

木犀草素与哌嗪共晶的表征及初步药动学研究^{*}

燕柳艳¹, 生立嵩^{1,3}, 宋俊科¹, 杨德智², 张丽², 吕扬², 王守宝¹, 杜冠华¹

(1.北京协和医学院、中国医学科学院药物研究所药物靶点研究与新药筛选北京市重点实验室,北京 100050;
2.北京协和医学院、中国医学科学院药物研究所晶型药物研究北京市重点实验室,北京 100050;3.山东省中医药研究院中药制剂研究所中药制剂研究室,济南 250014)

摘要 目的 研究木犀草素与哌嗪共晶的制备与表征,体外溶解性以及大鼠体内药动学,并与二者同比例物理混合物进行对比。方法 对共晶以及物理混合物进行粉末 X 射线衍射(PXRD)和差示扫描量热(DSC)分析,采用高效液相色谱法检测其体外溶解性,采用高效液相色谱-串联质谱技术测定大鼠灌胃给药的血药浓度,比较主要药动学参数的差异。结果 共晶与木犀草素的 PXRD、DSC 等方法检测结果存在明显差异,在十二烷基硫酸钠溶液中的溶解度较物理混合物提高 39%。大鼠灌胃给予共晶和物理混合物后,共晶的达峰时间和体内滞留时间明显缩短,药物浓度-时间曲线下面积增加。结论 共晶改善了木犀草素溶解度和体内生物利用度,提高了木犀草素的成药性。

关键词 木犀草素;哌嗪;共晶;药动学;生物利用度

中图分类号 R282.71;R943

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2022)05-0621-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2022.05.005

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Characterization and Preliminary Pharmacokinetics Study of Luteolin and Piperazine Cocrystal

YAN Liuyan¹, SHENG Lison^{1,3}, SONG Junke¹, YANG Dezhi², ZHANG Li², LYU Yang², WANG Shoubao¹, DU Guanhua¹ (1. *Beijing Key Laboratory of Drug Target Research and New Drug Screening, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100050 China*; 2. *Beijing Key Laboratory of Crystalline Drug Research, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*; 3. *Chinese Medicine Preparation Laboratory, Institute of Traditional Chinese Medicine, Shandong Institute of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China*)

ABSTRACT Objective To prepare, and characterize the cocrystal of luteolin and piperazine, and to compare the solubility and pharmacokinetics of luteolin cocrystal and mixture *in vitro*. **Methods** The powder X-ray diffraction (PXRD) and differential scanning calorimetry (DSC) were used to characterize the cocrystal and physical mixture. The *in vitro* solubility of luteolin was determined by the method of HPLC. The plasma concentration of luteolin was determined by liquid chromatography combined with mass spectrum (LC-MS). **Results** There were obvious differences in the results of PXRD and DSC between the cocrystal and luteolin. The solubility of the cocrystal in SDS solution was higher than that of the physical mixture by 39%. The primary pharmacokinetic study on the rats showed that, as compared to the physical mixture, the cocrystal presented shorter time reaching to peak and retention time, and increased the area under the drug concentration-time curve after intragastric administration. **Conclusion** The cocrystal improves the solubility and bioavailability of luteolin, indicating that a better druggability of luteolin.

KEY WORDS Luteolin; Piperazine; Cocrystal; Pharmacokinetics; Bioavailability

共晶是指 2 种或 2 种以上不同分子通过非共价相互作用力而处于同一晶格内的固体存在形式,既可以是药物-药物的组合,也可以是药物-化学小分子的组合,共晶技术是改善药物理化性质、提高成药性的有效手段^[1]。药物形成共晶后化学结构不受影响,但理化性质得到改善^[2-3]。药物共晶作为一种改善药物成药性的有效手段已引起广大药学研究者的关注^[4-6]。药物共晶的性质与药学研究不断有新颖和深入的发现,熊果酸-乙醇共晶^[7]以及加入十二烷基硫酸钠灌胃给药后熊果酸在大鼠体内的生物利用度显著提高。在抗菌药物共晶中^[2],磺胺噻唑与苯巴比妥酸共晶可大大

提高抗菌活性,使前者活性提高 2 倍以上。ARAUJO 等^[8]报道了氟苯咪唑的多个共晶,通过共晶改善了氟苯咪唑的溶解度,并因此提高了其体内血药浓度-时间曲线下面积(AUC)和吸收速率。因此,作为医药研究领域与药物晶体学工程研究的新兴交叉学科,药物共晶研究具有相当广阔的前景。

