

白藜芦醇-牛磺脱氧胆酸钠共无定形体系改善溶解度和物理稳定性

李 珏¹, 姜 飞¹, 李慧丽¹, 沈祥春¹, 贺智勇¹, 易媛丹², 刘 文^{1*}, 陶 玲^{1*}

1. 贵州医科大学药学院, 贵州省特色天然药物资源高效利用工程中心, 贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价特色重点实验室, 贵州医科大学-贵阳市联合重点实验室, 天然药物资源优效利用重点实验室, 贵州 贵阳 550006
2. 贵州省妇幼保健院, 贵州 贵阳 550000

摘要: 目的 通过共无定形体系 (coamorphous system, CAS) 来改善和提升白藜芦醇 (resveratrol, Res) 的溶解度和物理稳定性。方法 通过溶剂挥发法进行白藜芦醇-牛磺脱氧胆酸钠 (sodium taurodeoxycholate, STD) 共无定形体系 (Res-STD-CAS) 制备研究, 考察了最佳物质的量比; 利用粉末 X 射线衍射、傅里叶变换红外光谱、拉曼光谱、固态核磁、差示扫描量热分析和扫描电子显微镜等技术表征其固态特征, 并考察其在不同 pH 值缓冲液中的溶解度, 进一步研究其吸湿性和物理稳定性。结果 固态表征结果显示, 白藜芦醇与 STD 形成了具有单一玻璃化转变温度的 CAS, 且存在分子间氢键作用; 溶解度结果显示, 在 Res-STD-CAS 物质的量比为 1:1、1:2、1:3 的 CAS 中, 白藜芦醇的溶解度均高于其原料药及其物理混合物; 在 40 °C、75%相对湿度条件下, 其稳定性高达 3 个月。结论 Res-STD-CAS 大幅提高了白藜芦醇的溶解度, 并具有良好的物理稳定性。

关键词: 白藜芦醇; 牛磺脱氧胆酸钠; 共无定形体系; 增溶; 溶解度; 稳定性; 溶剂挥发法; 吸湿性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)21-7248-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.21.006

Resveratrol-sodium taurodeoxycholate coamorphous system improves solubility and physical stability

LI Jue¹, JIANG Fei¹, LI Huili¹, SHENG Xiangchun¹, HE Zhiyong¹, YI Yuandan², LIU Wen¹, TAO Ling¹

1. Guizhou Province Specialized Natural Medicine Resource Efficient Utilization Engineering Center, Specialized Key Laboratory of Pharmacology and Pharmacological Evaluation of Natural Medicines in Guizhou Higher Education Institutions, Guizhou Medical University Guiyang Joint Key Laboratory, Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicine Resources, School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550006, China
2. Guizhou Maternal and Child Health Care Hospital, Guiyang 550000, China

Abstract: Objective The solubility and physical stability of resveratrol (Res) are improved and promoted through coamorphous system (CAS). **Methods** Resveratrol-sodium taurodeoxycholate coamorphous system (Res-STD-CAS) was prepared by solvent volatilization method and the optimal molar ratio was investigated. Powder X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, raman spectroscopy, solid state nuclear magnetism, differential scanning calorimetry and scanning electron microscope were used to racterise the solid state properties, and its solubility in buffers with different pH values was investigated, and its hygroscopicity and physical stability were further study. **Results** The solid-state characterization results showed that resveratrol and STD formed a CAS with a single glass transition temperature, and there was intermolecular hydrogen bonding. The solubility results showed that the solubility of resveratrol was higher than that of its raw material and its physical mixture in the CAS with the molar ratios of Res-STD-CAS of 1:1, 1:2 and 1:3. It is stable for up to three months at 40 °C and 75% relative humidity. **Conclusion** Res-STD-CAS greatly improves the solubility of resveratrol and has good physical stability.

收稿日期: 2024-04-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82260827); 国家自然科学基金资助项目 (U1812403-4-4); 贵州省自然科学基金资助项目 ([2020]1Z069); 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2020] 4Y240 号); 贵州省高层次人才十层次人才项目 (黔科合平台人才-GCC [2023]048); 贵州省科技创新基地 (黔科合中引地[2023]003)

作者简介: 李 珏, 硕士研究生, 研究方向为药物共无定形。E-mail: 18198134063@163.com

***通信作者:** 陶 玲, 教授, 博士生导师, 研究方向为药物制剂新技术与新剂型。E-mail: taoling@gmc.edu.cn

刘 文, 教授, 博士生导师, 研究方向为药物制剂新技术与新剂型。E-mail: liuwen16258@126.com

Key words: resveratrol; sodium taurodeoxycholate; coamorphous system; solubilization; solubility; stability; solvent evaporation method; hygroscopicity

白藜芦醇是一种天然存在的二苯乙烯类化合物,广泛存在于多种植物中,如虎杖、松树、葡萄、浆果等^[1]。研究表明,白藜芦醇具有广泛的药理活性,包括抗炎、抗氧化、抗肥胖、抗癌、心脏保护和抗衰老等^[2-6];同时,其在临床、化妆品、膳食补充剂和食品领域都有广泛应用^[7]。由于白藜芦醇属于生物制药分类系统(biopharmaceutical classification system, BCS) II 类产品,具有高渗透性和高吸收性,但其水溶性很差,代谢快,并通过葡萄糖醛酸化和硫酸化途径清除,生物利用度低,限制了其在临床和日常保健中作用的充分发挥^[8-9]。因此,提高白藜芦醇的溶解度是提高其生物利用度的关键。

药物的晶型与药剂学性能和药效密切相关。在无定形形式中,分子的排列是长程无序的,具有较高的吉布斯自由能,在溶出过程中,不需要克服晶格能的限制^[10],溶解度和溶出速率较高,可以提高其体内吸收并改善疗效^[11-12]。然而,高能量、无定形形式增强药物溶解度,是以低热力学稳定性为代价的,并且由于药物在与溶解介质接触时或在储存期间的快速重结晶,可能导致其溶出性能和体内药效的改变^[13-14],产生新的物理不稳定性。

