

多西他赛与 β -环糊精及羟丙基- β -环糊精包合作用的研究

李 香, 林秀丽 (山东大学药学院, 山东 济南 250012)

摘要 目的: 考察多西他赛 (docetaxel, DTX) 与 β -环糊精 (β -CD) 及羟丙基- β -环糊精 (HP- β -CD) 的包合作用。方法: 采用冷冻干燥法和研磨法制备 DTX- β -CD 和 DTX-HP- β -CD 包合物, 差示扫描量热法 (DSC) 和红外光谱法 (IR) 对包合物进行鉴定; 摩尔连续递变法测定包合物的组成比例, 相溶解度法测定 DTX 在 25、37、45 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下在不同浓度 β -CD、HP- β -CD 水溶液中的包合稳定常数及相关的热力学常数。结果: DTX 与 β -CD、HP- β -CD 形成了稳定的包合物; 摩尔包合比均为 1:1, 相溶解度曲线为 A_N 型, 表观稳定常数 K 随着温度的升高而下降, 包合过程中的吉布斯自由能变化 (ΔG)、焓变 (ΔH) 和熵变 (ΔS) 均为负值。 β -CD 对 DTX 的增溶作用强于 HP- β -CD, 且 DTX- β -CD 包合物的稳定常数高于 DTX-HP- β -CD 包合物。结论: DTX 与 β -CD、HP- β -CD 可以自发形成可溶性包合物, 且低温有利于包合物的形成和稳定。 β -CD 对 DTX 的增溶作用及与 DTX 形成包合物的稳定常数均高于 HP- β -CD。

关键词 多西他赛; β -环糊精; 羟丙基- β -环糊精; 包合比; 包合常数; 热力学参数

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2008)02-0129-05

Complexation of docetaxel with β -cyclodextrin and HP- β -cyclodextrin

LIXiang, LIN Xiu-li (College of pharmacy, Shan Dong University, Jinan 250012, China)

ABSTRACT **Objective** To study the inclusion effects of β -CD and HP- β -CD on docetaxel. **Methods** The inclusion compound was prepared by the freeze-drying method and trituration. The measurements of the inclusion molar ratio of the host to guest molecules, apparent complexation constant, the thermodynamic parameters and the identification of the inclusion complex were carried out by the methods such as continuous variation method, UV absorption spectroscopy, phase solubility diagram, differential scanning calorimeter (DSC) and infrared spectra (IR) methods, respectively. **Results** The continuous variation method suggested the formation of aqueous soluble complexes with 1:1 molar ratio. A_N -type phase solubility curves were obtained. The apparent complexation constant K decreased when the temperature increased. All the thermodynamic parameters of ΔG , ΔH and ΔS in the complexations gave negative values. The solubility of docetaxel complexed with β -CD was higher than that of docetaxel complexed with HP- β -CD, also the apparent complexation constant of docetaxel- β -CD was higher than that of docetaxel-HP- β -CD. **Conclusion** The inclusion complex of DTX-Cyclodextrin could be formed spontaneously, and lower temperature is a benefit to the formation and the stability of the inclusion complex. The solubility and the stability constant of docetaxel complexed with β -CD is higher than that of docetaxel complexed with HP- β -CD.

KEY WORDS docetaxel; β -cyclodextrin; hydroxypropyl- β -cyclodextrin; complexation ratio; apparent complexation constant; thermodynamic parameter

多西他赛 (docetaxel, DTX) 作为第 2 代紫杉烷类抗肿瘤药物的代表, 其优异的广谱抗癌作用日益受到人们的关注。它能加快微管蛋白聚合成微管的速度并延缓微管的解聚作用, 导致形成稳定的非功能性的微管束, 从而破坏有丝分裂和细胞增值。其对多种肿瘤都具有抗癌活性, 包括乳腺癌、非小细胞癌和其他恶性肿瘤 (前列腺癌、食管癌以及头颈部恶性肿瘤等)^[1]。由于 DTX 水溶性差, 现有注射剂

