

染料木素固体分散体的制备及其性质研究

孟庆杰*,包琳琳,潘五九,王伟明#,王红莉(黑龙江省中医药科学院中药所,哈尔滨 150036)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)10-1406-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.10.33

摘要 目的:制备染料木素固体分散体,以提高其体外溶出度。方法:分别以聚乙烯吡咯烷酮K30(PVP K30)、聚乙二醇(PEG)6000、PEG4000为载体,采用溶剂-熔融法制备染料木素固体分散体,考察其体外溶出度,并采用傅里叶红外光谱法(FTIR)、差示扫描量热法(DSC)对固体分散体的结构特征进行分析。结果:以PEG4000为载体制备的染料木素固体分散体的体外溶出度优于其他载体制备的固体分散体,且以药物-载体比例1:5为最佳。DSC与FTIR测定结果表明,固体分散体中染料木素以非晶形式存在。结论:成功制得染料木素固体分散体,其可显著提高染料木素的体外溶出度。

关键词 染料木素;固体分散体;体外溶出度;傅立叶红外光谱法;差示扫描量热法

Preparation of Genistein Solid Dispersion and Its Properties Study

MENG Qingjie, BAO Linlin, PAN Wujiu, WANG Weiming, WANG Hongli (Institute of Chinese Materia Medica, Heilongjiang Academy of Chinese Medicine Sciences, Harbin 150036, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Genistein (GEN) solid dispersion, and improve the dissolution rate of GEN *in vitro*. METHODS: Using PVP K30, PEG6000, and PEG4000 as carriers, GEN solid dispersion was prepared by solvent melting method, and its dissolution *in vitro* was investigated. The structure of the solid dispersion was characterized by FTIR and DSC. RESULTS: GEN solid dispersion prepared with PEG4000 as carrier was better than those with other carriers in dissolution, and drug-carrier ratio (1:5) was the best. The results of DSC and FTIR showed that GEN in solid dispersion took amorphous form. CONCLUSIONS: GEN solid dispersion is prepared successfully and significantly improve the dissolution of GEN *in vitro*.

KEYWORDS Genistein; Solid dispersion; Dissolution *in vitro*; FTIR; DSC

异黄酮类化合物染料木素(Genistein, GEN)被公认为典型的植物雌激素^[1],研究证实它具有降血压、降血脂、抗氧化、抗肿瘤、防治骨质疏松和抗心血管系统疾病等多种药理作用^[2-4]。目前一类新药“染料木素胶囊”已进入II期临床研究^[5]。然而GEN由于其强疏水性,直接口服生物利用度低^[6],临床应用受到限制^[7-8]。为提高GEN的生物利用度,本研究利用固体分散技术将GEN制备成固体分散体,以提高其体外溶出度,改善其生物利用度,扩大临床应用范围。另采用傅里叶红外光谱法(FTIR)、差示扫描量热法(DSC)对固体分散体中GEN的存在状态进行分析,为进一步设计出合理的GEN剂型提供参考。

1 材料

1.1 仪器

RC-806 溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司);PYRIS Diamond 差示扫描量热仪(美国PE公司);Spectrum Two™傅里叶变换红外光谱仪(美国PE公司);LC-2010 高效液相色谱(HPLC)仪(日本Shimadzu公司);BSA224S-CW 电子天平、BP211D 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];DHG-9070A 电热鼓风干燥箱、HWS26 电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司);85-2 恒温磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司);KQ-300DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

GEN 对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111704-200501,纯度:≥98%);GEN 原料药(陕西大田生物科技有限公司,批号:20141130,纯度:>98%);聚乙二醇(PEG)6000、

PEG4000、聚乙烯吡咯烷酮K30(PVP K30)(南京威尔化工有限公司,批号:20120811、20121028、20141120);甲醇(美国Tedia公司,色谱纯);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法的建立

2.1.1 检测波长的选择 分别精密称取GEN对照品、GEN原料药适量,用无水乙醇制成一定质量浓度的溶液,以无水乙醇为空白对照,在200~500 nm波长范围内进行紫外扫描。结果显示,对照品溶液和原料药溶液均在262 nm处有最大吸收峰,而溶剂无水乙醇在该波长下无吸收峰,因此确定检测波长为262 nm。