木犀草素是一种四羟基黄酮类化合物,存在于自然界多种植物当中,是一种广泛存在且具有药用价值的化合物。研究发现,木犀草素具有多种药理学作用,包括抗肿瘤^[9-15]、抗氧化、抗炎、保护神经系统等^[10-11]。作为典型的黄酮类化合物,木犀草素有多个酚羟基基

团作为氢键供体,有较好的形成共晶条件,因此将其与哌嗪进行共晶研究,旨在探讨提高木犀草素生物利用度的方法,以提高木犀草素的成药性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级健康SD大鼠,雄性,体质量180~220 g,购自北京维通利华实验动物技术公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006。大鼠分笼饲养,自由饮食,饲养室温度(25 ± 2)℃,相对湿度(60 ± 5)%,光暗周期同昼夜周期。

1.2 药品与试剂 木犀草素由陕西惠科植物开发有限公司生产(批号:20121016,含量 $\geq 96.0\%$);哌嗪由北京偶联科技有限公司生产(批号:20170226,含量 $\geq 95.0\%$);木犀草素与哌嗪共晶及同比例混合物均由中国医学科学院药物研究所药物晶型研究中心晶型药物研究北京市重点实验室自制。

1.3 实验仪器 Rigaku Smartlab 粉末X射线衍射仪(日本Rigaku公司);Mettler Toledo DSC 差示扫描量热仪(瑞士Mettler Toledo公司);Five Easy型pH计(瑞士Mettler Toledo公司);Agilent 1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);XS 105 Dual Range型分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,感量:0.01 mg);Agilent 1200系列液相质谱联用色谱仪(G1379B在线脱气机,G1311A四元梯度泵,G1329A自动进样器,G1315DDAD检测器及系统控制器,G1316A柱温箱,6110单四级杆质谱仪,ESI离子源,Agilent公司,美国);Allegra TMX-22R全自动高速冷冻离心机(Beckman公司,美国);Vortex-Genie 2漩涡混匀器(上海凡劲仪器设备有限公司);Organomation N-EVAP系列氮吹仪(Organomation公司,美国);固体灌胃器(中国医学科学院药物研究所国家药物筛选中心研制);Eppendorf移液器(Eppendorf公司,德国)等。

收稿日期 2021-11-30 修回日期 2021-12-22

基金项目 *国家重点研发计划(2018YFC0311003);海洋药物与生物制品功能实验室开放基金资助项目(LMDBKF201804)。

作者简介 燕柳艳(1997-),女,山东聊城人,硕士,专业方向:心血管药理学与新药发现。ORCID:0000-0002-9091-5073, E-mail:17862812787@163.com。

通信作者 王守宝(1978-),男,山东滕州人,副研究员,博士,从事心血管药理学与新药发现研究。电话:010-63165313, E-mail:shoubaowang@imm.ac.cn。

通信作者 杜冠华(1956-),男,山东人,研究员,博士,从事神经药理学与新药发现研究。电话:010-63165184, E-mail:dugh@imm.ac.cn。

1.4 粉末X射线衍射(powder X-ray diffraction, PXRD)条件 CuK α 辐射,石墨单色器,管压40 kV,管流150 mA,2 θ 扫描范围 $3^\circ\sim 40^\circ$,扫描速度 $8^\circ\cdot\text{min}^{-1}$,步长 0.02° ,发散狭缝 $DS=1^\circ$,接收狭缝为 $RS=0.15\text{ mm}$,防散射狭缝为 $SS=1^\circ$ 。

1.5 差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)热分析条件 样品量3~10 mg,精密称定。以空铝坩埚作为参比,氮气(N_2)气氛 $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,扫描温度范围: $30\sim 350^\circ\text{C}$,升温速率: $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

1.6 样品制备方法 共晶制备方法:精密称取木犀草素286.2 mg,哌嗪172.3 mg(摩尔比1:2)混合均匀,加入乙酸乙酯0.5 mL,轻轻研磨直至溶剂挥干,即得。物理混合物制备方法:按摩尔比1:2精密称取木犀草素和哌嗪,混合均匀,即得。

