > Pluronic-F68 和 PEG4000, 无定形载体在抑制 Dio 结晶方面比半结晶载体更有效。

**2.1.3 相图的绘制** 药物与聚合物的混溶性是设计 ASD 最佳处方的关键参数, 对于给定的药物-聚合物二元体系, 其混溶性也是选择载药量的重要依据,

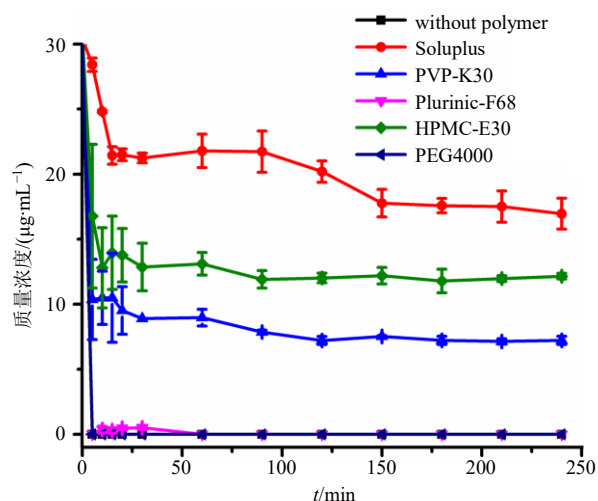


图 2 在超饱和状态下不同聚合物对 Dio 的结晶抑制效应 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effects of different polymers on crystallization inhibition of Dio in a supersaturated state ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

关系到 ASD 的物理稳定性。混溶性决定了亚稳态 ASD 的载药上限, 因为较高的载药量会导致自发相分离, 致使药物结晶, 这就否定了 ASD 的优势。混溶性曲线 (即不同温度或组分下的混溶性) 可以构建温度-组分相图, 为 ASD 的配方设计和产品制造提供有价值的信息。事实上, 根据 F-H 理论, 热力学定义了旋节曲线, 它是亚稳态的极限, 在旋节曲线的任何一点上, 都会发生称为旋节线分解的自发相分离。旋节曲线对应于混溶性曲线, 可以根据 F-H 理论进行预测, 得到相图<sup>[10]</sup>。对于药物-聚合物二元体系, 混合的吉布斯自由能由公式 (1) 描述。

$$\Delta G_{\text{mix}} = RT[\Phi \ln \Phi + (1 - \Phi) \ln(1 - \Phi) + \chi(1 - \Phi)] \quad (1)$$

$R$  是气体常数,  $T$  是绝对温度,  $\Phi$  是药物的体积分数,  $m$  是被聚合物链占据的晶格位数 (在此定义为药物分子的体积),  $\chi$  是药物-聚合物相互作用参数

聚合物链所占据的晶格位数和药物-聚合物相互作用参数可由公式 (2) (3) 计算。

$$m = M_{\text{polymer}} \rho_{\text{drug}} / M_{\text{drug}} \rho_{\text{polymer}} \quad (2)$$

$$\chi = v(\delta_{\text{drug}} - \delta_{\text{polymer}})^2 / RT \quad (3)$$

$M$  为相对分子质量,  $\rho$  是密度,  $\delta$  是 Hansen 溶解度参数,  $v$  是晶格点的体积 (即药物的体积)

将自由能的二阶导数设为零, 可以得到自旋点曲线, 并表示为公式 (4)。

$$T_s = 2v(\delta_{\text{drug}} - \delta_{\text{polymer}})^2 / \{R[1/\Phi + 1/m(1 - \Phi)]\} \quad (4)$$

表 1 中示出了估计混溶性曲线 (即旋节线曲线) 所需的参数, 根据公式 (4) 进行计算并得到混溶性曲线, 结果见图 3。



表 1 Dio 混溶性计算所需参数

Table 1 Data used for calculation of miscibility of Dio.

| 物质       | $M/(\text{g}\cdot\text{mol}^{-1})$ | $\rho/(\text{g}\cdot\text{cm}^{-3})$ | $v/(\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1})$ | $\delta/\text{MPa}^{1/2}$ |
|----------|------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| Dio      | 414.62                             | 1.13                                 | 366.8                                 | 17.21                     |
| Soluplus | 118000                             | 1.20                                 | 98333                                 | 17.40                     |

