

· 药物制剂与药品质量控制 ·

新型载体罗汉果苷 V 对紫杉醇的增溶作用*

王杏利¹, 王爽², 张雷³, 罗玉琴¹, 韦铭旻¹, 吴春勇⁴, 张峻颖¹

(1. 中国药科大学中药制药系, 南京 211198; 2. 广东食品药品监督管理局认证审评中心, 广州 510080; 3. 山东省食品药品检验研究院, 济南 250101; 4. 中国药科大学药物分析系, 南京 210009)

摘要 **目的** 考察罗汉果苷 V 作为新型载体对难溶性药物的增溶作用。**方法** 以罗汉果苷 V 为载体, 紫杉醇为模型药物, 采用溶剂法制备紫杉醇-罗汉果苷 V 固体分散体。采用高效液相色谱(HPLC)法测定紫杉醇的含量, 考察固体分散体中紫杉醇的饱和溶解度和体外溶出性能的变化。同时, 用差示热扫描法(DSC)进行物相鉴别, 评价药物在固体分散体中晶型变化。**结果** 紫杉醇-罗汉果苷 V 固体分散体的饱和溶解度比紫杉醇增加约 375 倍; 与紫杉醇比较, 固体分散体的体外溶出速率和累积溶出度明显提高; 差示热扫描法结果表明, 紫杉醇在固体分散体内以无定形存在。**结论** 罗汉果苷 V 能明显增加难溶性药物的溶解度和体外溶出度, 且该载体安全、无毒, 有望成为难溶性药物增溶的新型载体。

关键词 罗汉果苷 V; 紫杉醇; 新型载体; 固体分散体; 溶出度

中图分类号 R943

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2019)06-0770-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2019.06.019

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Solubilization Effects of Novel Carrier Mogroside V on Paclitaxel

WANG Xingli¹, WANG Shuang², ZHANG Lei³, LUO Yuqing¹, WEI Mingmin¹, WU Chunyong⁴, ZHANG Junying¹ (1. Department of TCMs Pharmaceuticals, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 2. Center for Certification and Evaluation, Guangdong Food and Drug Administration, Guangzhou 510080, China; 3. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China; 4. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT Objective To investigate the solubilization effects of mogroside V as a novel carrier on the poorly soluble drugs. **Methods** Using mogroside V as a carrier and paclitaxel as a model drug, a solid dispersion of paclitaxel-mogroside V was prepared by the solvent method. The content of paclitaxel was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The saturated solubility and *in vitro* dissolution of paclitaxel were investigated. In addition, differential thermal scanning (DSC) was used for phase identification and evaluation of drug crystal changes in solid dispersion. **Results** Paclitaxel-mogroside V solid dispersion showed pronounced improvement in both dissolution rate and drug solubility, as evidenced by a 375-fold increase in solubility compared with paclitaxel. The results of DSC indicated that paclitaxel was in amorphous form in solid dispersion. **Conclusion** Mogroside V can improve the solubility and *in vitro* dissolution of the poorly soluble drug. Being safe and non-toxic, mogroside V was found to have suitable characteristics to be used as a pharmaceutical excipient.

KEY WORDS Mogroside V; Paclitaxel; Novel carrier; Solid dispersion; Dissolution

口服给药简单, 方便, 患者依从性高, 是药物递送的最优选途径。但目前超过 40% 市售药物、60% 研发中药物都存在难溶性问题。得益于载体辅料的应用, 改善疏水性药物的溶解性和生物利用度已有多种

方法, 如: 使用磷脂复合物、生物相容性聚合物、固体分散体、脂质体或胶束等^[1-4]。但目前满足上述方法要求、符合中药成分特性的辅料尤为缺乏。本课题组前期发现一些糖基化苷类化合物在水性环境中, 能够形成与表面活性剂相似的结构, 可作为固体分散体的载体, 实现难溶性药物的高效增溶^[5-7]。罗汉果甜苷是罗汉果的甜味成分。植物含量较高且水溶性好, 目前已经有纯度 98% 以上成品用作食品添加剂, 其甜度为蔗糖的 300 倍。罗汉果苷 V 是罗汉果甜苷的主要成分, 是一种天然小分子化合物, 由亲水性葡萄糖基和疏水性三萜类两部分组成, 与已报道的糖苷类增溶载体结构相似, 故选其为载体, 以研究其对难溶性药物的增溶效果。罗汉果苷 V 甜度高, 热稳定性好, 色泽浅, 易于

