

# 基于共无定形技术葛根素改善黄芩苷物理稳定性和溶出度及其机制研究

曾慧玲<sup>1</sup>, 蒋且英<sup>2</sup>, 赵国巍<sup>1</sup>, 梁新丽<sup>1</sup>, 刘欢<sup>1</sup>, 欧阳料洪<sup>1</sup>, 廖正根<sup>1\*</sup>

1. 江西中医药大学, 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西中医药大学实验动物科技中心, 江西 南昌 330004

**摘要:** 目的 制备葛根素-黄芩苷共无定形 (puerarin-baicalin co-amorphous, Pue-Bai-CA) 混合物系统, 考察葛根素对无定形黄芩苷物理稳定性及其溶出的影响及其机制。方法 利用喷雾干燥法制备葛根素、黄芩苷、Pue-Bai-CA 系统, 采用偏振光显微镜 (polarizing microscope, PLM)、差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC)、X 射线单晶衍射法 (X ray single crystal diffraction, XRD)、傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 等表征其固态特征; 按照《中国药典》2020 年版溶出度测定法测定黄芩苷的溶出度; 用相溶解度法研究葛根素对黄芩苷溶出度的影响; 同时测定其吸湿性和储存稳定性。结果 喷雾干燥法能成功制备葛根素、黄芩苷无定形样品和 Pue-Bai-CA 样品, 共无定形系统中 2 者存在明显的相互作用; Pue-Bai-CA 系统中黄芩苷的溶出优于晶体混合物, 晶体混合物优于黄芩苷无定形; 相溶解度结果显示, 黄芩苷与葛根素形成了 1:1 AL 型络合物; Pue-Bai-CA 系统的物理稳定性优于黄芩苷无定形。结论 Pue-Bai-CA 系统可提高黄芩苷无定形的物理稳定性和溶出度, 其机制与提高玻璃化转变温度 (glass transition temperature,  $T_g$ )、2 者之间存在相互作用及形成络合物有关。

**关键词:** 黄芩苷; 葛根素; 共无定形系统; 溶出; 络合; 稳定性; 相溶解度法; 吸湿性; 喷雾干燥法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)20-6423-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.20.014

## Analysis on improvement of physical stability and dissolution of amorphous baicalin by puerarin and its mechanism in puerarin-baicalin co-amorphous system

ZENG Hui-ling<sup>1</sup>, JIANG Qie-ying<sup>2</sup>, ZHAO Guo-wei<sup>1</sup>, LIANG Xin-li<sup>1</sup>, LIU Huan<sup>1</sup>, OUYANG Liao-qi<sup>1</sup>, LIAO Zheng-gen<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Animal Research Center for Science and Technology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

**Abstract: Objective** The mixture system of puerarin-baicalin co-amorphous (Pue-Bai-CA) was prepared to investigate the effect of puerarin on the physical stability and dissolution of amorphous baicalin and its mechanism. **Methods** Puerarin, baicalin and Pue-Bai-CA systems were prepared by spray drying method, and their solid state characteristics were characterized by polarized light microscopy (PLM), differential scanning calorimetry (DSC), X ray single crystal diffraction (XRD), and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The dissolution rate of baicalin was determined according to the dissolution rate determination method of *Chinese Pharmacopoeia* (2020 edition). The effect of puerarin on the dissolution of baicalin was studied by phase solubility method. Its hygroscopicity and storage stability were also measured. **Results** The amorphous samples of puerarin amorphous, baicalin amorphous samples, and Pue-Bai-CA sample were successfully prepared by spray drying method, and there was obvious interaction between the two in the amorphous system. The dissolution of the co-amorphous system baicalin is better than that of the crystal mixture, which is better than that of the amorphous system baicalin. The phase solubility results showed that baicalin and puerarin formed 1:1 AL complex. The physical stability of co-amorphous system is better than that of baicalin amorphous system. **Conclusion**

收稿日期: 2022-05-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82160751); 江西中医药大学中药制剂技术与制药装备创新团队 (CXTD22006); 校级大学生创新创业计划项目 (202110412212)

作者简介: 曾慧玲 (1998—), 女, 硕士, 研究方向为药物制剂及新剂型研究。Tel: 15727793560 E-mail: 2934799143@qq.com

\*通信作者: 廖正根 (1967—), 男, 教授, 理学博士, 博士生导师, 从事中药制剂及新剂型研究。Tel: (0791)87118658 E-mail: lyzlyg@163.com

Co-amorphous can improve the physical stability and dissolution of baicalin amorphous, and the mechanism is related to the increase of  $T_g$ , the interaction between the two and the formation of complex.

**Key words:** baicalin; puerarin; co-amorphous system; dissolution; complexation; stability; phase solubility method; hygroscopicity; spray drying method

许多中药活性成分由于溶解度低导致生物利用度低,限制了其在临床上的使用<sup>[1]</sup>。晶体药物无定形化被认为是提高溶解度的有效方法之一<sup>[2-3]</sup>,然而,无定形药物易重结晶而失去其溶解度/溶出度的优势<sup>[4]</sup>,为此,常使用亲水聚合物将其制备成无定形固体分散体(amorphous solid dispersion, ASD)以提高物理稳定性<sup>[5-6]</sup>。然而,亲水聚合物容易吸收环境中的水分从而增加药物的分子迁移率,导致无定形药物重结晶;同时,亲水聚合物载药量低会增大服用剂量<sup>[7]</sup>。为了克服聚合物为基础的ASD的局限性,近年提出了以小分子为载体的共无定形药物传递系统(co-amorphous drug delivery system, CA),并成为药剂学前沿研究的热点之一<sup>[8]</sup>。CA系统是以小分子辅料或药物为配体,与所研究的药物共同制成的无定形均相混合物,一般有特定的化学计量比<sup>[9]</sup>。与基于聚合物的ASD不同,CA可以在高载药量下使其物理稳定性和溶解度提高<sup>[10]</sup>。