与单独的无定形药物形式相比,无定形固体分散体(amorphous solid dispersion, ASD)中,无定形药物的玻璃化转变温度(glass-transition temperature, T_g)会变高^[15],以及药物与聚合物之间的相互作用,降低了药物分子的运动性,稳定其无定形态,削弱了药物的成核能力和结晶能^[16],表现出显著改善其稳定性。然而,ASD 中需要添加大量的聚合物以实现足够的药物负载,最终导致制剂的质量和体积较大^[17-18]。此外,通常使用的亲水性聚合物(比如聚乙烯基吡咯烷酮和羟丙基甲基纤维素)容易吸收水分,水作为增塑剂会降低 ASD 的 T_g ,加速相分离,导致其转化为稳定的结晶形式^[19]。以上这些缺点限制了无定形药物固体分散体的商业化应用。

近年来,共无定形体系(coamorphous system, CAS)成为了替代 ASD 的一种有效方法,并日益受到关注。CAS 是指由原料药和低分子辅料或药物等共形成体组成的均匀单相无定形材料,各组分之间通过非共价键相互作用连接,甚至没有分子间相互

作用^[20-21]。药物和小分子添加剂之间的氢键和离子键等非共价相互作用,提供了使药物呈现和保持无定形形式的途径,不仅能改善药物的溶解度,而且具有较好的稳定性。Löbmann 等^[20]证明了氨基酸等通过形成 CAS,稳定无定形药物的能力;除了提供物理稳定性外,与精氨酸共无定形化也改善了吡哌美辛片的溶出性能^[22];硝苯地平与缬沙坦形成 CAS 后,体外溶出度分别提高了 5.66 倍和 1.61 倍,体内最大血药浓度(maximum blood concentration, C_{max})分别提高了 3.63 倍和 2.19 倍,硝苯地平的口服生物利用度显著增加^[23]。因此,CAS 对于难溶性药物口服固体制剂的研发,具有广阔的应用前景。

胆盐(bile salt)是由肝细胞分泌的胆汁酸与甘氨酸或牛磺酸结合而形成的钠盐或钾盐,包含 2 个六元环结构,它们以一种独特的弯曲形状以顺式结构连接,在凹面为 α 端亲水,在凸面为 β 端疏水^[24];其具有特殊的表面活性能力,有助于提高难溶性药物的溶解度;研究还发现,胆盐独特的结构特征,可防止药物在胃肠道过饱和条件下的重结晶,以改善难溶性药物的口服吸收^[25]。例如在牛磺胆酸钠与卡马西平、吡哌美辛和甲芬那酸均以 1:1 的物质的量比形成的 CAS 中,牛磺胆酸钠在 CAS 中具有显著地促进共形成体药物的溶解优势,以及提高其物理稳定性和溶出速率^[25]。

实验室前期以溶解度为考察指标,通过溶剂挥发法,将胆酸钠(sodium cholate, SC)、脱氧胆酸钠(sodium deoxycholate, SDC)、牛磺胆酸钠(sodium taurocholate, STC)和牛磺脱氧胆酸钠(sodium taurodeoxycholate, STD)4 种胆盐,分别与白藜芦醇进行了 CAS 制备的预实验考察。本研究根据预实验结果,选择与白藜芦醇形成 CAS 体系后溶解度最好的 STD,制备白藜芦醇-STD 共无定形体系(resveratrol-STD coamorphous system, Res-STD-CAS),继续进行 STD 与白藜芦醇不同物质的量比对白藜芦醇溶解度影响的考察,并对其固态特征进行粉末 X 射线衍射(powder X-ray diffraction analysis, PXRD)、傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)、拉曼光谱、固态核磁和差示扫描量热(differential scanning calorimetry, DSC)分析等表征,并对其吸湿性和稳定性进行评估,为后期 Res-STD-CAS 的生物利用度

等体外和体内研究奠定实验基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

R-1001W 型旋转蒸发仪, 购自郑州长城有限公司; K-98-II 型电热恒温水浴锅, 购自天津市泰斯特仪器有限公司; SHZ-88 型水浴恒温振荡箱, 购自江苏省金坛市医疗仪器厂; FTIR-650 型傅里叶变换红外光谱仪, 购自天津港东科技发展股份有限公司; UltiMate 3000 型高效液相色谱仪, 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; UPW-UP-10 型纯水仪, 购自成都天萃宁科技有限公司; Ulitma IV 型 X 射线衍射仪, 购自日本株式会社理学公司; DSC 1 专业型热分析仪器, 购自瑞士梅特勒托利多仪器有限公司; Quanta FEG 250 型扫描电子显微镜 (SEM), 购自美国 FEI 公司; Bruker Avance III-500 MHz 型核磁共振波谱仪, 购自德国布鲁克分析仪器公司。

1.2 试剂

白藜芦醇原料药, 质量分数 $\geq 95\%$, 批号 CHB-B-022, 购自成都克洛玛生物科技有限公司; 白藜芦醇对照品, 质量分数 98.0% , 批号 BD4672, 购自毕得医药有限公司; STD 原料药, 质量分数 95% , 批号 BD152418, 购自毕得医药有限公司; 无水乙醇、无水甲醇, 分析纯, 均购自国药集团化学试剂有限公司; 乙腈, 色谱纯, 购自弗顿科学有限公司; 溴化钾 (KBr), 批号 P-77581, 购自天津希恩思生化科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 Res-STD-CAS 的制备

采用溶剂挥发法进行制备。溶剂挥发法是将完全溶解的药物在较低的温度下进行真空旋转蒸发, 使溶剂挥发析出药物, 得到药物无定形形态的一种方法。参考文献报道^[26]的温度及溶剂, 本研究将白藜芦醇 (0.4 mmol , 91.3 mg) 和 STD 分别以 $1:1$ 、 $1:2$ 、 $1:3$ 的物质的量比混合均匀, 加入适量甲醇溶解, 再于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下减压蒸发除去溶剂, 所得白色固体分别是物质的量比为 $1:1$ 、 $1:2$ 、 $1:3$ 的白藜芦醇和 STD 共无定形药物, 分别表示为 Res-STD-CAS-1、2、3, 将粉末刮下, 收集到密封的样品管中, 备用。单独的白藜芦醇和 STD 也采用同法制备后收集, 备用。分别精密称取相应质量, 搅拌均匀制备物理混合物 (physical mixture, PM), 物质的量比为 $1:1$ 、 $1:2$ 、 $1:3$ 的白藜芦醇和 STD 物理混合物分别表示为 Res-STD-PM-1、2、3。