收稿日期 2018-09-30 修回日期 2018-12-05

基金项目 * 国家自然科学基金资助项目 (81473357, 81673681); 中央高校基本科研业务费 (2015PT062)

作者简介 王杏利 (1994-), 女, 河南洛阳人, 在读硕士, 从事中药新剂型及质量分析研究。ORCID: 0000-0002-0323-3702。电话: 025-86185126, E-mail: 919252921@qq.com。

通信作者 张峻颖 (1977-), 女, 江苏南京人, 副教授, 博士, 从事药物新剂型新工艺研究。电话: 025-86185126, E-mail: ivy366300@hotmail.com。

使用,不受 pH 值(pH 值在 2~10)的影响。它在中国、美国、日本等一些国家作为非营养性天然甜味剂而闻名^[8]。同时,含葡基辅料还可能通过与葡萄糖转运体 1(glucose transporter 1, GLUT1) 结合实现跨越血-脑屏障,进而实现对目标药物的脑靶向转运^[9]。

紫杉醇(paclitaxel, PTX)是一种从短叶红豆杉(*taxus brevifolia*)茎皮中分离出来的复杂二萜类天然产物^[10],由于能够与微管蛋白结合诱导细胞死亡并影响微管动力学^[11],紫杉醇在治疗乳腺癌、卵巢癌和非小细胞肺癌方面表现出优异的抗肿瘤活性^[12]。然而紫杉醇高度亲脂,水中溶解度低,研究报道显示其在小鼠中的生物利用度<3.6%^[13],这一缺陷大大限制紫杉醇的临床应用。已上市产品紫杉醇注射液(Taxol[®], 商品名:泰素)使用乙醇和聚氧乙烯蓖麻油(50:50)的共溶剂系统来增加其溶解度,由于聚氧乙烯蓖麻油存在显著的毒副作用,如神经毒性、肾毒性、变态反应等^[14],给患者的生命健康带来极大的危害。所以,新型载体或辅料的发掘,可为紫杉醇的临床制剂进一步开发提供帮助。

因此,笔者以罗汉果苷 V 为载体,以紫杉醇为模型药,采用溶剂法制备紫杉醇-罗汉果苷 V 固体分散体。考察其饱和溶解度和体外溶出特征,通过差示扫描法(differential scanning calorimetry, DSC)考察紫杉醇在固体分散体中的物理存在形态。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 LC-2010CHT 液相色谱仪(含高压泵、柱温箱、自动进样器、紫外检测器、LC solution 色谱工作站,日本岛津公司);KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BT125D 电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司,感量:0.01 mg);XW-80A 旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);旋转蒸发装置(含 N-1100 型旋转蒸发仪、OSB-2100 型油浴锅,上海爱朗仪器有限公司);SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);DKZ 系列电热恒温振荡水槽(上海一恒科技有限公司);2XZ-2 型旋片式真空泵(临海市永昊真空设备有限公司);差示扫描量热仪 NETZSCH DSC 204(NETZSCH GERAETEBAU GmbH)等。

1.2 试剂 紫杉醇对照品(阿拉丁,含量:99%,批号:E1822047);罗汉果苷 V(成都普瑞法科技开发有限公司,含量:98%,批号:PRF8093001);去离子水;乙腈为色谱纯;其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 紫杉醇-罗汉果苷 V 物理混合物的制备 取紫杉

醇适量,按 1:5,1:10,1:15,1:20(W/W)添加相应量的罗汉果苷 V,置于研钵中研细,混匀,置干燥器中备用。

2.2 紫杉醇-罗汉果苷 V 固体分散体的制备 采用溶剂法制备紫杉醇-罗汉果苷 V 固体分散体,按 1:20(W/W)称取适量紫杉醇和罗汉果苷 V,加入适量的 80%乙醇,常温下 50 Hz 超声 30 min,置于 50 ℃水浴锅中进行减压浓缩干燥 60 min,即可得到固体分散体。得到固体状固体分散体,用研钵研磨均匀,置干燥器中备用。

2.3 高效液相色谱(HPLC)测定紫杉醇

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Inertsil[®] ODS-3(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);柱温:30 ℃;检测波长:227 nm;流速:1 mL · min⁻¹;流动相:乙腈-水(65:35)。