葛根和黄芩在方剂中常联合应用<sup>[11-13]</sup>,两者构成药对<sup>[14]</sup>。葛根素是葛根的主要活性成分,黄芩苷为黄芩主要活性成分,两者均可用于酒精性肝病<sup>[15]</sup>和糖尿病的治疗<sup>[16-17]</sup>。为了兼容“配伍艺术”与“精准药物”这2大核心,张伯礼院士等<sup>[18]</sup>提出了以组分配伍研制现代中药的有效组分配伍研究新策略,但有关如何构建组分中药制剂形式的研究报道较少见到报道。本研究根据葛根芩连汤中葛根与黄芩的剂量配比并结合《中国药典》2020年版中关于2味药材相应成分的含量要求<sup>[19]</sup>,将葛根素与黄芩苷构建物质的量比为1:1的CA体系,并考察CA体系中葛根素对黄芩苷制剂性能的影响,为组分中药制剂形式的构建提供思路,同时也为分析复方汤剂中葛根素和黄芩苷可能存在的相互作用提供解释。

## 1 仪器与材料

ZRS-8G型智能溶出度仪,天津市天大天发科技有限公司;B-290型小型喷雾干燥机,瑞士Büchi公司;BAS124S型电子天平,赛多利斯科学仪器北京有限公司;Agilent 1200型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;Oxford Diffraction型X-射线单晶衍射仪,日本Rigaku公司;Genius3型漩涡混合器,德国IKA集团;Exstar 6000 TG/DTA6300型热重/差热综

合热分析仪,日本精工电子有限公司;Diamond DSC型差示扫描量热分析仪,美国PerkinElmer公司;Mshot MS60型偏振光显微镜,广州市明美光电技术有限公司;Spectrum Two型傅里叶变换红外光谱仪,美国珀金埃尔默公司;PLUS-E2-10<sup>TH</sup>型衡量分析型超纯水机,南京易普易达科技发展有限公司。

葛根素原料药,批号CPG20190518,质量分数98%,购自西安昊轩生物科技有限公司;黄芩苷原料药,批号AF21021101,质量分数98%,购自成都埃法生物科技有限公司;实验用水,Milli-Q水纯化系统自制;甲醇为色谱纯,购自湖北弗顿科学技术有限公司;其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品的制备

**2.1.1 葛根素-黄芩苷-共无定形(puerarin-baicalin-CA, Pue-Bai-CA)及葛根素无定形(puerarin amorphous, Pue-A)、黄芩苷无定形(baicalin amorphous, Bai-A)样品的制备** 称取葛根素原料药2.08 g,黄芩苷原料药2.23 g(物质的量比为1:1)至烧杯中,加入无水乙醇,室温超声溶解后进行喷雾干燥,设定雾化气为氮气,加料速度为2.8 mL/min,氮气体积流量为40 m<sup>3</sup>/h,设置进口温度为65 °C,出口温度为30~40 °C。收集粉末于干燥器中,即得Pue-Bai-CA样品。同样的方法制备Pue-A、Bai-A单体样品。

**2.1.2 葛根素-黄芩苷-物理混合物(puerarin-baicalin-physical mixture, Pue-Bai-PM)的制备** 原料药分别过80目筛后,称取葛根素2.08 g,黄芩苷2.23 g,按物质的量比为1:1,涡旋20 min,制备得Pue-Bai-PM。

**2.1.3 葛根素-黄芩苷-无定形物理混合物(puerarin-baicalin-amorphous physical mixture, Pue-Bai-A-PM)的制备** Pue-A、Bai-A样品分别过80目筛后,取Pue-A 2.08 g, Bai-A 2.23 g,按物质的量比为1:1,涡旋20 min,制备得Pue-Bai-A-PM。

### 2.2 各固态的表征

**2.2.1 偏振光显微镜(polarizing microscope, PLM)观察** 将葛根素原料药、黄芩苷原料药、Pue-Bai-PM,喷雾干燥制备的Pue-A、Bai-A和Pue-Bai-CA粉末均匀洒在洁净的载玻片上,滴加液体石蜡适当

分散, 在偏光显微镜下观察, 图像信息用 D3K-MS 软件采集, 结果见图 1。葛根素原料药、黄芩苷原料药、Pue-Bai-PM 在偏光显微镜下观察到不规则块状, 具有双折射现象, 表明它们均为晶体形态; 而喷雾干燥制备的 Pue-A、Bai-A 和 Pue-Bai-CA 在偏光显微镜下不具有双折射现象, 表明它们均为无定形态。

**2.2.2 X 射线单晶衍射法 (X ray single crystal diffraction, XRD)** 分别取适量葛根素原料药、黄芩苷原料药、Pue-Bai-PM、喷雾干燥制备的 Pue-A、Bai-A、Pue-Bai-A-PM 和 Pue-Bai-CA, 采用 X 射线单晶衍射仪 Cu-K $\alpha$  靶测定, 管电压 50 kV, 管点流 1.0 mA, 步长 0.02°, 步时 10 s, 扫描范围  $2\theta$  5°~45°。各样品的 XRD 图谱如图 2 所示。葛根素原料药在  $2\theta$  为 8.0°、11.6°、13.6°、15.9°、16.8°、18.2°、18.9°、19.6°、21.1°、23.3° 等处出现晶体特征衍射峰, 黄芩苷原料药在  $2\theta$  为 8.5°、10.4°、12.4°、17.0°、

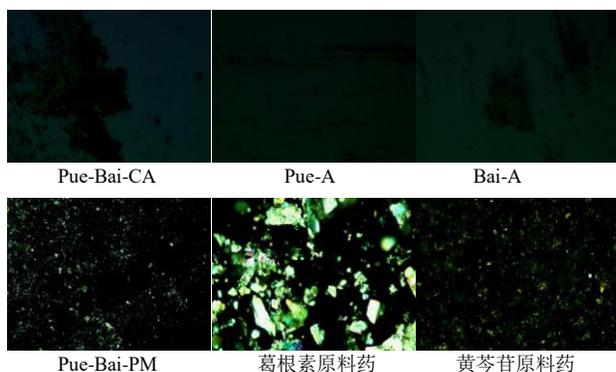
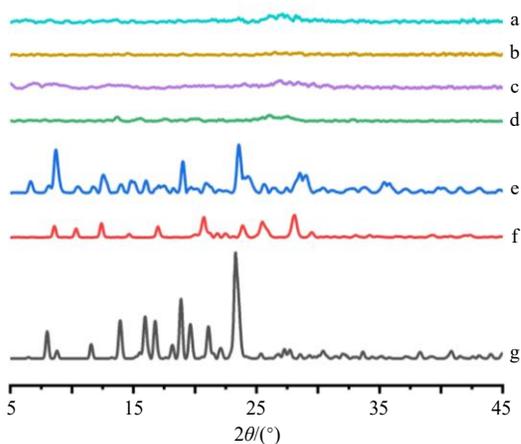