$v$  和  $\delta$  的计算方法参考文献<sup>[11]</sup>

reference<sup>[11]</sup> for the calculation method of  $v$  and  $\delta$

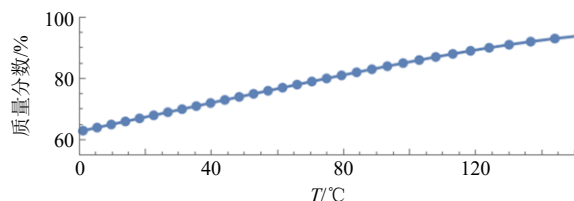


图 3 预测 Dio-Soluplus 系统的温度-组分相图

Fig. 3 Temperature-composition phase diagram predicted for the Dio-Soluplus system

由所构建的相图所示,在混溶性曲线之上的,将会发生自发相分离。从相图可以看出,混溶度随着温度的升高而增加,Dio 和 Soluplus 在 25 °C 下的混溶性 68.57%,在室温下 ASD 的最大载药量不能超过 68.57%。

## 2.2 Dio-ASD 制备工艺优化

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Diamonsil Plus C<sub>18</sub> 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (84 : 16); 检测波长 203 nm; 柱温 30 °C; 体积流量 1 mL/min。

**2.2.2 物理混合物 (physical mixture, PM) 的制备** 按一定比例精确称量已经研磨过 80 目筛的原料药和 Soluplus,装到真空袋中,混匀,即得。

**2.2.3 溶出度测定** 取 Dio、Dio-ASDs 及 PM,按照《中国药典》2020 年版溶出度与释放度测定方法中“浆法”进行溶出实验,以 900 mL 0.1% SDS 溶液为介质,在 37 °C、100 r/min 下试验,分别于 5、15、30、45、60、90、120 min 取样 5 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后测定,同时补充同温等量介质计算得到溶出度。

**2.2.4 共沉淀法制备 Dio-ASD** 以 Soluplus 为载体,按原料药与载体的比例 (药载比) 1 : 2、1 : 4、1 : 6、1 : 8、1 : 10、1 : 12 精确称量,加无水乙醇超声至完全溶解,旋转蒸发溶剂后冷冻 30 min,放 50 °C 烘箱干燥过夜,取出粉碎,过 80 目筛,测定溶出度,结果见图 4。可见在药载比为 1 : 10 时,溶出度最高,此时的载药量为 9.10%,没有超过按混溶性曲线计算的最大载药量 68.57%,推测此时药

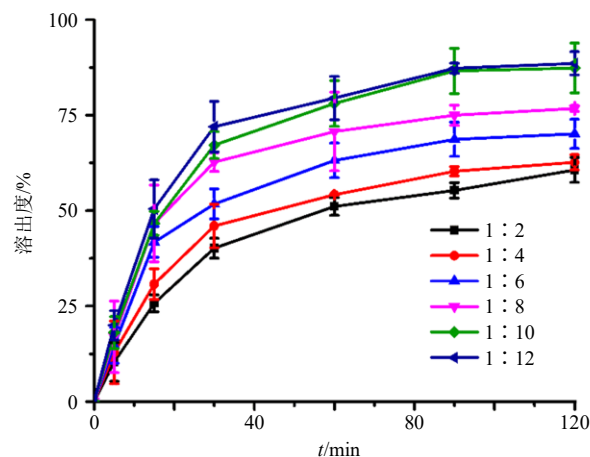


图 4 Dio-ASDs 中不同 Dio/Soluplus 比例的溶出度 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 4 Dissolution of different Dio/Soluplus ratios in Dio-ASDs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

物和载体应具有较好的混溶性,因此,选择此比例为最佳工艺。

**2.2.5 工艺验证** 按优选的最佳比例制备 Dio-ASDs 和 PM 各 3 批,测定溶出度,结果见图 5。在 0.1% SDS 溶液中,Dio-ASDs 的溶出度明显高于原料药 Dio 和 PM,原因可能是药物在溶出介质中润湿性的改善<sup>[12]</sup>。

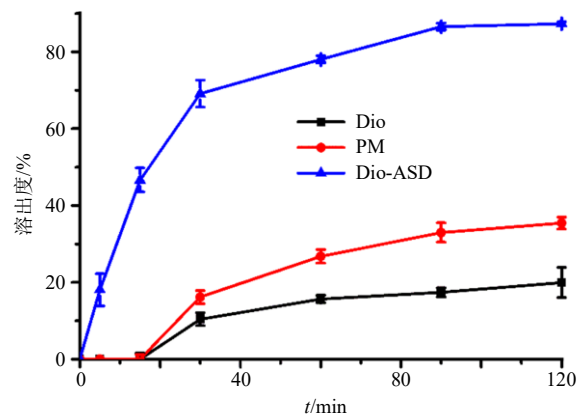


图 5 药物与载体的质量比为 1 : 10 时 Dio-ASD 的溶出度 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 5 Dissolution of Dio-ASDs with a mass ratio of 1 : 10 for drug and carrier ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