2.1.2 色谱条件^[9] 色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.05%磷酸水溶液(70:30),流速:1.0 ml/min;检测波长:262 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。对照品、供试品、阴性对照溶液的色谱图见图1。

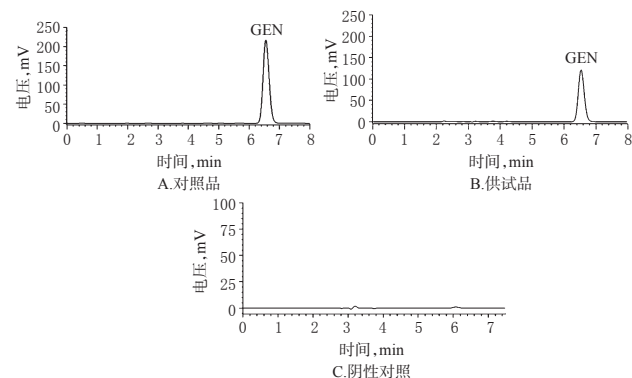


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

* 助理研究员, 硕士。研究方向: 中药新药与新剂型。电话: 0451-55653086-6903。E-mail: mengqingjie6646499@163.com

通信作者: 研究员, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药新剂型。电话: 0451-55653086-6612。E-mail: zyyjy@163.com

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取固体分散体0.1 g,置于具塞锥形瓶中,加入无水乙醇50 ml,称定质量,水浴超声处理30 min,放冷,再称定质量,用无水乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过。精密吸取续滤液1 ml,置于25 ml量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.1.4 标准曲线制备 精密称取GEN对照品4.40 mg,置于100 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制得质量浓度为44 μg/ml的对照品贮备液。精密吸取贮备液0.1、0.1、1、1 ml,分别置于100、10、10、5 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。吸取上述4个质量浓度的溶液和质量浓度为44 μg/ml的对照品贮备液各10 μl,按“2.1.2”项下方法进样测定。以峰面积为纵坐标(y)、质量浓度(x)为横坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=92\ 336.73x+55\ 490.54$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明GEN在0.044~44 μg/ml质量浓度范围内与峰面积呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 取同一对照品溶液,按“2.1.2”项下方法测定GEN峰面积,每2 h测定1次,连续测5次,计算日内精密度RSD为0.06%($n=5$);每日测定1次,连续测5 d,计算日间精密度RSD为0.12%($n=5$),结果表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,室温下放置,分别于0、3、6、9、12、24、48、72 h,按“2.1.2”项下方法测定GEN峰面积,计算得RSD为0.69%($n=8$),表明供试品溶液在72 h内稳定。

2.1.7 重复性试验 平行制备6份供试品溶液,按“2.1.2”项下方法进样测定并计算GEN含量的RSD为1.43%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.1.8 准确度试验 精密称取已知GEN含量的固体分散体约0.05 g,共9份,分别置于具塞锥形瓶中,精密加入GEN对照品适量,按“2.1.3”项下方法制备高、中、低3个质量浓度的供试品溶液,每组3份,按“2.1.2”项下方法测定,计算含量和回收率。结果,3个质量浓度供试品溶液的平均回收率分别为99.93%、100.86%、99.41%,RSD分别为1.60%、2.73%、0.20%($n=3$),表明该方法准确度良好。

2.2 固体分散体的制备

采用溶剂-熔融法制备固体分散体^[10]。以药物与载体质量比为1:3分别称取GEN和PEG6000、PEG4000、PVP K30。GEN用适量乙醇溶解,载体置蒸发皿中于75 ℃水浴熔融后,将GEN缓慢加入载体中,边加边搅拌,使其混合均匀;于75 ℃水浴剧烈搅拌使乙醇挥发除去,待混合物至黏稠状态且无乙醇味时转入冰浴中,剧烈搅拌至完全固化。放入冰箱冷却12 h,置真空干燥器中干燥24 h,粉碎,过80目筛,置干燥器中备用。