2.3.2 紫杉醇对照品溶液的配制 精密称定紫杉醇 10 mg,置于 10 mL 棕色量瓶中,加入乙腈 5 mL,超声使其溶解,用乙腈定容,配制得浓度约为 1 mg · mL⁻¹紫杉醇对照品溶液。

2.3.3 罗汉果苷 V 对照品溶液的配制 精密称定罗汉果苷 V 10 mg,置于 10 mL 棕色量瓶中,加入乙腈 5 mL,超声使其溶解,用乙腈定容,配制得浓度约为 1 mg · mL⁻¹罗汉果苷 V 对照品溶液。

2.3.4 紫杉醇-罗汉果苷 V 固体分散体溶液的配制 精密称定紫杉醇-罗汉果苷 V 固体分散体 10 mg,置于 10 mL 棕色量瓶中,加入乙腈 5 mL,超声使其溶解,用乙腈定容,配制得浓度约为 1 mg · mL⁻¹紫杉醇-罗汉果苷 V 固体分散体溶液。

2.3.5 专属性实验 分别取空白溶剂、罗汉果苷 V 对照品溶液、紫杉醇对照品溶液和紫杉醇-罗汉果苷 V 固体分散体溶液,按“2.3.1”条件,进行 HPLC 分析,紫杉醇典型色谱图见图 1。结果表明,在本色谱条件下,紫杉醇峰形良好,保留时间约为 6.8 min,空白溶剂和罗汉果苷 V 对主峰的测定无干扰。

2.3.6 检测限及定量限 取“2.3.2”项制备的紫杉醇对照品溶液,按一定比例稀释,得到一系列浓度溶液,进行 HPLC 分析,紫杉醇检测限($S/N=3$)和定量限($S/N=10$)分别为 20 ng · mL⁻¹和 50 ng · mL⁻¹($n=5$)。

2.3.7 线性关系考察 取“2.3.2”项制备的紫杉醇对照品溶液,按一定比例稀释,得到浓度分别为 0.05, 0.1, 0.2, 1, 5, 10, 25, 50 μg · mL⁻¹的标准液,按“2.3.1”项条件进行 HPLC 分析,以紫杉醇峰面积(A)为纵坐标,紫杉醇浓度(C , μg · mL⁻¹)为横坐标进行线性回归,结果表明紫杉醇在 0.05~50 μg · mL⁻¹内线性关系

良好,回归方程为: $A=44\,827\,C+387.46$, $R^2=1.000\,0$ 。

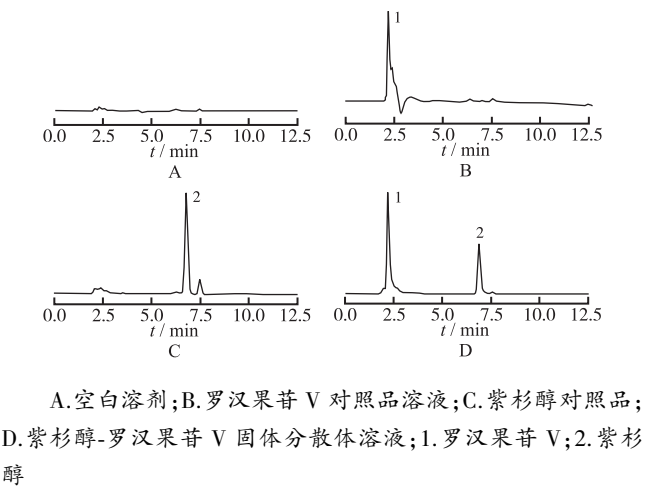


图1 4种溶液的HPLC图谱

1. blank solution; B. mogroside-V reference solution; C. paclitaxel reference solution; D. paclitaxel-mogroside-V SD solution; 1. mogroside-V; 2. paclitaxel

Fig.1 HPLC chromatograms of four kinds of solution

2.3.8 精密度实验 精密量取“2.3.2”项制备紫杉醇对照品溶液0.5 mL,置于100 mL量瓶中,加流动相定容,得到 $5\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 紫杉醇溶液。按“2.3.1”项方法重复测定6次,结果峰面积稳定,RSD为0.8%,表明仪器精密度良好。