## 2.3 Dio-ASD 物相表征

**2.3.1 DSC 分析** 取待测样品约 5 mg,精密称定,装入铝坩埚中,以空坩埚为参比,进行 DSC 分析。工作条件:扫描速度 10 °C/min, N<sub>2</sub> 吹扫气体流量 40 mL/min, N<sub>2</sub> 保护气体流量 60 mL/min,扫描范围 25~300 °C。DSC 图谱如图 6 所示。图 6 显示了 Dio、Soluplus、PM 和 Dio-ASD 的热行为。

在 213.67 °C 时, Dio 出现了 1 个明显的吸热峰, 表明 Dio 原料药为晶体结构。Dio-ASD 中 Dio 的吸热峰消失, 证实该药物与载体混溶, 药物成无定形态。本实验 PM 未发现明显吸热峰, 可能是由于在 DSC 程序升温时使先熔融的载体成为 Dio 良好的溶剂, 使其在到达熔点之前就已逐渐溶解在熔融的载体中, 或者只是药物的结晶性受到 Soluplus 的抑制, 由于 DSC 灵敏度有限而未检测到明显吸热峰, 因此, 并不能确定 PM 中药物以无定形态存在, 需要通过 PXRD 和 SEM 进一步确证。

**2.3.2 X-射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRPD) 分析** 分析条件为 Cu 靶, 波长为 0.154 0 nm, 管流强度 40 mA, 管电压 40 kV, 扫描角度 10°~60°, 步长 0.02°, 扫描频率 8°/min。对样品进行 XRPD 分析。图 7 显示了 Dio、Soluplus、PM 和 Dio-ASD

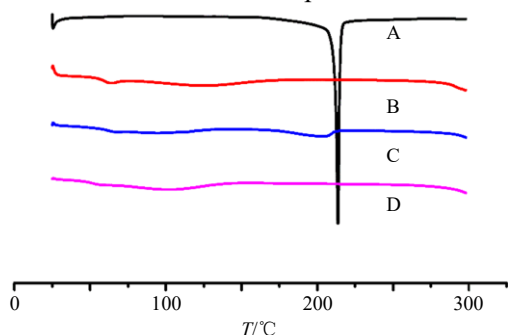


图 6 Dio (A)、Soluplus (B)、PM (C) 和 Dio-ASD (D) 的 DSC 图谱

Fig. 6 DSC curves of Dio (A), Soluplus (B), PM (C), and Dio-ASD (D)

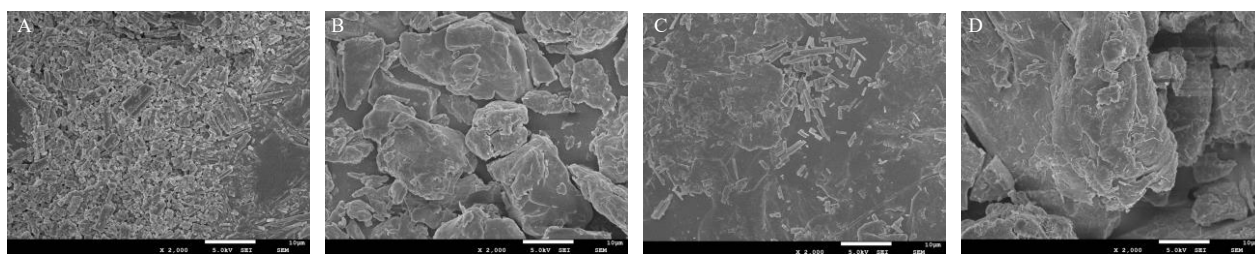


图 8 Dio (A)、Soluplus (B)、PM (C) 和 Dio-ASD (D) 的 SEM 图谱

Fig. 8 SEM photomicrographs of Dio (A), Soluplus (B), PM (C), and Dio-ASD (D)