2.2 Res-STD-CAS 的固态表征

2.2.1 PXRD 分析 所有样品的 PXRD 光谱采集在 X 射线衍射仪上进行, $\text{CuK}\alpha$ 辐射源。检测条件: 扫描范围 2θ 为 $5^{\circ}\sim 50^{\circ}$, 步长 0.02° , 扫描速率 $10^{\circ}/\text{min}$ 。各样品的 PXRD 图谱如图 1 所示, 白藜芦醇和 STD 原料药均出现晶体衍射峰, 经过旋转蒸发法制备过程处理的白藜芦醇与其原料药相比, 衍射峰在位置上无变化, 但衍射峰的大小发生了变化, 可能是由于经过旋转蒸发法制备的白藜芦醇晶型发生了变化, 而经过旋转蒸发法制备过程处理的 STD 衍射峰消失, 表明其形成了无定形。Res-STD-PM-1 的 PXRD 图基本是原料药 PXRD 图谱的叠加, 而在 Res-STD-CAS-1、2、3 中均未出现晶体衍射峰, 结合前文相同的制备条件下白藜芦醇无法产生无定形的结果, 表明白藜芦醇与 STD 形成了共无定形复合物, 而不是两者的简单物理混合。

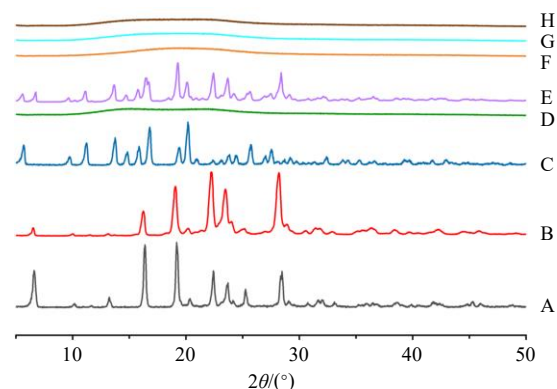


图 1 白藜芦醇原料药 (A)、制备后的白藜芦醇 (B)、STD 原料药 (C)、制备后的 STD (D)、Res-STD-PM-1 (E) 及 Res-STD-CAS-1 (F)、2 (G)、3 (H) 的 PXRD 图

Fig. 1 PXRD patterns of resveratrol bulk drug (A), prepared resveratrol (B), STD bulk drug (C), prepared STD (D), Res-STD-PM-1 (E), and Res-STD-CAS-1 (F), 2 (G), 3 (H)

2.2.2 FT-IR 分析 使用 KBr 压片法采集各样品的 FT-IR 图谱。将约 2 mg 样品和 150 mg KBr 研磨成粉末, 并使用平板仪器将其压缩成透明薄片。每个样品在 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 进行扫描、分辨率设置为 4 cm^{-1} , 扫描次数为 32 次。氢键是共无定形中最常见的弱相互作用, 可以通过对 FT-IR 中与氢键相关特征峰的变化, 来推测体系中 2 种物质相互作用的氢键行为。在白藜芦醇中, 含有氢键受体 C-O 键和氢键供体 O-H 键; 在 STD 中, 含有氢键受体 C=O、S-O 和氢键供体 N-H, 因此, 应着重分析这些氢键的 FT-IR 特征峰的变化情况。白藜芦醇原料药、STD

原料药、Res-STD-CAS 及 Res-STD-PM-1 的 FT-IR 如图 2 所示。白藜芦醇原料药光谱中, $3\,224\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收带是由酚羟基引起的-OH 伸缩振动, 白藜芦醇的强吸收带在 $1\,633$ 、 $1\,573\text{ cm}^{-1}$ 处归因于苯环 C=C 的伸缩振动。STD 原料药在 $3\,648\text{ cm}^{-1}$ 处显示出 1 个较弱的 O-H 伸缩振动峰, 在 $3\,270$ 、 $1\,646\text{ cm}^{-1}$ 处显示出强的 N-H、C=O 伸缩振动带, STD 的 SO_3^- 在 $1\,199$ 、 $1\,054\text{ cm}^{-1}$ 处有较强的振动峰。Res-STD-CAS-1、2、3 相比于原料白藜芦醇和 STD 的特征峰, O-H 峰分别移动至 $3\,426$ 、 $3\,392$ 、 $3\,405\text{ cm}^{-1}$, C=O 峰分别移动至 $1\,664$ 、 $1\,619$ 、 $1\,616\text{ cm}^{-1}$, 且伸缩振动谱带变宽; SO_3^- 振动峰分别移动至 $1\,164\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,043\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\,157\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,031\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\,155\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,027\text{ cm}^{-1}$ 。以上结果证实了白藜芦醇的酚羟基与 STD 的 C=O 和磺酸基团参与了氢键的形成。

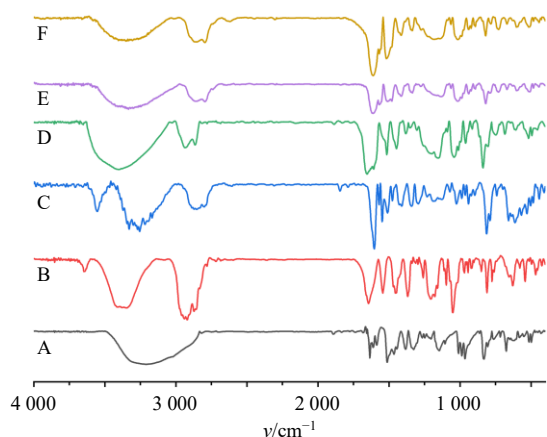


图 2 白藜芦醇原料药 (A)、STD 原料药 (B)、Res-STD-PM-1 (C) 及 Res-STD-CAS-1 (D)、2 (E)、3 (F) 的 FT-IR 图
Fig. 2 FT-IR spectra of resveratrol bulk drug (A), STD bulk drug (B), Res-STD-PM-1 (C), and Res-STD-CAS-1 (D), 2 (E), 3 (F)