图 1 各样品的 PLM 图 ( $\times 100$ )

Fig. 1 PLM images of each sample ( $\times 100$ )



a-Pue-Bai-CA b-Pue-Bai-A-PM c-Bai-A d-Pue-A e-Pue-Bai-PM  
f-黄芩苷原料药 g-葛根素原料药, 图 4 同  
a-Pue-Bai-CA b-Pue-Bai-A-PM c-Bai-A d-Pue-A e-Pue-Bai-PM  
f-baicalin bulk drug g-puerarin bulk drug, same as Fig. 4

图 2 各样品的 XRD 图

Fig. 2 XRD of each sample

20.7°、23.8°、25.5°、28.1° 等处出现晶体特征衍射峰; Pue-Bai-PM 的衍射峰为 2 种原料药的简单叠加; 表明它们均为晶体形态。而喷雾干燥制备的 Pue-A、Bai-A、Pue-Bai-A-PM 和 Pue-Bai-CA 均呈现弥散衍射环, 表明它们均为无定形态。

**2.2.3 热重分析 (thermal gravity analysis, TGA)** 将葛根素原料药、黄芩苷原料药置于铝制样品池中, 氮气为氛围气, 体积流量为 25 mL/min, 升温速率 10 °C/min, 温度为 25~250 °C, 数据用 PerkinElmer Thermal Analysis 软件处理, 样品的 TGA 图如图 3 所示。葛根素原料药在 70~125 °C, 样品质量缓慢下降, 失重比例为 2.4%, 在 225 °C 左右快速陡峭的下降; 黄芩苷原料药在 60~140 °C 发生第 1 次缓慢下降, 失重比例为 4.2%, 在 200 °C 左右质量急剧下降。

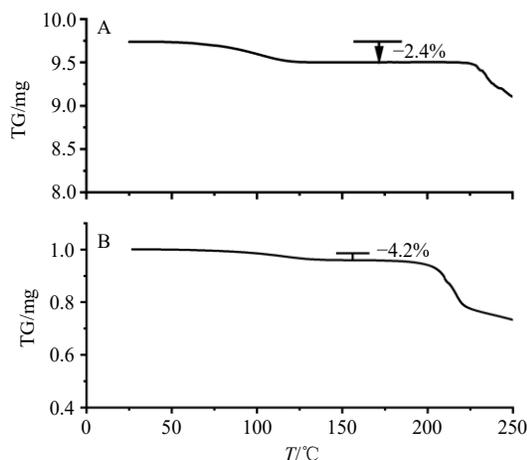


图 3 葛根素 (A) 和黄芩苷 (B) 的 TGA 曲线

Fig. 3 TGA curves of puerarin (A) and baicalin (B)

**2.2.4 差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 分析** 将葛根素原料药、黄芩苷原料药、Pue-A、Bai-A、Pue-Bai-PM、Pue-Bai-A-PM、Pue-Bai-CA 各 3~5 mg 置于坩埚内, 升温速率 10 °C/min, 升温范围为 30~250 °C, 数据用 Netzsch-Proteus 热分析软件 (Version 4.2) 处理, 各样品的 DSC 图谱如图 4 所示。葛根素原料药在 214.3 °C 处有 1 个吸热熔融峰, 黄芩苷原料药的吸热熔融峰在 213.5 °C, 2 种成分的吸热熔融峰相近, 物理混合物的吸热熔融峰重合且发生偏移。Pue-A、Bai-A、Pue-Bai-A-PM、Pue-Bai-CA 则出现单一的玻璃化转变温度 (glass transition temperature,  $T_g$ ), Pue-Bai-CA 系统 (图 4-a)、Pue-Bai-A-PM (图 4-b)、Bai-A (图 4-c) 和 Pue-A (图 4-d) 的  $T_g$  分别为 65.5、60.1、62.5、58.1 °C。

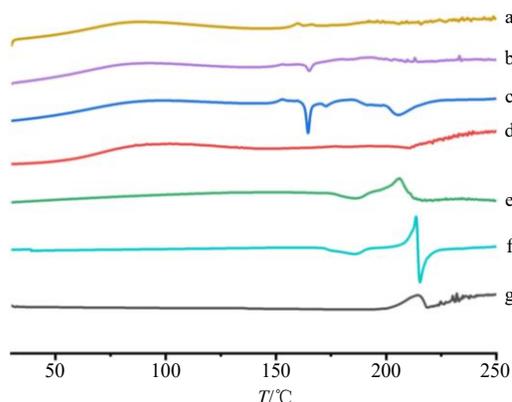


图4 各样品的DSC图

Fig. 4 DSC chart of each sample

以 Gordon-Taylor 方程 (eq.1) 计算 2 种组分理想状态混合的理论  $T_{g(mix)}$ , 计算得到 2 种组分的  $T_{g(mix)}$  值为 59.3 °C。结果显示, 实测值大于理论值, 且  $T_{g测}$  大于任一单体组分的  $T_g$ 。

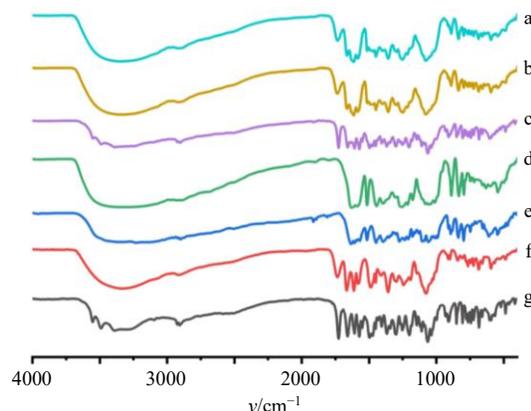
$$T_{g(mix)} = (w_1 T_{g1} + K w_2 T_{g2}) / (w_1 + K w_2) \quad (eq.1)$$