**2.3.4 FT-IR 分析** 采用 KBr 压片法将样品压片, 在 4000~400  $\text{cm}^{-1}$  扫描范围分别进行 FT-IR 分析。结果如图 9 所示。Dio 有如下特征峰 ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3 452.2 (-OH)、1 241.5、1 053.1 ( $3\beta\text{-OH}$ ,  $\Delta^5$ )、980.4、峰强度  $918.7 < 897.4$ 、866.3 (25R 螺甾烷); Soluplus 存在 -OH、O=C-S-和 O=C-C=C-羰基的伸缩振动特征峰, 分别位于 3 465.3、1 739.2、1 637.7  $\text{cm}^{-1}$ ; PM 与 Dio 红外光谱图基本相似, Dio 的特征峰基本

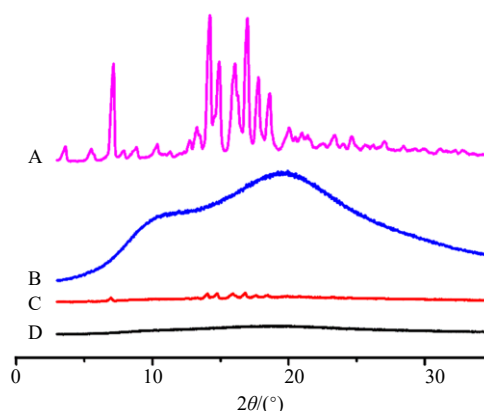


图 7 Dio (A)、Soluplus (B)、PM (C) 和 Dio-ASD (D) 的 XRPD 图谱

Fig. 7 XRPD spectras of Dio (A), Soluplus (B), PM(C), Dio-ASD (D)

的 XRPD 图像。Dio 在 5°~20°有特征的晶体衍射峰, 分别位于 7.14°、14.22°、14.90°、16.08°、16.98°、17.78°、18.64°, 在 PM 衍射图中可以清楚地观察到 Dio 的所有主要特征晶体峰, Dio-ASD 中的 Dio 晶体特征峰消失, 表明载体与 Dio 之间的相互作用可以有效地将药物的晶体状态转变为无定形态, 此结果与 DSC 结果一致。

**2.3.3 SEM 观察** 将样品涂于干净的铜片上, 喷金后观测各样品的表面形态。结果如图 8 所示。Dio 呈棒状或粒状结晶结构, Soluplus 以无定形态存在, 能观察到 PM 中 Dio 晶体出现在载体中, 而 Dio-ASD 中没有 Dio 晶体结构, 这一结果表明 Dio 以无定形式存在于 ASD 体系中。

都存在, 说明药物和载体之间只是简单混合, 并没有发生相互作用; 相反, 在 Dio-ASD 中来自 Dio 的羟基峰发生了位移, 提示药物和载体之间可能存在氢键。Dio 特征峰 3 452.2  $\text{cm}^{-1}$  (-OH) 的小尖峰消失, 与 Soluplus 的羟基峰合并为 1 个宽、钝的吸收峰, 位于 3 459.8  $\text{cm}^{-1}$ 。-OH 的消失表明 Dio 的羟基与 Soluplus 的羰基 (氢键受体) 之间存在分子间氢键。值得注意的是, 药物和载体之间的相互作用对

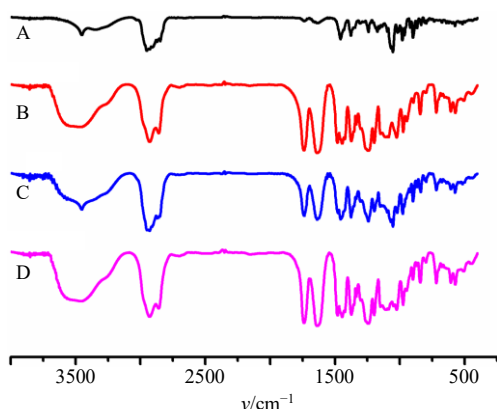


图 9 Dio (A)、Soluplus (B)、PM (C) 和 Dio-ASD (D) 的 FT-IR 图谱

Fig. 9 FT-IR spectras of Dio (A), Soluplus (B), PM (C), and Dio-ASD (D)