2.2.3 DSC 分析 采用 DSC 法考察 Res-STD-CAS 及其原料的热行为。检测条件: 氮气气氛, 升温速度 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 温度范围 $30\sim 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。白藜芦醇原料药的 DSC 谱图 (图 3) 显示, 在 $272.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处有一尖锐的熔融峰, 证实了白藜芦醇原料药为晶型。STD 的 DSC 谱图在 $203.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 有一较宽的熔融峰。在 Res-STD-PM-1 中 $210.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处对应 STD 的熔融峰, $259.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处对应白藜芦醇的熔融峰。对于 Res-STD-CAS-1、2、3 观测到白藜芦醇和 STD 的熔融峰消失 (图 3), 说明形成了新相, 证实了共无定形的形成。Res-STD-CAS-1、2、3 的 T_g 分别为 127.2 、 144.2 、 $150.8\text{ }^{\circ}\text{C}$, 随着 STD 比例的增加, T_g 越高, 说明 STD

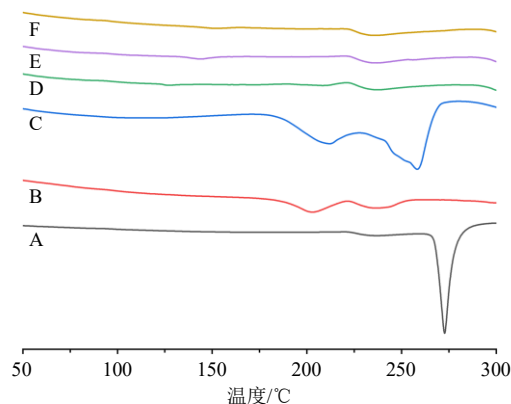


图 3 白藜芦醇原料药 (A)、STD 原料药 (B)、Res-STD-PM-1 (C) 及 Res-STD-CAS-1 (D)、2 (E)、3 (F) 的 DSC 图
Fig. 3 DSC spectra of resveratrol bulk drug (A), STD bulk drug (B), Res-STD-PM-1 (C), and Res-STD-CAS-1 (D), 2 (E), 3 (F)

有利于提高白藜芦醇的物理稳定性。

2.2.4 拉曼光谱分析 取适量各样品, 平铺于载玻片表面, 进行拉曼光谱测定。扫描范围 $2\,000\sim 400\text{ cm}^{-1}$, 设置激发光波长 583 nm , 激发光功率 200 mW , 平均扫描次数 3, 分辨率 $2\sim 3\text{ cm}^{-1}$ 。拉曼光谱可以提供分子结构的许多信息, 如分子键振动、结晶度、分子间相互作用等。在拉曼光谱中, 晶体结构样品的拉曼光谱峰强而尖锐, 而无定形形态的样品, 由于其结构的结晶度降低, 无序度增加, 导致无定形形态样品的拉曼光谱峰弱而宽^[27]。如图 4-D~F 所示, 白藜芦醇与 STD 形成 Res-STD-CAS 后, 拉曼光谱峰变宽且变弱, 部分峰发生简并、消失等现象。如图 4-A 的拉曼光谱中, 白藜芦醇在 $3\,300\text{ cm}^{-1}$ 以上应有 O-H 的伸缩振动, 但该拉曼光谱峰较弱, 在图中不显示, $3\,145\text{ cm}^{-1}$ 为苯环上 C-H 的伸缩振动峰, $1\,624$ 、 $1\,599\text{ cm}^{-1}$ 处的峰为苯环上 C-H 的弯曲振动峰, $1\,256\text{ cm}^{-1}$ 为羟基氢的弯曲振动峰。在 STD 中 $3\,407\text{ cm}^{-1}$ 处为 N-H 的伸缩振动峰, $2\,872$ 、 $2\,957\text{ cm}^{-1}$ 处为 STD 环上 C-H 的伸缩振动峰, $1\,348\text{ cm}^{-1}$ 为磺酸基的 S-O 键的振动峰。在 Res-STD-CAS 中白藜芦醇 $1\,256\text{ cm}^{-1}$ 处的羟基氢的弯曲振动峰移动至 $1\,260\text{ cm}^{-1}$, STD $1\,348\text{ cm}^{-1}$ 处 S-O 键的振动峰移动至 $1\,353\text{ cm}^{-1}$ 处, 在 Res-STD-PM-1 中并未发生波数的移动, 说明在 Res-STD-CAS 中, 白藜芦醇的酚羟基可能与 STD 的磺酸基发生了相互作用。

2.2.5 固态核磁共振氢谱 (solid-state $^1\text{H-NMR}$, ss $^1\text{H-NMR}$) 分析 采集 ss $^1\text{H-NMR}$ 谱图, 旋转速率

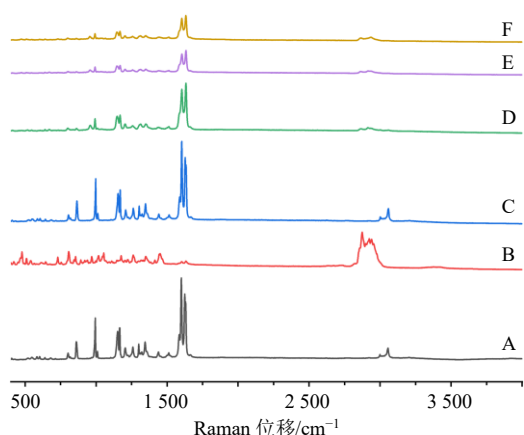


图 4 白藜芦醇原料药 (A)、STD 原料药 (B)、Res-STD-PM-1 (C) 及 Res-STD-CAS-1 (D)、2 (E)、3 (F) 的拉曼光谱图

Fig. 4 Raman spectra of resveratrol bulk drug (A), STD bulk drug (B), Res-STD-PM-1 (C) and Res-STD-CAS-1 (D), 2 (E), 3 (F)

为 14 kHz, ^1H 化学位移外部参考 TMS ($\delta 0$)。图 5 为白藜芦醇原料药、STD 原料药及 Res-STD-CAS 的 ss ^1H -NMR 结果, 用 ss ^1H -NMR 证实了共无定形的形成。由于 ss ^1H -NMR 的分辨率较液态核磁低, 导致明显的峰展宽及合并, 使得峰分配具有挑战性。在白藜芦醇中, $\delta 6.06 \sim 8.84$ 为白藜芦醇苯环上的氢, $\delta 9.07 \sim 10.56$ 为酚 O-H 上的氢; 在 STD 中, $\delta 4.35 \sim 5.52$ 为 O-H 上的氢, $\delta 9.51$ 处为酰胺基团中 N-H 上的氢, 由图 5 可知, Res-STD-PM-1 的 ss ^1H -NMR 只是白藜芦醇和 STD 的 ss ^1H -NMR 谱的简单叠加, 并未发生相互作用, 而在 Res-STD-CAS 中 $\delta 9.07 \sim 10.56$ 处酚羟基峰的化学位移发生了变化, 且