$T_{g(mix)}$  为共无定形的理论  $T_g$ ,  $T_{g1}$  和  $T_{g2}$  为各药物的  $T_g$ ,  $w_1$  和  $w_2$  为各药物的质量分数,  $K$  为常数

$$K = T_{g1} \rho_1 / T_{g2} \rho_2 \quad (eq.2)$$

$\rho_1$  和  $\rho_2$  为 2 种化合物各自的密度

**2.2.5 傅里叶变换红外光谱法 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)** 分别取葛根素原料药、黄芩苷原料药、Pue-Bai-PM、Pue-A、Bai-A、Pue-Bai-A-PM 和 Pue-Bai-CA 与 KBr 压片, 在 4000~400  $cm^{-1}$  扫描。数据经 Nicolet Omnic 红外光谱软件 (Version 8.0) 处理, 各样品的 FT-IR 图谱如图 5 所示。黄芩苷原料药 O-H 的特征吸收峰位于 3 389.8  $cm^{-1}$ , C=O 的特征吸收峰位于 1 659.9  $cm^{-1}$  且羟基特征峰峰形较宽; 葛根素原料药 O-H 的特征吸收峰位于 3 350.1  $cm^{-1}$ , C=O 的特征吸收峰位于 1 634.6  $cm^{-1}$ ; 2 者物理混合物的吸收峰为二者原料药吸收峰的叠加。振动峰的偏移和带宽的变化是分子相互作用的重要特征, 与原料药相比, Bai-A O-H 的吸收峰红移至 3 332.6  $cm^{-1}$ , C=O 吸收峰蓝移至 1 666.9  $cm^{-1}$ ; Pue-A O-H 的吸收峰红移至 3 307.8  $cm^{-1}$ , C=O 吸收峰红移至 1 631.1  $cm^{-1}$ 。Pue-Bai-A-PM 与 Bai-A 相比, 黄芩苷的 O-H 由 3 332.6  $cm^{-1}$  蓝移至 3 340.1  $cm^{-1}$ , C=O 由 1 666.9  $cm^{-1}$  红移至 1 664.2  $cm^{-1}$ ; 与 Pue-A 相比, 葛根素的 O-H 吸收峰由 3 307.8  $cm^{-1}$  蓝移至 3 340.1  $cm^{-1}$ , C=O 由 1 631.1  $cm^{-1}$  蓝移至 1 664.2  $cm^{-1}$ 。Bai-Pue-CA 与 Bai-A 相比, 黄芩苷的 O-H 由 3 332.6  $cm^{-1}$  蓝移至 3 343.9  $cm^{-1}$ ,



a-Pue-Bai-CA b-Pue-Bai-A-PM c-Pue-Bai-PM d-Pue-A e-葛根素原料药 f-Bai-A g-黄芩苷原料药  
a-Pue-Bai-CA b-Pue-Bai-A-PM c-Pue-Bai-PM d-Pue-A  
e-puerarin bulk drug f-Bai-A g-baicalin bulk drug

图5 FT-IR图

Fig. 5 FT-IR spectrum

C=O 由 1 666.9  $cm^{-1}$  红移至 1 663.7  $cm^{-1}$ ; 与 Pue-A 相比, 葛根素的 O-H 由 3 307.8  $cm^{-1}$  蓝移至 3 343.9  $cm^{-1}$ , C=O 由 1 631.1  $cm^{-1}$  蓝移至 1 663.7  $cm^{-1}$ 。

### 2.3 体外溶出度研究

**2.3.1 平衡溶解度的测定** 将过量的黄芩苷原料药加入纯水中, 37 °C 恒温摇床平衡 24 h, 滤过, 续滤液稀释适宜倍数后, HPLC 法测定平衡溶解度, 含量测定按照文献方法进行<sup>[20]</sup>。

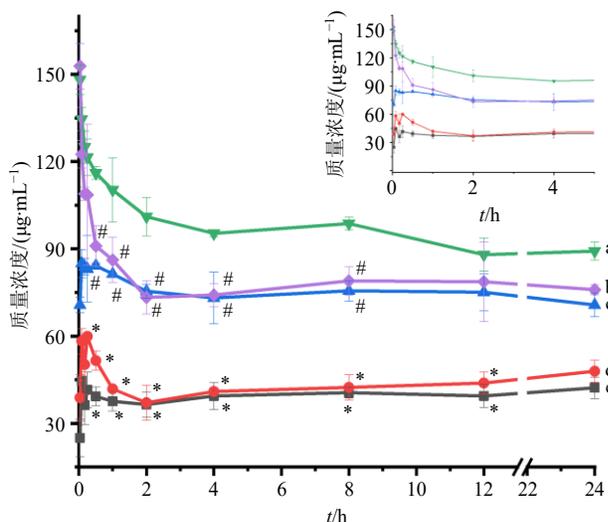
HPLC 色谱条件: 色谱柱为 Hypersil ODS2 (150 mm×4.6 mm, 5  $\mu m$ ) 柱; 流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液 (47:53); 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长 280 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10  $\mu L$ 。方法学考察结果表明, 在质量浓度 10.1~80.8  $\mu g/mL$  内, 黄芩苷峰面积与质量浓度呈现良好的线性关系, 线性回归方程为  $Y=28.755 X-14.667$ ,  $R^2=0.999 8$ 。

经 HPLC 法测得黄芩苷在水中的平衡溶解度为 (39.42±3.95)  $\mu g/mL$ 。

**2.3.2 过饱和粉末溶出实验** 分别取黄芩苷原料药、Bai-A、Pue-Bai-PM、Pue-Bai-A-PM 和 Pue-Bai-CA 样品过 80 目筛处理, 以避免粉末粒径差异引起的溶出差异。依照《中国药典》2020 年版通则 0931 溶出度与释放度测定法第 3 法, 根据黄芩苷平衡溶解度的测定结果, 选择超过平衡溶解度的质量浓度, 即取黄芩苷 200 mg 投入 100 mL 纯水中, 介质温度为 37 °C, 转速为 100 r/min, 分别于 2、5、10、15、30 min 及 1、2、4、8、12、24 h 取样 1 mL, 同时补充相同温度和相同体积的溶出介质。取出的溶液经 0.22  $\mu m$  滤膜滤过, 续滤液经适当稀释后, 采用