ASD 是一个额外的好处，因为它们不仅可以抑制药物的结晶，而且可以增强药物在亲水性辅料中的固溶度<sup>[13]</sup>。

## 2.4 Dio-ASD 药动学研究

**2.4.1 给药方案** 将 SD 大鼠随机分组，每组 6 只。分别口服 Dio、PM 和 Dio-ASD，给药剂量为 100 mg/kg。给药后于 0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、6、8、12、24、36、48、72 h 大鼠眼眶取血，置于肝素处理的 EP 管中，离心（转速为 10 000 r/min）10 min，即得血浆，迅速将血浆样品保存于 -80 °C 冰箱。利用 UPLC-MS/MS 法测定血浆中 Dio 的血药浓度。

### 2.4.2 分析方法及样品处理方法

(1) 色谱条件：色谱柱：Waters Acquity UPLC® BEH C<sub>18</sub> 柱（50 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相为乙腈-0.03%甲酸水溶液（80：20）；柱温 35 °C；样品温度 4 °C；进样量 2 μL；体积流量 0.3 mL/min。

(2) 质谱条件：离子源参数如下：ESI（+）；Dio 去簇电压 71.96 V，碰撞电压 23.03 eV；丹参酮 IIA（内标）去簇电压 120 V，碰撞电压 25.92 eV；

用于定量分析的离子对如下： $m/z$  415.2→271.2（Dio）； $m/z$  295.2→277.1（丹参酮 IIA）。

(3) 方法学考察：参照《中国药典》2020 年版附录生物样品定量分析方法验证指导原则，对专属性、线性范围、精密度与准确度、提取回收率与基质效应和稳定性进行方法学考察，所有项目考察结果均符合规定。

(4) 血浆处理：精密量取 50 μL 大鼠血浆，加入 50 μL 内标（41.85 ng/mL），涡旋 30 s，加入 250 μL 甲醇-乙腈（1：1），涡旋 2 min，13 000 r/min 高速离心 15 min，取上清液，UPLC-MS/MS 分析，药时曲线结果见图 10，药动学参数见表 2。

**2.4.3 数据处理与药动学参数计算** 实验前取出血浆，在室温下融化后按“2.4.2”项下分析方法进行检测，收集实验数据。采用 SPSS 19.0 统计软件对试验数据进行处理，计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示，各组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）。使用 DAS 3.0 药动学处理软件，选择非房室模型方法进行药动学参数计算。由图 10 和表 2 可知，Dio-ASD 的  $AUC_{0 \sim t}$  和  $C_{max}$  分别是 Dio 的 5.84、3.17 倍。

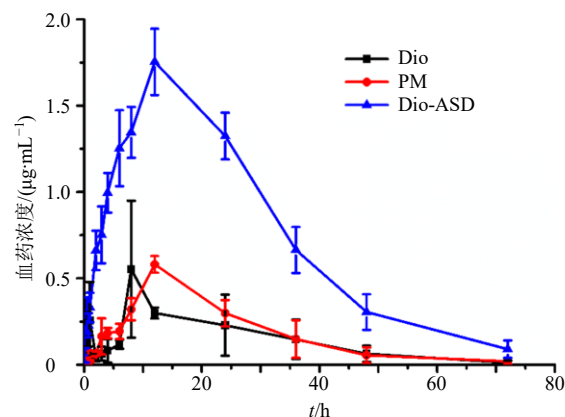


图 10 口服 Dio 和 Dio-ASD 后 Dio 的血药浓度-时间分布 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 10 Plasma concentration-time profiles of Dio following oral administration of Dio and Dio-ASD ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

表 2 口服 Dio and Dio-ASD 后药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Pharmacokinetic parameters following oral administration of Dio and Dio-ASD ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 参数               | 单位                           | Dio                | PM                   | Dio-ASD                |
|------------------|------------------------------|--------------------|----------------------|------------------------|
| $AUC_{0 \sim t}$ | $\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$ | 9 302.24 ± 4013.38 | 12 101.45 ± 3 357.26 | 54 386.54 ± 8 864.42** |
| $t_{1/2z}$       | h                            | 12.33 ± 3.02       | 9.11 ± 2.29          | 10.37 ± 1.68           |
| $t_{max}$        | h                            | 8.37 ± 2.54        | 12.16 ± 4.92         | 10.98 ± 1.99           |
| $C_{max}$        | $\mu g \cdot L^{-1}$         | 552.63 ± 100.13    | 567.88 ± 88.34       | 1 742.65 ± 491.46**    |

与 Dio 比较：\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs Dio



应用下列公式计算 Dio-ASD 的相对生物利用度 ( $F$ )。

$$F = \text{AUC}_{0 \sim \infty} \text{Dio-ASD} / \text{AUC}_{0 \sim \infty} \text{Dio}$$