2.3.9 重复性实验 取紫杉醇-罗汉果苷V固体分散体(1:20)约20 mg,共6份,精密称定。置于10 mL量瓶中,加适量乙腈溶解并定容。精密量取0.5 mL,置10 mL量瓶,加流动相定容。配制得相当于紫杉醇含量 $5\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液。按“2.3.1”项方法测定,计算6份样品中的紫杉醇含量。测定6份固体分散体中紫杉醇的含量分别为4.3%,4.2%,4.3%,4.4%,4.4%,4.3%,RSD为1.3%,表明该方法重复性良好。

2.3.10 稳定性实验 取“2.3.9”项下含紫杉醇 $5\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的紫杉醇-罗汉果苷V固体分散体溶液,室温下放置0,2,4,6 h,按“2.3.1”项方法分别测定,紫杉醇峰面积RSD为0.06%,表明紫杉醇溶液在室温下6 h内稳定。

2.3.11 加样回收率实验 参考文献[15]方法,分别精密称取紫杉醇适量,按处方比例(1:20)添加罗汉果苷V,分别制成高、中、低浓度溶液各3份,按“2.3.1”项方法测定。分析结果见表1,加样回收率在97.9%~101.5%,方法准确度良好。

2.4 紫杉醇与罗汉果苷V投药比例筛选 根据物理混合物饱和溶解度测定。取紫杉醇-罗汉果苷V不同

比例的物理混合物(相当于紫杉醇1 mg),置于2 mL EP管中,加水0.5 mL,置于恒温振荡水浴锅中,37℃振摇饱和24 h,后取上清液,用孔径 $0.45\,\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液按“2.3.1”项方法测定紫杉醇浓度。结果如图2。结果显示随着罗汉果苷V加入量的增加,紫杉醇的增溶倍数增加,故最终选取紫杉醇-罗汉果苷V 1:20(W/W)为处方制备固体分散体。

表 1 紫杉醇加样回收率实验结果					
Tab.1 Results of recovery test of paclitaxel					
浓度水平	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
	mg		%		
高	12.04	12.12	100.7		
	12.02	12.20	101.5	101.2	0.46
	12.01	12.19	101.5		
中	10.01	10.07	100.6		
	10.02	10.04	100.2	100.4	0.21
	10.01	10.06	100.5		
低	8.03	8.04	100.1		
	8.02	7.85	97.9	99.2	1.16
	8.01	7.98	99.6		

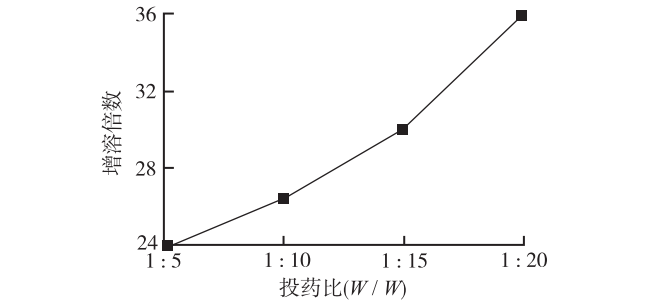


图2 紫杉醇/罗汉果苷V物理混合物的增溶倍数变化曲线

Fig.2 Solubilization fold curve of paclitaxel -Mog-V physical mixture

2.5 固体分散体饱和溶解度实验 分别取紫杉醇和紫杉醇-罗汉果苷V固体分散体(相当于紫杉醇1 mg),置于2 mL EP管中,加水0.5 mL,置于恒温振荡水浴锅中,37℃振摇饱和24 h,用孔径 $0.45\,\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液按“2.3.1”项方法测定紫杉醇浓度。结果显示紫杉醇的饱和溶解度约为 $0.1\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,紫杉醇/罗汉果苷V固体分散体的饱和溶解度约为 $37.5\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。与紫杉醇比较,固体分散体的饱和溶解度增加约375倍,表明罗汉果苷V明显增加紫杉醇的溶解度。

2.6 DSC法分析 分别取紫杉醇、罗汉果苷V、紫杉醇与罗汉果苷V的物理混合物(1:20)、紫杉醇-罗汉果苷V固体分散体适量,置于铝制坩埚内,盖上盖子,

密封。测试条件为:以空铝坩埚为参比,升温速率: $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$,扫描范围: $40\sim 300\text{ }^{\circ}\text{C}$,结果见图 3。由 DSC 图可知,紫杉醇和罗汉果苷 V 分别在 214 和 $178.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处各有一吸热峰。紫杉醇和罗汉果苷 V 物理混合物的 DSC 图为两者图谱的叠加,分别在 177 和 $210\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处有吸热峰。而固体分散体的 DSC 图中,紫杉醇的吸热峰消失,仅在 $164.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处出现一个微小的吸热峰,表明以罗汉果苷 V 为载体,紫杉醇在固体分散体的制备过程中,由晶体转变为无定形或极其微小的晶体。