1.7 色谱及质谱条件 色谱柱 Agilent SB-C $_{18}$,柱温 30°C 。流动相,梯度洗脱: $0\sim 10\text{ min}$,乙腈:0.1%甲酸=25:75(V/V); $10\sim 14\text{ min}$,乙腈:0.1%甲酸=80:20(V/V); $14\sim 17\text{ min}$,乙腈:0.1%甲酸=25:75(V/V),流速 $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量:10 μL ,测定时间:17 min。质谱信号:ESI源(负离子检测模式),用于定量分析的离子荷质比为269.10与285.00(木犀草素),增益系数为2.0,干燥气流为 $10.0\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$,喷雾室电压为241.3 kPa,干燥器温度为 350°C 。

1.8 血浆样品的采集与处理 取雄性SD大鼠,随机分组,每组3只,动物自由饮水,禁食12 h后,根据设计于上午9:00按相同剂量固体灌胃给予木犀草素哌嗪共晶以及同比例物理混合物。给药5,15,30,45 min,1,1.5,2,3,6,9,12 h,眼眶内静脉丛取血约0.4 mL,至肝素化抗凝管, 4°C , $5000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min($r=6\text{ cm}$)。精密吸取肝素抗凝血浆100 μL ,置于1.5 mL离心管中,加入乙酸乙酯1.2 mL萃取,充分震荡5 min,离心($13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $r=6\text{ cm}$,10 min)。取上层溶液100 μL 于离心管中,常温下以 N_2 吹干。加入乙腈100 μL 复溶,震荡3 min,离心($13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $r=6\text{ cm}$,5 min),取上层溶液50 μL 于内衬管中,进样10 μL 。

1.9 统计学方法 实验结果中计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。利用DAS2.0版软件对测得的木犀草素与哌嗪共晶以及同比例物理混合物血药浓度数据进行药动学参数的计算和对比研究(非房室模型法)。

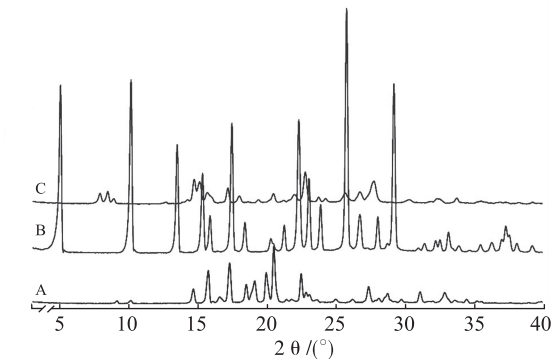
2 结果

2.1 木犀草素与哌嗪共晶的表征

2.1.1 PXRD分析 PXRD分析法可用于不同晶型物质鉴别,是木犀草素与哌嗪共晶的有效分析方法,共

晶和单一哌嗪、木犀草素的 PXRD 图谱在衍射峰数量、衍射峰位置、衍射峰强度、衍射峰拓扑图形等方面均存在明显差异,表明木犀草素与哌嗪共晶和单一哌嗪与木犀草素既不相同也不等同,证明了共晶形成,图谱见图 1。

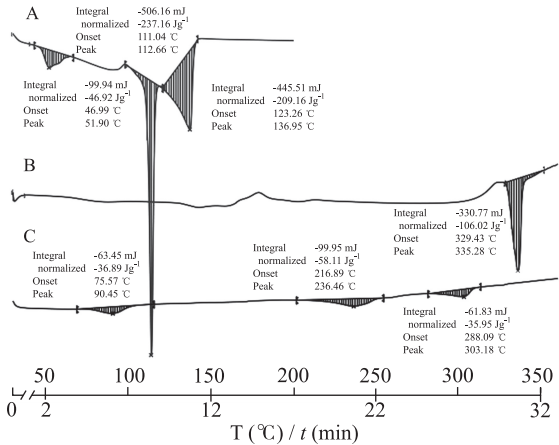
2.1.3 红外光谱分析 采用红外光谱法对木犀草素、哌嗪及共晶进行表征,其红外吸收光谱如图 3 所示。分析结果表明,在 3500,1250 cm^{-1} 附近,共晶与单一木犀草素、哌嗪的红外振动光谱存在明显差异。



A.哌嗪;B.木犀草素;C.木犀草素与哌嗪共晶。
图 1 哌嗪、木犀草素及两者共晶的 PXRD 图谱
A.piperazine;B.luteolin;C.luteolin and piperazine cocrystal.