HPLC 法测定质量浓度，每份样品平行测定 3 次。以质量浓度-时间做溶出曲线图 (图 6)，梯形法计算质量浓度-时间曲线下面积 (AUC, 表 1)。

由表 1 可知，从整体动态趋势来看，Bai-A 在溶出介质中可以迅速达到最大质量浓度，但迅速下降至与原料药溶解度相近的稳定质量浓度，表现出明显的“弹簧”效应；Pue-Bai-PM 中黄芩苷溶出趋势与黄芩苷原料药相似，即质量浓度逐渐增加，于 2 h 后逐渐趋于平衡；Pue-Bai-CA 系统中黄芩苷在溶出介质中能迅速溶解，一开始便具有最高的表观质量浓度，随后先较快速下降，后缓慢下降表现出明显的“弹簧-降落伞”效应；Pue-Bai-A-PM 溶出趋势为开始便达到最高的表观质量浓度，随后迅速



a-Pue-Bai-CA b-Pue-Bai-A-PM c-Pue-Bai-PM d-Bai-A e-黄芩苷原料药  
与 Pue-Bai-CA 相比较: #*P*<0.05; 与 Pue-Bai-PM 组比较: \**P*<0.05

a-Pue-Bai-CA b-Pue-Bai-A-PM c-Pue-Bai-PM d-Bai-A  
c-baicalin bulk drug #*P*< 0.05 vs Pue-Bai-CA group; \**P*< 0.05 vs Pue-Bai-PM group

图 6 黄芩苷在纯水中的过饱和粉末溶出图 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 6 Dissolution diagram of baicalin supersaturated powder in ultrapure water ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

表 1 黄芩苷过饱和和粉末溶出的质量浓度-时间曲线下面积 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 1 Area under concentration-time curve of baicalin supersaturated powder dissolution ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

样品	AUC/( $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	样品	AUC/( $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
Pue-Bai-CA	2 241.35 ± 76.25	Bai-A	1 092.45 ± 55.18*
Pue-Bai-A-PM	1 895.79 ± 97.96#	黄芩苷原料药	949.41 ± 40.75*
Pue-Bai-PM	1 764.42 ± 123.06#		

与 Pue-Bai-CA 组比较: #*P*<0.05; 与 Pue-Bai-PM 组比较: \**P*<0.05  
#*P*< 0.05 vs Pue-Bai-CA group; \**P*< 0.05 vs Pue-Bai-PM group

下降到 Pue-Bai-PM 的溶出水平，表现出明显的“弹簧”效应。各时间点的溶出数据统计比较显示，在开始的一定时间内，黄芩苷的溶出大小为 Pue-Bai-CA 系统 ≈ Pue-Bai-A-PM > Pue-Bai-PM > Bai-A > 黄芩苷原料药；随着溶出时间的延长，黄芩苷的溶出大小为 Pue-Bai-CA 系统 > Pue-Bai-A-PM ≈ Pue-Bai-PM > Bai-A ≈ 黄芩苷原料药；相应各样品最大质量浓度分别为 148.1、152.8、85.0、59.9、44.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，分别为原料药溶解度的 3.8、3.9、2.2、1.5、1.1 倍。

整体溶出行为结果显示，各形态黄芩苷的 AUC 大小为 Pue-Bai-CA > Pue-Bai-A-PM ≈ Pue-Bai-PM > Bai-A ≈ 黄芩苷原料药，分别为黄芩苷原料药 AUC 的 2.4、2.0、1.9、1.2 倍。

2.3.3 相溶解度研究 分别将过量的黄芩苷投入 5 mL 含不同浓度 (0~3.84 mmol/L) 的葛根素水溶液中，于 37 °C、100 r/min 的条件下放置在恒温摇床中 48 h，溶液达到平衡后，将混悬液于 37 °C 下静置一段时间后取上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜，续滤液经适当稀释后采用 HPLC 法测定溶液中黄芩苷的浓度，每组样品平行测定 3 次。

如果组分葛根素和组分黄芩苷按式 (1) 形成 1 : 1 二元络合物。



溶液中形成的 1 : 1 的络合物的结合常数 ( $K_{1:1}$ ) 按公式 (2) 计算，溶液中葛根素以加入的浓度、黄芩苷以 HPLC 检测的浓度 2 个已知量表示，由公式 (2) ~ (4) 可得单组分黄芩苷的溶解度可按公式 (5) 计算得到，组分黄芩苷的浓度随着组分葛根素浓度的增加而线性增加。

$$K_{1:1} = [\text{葛根素-黄芩苷}] / [\text{葛根素}][\text{黄芩苷}] \quad (2)$$

$$[\text{黄芩苷}] = [\text{黄芩苷}]_0 \quad (3)$$

$$[\text{黄芩苷}]_T = [\text{黄芩苷}] + [\text{葛根素-黄芩苷}] \quad (4)$$

$[\text{黄芩苷}]_0$  表示当溶液中葛根素浓度为 0 时黄芩苷在溶液中的溶解度， $[\text{黄芩苷}]_T$  为黄芩苷的总浓度

$$[\text{黄芩苷}]_T = [\text{黄芩苷}]_0 + K_{1:1} [\text{黄芩苷}]_0 \times [\text{葛根素}] / (1 + K_{1:1} [\text{黄芩苷}]_0) \quad (5)$$

$[\text{葛根素}]$  为加入的葛根素浓度

以葛根素浓度为横坐标 ( $X$ )，黄芩苷浓度为纵坐标 ( $Y$ ) 做图 (图 7)，结果显示，黄芩苷浓度随葛根素浓度的增加而增加，二者接近直线关系，进行线性回归得方程  $Y = 0.00975X + 0.04847$ ， $R^2 = 0.98898$ ，表明二者线性关系成立，并由此得到结合常数  $K_{1:1}$  为 0.203，可知二者形成了 1 : 1 的复合物。