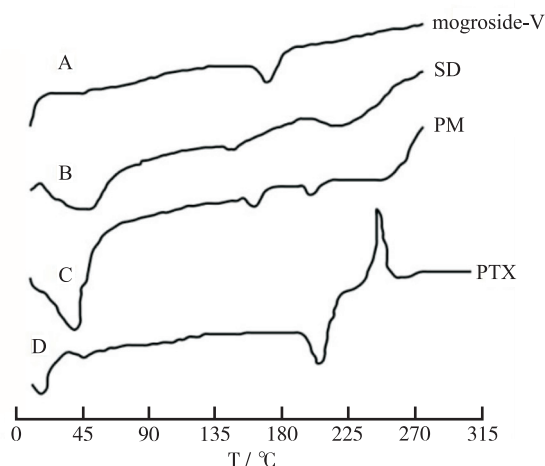


图 3 罗汉果苷 V (A)、固体分散体 (B)、物理混合物 (C)、紫杉醇 (D) DSC 图谱

Fig.3 DSC thermograms of mogroside-V (A), SD (B), PM (C), and pure paclitaxel (D)

2.7 体外溶出度实验 参照文献[16]方法,以恒温振荡水浴锅为溶出装置,以 pH 值 6.8 磷酸盐溶液(含 0.2% 聚山梨酯 80)为溶出介质,每个溶出杯加入溶出介质 100 mL,振荡频率 $50\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,温度为 $(37\pm 0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。称取等价于主药约 2 mg 的紫杉醇、物理混合物(1:20)、固体分散体分别加入溶出介质中,于 5, 10, 20, 30, 60, 120 min 定时定位取样 1 mL,经孔径 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,弃去初滤液。同时向溶出杯中补加新鲜介质 1 mL。取出的样品立即按“2.3.1”项方法测定紫杉醇浓度,重复 3 次。结果见图 4。结果显示紫杉醇在 120 min 时累积溶出度为 12%,紫杉醇-罗汉果苷 V(1:20)物理混合物累积溶出度在 120 min 达到 36.3%。紫杉醇-罗汉果苷 V 固体分散体在 5 min 时溶出度就达到 42.2%,120 min 时累积溶出度达到 83.9%。与紫杉醇比较,固体分散体和物理混合物的溶出速率和累积溶出度都有明显的提高,说明罗汉果

苷 V 能够显著增加难溶性药物紫杉醇的体外溶出。

累积溶出量(%) = (溶出的总物质量/投入量) × 100%

溶出的总物质量 = 当前取样点介质浓度 × 介质体积 + (之前取样点介质浓度 × 取样量)

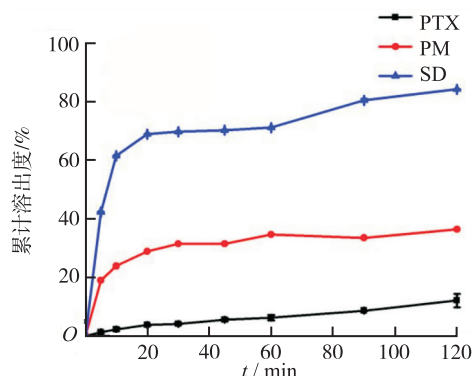


图 4 紫杉醇、物理混合物和固体分散体的体外溶出曲线

Fig.4 Dissolution curves of paclitaxel, PM and SD

3 讨论

笔者在本研究以食品添加剂罗汉果苷 V 为固体分散体的载体,考察不同投药比例对紫杉醇增溶效果的影响。以药物增溶倍数为指标,筛选出最佳的固体分散体投药比例为 1:20(W/W)。同时,本研究建立了灵敏度高、准确度好、检测范围广的 HPLC 法,用于测定制剂中紫杉醇的含量。另外,通过 DSC 分析法验证紫杉醇在固体分散体中以无定形或微小晶体形式存在,显示出该制剂中紫杉醇的增溶机制是改变其难溶性的晶体结构及降低晶体的大小。饱和溶解度和体外溶出的实验结果表明,以罗汉果苷 V 为载体,能有效提高难溶性药物紫杉醇的溶解度,进而改善其溶出速率和累积溶出度。