2.3 物理混合物的制备

称取GEN适量,按药物与载体质量比为1:3准确称取PEG4000置于研钵中研细,与GEN混匀,过80目筛,置干燥器内保存备用。

2.4 溶解度的测定

分别称取过量的GEN原料药、物理混合物和固体分散体各3份,置于具塞离心管中,加蒸馏水各10 ml,充分混匀,于水摇床中在37 ℃下以100 r/min振摇72 h,使其充分溶解。所得混悬液经0.45 μm微孔滤膜过滤,取续滤液10 μl进样测定,计算溶解度。结果,GEN原料药的平衡溶解度仅为0.13 μg/ml,相同比例(药物与载体质量比1:3)的物理混合物和固体分散体的GEN溶解度分别为9.94、34.05 μg/ml,后者较GEN原料药溶解度分别提高了75、260倍。

2.5 体外溶出度的测定

按照2010年版《中国药典》(二部)附录XC溶出度测定法第一法(转篮法)进行测定^[11]。转速为 (100 ± 1) r/min,温度为 (37 ± 0.5) ℃,溶出介质为2%聚山梨酯80的pH 6.8磷酸盐缓冲液900 ml。分别精密称取GEN原料药、固体分散体(约相当于GEN 60 mg),装入胶囊,置于转篮中,自样品接触介质开始计时,分别于5、10、20、30、45、60 min取样5 ml(同时补充同温等量溶出介质),经0.45 μm微孔滤膜滤过。取续滤液10 μl进样测定,按外标法计算GEN质量浓度,并换算成累积溶出度。

2.6 不同载体的考察

分别以PEG6000、PEG4000、PVP K30为载体,以药物-载体质量比1:3按“2.2”项下方法制备GEN固体分散体,再按照“2.5”项下方法测定体外溶出度。结果显示,GEN原料药60 min时的累积溶出度仅为35%,而载体的加入明显改善了GEN的溶出速率和溶出度。不同载体对固体分散体中GEN溶出度的影响由大到小依次为PEG4000>PEG6000>PVP K30,故选择PEG 4000作为制备固体分散体的载体材料。不同样品的体外溶出曲线见图2。

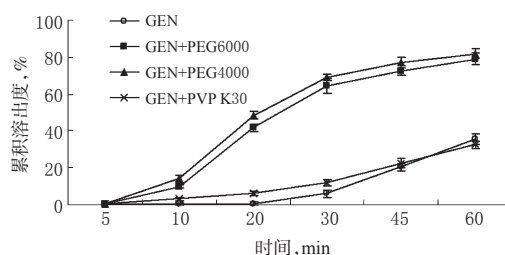


图2 不同样品的体外溶出曲线($n=6$)

Fig 2 Dissolution curves of different samples *in vitro* ($n=6$)

2.7 药物-载体比例的考察

以PEG4000为载体,以药物-载体质量比1:1、1:3、1:5、1:7、1:9按“2.2”项下方法制备GEN固体分散体,再按“2.5”项下方法测定体外溶出度。结果显示,GEN溶出度随着载体比例的增加而增大,且载药比例不同的固体分散体体外溶出度存在明显差异。其中1:9比例制备的固体分散体中GEN累积溶出度为63.2%的时间(T_d)为20.4 min,60 min时的累积溶出度可达98%以上,其溶出速率和溶出度均高于其他考察比例;但该比例与1:5、1:7相较,GEN体外溶出度差异无统计学意义($P>0.05$)。从节能降耗角度考虑,选择药物与载体质量比为1:5。不同药物-载体比例的GEN固体分散体的溶出曲线见图3。

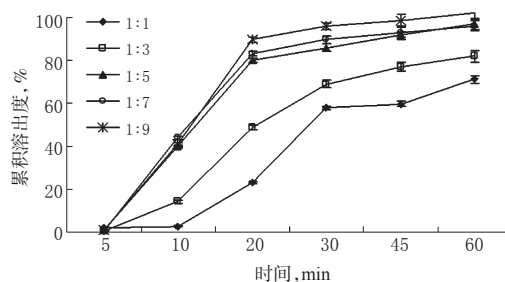


图3 不同药物-载体比例的GEN固体分散体的溶出曲线($n=6$)