(40 g/L) 是采用吐温-80 作溶剂, 同时配有含 13% 乙醇的溶媒, 由于吐温-80 具有溶血性, 且黏性大, 临床 I 期实验中大多数患者产生了明显的过敏反应; 另外, 吐温-80 可以干扰 p 糖蛋白表达, 会与一些联合使用的药物发生瞬间相互作用。因此有必要针对 DTX 研发新的制剂。

目前, 将 DTX 制成脂质体、微囊, 微滴已有广泛的研究^[2-4], 但与环糊精及衍生物制成包合物的报道却不多。本研究选用具有增加药物溶出度和溶出速度、提高药物稳定性及生物利用度作用的 β -环糊精 (β -cyclodextrin, β -CD)^[5] 和溶解性能良好、热稳

作者简介: 李香 (1980-), 女, 硕士研究生。E-mail: lixiang19800204@yahoo.com.

通讯作者: 林秀丽。E-mail: lixiul@sdlu.edu.cn.

定、溶血性低的羟丙基- β -环糊精 (hydroxypropyl- β -cyclodextrin HP- β -CD)^[6,7]为包合材料,采用冷冻干燥法、研磨法制备包合物,红外分光光度法 (IR)和差示扫描量热法 (DSC)对包合物进行鉴定。同时对包合过程中相关的热力学参数进行考察,为今后研制多西他赛包合物制剂提供理论依据。

1 仪器与材料

UV-2401PC型紫外-可见分光光度计(日本岛津);DSC822^o型热分析仪(瑞士梅特勒-托利多);傅立叶变换红外光谱仪(美国尼高利);Fu-1000型冷冻干燥机(日本东京),微型涡旋混合仪(上海泸西);2002型震荡器(常州国华电器有限公司);80-2离心沉淀器(上海);多西他赛原料药(齐鲁制药厂,纯度99%); β -CD(山东恒台新大精细化工有限公司,纯度 $\geq 98\%$);HP- β -CD(山东恒台新大精细化工有限公司,纯度 $\geq 98.6\%$,平均取代度6);其他试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 包合物及物理混合物的制备

2.1.1 包合物的制备 冷冻干燥法 按照处方比例称取DTX、环糊精分置烧杯中,加入无水乙醇使DTX溶解,搅拌条件下逐滴加到环糊精水溶液中,室温下搅拌3d将混合溶液中的乙醇蒸发;溶液过滤,滤液在-50℃条件下冷冻干燥24h得到无定形粉末,置干燥器中,备用。**研磨法:**按照处方比例称取DTX、环糊精,环糊精加蒸馏水研匀后,加入多西他赛的乙醇溶液混匀,置胶体磨中,充分研磨至糊状,过滤,冷风吹干即得。

2.1.2 物理混合物的制备 称取一定量的DTX及环糊精(摩尔比为1:1),过筛混匀,置干燥器中,备用。

2.2 包合物的物性测定

2.2.1 差示扫描量热法(DSC) 对DTX、环糊精、物理混合物(1:1)、包合物进行DSC扫描。测定条件:以空铝坩锅为参比物,另一铝坩锅放入样品,升温速度10℃/min,扫描范围30~300℃,测定气体为氮气。

2.2.2 红外光谱分析法 分别取DTX、环糊精、物理混合物(1:1)、包合物,经KBr压片,得红外光谱图。

2.3 包合物摩尔比组成的确定(连续递变法)^[8] 精密称取DTX4mg, β -CD5.7mg,HP- β -CD7.4mg分别置100mL容量瓶中,用25mL甲醇溶解,蒸馏水稀释至刻度,则浓度均为 5×10^{-5} mol/L;配制一系

列总浓度相同而DTX与环糊精(即 β -CD、HP- β -CD,以下均以环糊精代表 β -CD、HP- β -CD)的摩尔浓度比分别为1:3,1:2,2:3,1:1,3:2,2:1,3:1的溶液,以相同浓度的环糊精做空白,测定系列溶液在230nm处吸收度(A_0),计算与相同浓度的DTX溶液吸收度(A_1)之差 ΔA , ΔA 值最大处对应的摩尔比即为包合物的最佳包合比。

2.4 包合平衡常数及相关热力学的测定^[9]