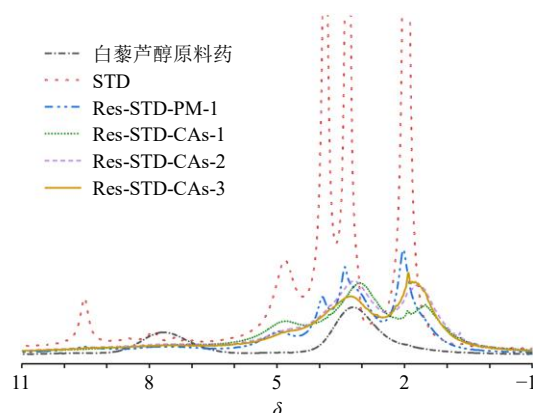


图 5 各样品的 ss ^1H -NMR 图

Fig. 5 ss ^1H -NMR spectra of each sample

峰变宽, 说明白藜芦醇的酚羟基可能与 STD 上的基团发生了相互作用。

2.2.6 SEM 观察外观形貌 用 SEM 观察各样品的形貌, 样品被安装在双面胶带上, 用金溅射。在 5 kV 加速电压下拍摄 SEM 照片, 观察外观形貌。原料药的结晶习惯 (形态) 是制药过程中的一个重要参数, 它影响着药物粉末的流动特性和压实特性等各种制药参数^[28]。图 6 为白藜芦醇原料药、STD 原料药及采用旋转蒸发法制备后的白藜芦醇、STD 和 Res-STD-CAS 的 SEM 显微图, 观察了各样品的外观形貌和颗粒形状。白藜芦醇原料药的晶体呈规则棒状, 制备后白藜芦醇晶体呈片状堆积, STD 原料药的晶体呈规则的块状, 制备后的 STD 呈凹凸不平且光滑的片状。Res-STD-CAS 的 SEM 照片显示为不规则的块状药物, 表面光滑, 此外, 不存在游离药物晶体, 表明形成了均匀的分散体, 与白藜芦醇相比有显著的物理转变, 这与前述 PXRD 固态表征

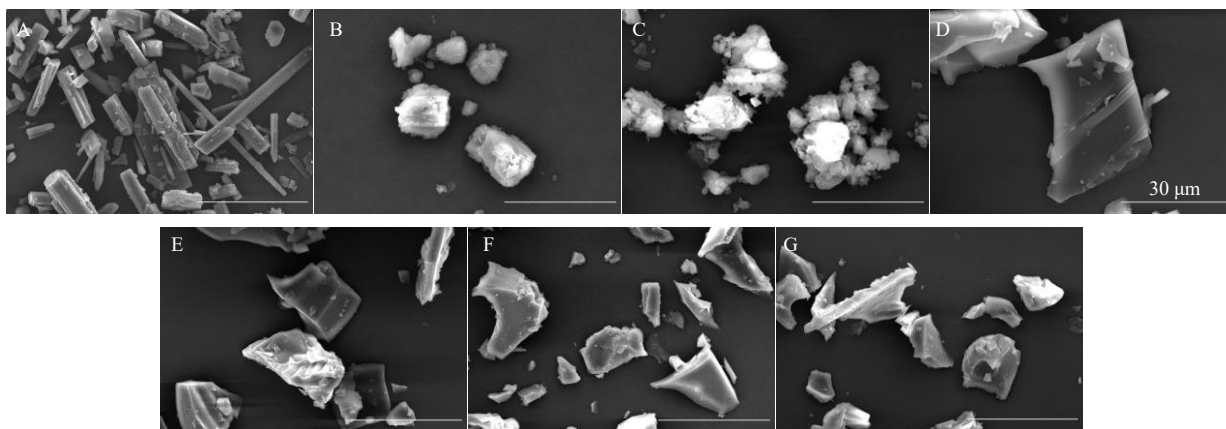


图 6 白藜芦醇原料药 (A)、制备后的白藜芦醇 (B)、STD 原料药 (C)、制备后的 STD (D) 及 Res-STD-CAS-1 (E)、2 (F)、3 (G) 的 SEM 图

Fig. 6 SEM images of resveratrol bulk drug (A), resveratrol after preparation (B), STD bulk drug (C), STD after preparation (D) and Res-STD-CAS-1 (E), 2 (F), 3 (G)

结果一致。Res-STD-CAS-3 内部有不均匀的孔隙存在,这可能与溶解度增强相关。

2.3 白藜芦醇含量测定方法学考察

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm); 检测波长为 306 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL; 流动相为甲醇-水溶液 (58:42), 等度洗脱。

2.3.2 对照品溶液的配制 精密称取白藜芦醇对照品 10.6 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加入适量甲醇超声 5 min 使其溶解, 放至室温后加入 50%乙醇定容得白藜芦醇质量浓度为 212 μg/mL 的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 称取适量 Res-STD-CAS-1 置于 5 mL EP 管中, 分别悬浮在 0.1 mol/L HCl 盐酸缓冲液、pH 4.5 磷酸盐缓冲液 (PBS)、pH 6.8 PBS 和纯水中, 在 37 °C 下振荡 24 h, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 精密吸取适量, 然后用 50%乙醇溶液将续滤液稀释到 HPLC 测定所需的适当质量浓度。

2.3.4 阴性对照溶液的制备 按照“2.3.3”项下方法制备不含白藜芦醇和 STD (前期做过紫外全波长扫描, 在 306 nm 的波长下 STD 没有吸收, 所以这里就没有考虑 STD 的影响) 的阴性对照溶液。

2.3.5 专属性考察 分别精密吸取白藜芦醇对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 结果见图 7。结果显示, 对照品溶液与供试品溶液在相同保留时间处有相同色谱峰, 白藜芦醇保留时间为 3.83 min, 阴性对照溶液在白藜芦醇出峰时间处无吸收峰, 不干扰其测定。

2.3.6 线性关系考察 精密量取白藜芦醇对照品溶液适量进行稀释, 制成质量浓度分别为 4.24、8.48、12.72、16.96、21.72、42.40、63.60 μg/mL 的系列对照品溶液。取各对照品溶液按“2.3.1”项下色谱条件分别进样测定, 记录峰面积, 以对照品溶液质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得白藜芦醇的回归方程为 $Y=1.4663X-2.7942$, $R^2=0.9993$, 结果表明白藜芦醇在 4.24~63.60 μg/mL 与其峰面积线性关系良好。