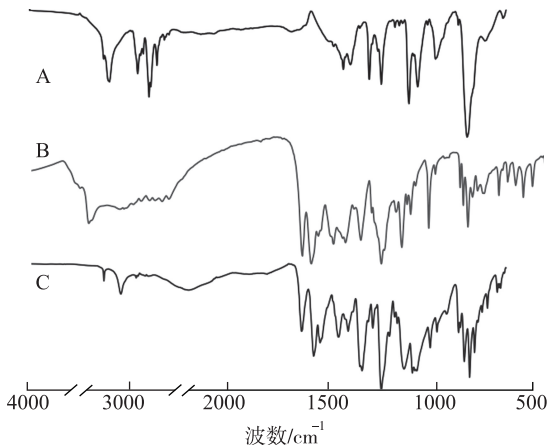
Fig.1 PXRD patterns of piperazine, luteolin and their cocrystal

2.1.2 DSC 分析 DSC 法是一种热分析法。该方法测量的是在程序控制温度下,测量输入到试样和参比物的功率差与温度的关系。由图 2 可知,哌嗪、木犀草素及共晶的吸热峰分别为 112.7,335.3,236.8 $^{\circ}\text{C}$,木犀草素和哌嗪熔融峰较尖锐,而共晶在相应温度下熔融峰完全消失,说明晶型发生改变。



A.哌嗪;B.木犀草素;C.木犀草素与哌嗪共晶。
图 2 哌嗪、木犀草素及两者共晶的 DSC 图谱
A.piperazine;B.luteolin;C.luteolin and piperazine cocrystal.

Fig.2 DSC curves of piperazine, luteolin and their cocrystal



A.哌嗪; B.木犀草素; C.木犀草素与哌嗪共晶。
图 3 哌嗪、木犀草素及两者共晶的 ATR-FTIR 图谱
A.piperazine; B.luteolin; C.luteolin and piperazine cocrystal.

Fig.3 ATR-FTIR patterns of piperazine, luteolin and their cocrystal

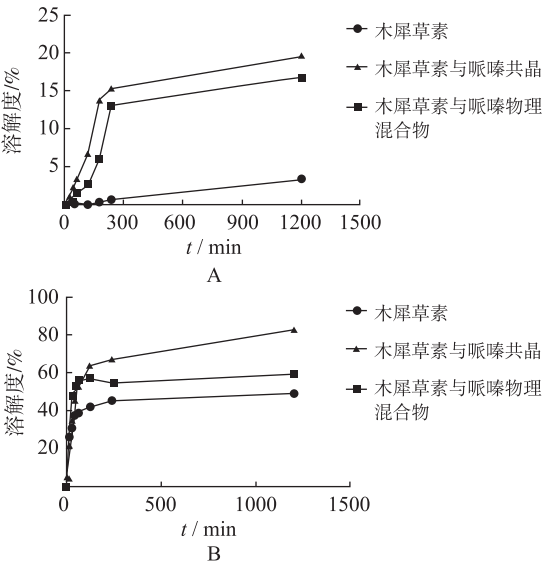
2.2 溶解性 为了验证晶型状态与晶型溶解性质的关系,对木犀草素、哌嗪及共晶进行溶解性质评价。参照溶解度测定方法^[16]测定。采用高效液相色谱法,利用样品的色谱峰面积数据对样品溶解的浓度进行计算,以时间为横坐标,溶剂浓度为纵坐标分别绘制溶解度曲线,溶解性数据见图 4。比较后发现,共晶可改善木犀草素的溶解性,在 0.5%十二烷基硫酸钠溶出介质中,共晶的溶出度较物理混合物提高 39%,溶出度最大达到 83.1%。

2.3 专属性 按照“1.7”项下色谱条件进行实验,木犀草素的保留时间为 7.0 min,在空白血浆相应位置处无吸收峰,说明该方法具有专属性。结果见图 5。

2.4 药动力学结果

2.4.1 血药浓度-时间曲线 共晶和物理混合物口服后在大鼠体内的血药浓度-时间曲线见图 6。共晶各个时间点血药浓度均高于物理混合物,共晶的血药浓度-时间曲线在 100 min 左右出现峰值,物理混合物的血药浓度-时间曲线在 350 min 左右出现峰值,说明共晶较物理混合物达峰时间早,且血药浓度高。说明共晶吸收速度快并且生物利用度高。