本研究的固体分散体处方简单、制备工艺简便,不仅显著提高紫杉醇的饱和溶解度,还有效改善其体外溶出性能。罗汉果苷 V 作为食品添加剂,安全、无毒。该研究结果表明罗汉果苷 V 有望成为新型载体辅料,在难溶性药物的制剂开发中具有极大应用价值。

参考文献

- [1] SUN W J, KANG M J. Improved oral absorption and chemical stability of everolimus via preparation of solid dispersion using solvent wetting technique [J]. Int J Pharm, 2014, 473 (1/2): 187-193.
- [2] SARODE A L, MALEKAR S A, COTE C, et al. Hydroxypropyl cellulose stabilizes amorphous solid dispersions of the poorly water soluble drug felodipine [J]. Carbohydr Polym, 2014, 112(21): 512-519.

- [3] AGARWAL N B, JAIN S, NAGPAL D, et al. Liposomal formulation of curcumin attenuates seizures in different experimental models of epilepsy in mice [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2013, 27(2): 169–172.
- [4] GOU M, MEN K, SHI H, et al. Curcuminloaded biodegradable polymeric micelles for colon cancer therapy *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nanoscale*, 2011, 3(4): 1558–1567.
- [5] ZHANG J, HIGASHI K, UEDA K, et al. Drug solubilization mechanism of α -glucosyl stevia by NMR spectroscopy [J]. *Int J Pharm*, 2014, 465(1/2): 255–261.
- [6] ZHANG J, TOZUKA Y, UCHIYAMA H, et al. NMR investigation of a novel excipient, α -glucosylhesperidin, as a suitable solubilizing agent for poorly water-soluble drugs [J]. *J Pharm Sci*, 2011, 100(10): 4421–4431.
- [7] TOZUKA Y, HIGASHI K, MORITA T, et al. Transglycosylated rutin-specific non-surface-active nanostructure affects absorption enhancement of flurbiprofen [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 82(1): 120–126.
- [8] JIA Z, YANG X. A minor, sweet cucurbitane glycoside from *Siraitia grosvenorii* [J]. *Nat Prod Commun*, 2009, 4(6): 769–772.
- [9] 莫丽英, 吴春勇, 王杏利, 等. 基于糖基化修饰的靶向药物传递系统研究概况 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(13): 209–219.
- [10] NICOLAOU K C, DAI W M, GUY M R K. Chemistry and biology of taxol [J]. *Angew Chem Int Edit*, 1994, 33(1): 15–44.
- [11] JORDAN M A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin [J]. *Curr Med Chem Anti Canc Agents*, 2002, 2(1): 1–17.
- [12] 程丹, 许幼发, 傅志勤, 等. 靶向肿瘤微环境的紫杉醇前药研究进展 [J]. *药学实践杂志*, 2018, 36(1): 1–8.
- [13] BARDELMEIJER H A, OUWEHAND M, BUCKLE T, et al. Low systemic exposure of oral docetaxel in mice resulting from extensive first-pass metabolism is boosted by ritonavir [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(21): 6158–6164.
- [14] GELDERBLUM H, VERWEIJ J, NOOTER K, et al. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation [J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(13): 1590–1598.
- [15] 刘蒸生, 郝海军, 马进安. 高乌甲素磷脂复合物及其固体分散体在大鼠体内的药动学 [J]. *医药导报*, 2018, 37(4): 449–452.
- [16] TOZUKA Y, IMONO M, UCHIYAMA H, et al. Dry powder formulation with α -glycosyltransferase-treated stevia for the effective absorption of hydrophobic bioactive compounds in crude drugs [J]. *Powder Technol*, 2013, 240: 2–6.

热烈祝贺《医药导报》入选北大中文核心期刊

(本刊讯) 依据文献计量学原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、统计和分析, 以及学科专家评审, 《医药导报》荣幸入选由北京大学图书馆编撰的 2017 年版《中文核心期刊要目总览》(即第 8 版) 综合性医药卫生类中文核心期刊。

我们将以本刊再次入选中文核心期刊为新的起点, 制订更加严格的编辑操作规程, 与广大读者、作者、编委、顾问、审稿专家共同努力, 进一步提高期刊质量, 将《医药导报》办得更加贴近读者, 贴近实际。

《医药导报》编辑部