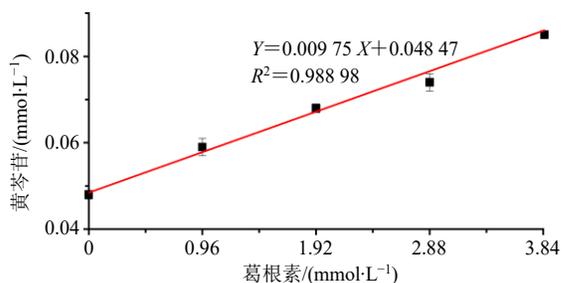


图 7 葛根素对黄芩苷在 37 °C 水中溶解度的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 7 Effect of puerarin concentration on solubility of baicalin in water at 37 °C ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

### 2.4 物理稳定性研究

**2.4.1 动态引湿性考察** 依照《药物引湿性试验指导原则》<sup>[21]</sup>, 取干燥的具塞玻璃称量瓶, 试验前 1 天置于 25 °C、相对湿度为 80% (下部放置氯化铵饱和溶液) 的恒温干燥器中, 24 h 后精密称定质量 ( $m_1$ )。分别称取各样品适量平铺于称量瓶内, 精密称定质量 ( $m_2$ )。将称量瓶敞口并和瓶盖置于盛有饱和溶液的干燥器中 24 h, 精密称定质量 ( $m_3$ ), 计算引湿率, 每组样品平行测定 3 份。

$$\text{引湿率} = (m_3 - m_2) / (m_2 - m_1)$$

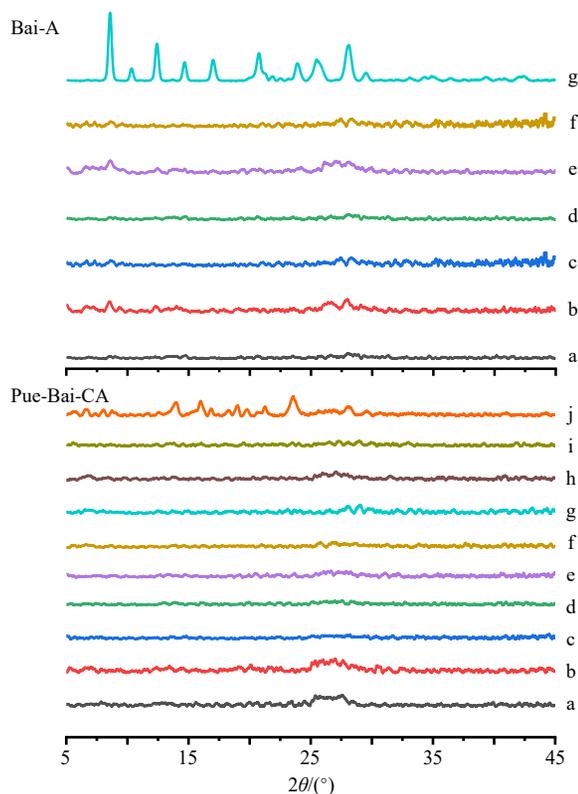
各样品的引湿性见表 2, 黄芩苷原料药的引湿率小于 0.2%, 表明其无或几乎无引湿性<sup>[21]</sup>; Pue-Bai-PM 的引湿率处于 0.2%~2.0%, 表明其略有引湿性<sup>[21]</sup>; Bai-A 和 Pue-Bai-CA 的引湿率位于 2.0%~15.0%, 显示它们有引湿性<sup>[21]</sup>, 且二者之间无明显差异。

**2.4.2 稳定性** 将新鲜制备的 Bai-A、Pue-Bai-CA 系统过 80 目筛后分别储存于 40 °C 盛有变色硅胶的干燥器以及 40 °C、相对湿度 75% 恒温恒湿干燥器中, 分别于 15、30、60、90、120 d 后取出, XRD 法分析测定样品的物理稳定性。无定形及共无定形样品在稳定性研究期间内 XRD 图谱如图 8 所示。无定形和共无定形样品在 40 °C 条件下放置 4 个月后 XRD 图谱无明显的衍射峰出现, 样品依然呈无定形态。在 40 °C、相对湿度 75% 条件下, Bai-A

表 2 样品引湿性考察结果 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 2 Moisture absorption results of samples ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

样品	引湿率/%	引湿性特征描述
黄芩苷原料药	0.11 ± 0.04	无或几乎无引湿性
Bai-A	6.15 ± 0.23	有引湿性
Pue-Bai-PM	0.94 ± 1.05	略有引湿性
Pue-Bai-CA	5.99 ± 0.02	有引湿性



a~e 分别为在 40 °C 条件下放置 0.5、1、2、3、4 个月; f~j 分别为在 40 °C、相对湿度 75% 条件下放置 0.5、1、2、3、4 个月  
a~e-stored at 40 °C for 0.5, 1, 2, 3 and 4 months respectively; f~j-stored at 40 °C and 75% relative humidity for 0.5, 1, 2, 3 and 4 months respectively

图 8 各样品在不同条件不同时间的 XRD 图

Fig. 8 XRD of each sample under different conditions and different time

样品 1 个月的 XRD 图谱出现晶体特征峰, Pue-Bai-CA 系统 4 个月的 XRD 图谱出现晶体特征峰, 且各峰强度小于 Bai-A 样品, 表明 Pue-Bai-CA 系统优于 Bai-A 样品。

**2.4.3 溶出稳定性** 分别取 40 °C 下放置 3 个月的 Bai-A 和 Pue-Bai-CA 样品, 过 80 目筛处理, 依照“2.3.2”项下方法测定 40 °C 下 3 个月的溶出稳定性, 结果如图 9 所示。Bai-A 和 Pue-Bai-CA 样品在此条件下 3 个月保持无定形态, 其溶出度与 0 月样品无明显差异。