2.4.2 共晶及物理混合物在大鼠体内的药动力学参数 木犀草素与哌嗪共晶以及同比例物理混合物的药

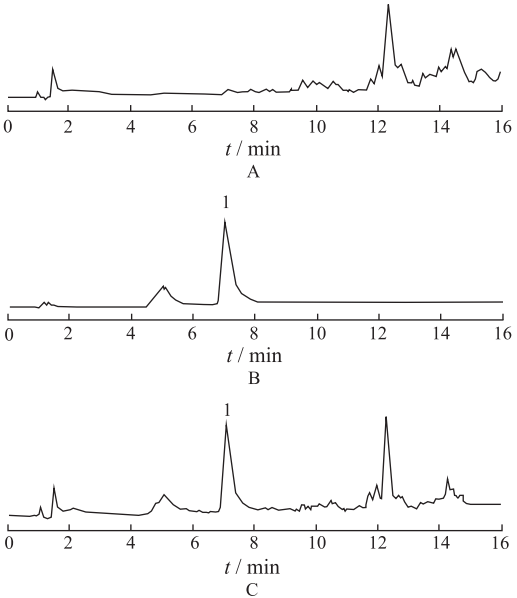


A.水;B.0.5%十二烷基硫酸钠溶液。

图4 木犀草素与哌嗪共晶、物理混合物及单一木犀草素在2种溶出介质中的溶出曲线图

A.water;B.0.5% sodium dodecyl sulfate solution.

Fig.4 Dissolution curves of luteolin and piperazine cocrystal, physical mixture and luteolin in two dissolution media



A.空白血浆;B.空白血浆+共晶样品;C.大鼠口服共晶5 min后血浆样品。

图5 血浆样品的LC-MS图

A. blank plasma; B. blank plasma mixed with cocrystal; C. rat plasma which were taken 5 min after oral cocrystal.

Fig.5 LC-MS chromatograms of plasma samples

代参数如表1所示,共晶的达峰时间(t_{\max})明显小于物理混合物,血药浓度-时间曲线下面积(AUC)大于物理

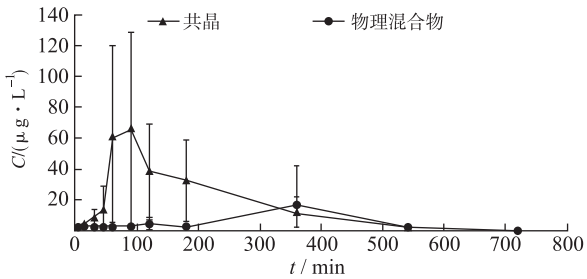


图6 共晶及物理混合物血药浓度-时间曲线($\bar{x}\pm s,n=3$)

Fig.6 Mean plasma concentration-time curves of cocrystal and physical mixture($\bar{x}\pm s,n=3$)

表1 大鼠灌胃给药后非房室模型药动学参数

Tab.1 Non-compartment model pharmacokinetic parameters of rats after intragastric administration

$\bar{x}\pm s,n=3$				
样品	AUC _(0-t)	AUC _(0-∞)	MRT _(0-t)	MRT _(0-∞)
	(μg·L ⁻¹ ·min ⁻¹)		min	
物理混合物	4 012.4±4 358.4	5 889.9±3 946.7	277.0±61.4	383.5±338.9
共晶	11 671.9±6 375.2	11 837.9±6 507.9	177.6±27.9 ^①	186.7±29.5

样品	$t_{1/2\alpha}$	t_{\max}	CL _Z /F/	V _Z /F/	C _Z /
	min		(L·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)	(L·kg ⁻¹)	(μg·L ⁻¹)
物理混合物	193.5±160.2	300.0±158.7	16.5±13.4	6 061.5±6 034.4	153.0±262.5
共晶	72.5±20.4	100.0±17.3 ^①	5.3±3.0	502.2±173.3	1.4±1.2

①与物理混合物比较, $t=2.553,2.170,P<0.05$ 。

①Compared with the physical mixture, $t=2.553,2.170,P<0.05$.

混合物($P<0.05$),说明共晶可使木犀草素更快达到合适的血药浓度,提高木犀草素的生物利用度。其他代谢参数与物理混合物也存在差异,如共晶在体内滞留时间短于物理混合物。

3 讨论

药物共晶是在不改变其化学结构的前提下,理化性质得到改善的一种强有力的方法。木犀草素具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化等良好的药理活性,但是成药性差,最重要的原因之一就是溶解度等理化性质差、生物利用度差,最终影响在体吸收过程,这是影响药理活性的关键,药物在体吸收浓度直接影响药物的有效性和安全性,因此,寻找提高生物利用度的方法尤其重要。近年来,对于溶解性的改善方面的研究很多,主要是将药物做成包合物^[17],结构修饰做成前药^[18]。本文通过共晶的方式明显改善了木犀草素的溶解性差的问题。