计算得 Dio-ASD 的相对生物利用度分别为 589.47% ( $P < 0.05$ ), 即采用共沉淀法将 Dio 制备成 ASD 后, Dio 呈现无定形态, 溶出度增加, 其生物利用度有了很大的提高。

## 2.5 Dio-ASD 稳定性研究

样品平铺于培养皿中, 厚度约 2~3 cm, 保存在 40 °C, 75% RH 下, 于 0、3、6 个月时分别取样, 进行 XRPD 测定, 来检测形态随时间的变化, 并采用 HPLC 对不同贮藏时间的体外溶出度进行测定。结果见图 11、12。如 XRPD 衍射峰图 (图 11) 所示, 存储后的 Dio-ASD 与初始状态相似, 没有显示 Dio 的任何衍射峰。在 40 °C, 75% 的湿度下保存 6 个月后溶出度 (图 12) 与新制备的 ASD 相比无显著性差异。进一步证实了该无定形药物不结晶并具有良好的稳定性。

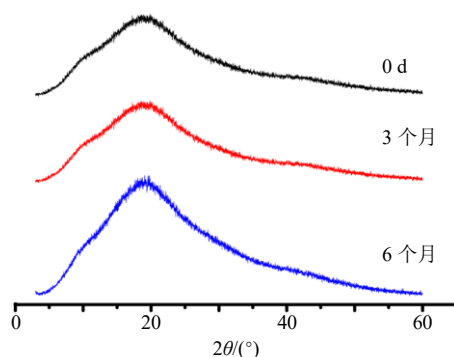


图 11 Dio-ASD 放置 0、3、6 个月后的 XRPD 图谱

Fig. 11 PXRD spectra for Dio-ASD stored for 0, 3, 6 months

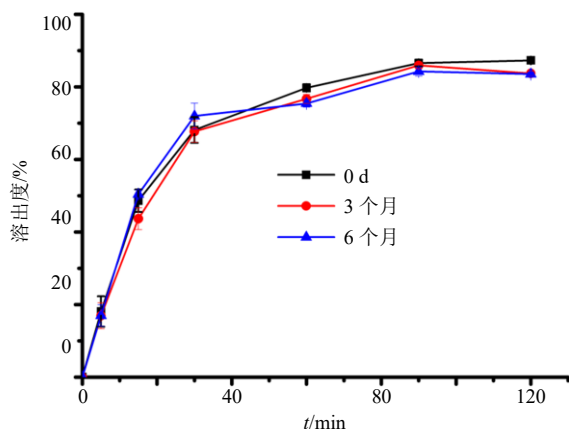


图 12 Dio-ASD 放置 0、3、6 个月后 Dio 的溶出度测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 12 Dissolution of Dio in Dio-ASD stored for 0, 3, 6 months ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 3 讨论

分子模拟是将量子力学理论与计算方法相结合研究分子结构的一项强有力的技术。它可以在分子力学和量子化学理论的基础上模拟分子在原子水平上的行为。将势函数和力参数描述为力场, 计算相互作用的分子间的力和整个系统的总能量。分子模拟可以提供可见的三维结构和轨迹剖面。这些参数 (如自由能和动态参数) 可以从轨迹中计算出来, 从而揭示分子结构<sup>[14]</sup>。由于分子建模的独特优势, 在药物研究中的应用实例越来越多。文献报道采用模拟退火法研究了一系列布洛芬 ASD 与聚乙二醇、泊洛沙姆、聚维酮、乳糖和甘露醇相互作用的分子结构, 并用分子动力学模拟方法研究了布洛芬十二烷基硫酸钠与聚乙二醇、聚维酮和泊洛沙姆的溶解过程<sup>[15]</sup>。因此, 分子模拟是在分子水平上解释实验现象的重要工具。本实验中, 由于氢键和疏水作用, Dio 和 Soluplus 之间形成了很强的结合能。Dio 和 Soluplus 之间分子相互作用可有效抑制药物结晶, 进而提高其溶解性和稳定性。