### 3 讨论

葛根素晶体为一水合物<sup>[22]</sup>, 同时含有 6 个羟基, 黄芩苷分子式中含有 1 个羧基和 5 个羟基, 由于这些极性基团容易吸附空气中的水蒸气而使其具有一定的吸湿性<sup>[23]</sup>, 故 TGA 中葛根素和黄芩苷开始时缓慢损失的质量可能为水的质量, 随后分别在 225、200 °C 左右质量急剧下降, 应为原料药降解所致。

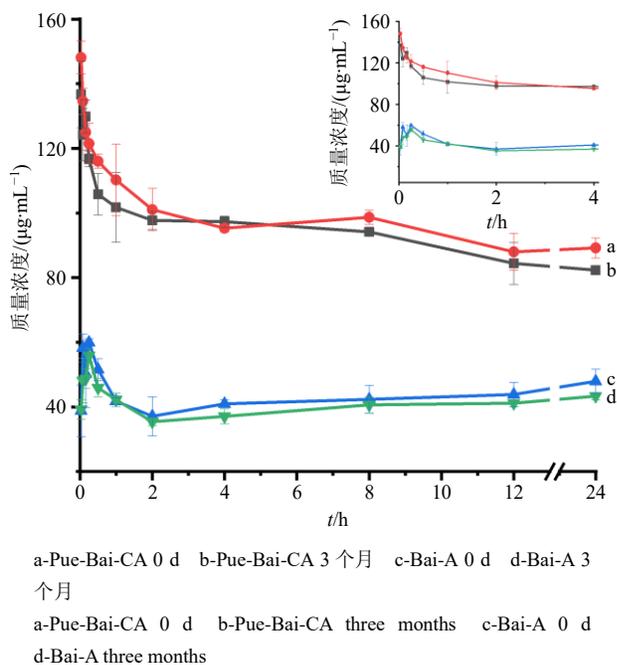


图 9 Bai-A 与 Pue-Bai-CA 放置不同时间后的溶出曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 Fig. 9 Dissolution curves of Bai-A and Pue-Bai-CA at different times ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

由此可知, 葛根素过熔点 214 °C 即分解, 黄芩苷未到熔点 213 °C 就开始分解, 据此, 不适宜采用熔融法制备其无定形样品, 因此, 本研究采用溶剂法制备各无定形样品。

喷雾干燥产物在偏振光显微镜下无晶体特有的双折射现象。XRD 图谱中仅能观察到 1 个较大的弥散状衍射环, 这些结果均显示通过喷雾干燥成功制备了无定形产品。当共无定形系统中 2 组分仅有一个  $T_g$  时, 表明 2 种组分形成了均相混合物<sup>[24]</sup>; 且当实验测得的值高于按 Gordon-Taylor 方程计算的理论值时, 表明 2 种组分之间存在正相互作用<sup>[25]</sup>。Pue-Bai-CA 喷干样品只有 1 个  $T_g$ , 且实验测得的值高于理论计算值, 表明共无定形系统中的葛根素和黄芩苷形成了均相混合物; 且 2 种组分之间存在正相互作用。FT-IR 结果显示, Pue-Bai-CA 系统中葛根素和黄芩苷的 O-H 与 C=O 吸收峰均发生了明显的偏移, 表明葛根素中的 O-H、C=O 与黄芩苷中的 C=O、O-H 间可能形成了分子间氢键, 进一步证明了 2 种组分间可能发生了相互作用。

与晶体药物相比, 无定形体系有更高的自由能, 在初始过程中可迅速溶解, 并达到过饱和状态, 但由于水的增塑作用, 无定形体系会在短时间内结晶, 失去其过饱和优势<sup>[26]</sup>, 因此, Bai-A、Pue-Bai-A-PM

及其 Pue-Bai-CA 均能在溶出介质中快速达到最大过饱和度。同时, Bai-A 的质量浓度快速下降到晶体溶出度的水平, 提示发生了重结晶而失去其过饱和和优势; Pue-Bai-A-PM 中黄芩苷的质量浓度则快速下降到 Pue-Bai-PM 中黄芩苷的质量浓度, 且高于 Bai-A 的质量浓度, 提示一方面葛根素对黄芩苷有增溶作用, 另一方面混合状态的 Pue-A 由于不与黄芩苷产生明显作用而处于独立状态, 因而未能进一步维持其溶出优势; Pue-Bai-CA 中的黄芩苷质量浓度则缓慢下降, 且在整个溶出过程中其质量浓度均高于 Pue-Bai-PM 中黄芩苷的质量浓度, 提示 Pue-Bai-CA 系统中的葛根素不仅对黄芩苷有增溶作用, 还有稳定黄芩苷无定形作用, 从而起到“降落伞”效应, 与文献报道的共无定形体系具有“降落伞”效应一致<sup>[27]</sup>。

为了进一步研究葛根素对黄芩苷增溶作用的机制, 进行了相溶解度研究。当难溶性化合物和可溶性化合物存在络合效应时, 难溶性化合物的溶解度曲线将随可溶性化合物的浓度变化而变化, 如果络合物可溶, 且难溶性成分的溶解度与可溶性成分浓度线性正相关, 则络合模型为  $A_L$  型<sup>[28]</sup>。本研究发现黄芩苷的浓度随葛根素的浓度线性增加, 表明 2 者形成了物质的量比为 1:1 的  $A_L$  型络合物。

$T_g$  和引湿性是影响无定形药物储存物理稳定性的重要因素, 一般认为  $T_g$  高于储存温度 50 °C 时, 无定形药物能保持良好的物理稳定性<sup>[29]</sup>, 引湿会增加分子的流动性而降低无定形药物的物理稳定性<sup>[7]</sup>。本研究发现 Bai-A 和 Pue-Bai-CA 系统在 40 °C 干燥条件下能稳定 4 个月, 可能与其有较高的  $T_g$  有关 (分别为 62.5 °C 和 65.5 °C)。当共无定形药物中 2 种药物存在强分子相互作用时有利于无定形系统的稳定<sup>[30]</sup>, Bai-A 与 Pue-Bai-CA 系统的吸湿性相近, 同时  $T_g$ 、FT-IR 及相溶解度研究均表明两者之间存在相互作用, 可能正是这种相互作用可以解释为什么在 40 °C、相对湿度 75% 时, Bai-A 1 个月即结晶, 而 Pue-Bai-CA 系统能稳定 3 个月以及在溶出过程中的“降落伞”效应。共无定形系统已成为一种有望提高难溶性药物无定形物理稳定性和溶出度的有效策略, 并有可能提高其口服生物利用度和治疗效果。Pue-Bai-CA 化可提高 Bai-A 的物理稳定性和溶出度, 提高 Bai-A 物理稳定性机制与提高其  $T_g$  及两者之间存在相互作用有关; 提高黄芩苷溶出度的机制与形成  $A_L$  形络合物及分子相互作用稳定溶出时的