Fig 3 Dissolution curves of GEN solid dispersions with different drug-carrier ratios ($n=6$)

2.8 固体分散体物相鉴别

2.8.1 FTIR分析 取GEN原料药、PEG4000、物理混合物和固体分散体,采用KBr压片法将各待测样品压片,于400~4 000 cm^{-1} 波数范围内扫描,分辨率为4 cm^{-1} 。结果显示,GEN

原料药分别在 3 411、1 651 cm^{-1} 处呈现—OH、C=O 伸缩振动峰, 在 1 616、1 519 cm^{-1} 处呈现苯环的骨架振动峰。载体 PEG4000 分别在 2 887、1 467 cm^{-1} 处呈现 CH_2 的对称伸缩振动和弯曲振动。物理混合物图谱中, C=O 和 CH_2 特征吸收峰清晰可辨, 表明 GEN 原料药和 PEG4000 只是简单的物理混合, 无相互作用。在固体分散体图谱中, GEN 的 4 处特征吸收峰基本均消失, 表明二者之间存在一定的相互作用, 推测 GEN 以非晶形式存在于固体分散体中, 提示药物与载体形成了固体分散体。FTIR 图谱见图 4。

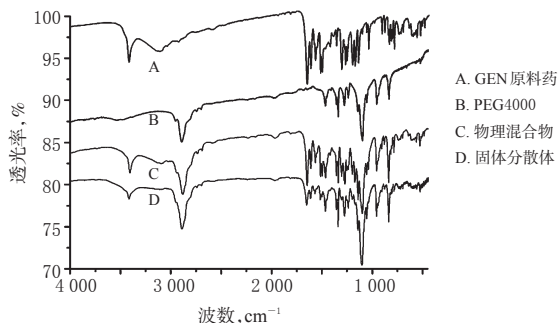


图 4 FTIR 图谱

Fig 4 FTIR spectra

2.8.2 DSC 分析 分别将 GEN 原料药、PEG4000、物理混合物、固体分散体样品各约 10 mg 放入铝坩埚中, 以空铝坩埚为参比物, 在 40~350 $^{\circ}\text{C}$ 范围内进行测定, 升温速度为 10.0 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 测定过程中以氮气净化。结果显示, GEN 原料药和 PEG4000 载体分别在 309.45、62.63 $^{\circ}\text{C}$ 出现明显吸热峰, 为其熔融峰。在物理混合物中, 可能由于在升温过程中熔点较低的 PEG4000 先于 GEN 熔融, 熔融的 PEG4000 成为 GEN 的溶剂, 因此在物理混合物中未见 GEN 的特征吸热峰^[2]。在固体分散体中, 未见原料药的吸热峰, 结合 FTIR 结果综合分析, 固体分散体中 GEN 以非晶形式存在, 提示药物与载体形成了固体分散体。DSC 图谱见图 5。

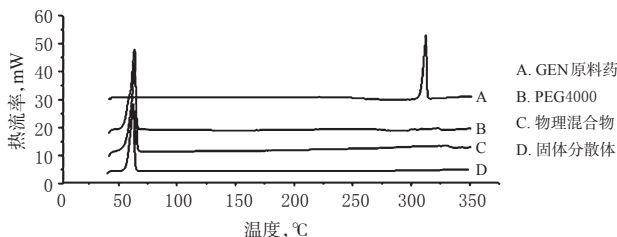


图 5 DSC 图谱

Fig 5 DSC spectra

3 讨论

本研究通过固体分散体技术, 改善了异黄酮类化合物 GEN 的水中平衡溶解度和体外溶出度。其中以 PEG4000 为载体制备的固体分散体的溶出速率和溶出度提高最为显著, 且随着载体比例增加而溶出度增大; 而采用 PVP K30 为载体制备的固体分散体的溶出度与原料药基本持平, 分析原因可能是 PVP K30 熔点较高, 能溶于水及多种有机溶剂, 宜采用溶剂法制备固体分散体, 而非溶剂-熔融法。