ASD 已被证明是提高低水溶性药物溶解度、溶出度和生物利用度最有前景的策略之一。然而, ASD 的配方设计仍然是药学工作者面临的一大挑战。研究表明, 晶体药物在无定形聚合物中的溶解度和药物与聚合物的相容性是设计最佳处方的 2 个关键参数。对于给定的药物-聚合物二元体系, 其溶解度和混溶性是选择载药量的重要依据, 这关系到 ASD 的物理稳定性<sup>[16]</sup>。混溶性决定了亚稳态 ASD 的载药上限, 因为较高的载药量会导致自发相分离, 药物结晶, 这就否定了 ASD 的优势。此外, 玻璃化转变温度 ( $T_g$ ) 是 ASD 的另一个关键参数<sup>[17]</sup>。溶解度曲线、混溶性曲线和  $T_g$  曲线 (即不同温度或组分下的溶解度、混溶性和  $T_g$ ) 可以构建温度-组分相图, 为 ASD 的配方设计和产品制造提供有价值的信息。然而, 由于聚合物的高黏度, 特别是在低于其  $T_g$  的温度下, 达到溶解度平衡所需的时间相当长, 这使得在各种温度下确定药物-聚合物的溶解度和可混溶性成为一个挑战。因此, 在这种情况下, 理论预测是有利的<sup>[18]</sup>。因此, 本实验通过绘制相图理论预测药物和聚合物之间的混溶性, 推测出制备的 ASD 载药上限, 为后续实验提供了理论依据, 具有一定的理论创新性。

在口服给药领域, 通过过饱和和增加腔内浓度有望增强肠道吸收<sup>[19-20]</sup>。加入聚合物载体可以稳定和



延长过饱和度, 其对 ASD 中无定形态药物结晶抑制机制包括与药物在局部产生的相互作用、无定形态药物的分子流动性降低和药物结晶成核活化能及  $T_g$  的提高。在此, 本课题组进行了高通量沉淀筛选来选择载体, 并在筛选/优化过程中评估过饱和和潜力<sup>[21-22]</sup>。在本实验中, 采用超饱和溶液法研究了 5 种不同水溶性载体对 Dio 晶体的抑制效果, 无定形载体在抑制 Dio 结晶方面比半结晶载体更有效。Soluplus 对 Dio 的抑晶效果最佳, 原因可能是其水溶性、黏度及三维结构体系降低了药物的自由能, 减缓过饱和溶液中药物的析晶沉淀, 起到维持过饱和度的作用。值得注意的是, Soluplus 在纯水中的 CMC 仅为 7.6 mg/L, 在不同 PBS (pH 6.8、6.5、7.0) 溶液中, CMC 值分别为 0.61、1.24 和 0.91  $\mu\text{g/mL}$ , 在 0.1 mol/L HCl (pH 1.0), Soluplus 的 CMC 值为 11.7  $\mu\text{g/mL}$ <sup>[23]</sup>, 这些研究结果证实 Soluplus 在溶液中极易形成胶束, 这种增溶作用不仅可以间接地促进过饱和体系的形成, 而且作为一个有利于快速补充及时吸收的游离药物的药物库。此外, 前期预实验过程中, 我们在药物与载体的比例为 1:3 时, 观察了不同载体对 Dio 的抑晶作用。结果表明, 除 Soluplus 具有微弱的晶体抑制作用外 (Dio 的质量浓度可在 0.003 mg/mL 下维持 2.5 h), 所有其他载体均无晶体抑制作用。这说明载体浓度的增加对抑制 Dio 结晶有有利的影响。而不同药载比下 (1:1、1:3、1:6、1:9、1:12) Soluplus 对 Dio 的抑晶作用结果显示药载比在 1:6 和 1:9 时呈现最佳效果 (二者相差无几), 为节约材料, 选择 1:6。

Soluplus 是巴斯夫公司用于热熔挤出技术而生产的, 本实验所用的共沉淀法为 Soluplus 的应用扩展。由 DSC、XRPD、SEM 和 FT-IR 等结果表明 Dio-ASD 中的 Dio 以无定形形式存在, 药物和载体之间存在相互作用, 而药物润湿性的改善、从结晶状态到无定形的转变<sup>[24]</sup>和药物载体分子间的氢键效应都有利于增强 Dio 的溶出, 进而提高其生物利用度。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 张释晴, 宋雨轩, 张文雪, 等. 抗肿瘤天然产物薯蓣皂苷元的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(17): 4360-4366.
- [2] 王洋, 赵立春, 庞宇舟, 等. 不同剂量薯蓣皂苷元的大鼠体内药动学研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2020,