无定形稳定性有关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Streubel A, Siepmann J, Bodmeier R. Drug delivery to the upper small intestine window using gastroretentive technologies [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2006, 6(5): 501-508.
- [2] Wang R N, Han J W, Jiang A, et al. Involvement of metabolism-permeability in enhancing the oral bioavailability of curcumin in excipient-free solid dispersions co-formed with piperine [J]. *Int J Pharm*, 2019, 561: 9-18.
- [3] Kasten G, Löbmann K, Grohganz H, et al. Co-former selection for co-amorphous drug-amino acid formulations [J]. *Int J Pharm*, 2019, 557: 366-373.
- [4] Wu W Q, Löbmann K, Rades T, et al. On the role of salt formation and structural similarity of co-formers in co-amorphous drug delivery systems [J]. *Int J Pharm*, 2018, 535(1/2): 86-94.
- [5] Shi X J, Song S J, Ding Z J, et al. Improving the solubility, dissolution, and bioavailability of ibrutinib by preparing it in a coamorphous state with saccharin [J]. *J Pharm Sci*, 2019, 108(9): 3020-3028.
- [6] Fung M H, DeVault M, Kuwata K T, et al. Drug-excipient interactions: Effect on molecular mobility and physical stability of ketoconazole-organic acid coamorphous systems [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(3): 1052-1061.
- [7] Chavan R B, Thipparaboina R, Kumar D, et al. Co amorphous systems: A product development perspective [J]. *Int J Pharm*, 2016, 515(1/2): 403-415.
- [8] Grohganz H, Priemel P A, Löbmann K, et al. Refining stability and dissolution rate of amorphous drug formulations [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2014, 11(6): 977-989.
- [9] Lu W D, Rades T, Rantanen J, et al. Inhalable co-amorphous budesonide-arginine dry powders prepared by spray drying [J]. *Int J Pharm*, 2019, 565: 1-8.
- [10] Korhonen O, Pajula K, Laitinen R. Rational excipient selection for co-amorphous formulations [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2017, 14(4): 551-569.
- [11] 孙元芳, 李冰冰, 关永霞, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨柴银颗粒抗冠状病毒感染潜在分子机制 [J]. *中草药*, 2020, 51(19): 4999-5009.
- [12] 任伟光, 郭丽丽, 张翠英. 葛根苓连汤的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. *中国新药杂志*, 2021, 30(18): 1675-1679.
- [13] 袁慕荣, 王汝上. 小儿热速清颗粒 UPLC 指纹图谱及 5 种成分含量测定研究 [J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(12): 1517-1522.
- [14] 严谨, 王芙蓉, 史海龙. 基于网络药理学探讨“葛根-黄芩”药对治疗糖尿病作用机制分析 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2018, 41(5): 173-177.
- [15] 沈佳妍, 徐婧淇, 刘淼, 等. 天然黄酮类化合物改善酒精性肝病作用及机制的研究进展 [J]. *中南药学*, 2022, 20(2): 371-381.
- [16] 王磊, 柴士伟. 葛根素治疗糖尿病及其并发症研究进展 [J]. *天津药学*, 2021, 33(4): 60-65.
- [17] 徐锋, 陈滕, 汪祖华, 等. 黄芩抗糖尿病作用与机制的近几年研究进展 [J]. *环球中医药*, 2022, 15(2): 342-348.
- [18] 张伯礼, 王永炎, 商洪才. 组分配伍研制现代中药的理论和方法 [J]. *继续医学教育*, 2006, 20(19): 89-91.
- [19] 张艺竹, 安靓, 袁瑾, 等. 基于药代动力学参数分析比较葛根苓连汤的不同配伍肠吸收特性 [J]. *药学学报*, 2013, 48(10): 1611-1617.
- [20] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 434.
- [21] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 485.
- [22] 仲昭毅, 吴敏, 钱帅, 等. 聚乙烯吡咯烷酮抑制葛根素一水合物在溶出过程中向二水合物的转变 [J]. *药学报*, 2017, 52(2): 302-309.
- [23] 王雅洁, 贾艾玲, 汤成成, 等. 温度和相对湿度对黄芩苷吸湿性的影响和模型拟合研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(2): 310-315.
- [24] 王星星, 孟旭. 共无定形给药系统研究进展 [J]. *中国药事*, 2019, 33(5): 544-554.
- [25] Baird J A, Taylor L S. Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(5): 396-421.
- [26] Guzmán H R, Tawa M, Zhang Z, et al. Combined use of crystalline salt forms and precipitation inhibitors to improve oral absorption of celecoxib from solid oral formulations [J]. *J Pharm Sci*, 2007, 96(10): 2686-2702.
- [27] Wang S R, Heng W L, Wang X J, et al. Coamorphization combined with complexation enhances dissolution of lurasidone hydrochloride and puerarin with synchronized release [J]. *Int J Pharm*, 2020, 588: 119793.
- [28] Higuchi T, Connors K A. Phase-solubility techniques [J]. *Adv Anal Chem Instr*, 1965, 4: 117-122.
- [29] Rams-Baron M, Jachowicz R, Boldyreva E, et al. Amorphous drug formulation [A] // Rams-Baron M, Jachowicz R, Boldyreva E, et al. *Amorphous Drugs* [M]. Cham: Springer International Publishing, 2018: 159-223.
- [30] Liu W, Liu Y, Huang J Q, et al. Identification and investigation of the vibrational properties of crystalline and co-amorphous drugs with Raman and terahertz spectroscopy [J]. *Biomed Opt Express*, 2019, 10(8): 4290-4340.

[责任编辑 郑礼胜]