2.4.1 标准曲线的绘制 配制DTX的系列标准溶液,在230nm处测定吸收度,以吸收度(A)对浓度(C)进行线性回归,得回归方程为 $A = 0.0264C - 0.0361$ 。结果表明DTX浓度与吸收度在1.2~8 μ g/mL范围内呈较好得线性关系。

2.4.2 绘制相溶解度图 根据Higuchi原理,精密配制不同浓度的 β -CD(2~10mmol/L)、HP- β -CD(2~20mmol/L)水溶液,置于具塞试管中,分别加入过量的DTX(约10mg),超声振荡3min,固定试管于25.37.45℃恒温振荡器中,调节转速200r/min振荡2d使其达到溶解平衡,静置。溶液离心20min(4000r/min),上清液稀释适当倍数以相同浓度的环糊精为空白在230nm波长处测定吸收度,按标准曲线法计算DTX的浓度。以DTX的浓度为纵坐标,环糊精浓度为横坐标,绘制平衡相溶解度图。

3 实验结果

3.1 包合物的鉴定

3.1.1 差示扫描量热法 DTX、环糊精、物理混合物、包合物的DSC扫描曲线见图1和图2。

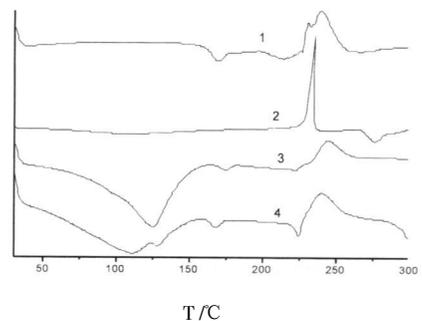


图1 β -CD·多西他赛体系 DSC曲线图

1-多西他赛; 2- β -CD; 3-多西他赛- β -CD包合物;
4-多西他赛- β -CD混合物

研磨法与冷冻干燥法制得的包合物 DSC图一致,由体系的DSC谱图可得:DTX在215℃的吸热峰为其熔点峰,240℃的放热峰则是分解峰; β -CD、HP- β -CD的吸热峰分别为276℃和236℃,其中 β -CD110℃左右出现的失水峰被较强的晶型转变峰掩盖,而HP- β -CD的失水峰约在70℃左右;物理混

合物谱图都含有 DTX 的吸热峰, 240 °C 和 254 °C 出现的放热峰分别为 DTX 和 β-CD 的叠加峰及 DTX 和 HP-β-CD 的叠加峰, 表明混合物为机械混合; 包合物的 DSC 曲线中 DTX 的熔点峰消失, 分解峰未发生变化, 这表明 DTX 与环糊精已形成包合物。

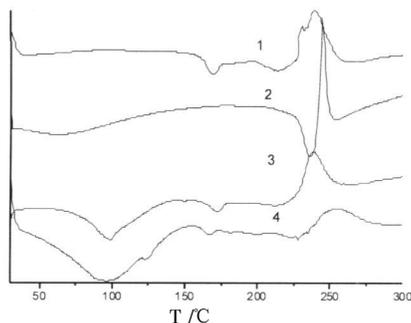


图 2 HP-β-CD·多西他赛体系 DSC 曲线图

1-多西他赛; 2-HP-β-CD; 3-多西他赛-HP-β-CD 包合物; 4-多西他赛-HP-β-CD 混合物

3.1.2 红外光谱图 红外分光光度法是比较药物包合前后在红外区吸收的特征, 根据吸收峰的变化情况(吸收峰降低、位移或消失)来判断包合物是否形成。

由红外谱图可得, DTX 与环糊精物理混合物的波形基本上是二者叠加的结果; 而包合物的波形则与环糊精波形相似, DTX 在 1750-1600, 1300-1180, 720-630 cm^{-1} 的吸收峰在包合物中消失或降低, 说明 DTX 与环糊精已形成包合物。

3.2 包合比例的确定 环糊精具有疏水的腔体, 能够包合适当大小的药物分子。当 DTX 的发色基团进入环糊精的非极性空腔后, 空腔内的高电子密度诱导 DTX 电子发生移动, 使得 DTX 吸收度发生不同程度的变化。由实验数据可知, 当药物与 β-CD、HP-β-CD 的比例为 1:1 时, 吸收度变化最大, 所以确定包合物的包合比例均为 1:1。