2.3.7 精密度考察 精密量取白藜芦醇对照品溶液进行稀释, 制成质量浓度为 16.96 μg/mL 的对照品溶液, 分别按“2.3.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积, 结果白藜芦醇峰面积的 RSD 为 0.562%, 表明该仪器精密度良好。

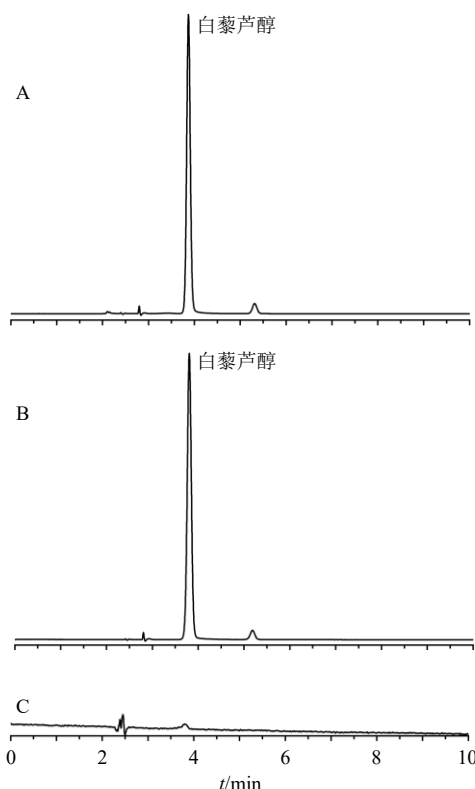


图 7 白藜芦醇对照品溶液 (A)、供试品溶液 (经 0.1 mol·L⁻¹ HCl 处理, B)、阴性对照溶液 (C) 的 HPLC 图
Fig. 7 HPLC of resveratrol reference solution (A), test solution (treated with 0.1 mol·L⁻¹ HCl, B) and negative control solution (C)

2.3.8 稳定性考察 取同一 Res-STD-CAS-1 供试品溶液 (经 0.1 mol/L HCl 处理), 分别于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 白藜芦醇峰面积的 RSD 为 0.044%, 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定。

2.3.9 重复性考察 取同一批 Res-STD-CAS-1 供试品溶液 (经 0.1 mol/L HCl 处理) 共 6 份, 按“2.3.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 白藜芦醇质量分数的 RSD 为 0.245%, 表明该方法的重复性良好。

2.3.10 加样回收率考察 精密量取 6 份已测定白藜芦醇含量的 Res-STD-CAS-1 样品溶液 (100 μg/mL) 各 5 mL, 分别加入 212 μg/mL 的对照品储备液 2.5 mL, 置于同一 50 mL 量瓶中, 按“2.3.3”项下方法制备 (经 0.1 mol/L HCl 处理), 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率。结果表明, 白藜芦醇平均加样回收率为 102.23%, RSD 值为 0.044%, 说明该含量测定方法

准确度良好。

2.4 平衡溶解度测定

称取过量白藜芦醇原料药、Res-STD-CAS、物理混合物分别置于 5 mL EP 管中, 悬浮在 0.1 mol/L HCl 盐酸缓冲液、pH 4.5 PBS、pH 6.8 PBS 和纯水中, 在 37 °C 下振荡 24 h, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 精密吸取适量, 用 50%乙醇将续滤液稀释到 HPLC 测定所需的适当质量浓度。

由于药物的溶解度对其治疗效果有重要影响, 因此提高溶解度是固态药物开发的重要目的之一。白藜芦醇原料药和 Res-STD-CAS-1、2、3 以及其对应比例的物理混合物, 在不同 pH 值缓冲液及水中的溶解度结果 (表 1) 表明, Res-STD-CAS 的溶解度均高于对应比例的物理混合物。相较于白藜芦醇

原料药, Res-STD-CAS-1、2、3 溶解度分别提高了 4.3~6.4 倍、13.2~15.3 倍、16.3~17.2 倍, 而物理混合物 1:1、1:2、1:3 较白藜芦醇原料药分别提高了 1.8~3.9 倍、2.2~5.6 倍、5.0~6.0 倍, 随着 STD 的比例增大, 白藜芦醇的溶解度也随之提高。

相较于对应比例物理混合物组, Res-STD-CAS-1、2、3 溶解度分别提高了 1.7~2.7 倍、2.3~6.0 倍、2.7~3.4 倍。物理混合物中白藜芦醇溶解度的提高, 可能是由于 STD 作为表面活性剂的增溶作用, 而 Res-STD-CAS 中白藜芦醇溶解度的提高不仅仅是因为 STD 的增溶作用, 还因为白藜芦醇与 STD 发生了分子间的相互作用, 共无定形化, 使得白藜芦醇达到较高的过饱和浓度, 并且在 STD 的增溶作用下, 能在 24 h 内维持过饱和浓度。

表 1 各样品在不同 pH 值缓冲液中的溶解度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Solubility of each sample in different pH buffers ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	溶解度/(μg·mL ⁻¹)			
	0.1 mol/L ⁻¹ HCl	pH 4.5 PBS	pH 6.8 PBS	水
白藜芦醇原料药	50.186±0.581	44.287±0.277	41.564±0.902	42.278±0.631
Res-STD-CAS-1	277.322±0.953***	292.650±0.730***	185.327±0.194***	217.265±0.532***
Res-STD-PM-1	104.331±0.291**	177.836±0.477**	77.370±0.188**	107.615±0.387**
Res-STD-CAS-2	672.367±0.752***	693.989±0.765***	561.297±0.502***	702.448±0.942***
Res-STD-PM-2	112.716±0.390**	139.074±0.114**	239.896±0.378**	260.223±0.384**
Res-STD-CAS-3	790.833±0.398***	741.817±0.705***	832.988±0.287***	734.152±0.925***
Res-STD-PM-3	300.062±0.549**	275.638±0.349**	213.499±0.687**	274.202±0.713**

与白藜芦醇组比较: ** $P < 0.01$; 各比例的 CAS 组与物理混合物组比较: *** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs resveratrol group; *** $P < 0.01$ vs between CAS group and physical mixture group in different proportions.