木犀草素多个羟基基团为其形成共晶创造了良好的条件,本研究采用化学小分子哌嗪进行共晶结合,制备后通过不同方法进行表征,发现PXRD、红外光谱分析与DSC均能有效鉴别共晶与物理混合物。通过溶

解性实验观察到在 0.5% 十二烷基硫酸钠溶剂系统中, 共晶溶解度较物理混合物有重要提高, 这对生物利用度的提高有重要意义。

同时, 大鼠初步体内药动学研究结果显示, 与物理混合物相比, 共晶固体口服给药在大鼠体内的峰浓度大于物理混合物, 且达峰时间明显缩短, 证明共晶能迅速发挥治疗作用, 具有更好的临床应用前景。

药物共晶研究对于新药的开发以及现有药物的优化都十分重要。木犀草素是一种黄酮类化合物, 哌嗪是一种化学小分子, 一种生物活性较强的物质与一种并无明确药效作用的物质结合, 其药理作用是否会进一步发生改变, 还有待深入研究发掘。

参考文献

- [1] 黄耀辉, 尹秋响, 张霞, 等. 药物共晶的合成和结构分析[J]. 化工学报, 2017, 68(2): 509-518.
- [2] GONG N, YU H, WANG Y, et al. Crystal structures, stability, and solubility evaluation of a 2 : 1 diosgenin-piperazine cocrystal[J]. Nat Prod Bioproc, 2020, 10(4): 261-267.
- [3] SANPHUI P, DEVI V K, CLARA D, et al. Cocrystals of hydrochlorothiazide: solubility and diffusion/permeability enhancements through drug-coformer interactions[J]. Mol Pharm, 2015, 12(5): 1615-1622.
- [4] ZEGARAC M, LEKSIC E, SKET P, et al. A sildenafil cocrystal based on acetylsalicylic acid exhibits an enhanced intrinsic dissolution rate[J]. Cryst Eng Comm, 2014, 16(1): 32-35.
- [5] ALMANSA C, MERCE R, TESSON N, et al. Co-crystal of tramadol hydrochloride-celecoxib (etc): a novel API-API co-crystal for the treatment of pain[J]. Cryst Growth Des, 2017, 17(4): 1884-1892.
- [6] 房政钰, 王雪, 邢逞, 等. 芒柄花素-4,4'-联吡啶共晶的制备表征及溶解性能[J/OL]. 医药导报: 1-18[2021-12-22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1293.R.20211220.0934.002.html>.
- [7] 刘夕琳, 张羽男, 杨玉婷, 等. 熊果酸共晶在大鼠体内的药代动力学[J]. 沈阳药科大学学报, 2017, 34(11): 973-978, 993.
- [8] DE ARAUJO G L B, FERREIRA F F, BERNARDES C E S, et al. A new thermodynamically favored flubendazole/maleic acid binary crystal form: structure, energetics and in silico PBPK model-based investigation[J]. Cryst Growth Des, 2018, 18(4): 2377-2386.
- [9] 冯旭琴, 胡兴胜, 张磊. 木犀草素抗肿瘤作用研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2017, 38(3): 79-82.
- [10] 吕畅, 王红芳, 阎雪莹. 木犀草素抗氧化作用研究进展[J]. 黑龙江医学, 2015, 28(5): 1019-1022.
- [11] 施凤超. 木犀草素抗骨关节炎的作用机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2015: 71-75.
- [12] 赵长祺, 郭志义. 木犀草素的药理作用研究进展[J]. 承德医学院学报, 2015, 32(2): 148-150.
- [13] 董欣敏. 木犀草素对乳腺癌 BT474 细胞增殖、侵袭的影响及机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2017: 42-55.
- [14] 严展鹏. 基于 Nrf2/ARE 信号通路探讨木犀草素对结直肠癌的化学预防作用及机理研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2014: 32-44.
- [15] 黄暨生. 木犀草素、芹菜素及槲皮素对黑色素瘤自杀基因治疗的增效研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016: 23-54.
- [16] 药品评审中心. 普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则[S]. 2015.
- [17] ATIPAIRIN A, SAWATDEE S. Inclusion complexes between sildenafil citrate and cyclodextrins enhance drug solubility[J]. Asian J Pharm Sci, 2016, 11(1): 104-105.
- [18] JIANG F J, FU X Z, WANG S W, et al. Synthesis and physicochemical property evaluation of carbamate derivatives of scutellarin methyl ester[J]. Chin Chem Lett, 2013, 24(4): 338-340.