3.3 包合平衡常数及相关热力学常数 水溶液中包合物的形成是一个动态的平衡过程, 温度对包

合物的形成有一定的影响, 因此考察了不同温度下的相溶解度图, 结果见图 3 和图 4 并计算其包合物的包合常数。

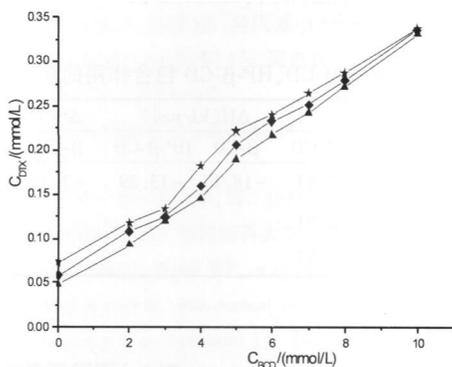


图 3 不同温度下水溶液中多西他赛-β-CD 的相溶解度图

- ▼ - 25 °C; - ◆ - 37 °C; - ★ - 45 °C

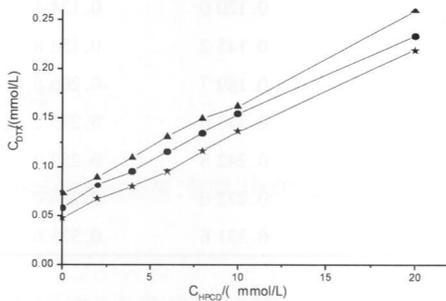


图 4 不同温度下水溶液中多西他赛-HP-β-CD 的相溶解度图

- ▼ - 45 °C; - ● - 37 °C; - ★ - 25 °C

从图 3 和图 4 可以看出, 相溶解度曲线呈 A_L 型, 说明有可溶性的包合物形成, 包合比为 1:1。参照文献^[10], 按以下公式计算出包合比为 1:1 时的包合常数: $K = \text{斜率} / S_0 (1 \text{斜率})$; 其中, 斜率为回归方程的斜率, S_0 为 DTX 在该温度下的饱和溶解度。结果见表 1。

表 1 不同温度下多西他赛与 β-CD、HP-β-CD 的稳定常数

T(°C)	回归方程		R2		K(L/mol)	
	β-CD	HP-β-CD	β-CD	HP-β-CD	β-CD	HP-β-CD
25	$Y = 0.0292X + 3.85 \times 10^{-5}$	$Y = 0.0086X + 4.75 \times 10^{-5}$	0.9958	0.9986	613	180
37	$Y = 0.0286X + 5.2 \times 10^{-5}$	$Y = 0.0087X + 6.24 \times 10^{-5}$	0.9921	0.9969	493	150
45	$Y = 0.0279X + 6.5 \times 10^{-5}$	$Y = 0.0093X + 7.27 \times 10^{-5}$	0.9843	0.9988	383	128

由表 1 可见, 随着温度的升高, 包合物的表观稳定常数减小, 即升温不利于包合物的生成, 因此在制备包合物时, 应选择合适的温度进行包合, 这样可使制得的包合物较稳定。由以上分析可知, 环糊精对

DTX 的增溶作用受环糊精浓度及温度的影响, 根据范得霍夫方程, 包合常数 K 与温度 T 符合下列关系式:

$$\text{Log } K = - \Delta H / 2.303RT + \Delta S / 2.303R$$

根据包含常数 K 与 T 的关系式, 以 $\log K$ 对 $1/T$ 绘图。由直线的斜率与截距可以计算出焓值 (ΔH) 和熵值 (ΔS), 在根据公式 $\Delta G = -RT \ln K$ 计算出反映自由能, 所得结果见表 2。

表 2 多西他赛与 β -CD、HP- β -CD 包合作用的热力学参数

T(°C)	G (kJ/mol)		ΔH (kJ/mol)		ΔS (J/k·mol)	
	β -CD	HP- β -CD	β -CD	HP- β -CD	β -CD	HP- β -CD
25	-15.90	-12.87	-18.17	-13.29	-7.36	-1.31
37	-15.98	-12.91				
45	-15.73	-12.83				