GEN 在水中的平衡溶解度仅为 0.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 较阮丽萍等^[13]测得的 8.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 低, 分析原因可能是实验用水的 pH 不同(本试验用水的 pH 为 6.4, 而阮丽萍等用水的 pH 为 6.1), 也可能是检测仪器、色谱柱或色谱条件的差异导致测定结果迥异。为满足漏槽条件, 参考相关文献并结合前期预试验结果, 选用

2% 聚山梨酯 80 的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 6.8)作为溶出介质。测定方法曾按照 2010 年版《中国药典》(二部)附录 X C 溶出度测定法第二法(浆法)进行, 但由于 GEN 原料药及其固体分散体质量较轻, 测定初始时漂浮于溶出介质表面, 导致溶出度测定结果不准确。经验证, 最终采用第一法(转篮法), 并将样品装于胶囊中, 考察不同载体材料及药物与载体比例对 GEN 溶出度的影响。

将难溶性药物与水溶性载体制成固体分散体, 可使药物高度分散; 同时载体的加入也可改善药物的润湿性, 进而有利于提高药物的溶解度和溶出度, 最终达到提高药物生物利用度的目的^[14-15]。在本研究的固体分散体中, 可能由于水溶性载体 PEG4000 能阻滞 GEN 聚集结晶, 同时增加了其与溶出介质的接触面, 从而有效地提高了药物的溶解度、溶出速率和溶出度。但其是否能够提高体内生物利用度, 还有待于进一步研究证实。

参考文献

- [1] 金鑫, 张振海, 朱静, 等. 响应面法优化纳米二氧化硅固体分散技术辅助酶解制备染料木素[J]. 药学学报, 2012, 47(4): 522.
- [2] 余立华, 刘康, 刘保林. 染料木素的药理作用[J]. 药学与临床研究, 2010, 18(3): 299.
- [3] Wang ZL, Sun JY, Wang DN, *et al.* Pharmacological studies of the large-scaled purified genistein from *Huaijiao* (*Sophora japonica*-Leguminosae) on anti-osteoporosis[J]. *Phytomedicine*, 2006, 13(2): 718.
- [4] 韦华梅, 王剑波. 中药槐角的研究进展[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(3): 115.
- [5] 何礼, 韩瑞伟, 唐晓飞, 等. 注射用染料木素胶束的体外释药研究[J]. 中国药房, 2012, 23(17): 1 607.
- [6] 何礼, 韩瑞伟, 唐晓飞, 等. 正交设计联用星点设计-效应面法优化染料木素胶束制备工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 12.
- [7] 冯怡, 曾星, 邓远辉. 液相色谱-串联质谱法测定人血浆中染料木素及其葡萄糖醛酸代谢[J]. 中国临床药理学杂志, 2010, 26(1): 64.
- [8] 夏丽文, 李大维, 张雨杰. 染料木素自乳制剂的制备及溶出度研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2010, 26(4): 398.
- [9] 孟庆杰, 潘五九, 王伟明, 等. 高效液相色谱法测定槐角总黄酮水解产物中染料木素和槐角苷含量[J]. 中国药业, 2014, 23(19): 40.
- [10] 王敏, 王淑君, 侯巍. 杨梅素固体分散体的制备以及体外溶出试验[J]. 实用药物与临床, 2012, 15(5): 281.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 85.
- [12] 孙考祥, 吕会芳, 梁容才, 等. 人参皂苷 Rg₃ 固体分散体的制备与体外特性研究[J]. 中草药, 2008, 39(1): 48.
- [13] 阮丽萍, 余伯阳, 朱丹妮, 等. 染料木素的小肠吸收与体内活性相关性的研究[J]. 中国天然药物, 2006, 4(4): 278.
- [14] 孙彩霞, 尹蓉莉, 赵俊霞, 等. 水蜈蚣总黄酮固体分散体的制备及其性质研究[J]. 中草药, 2014, 45(14): 2 018.
- [15] 李标. 固体分散体在药剂学中的应用[J]. 中国药房, 2009, 20(10): 790.

(收稿日期: 2015-05-29 修回日期: 2015-08-17)

(编辑: 邹丽娟)