2.5 吸湿性考察

按照《中国药典》2020 年版通则 9103, 在实验前 24 h 将干燥的玻璃称量瓶置于 (25±1) °C 恒湿的密闭烘箱中, 在底部放置盛有饱和 NaCl 溶液的干燥器 [相对湿度 (relative humidity, RH) 约为 75%], 精密称定玻璃称量瓶质量 m_1 ; 取白藜芦醇原料药、STD 原料药、Res-STD-CAS-1、2、3 以及物理混合物适量, 平铺于玻璃称量瓶中, 精密称定质量 m_2 ; 将称量瓶敞口置于密封干燥器中 48 h 后, 测定各样品和玻璃称量瓶总质量 m_3 , 计算吸湿率。

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

在 25 °C、75% RH 条件下, 各样品的吸湿性见表 2。STD 原料药的吸湿增重率大于 2%, 其余各样品的吸湿增重率均处于 0.2%~2.0%, 其中 Res-STD-CAS-2 和 Res-STD-CAS-3 吸湿性最低, 与白藜芦醇原料药组和物理混合物组比较, 均具有显著性差异 ($P < 0.01$ 、0.000 1), 表明白藜芦醇与 STD 按 1:2

表 2 各样品的吸湿性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Hygroscopicity of each sample ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	吸湿增重率/%	吸湿性
白藜芦醇原料药	1.73±0.23	略有
STD 原料药	2.40±0.12**	有
Res-STD-PM-1	1.56±0.12	略有
Res-STD-CAS-1	1.31±0.15*	略有
Res-STD-CAS-2	0.78±0.12***	略有
Res-STD-CAS-3	0.74±0.04***	略有

与白藜芦醇组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 Res-STD-PM-1 组比较: *** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs resveratrol group; *** $P < 0.01$ vs Res-STD-PM-1 group.

和 1:3 物质的量比形成的共无定形抗吸湿性较好, 这可能是二者分子间的相互作用占据了水分子的结合位点, 因此吸湿性降低。

2.6 物理稳定性考察

根据溶解度测定结果, 将 Res-STD-CAS-3 储存

在 40 ℃、75% (在含有饱和氯化钠溶液的密闭烘箱中) 下。每隔半个月取出等分样品, 并对样品按“2.2.1”项下方法进行 PXRD 扫描。Res-STD-CAS-3 在 40 ℃、75% RH 储存 90 d 后, PXRD 图中没有出现白藜芦醇和 STD 的衍射峰, 表明 Res-STD-CAS-3 样品在储存期间保持无定形, 白藜芦醇和 STD 之间的分子间相互作用可能是其物理稳定性良好的原因, 结果见图 8。这为白藜芦醇相关制剂开发的可行性提供了一定的参考。

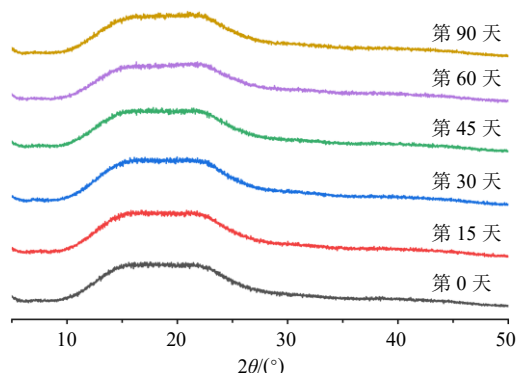


图 8 Res-STD-CAS-3 的物理稳定性

Fig. 8 Physical stability of Res-STD-CAS-3

3 讨论

药物共无定形中共形成体分子的选择对于药物溶解度的提高也至关重要。近年来, 各种结构不同的小分子辅料已被用来作为共形成体制备共无定形, 如有机羧酸类^[29]、氨基酸类^[30]、糖类^[31]等。而胆盐作为内源性表面活性剂, 也引起了研究人员的兴趣, 在人体肠液中发现的最丰富的生物相关胆盐为 STC、STD 等, 文献报道显示出它们具有作为结晶抑制剂的潜力, 以维持药物溶液的过饱和状态^[24]。本实验通过探索白藜芦醇与 STD 基团之间的相互作用, 设计了稳定的 Res-STD-CAS。当 Res-STD-CAS 与溶解介质接触时, STD 作为表面活性剂, 有助于药物溶解, 且药物的无定形态有利于药物的快速溶出, 而 STD 的增溶作用可以维持药物的高浓度。因此 Res-STD-CAS 的平衡溶解度高于其物理混合物。且由于形成 CAS, 白藜芦醇的酚羟基与 STD 的 C=O 和磺酸基团之间发生了氢键相互作用, 降低了无定形分子的迁移率, 从而导致 Res-STD-CAS 能够保持物理稳定性。

本实验通过溶剂挥发法制备了 Res-STD-CAS-1、2、3, 并对其固态特征进行了表征, 结果表明, 白藜芦醇与 STD 在 1:1、1:2、1:3 比例下均能