3种温度条件下, 包含反应的 ΔG 和 ΔH 均为负值, ΔS 为负值, 说明在恒温和恒压下, 包含过程是一个能自发进行的放热过程, 即属于焓作为主要驱动力的过程。同时考察了 DTX 在不同温度, 不同浓度环糊精对药物的增溶作用, 结果见表 3 和表 4。

随着温度的升高, DTX 的溶解度相应的增加, 同时, 随着环糊精浓度的增大, DTX 的溶解度也逐渐增加, 并且 β -CD 对多西他赛的增溶能力强于 HP- β -CD。可见, 环糊精可以增加药物的溶解度, 并且这种效应在一定范围内与环糊精的浓度和温度呈正相关。

表 3 不同质量浓度 β -CD 溶液对多西他赛的增溶作用

$C_{\beta\text{-CD}}$ (mmol/L)	多西他赛 (mmol/L)			增溶倍数 (S_1/S_2)		
	25 °C	37 °C	45 °C	25 °C	37 °C	45 °C
0	0.0476	0.0580	0.0728			
2	0.0928	0.1080	0.1180	1.950	1.862	1.621
3	0.1200	0.1244	0.1336	2.521	2.145	1.835
4	0.1452	0.1588	0.1819	3.050	2.738	2.499
5	0.1897	0.2068	0.2221	3.985	3.566	2.049
6	0.2176	0.2332	0.2412	4.782	4.021	3.313
7	0.2428	0.2520	0.2652	4.571	4.345	3.643
8	0.2720	0.2860	0.2881	5.714	4.931	3.957
10	0.3316	0.3356	0.3372	6.966	5.786	4.632

表 4 不同质量浓度 HP- β -CD 溶液对多西他赛的增溶作用

$C_{\text{HP-}\beta\text{-CD}}$ (mmol/L)	多西他赛 (mmol/L)			增溶倍数 (S_1/S_2)		
	25 °C	37 °C	45 °C	25 °C	37 °C	45 °C
0	0.0476	0.0580	0.0728			
2	0.0672	0.0812	0.0900	1.412	1.400	1.236
4	0.0804	0.0957	0.1096	1.689	1.650	1.505
6	0.0956	0.1158	0.1312	2.008	1.997	1.802
8	0.1160	0.1348	0.1492	2.437	2.324	2.049
10	0.1360	0.1542	0.1620	2.857	2.659	2.225
20	0.2192	0.2338	0.2592	4.605	4.031	3.560

注: S_1 , 多西他赛在环糊精溶液中的溶解度; S_2 , 多西他赛在水溶液中的溶解度

4 讨论

4.1 连续递变实验和相溶解度实验均证实, 多西他赛与环糊精以摩尔比 1:1 进行包含, 所以在包合物制备时, 按照 1:1 进行投料。

4.2 包合物制备过程中加入乙醇助溶, 形成了 DTX/环糊精/乙醇三元包合物, 并且无法通过干燥等纯化步骤将乙醇除去, 从而造成药物中乙醇的残留。同时由于乙醇可与药物竞争进入环糊精空腔, 因此乙醇对 DTX/环糊精包合物的制备不利。

4.3 包含过程的 ΔH 和 ΔS 均为负值, 表明包含反

应为放热反应, 故随着温度的升高, 包含过程朝反方向进行, 表现为包合物的 K 值随温度的升高而减小, 提示温度升高时, 更多的被包含的客体分子可能离开组分子的空腔而进入水相。

4.4 环糊精包合物 K 值的测定是环糊精包含技术应用的基础, 本研究采用相溶解度法测得包合物的 K 值, 证明 DTX 与环糊精有较好的包合作用。力学参数测定结果表明, 两种包合物的 K 值大小明显不同, HP- β 环糊精包合物的 K 值小于 β -环糊精包合物, 可能是由于 HP- β -CD 分子上的羟丙基产生了空间位阻效应, 从而导致该包合物主、客体分之间作用力减弱。

Stella V J等^[11]曾在文献中提到药物-环糊精的包合常数 K 一般在 100~ 20 000 mol/L 之间, 本文测得的 K 值较小, 说明药物与环糊精之间的作用力较弱, 主要是分子之间的范德华力和氢键作用力。

参考文献:

[1] 宋沁馨, 于立杰. 多西他赛的临床应用进展 [J]. 中国新药杂志, 2001, 10(12): 900.
 [2] Imordino ML, Bnusa P, Arpicco S, *et al* Preparation characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel [J]. *J Controlled Release*, 2003, 91(4): 417.
 [3] Dhanikula AB, Khalid NM, Lee SD, *et al* Long circulating lipid nanocapsules for drug detoxification [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(6): 1248.
 [4] Jakate AS, Einhaus CM, DeAnglis AP, *et al* Preparation characterization, and preliminary application of fibrinogen-coated olive droplets for the targeted delivery of docetaxel to solid malignancies [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(21): 7314.

[5] 王文波, 卞淑琴. 浅谈 β-环糊精在药物制剂中的应用及其作用机制 [J]. 中国制药信息, 2001, 17(2): 21.
 [6] Gould S, Scott RC. 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD): a toxicology review [J]. *Food Chem Toxicol*, 2005, 43(10): 1451.
 [7] 谢伯泰, 杨国武, 谢薇梅. 羟丙基-β-环糊精特性及其在医药领域中的应用与安全性 [J]. 国外医药: 合成药、生化药、制剂分册, 2002, 23(5): 302.
 [8] 陆彬. 药物新剂型与新技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 32.
 [9] 王敏, 任勇, 马学琴, 等. 盐酸哌唑嗪/羟丙基-β-环糊精包合作用研究 [J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(5): 423.
 [10] Pekka J, Anto U, David WP, *et al* Increase in aqueous solubility, stability and in vitro corneal permeability of anandamide by hydroxypropyl-β-cyclodextrin [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 1996, 137(2): 209.
 [11] Stella VJ, Rajewski RA. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery [J]. *Pharm Res*, 1997, 14(5): 556.

收稿日期: 2007-10-08

复方氯解磷定注射液细菌内毒素的检查方法

高锦¹, 付聪², 嵇扬¹, 聂瑜琼¹, 胡丹¹ (1. 总后勤部卫生部药品仪器检验所, 北京 100071; 2. 中国人民解放军第307医院药学部, 北京 100039)

摘要 目的: 建立复方氯解磷定注射液细菌内毒素检查法。方法: 采用《中国药典》2005年版附录细菌内毒素检查法。结果: 复方氯解磷定注射液稀释至含氯解磷定 10 mg/mL 及以下浓度时, 用灵敏度为 0.25 EU/mL 的鲎试剂检测细菌内毒素, 无干扰因素影响。结论: 复方氯解磷定注射液细菌内毒素限值确定为 0.2 EU/mg 可应用鲎试剂进行细菌内毒素法检查。

关键词 复方氯解磷定注射液; 细菌内毒素; 干扰试验

中图分类号: R927.11 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2008)02-0133-03

Application of bacterial endotoxin test to compound pralidoxime chloride injection

GAO Jin¹, FU Cong², JI Yang¹, NIE Yuqiong¹, HU Dan¹ (1. Institute for Drug and Instrument Control of Health Dept of PLA, Beijing 100071, China; 2. Department of Pharmacy, 307 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

ABSTRACT Objective To establish an application of bacterial endotoxin test to compound pralidoxime chloride injection. **Methods** The experiment was carried out based on the bacterial endotoxin test in Chinese pharmacopoeia 2005 edition. **Results** It was proved that the maximum non-interference concentration of compound pralidoxime chloride injection was pralidoxime chloride 10 mg/mL and the sensitivity of TAL was 0.25 EU/mL. **Conclusion:** The results suggested that the bacterial endotoxin test was suitable for the detection of endotoxin in compound pralidoxime chloride injection and the bacterial endotoxin limit was 0.2 EU/mg.

KEY WORDS compound pralidoxime chloride injection; bacterial endotoxin test; interfere factors test

复方氯解磷定注射液是将具有较强中枢作用和外周作用的抗胆碱药(硫酸阿托品与盐酸苯那辛)与起效快的胆碱酯酶重活化剂(氯解磷定)配

作者简介: 高锦 (1972-), 女, 主管药师. Tel (010) 66949079, E-mail: angelgaojin@163.com