- 40(3): 269-273.
- [3] Okawara M, Tokudome Y, Todo H, *et al.* Effect of  $\beta$ -cyclodextrin derivatives on the diosgenin absorption in Caco-2 cell monolayer and rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(1): 54-59.
- [4] Okawara M, Tokudome Y, Todo H, *et al.* Enhancement of diosgenin distribution in the skin by cyclodextrin complexation following oral administration [J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(1): 36-40.
- [5] Liu C Z, Chang J H, Zhang L, *et al.* Preparation and evaluation of diosgenin nanocrystals to improve oral bioavailability [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2017, 18(6): 2067-2076.
- [6] Okawara M, Hashimoto F, Todo H, *et al.* Effect of liquid crystals with cyclodextrin on the bioavailability of a poorly water-soluble compound, diosgenin, after its oral administration to rats [J]. *Int J Pharm*, 2014, 472(1/2): 257-261.
- [7] Prasad E, Robertson J, Halbert G W. Mefenamic acid solid dispersions: Impact of formulation composition on processing parameters, product properties and performance [J]. *Int J Pharm*, 2022, 616: 121505.
- [8] Chavan R B, Rath S, Sainaga Jyothi V G S, *et al.* Cellulose based polymers in development of amorphous solid dispersions [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2019, 14(3): 248-264.
- [9] Chen J, Ormes J D, Higgins J D, *et al.* Impact of surfactants on the crystallization of aqueous suspensions of celecoxib amorphous solid dispersion spray dried particles [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12(2): 533-541.
- [10] Tian B, Wang X Y, Zhang Y Y, *et al.* Theoretical prediction of a phase diagram for solid dispersions [J]. *Pharm Res*, 2015, 32(3): 840-851.
- [11] Forster A, Hempenstall J, Tucker I, *et al.* Selection of excipients for melt extrusion with two poorly water-soluble drugs by solubility parameter calculation and thermal analysis [J]. *Int J Pharm*, 2001, 226(1/2): 147-161.
- [12] Vasconcelos T, Marques S, das Neves J, *et al.* Amorphous solid dispersions: Rational selection of a manufacturing process [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 100: 85-101.
- [13] Riekes M K, Kuminek G, Rauber G S, *et al.* HPMC as a potential enhancer of nimodipine biopharmaceutical properties via ball-milled solid dispersions [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 99: 474-482.
- [14] de Vivo M, Masetti M, Bottegoni G, *et al.* Role of molecular dynamics and related methods in drug discovery [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(9): 4035-4061.

- [15] Chan T, Ouyang D F. Investigating the molecular dissolution process of binary solid dispersions by molecular dynamics simulations [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2018, 13(3): 248-254.
- [16] Zhao Y Y, Inbar P, Chokshi H P, *et al*. Prediction of the thermal phase diagram of amorphous solid dispersions by flory-Huggins theory [J]. *J Pharm Sci*, 2011, 100(8): 3196-3207.
- [17] Kaushal A M, Gupta P, Bansal A K. Amorphous drug delivery systems: Molecular aspects, design, and performance [J]. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst*, 2004, 21(3): 133-193.
- [18] Bellantone R A, Patel P, Sandhu H, *et al*. A method to predict the equilibrium solubility of drugs in solid polymers near room temperature using thermal analysis [J]. *J Pharm Sci*, 2012, 101(12): 4549-4558.
- [19] Pas T, Bergonzi A, Lescrinier E, *et al*. Drug-carrier binding and enzymatic carrier digestion in amorphous solid dispersions containing proteins as carrier [J]. *Int J Pharm*, 2019, 563: 358-372.
- [20] Sun D D, Lee P I. Crosslinked hydrogels-a promising class of insoluble solid molecular dispersion carriers for enhancing the delivery of poorly soluble drugs [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2014, 4(1): 26-36.
- [21] Chavan R B, Rathi S, Jyothi V, *et al*. Cellulose based polymers in development of amorphous solid dispersions [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2019, 14(3): 248-264.
- [22] Bevernage J, Forier T, Brouwers J, *et al*. Excipient-mediated supersaturation stabilization in human intestinal fluids [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(2): 564-570.
- [23] Shi N Q, Lai H W, Zhang Y, *et al*. On the inherent properties of Soluplus and its application in ibuprofen solid dispersions generated by microwave-quench cooling technology [J]. *Pharm Dev Technol*, 2018, 23(6): 573-586.
- [24] Bikiaris D N. Solid dispersions, part I: recent evolutions and future opportunities in manufacturing methods for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011, 11(8): 1501-1519.

[责任编辑 郑礼胜]