形成 CAS, 且 FT-IR、拉曼光谱和 ss ¹H-NMR 等表征结果表明, 白藜芦醇的酚羟基与 STD 的磺酸基团之间存在氢键相互作用, SEM 结果也显示二者形成了均匀的分散体, 与白藜芦醇原料药相比, 具有显著的物理形态转变。平衡溶解度结果表明, Res-STD-CAS 的溶解度均高于对应比例的物理混合物, 且相较于白藜芦醇原料药溶解度最大提高了 17.2 倍。吸湿性结果表明, Res-STD-CAS-2、3 的抗吸湿性要优于原料药及两者的物理混合物; Res-STD-CAS-3 在加速实验 40 ℃、75% RH 的环境下放置 90 d 后, 仍然保持无定形态。该体系表现出良好的溶解度和物理稳定性, 对白藜芦醇口服固体制剂的开发提供一定的技术支持及配方参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Tian B R, Liu J Y. Resveratrol: A review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application [J]. *J Sci Food Agric*, 2020, 100(4): 1392-1404.
- [2] Pangen R, Sahni J K, Ali J, *et al.* Resveratrol: Review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2014, 11(8): 1285-1298.
- [3] Siedlinski M, Boer J M A, Smit H A, *et al.* Dietary factors and lung function in the general population: Wine and resveratrol intake [J]. *Eur Respir J*, 2012, 39(2): 385-391.
- [4] Berman A Y, Motechin R A, Wiesenfeld M Y, *et al.* The therapeutic potential of resveratrol: A review of clinical trials [J]. *NPJ Precis Oncol*, 2017, 1: 35.
- [5] Yang Y J, Lei T, Bi W Y, *et al.* The combined therapy of mesenchymal stem cell transplantation and resveratrol for diabetes: Future applications and challenges [J]. *Life Sci*, 2022, 301: 120563.
- [6] 王真, 陈立伟. 白藜芦醇抗肿瘤药理作用机制研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(2): 445-452.
- [7] Ramírez-Garza S L, Laveriano-Santos E P, Marhuenda-Muñoz M, *et al.* Health effects of resveratrol: Results from human intervention trials [J]. *Nutrients*, 2018, 10(12): 1892.
- [8] Letelier M E, Lagos F, Faúndez M, *et al.* Copper modifies liver microsomal UDP-glucuronyltransferase activity through different and opposite mechanisms [J]. *Chem Biol Interact*, 2007, 167(1): 1-11.
- [9] Yang F F, Zhou J, Hu X, *et al.* Improving oral bioavailability of resveratrol by a UDP-glucuronosyltransferase inhibitory excipient-based self-microemulsion [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 114: 303-309.
- [10] 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.
- [11] Murdande S B, Pikal M J, Shanker R M, *et al.* Solubility advantage of amorphous pharmaceuticals: II. Application of quantitative thermodynamic relationships for prediction of solubility enhancement in structurally diverse insoluble pharmaceuticals [J]. *Pharm Res*, 2010, 27(12): 2704-2714.
- [12] Babu N J, Nangia A. Solubility advantage of amorphous drugs and pharmaceutical cocrystals [J]. *Cryst Growth Des*, 2011, 11(7): 2662-2679.
- [13] Ueda K, Taylor L S. Polymer type impacts amorphous solubility and drug-rich phase colloidal stability: A mechanistic study using nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Mol Pharmaceutics*, 2020, 17(4): 1352-1362.
- [14] Almeida e Sousa L, Reutzel-Edens S M, Stephenson G A, *et al.* Assessment of the amorphous “solubility” of a group of diverse drugs using new experimental and theoretical approaches [J]. *Mol Pharmaceutics*, 2015, 12(2): 484-495.
- [15] Ueda K, Taylor L S. Polymer type impacts amorphous solubility and drug-rich phase colloidal stability: A mechanistic study using nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Mol Pharmaceutics*, 2020, 17(4): 1352-1362.
- [16] Qi S, Craig D. Recent developments in micro- and nanofabrication techniques for the preparation of amorphous pharmaceutical dosage forms [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 100: 67-84.
- [17] Seaton C C, Munshi T, Williams S E, *et al.* Multi-component crystals of 4-phenylpyridine: Challenging the boundaries between co-crystal and organic salt formation with insight into solid-state proton transfer [J]. *Cryst Eng Comm*, 2013, 15(26): 5250.
- [18] Heng W L, He X S, Song Y T, *et al.* Insights into cocrystallization and coamorphization engineering techniques in the delivery of traditional Chinese medicine: Formation mechanism, solid-state characterization, and improved pharmaceutical properties [J]. *Cryst Growth Des*, 2022, 22(8): 5110-5134.
- [19] Li B, Hu Y, Guo Y J, *et al.* Coamorphous system of florfenicol-oxymatrine for improving the solubility and dissolution rate of florfenicol: Preparation, characterization and molecular dynamics simulation [J]. *J Pharm Sci*, 2021, 110(6): 2544-2554.
- [20] Löbmann K, Laitinen R, Strachan C, *et al.* Amino acids as co-amorphous stabilizers for poorly water-soluble drugs- Part 2: Molecular interactions [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 85(3): 882-888.
- [21] Löbmann K, Strachan C, Grohgan H, *et al.* Co-amorphous simvastatin and glipizide combinations show improved physical stability without evidence of intermolecular interactions [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 81(1): 159-169.
- [22] Lenz E, Löbmann K, Rades T, *et al.* Hot melt extrusion and spray drying of co-amorphous indomethacin-arginine with polymers [J]. *J Pharm Sci*, 2017, 106(1): 302-312.
- [23] Lodagekar A, Chavan R B, Chaitanya Mannava M K, *et al.* Co-amorphous valsartan nifedipine system: Preparation, characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 139: 105048.
- [24] Lu J, Ormes J D, Lowinger M, *et al.* Maintaining supersaturation of active pharmaceutical ingredient solutions with biologically relevant bile salts [J]. *Cryst Growth Des*, 2017, 17(5): 2782-2791.
- [25] Gniado K, MacFhionnghaile P, McArdle P, *et al.* The natural bile acid surfactant sodium taurocholate (NaTC) as a cofomer in coamorphous systems: Enhanced physical stability and dissolution behavior of coamorphous drug-NaTC systems [J]. *Int J Pharm*, 2018, 535(1/2): 132-139.
- [26] Shohei A, Hironori T, Hiroshi U, *et al.* Formation of a stable co-amorphous system for a brick dust molecule by utilizing sodium taurocholate with high glass transition temperature [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 15(1): 84.
- [27] 张绍兴, 袁舒颖, 刘瑞杰, 等. 拉曼光谱技术的临床应用研究进展 [J]. *浙江临床医学*, 2024, 26(4): 609-612.
- [28] Dhumal S S, Suresh A K. Understanding interfacial polycondensation: Experiments on polyurea system and comparison with theory [J]. *Polymer*, 2010, 51(5): 1176-1190.
- [29] Chen X, Li D X, Zhang H L, *et al.* Sinomenine-phenolic acid coamorphous drug systems: Solubilization, sustained release, and improved physical stability [J]. *Int J Pharm*, 2021, 598: 120389.
- [30] Liu J W, Rades T, Grohgan H. Determination of the optimal molar ratio in amino acid-based coamorphous systems [J]. *Mol Pharmaceutics*, 2020, 17(4): 1335-1342.
- [31] Ueda H, Hirakawa Y, Miyano T, *et al.* Design of a stable coamorphous system using lactose as an antiplasticizing agent for diphenhydramine hydrochloride with a low glass transition temperature [J]. *Mol Pharm*, 2022, 19: 1209-1218.