

人参皂苷CK水合物的制备及其稳定性研究

朱文明¹ 张灵坚¹ 方佳双¹ 张辉^{2,*}

(1 浙江海正药业股份有限公司浙江省抗真菌药物重点实验室, 台州 318000; 2 台州科技职业学院, 台州 318000)

摘要: **目的** 研究人参皂苷CK的水合物及其稳定性差异。**方法** 采用X-射线粉末衍射、差示扫描量热仪和热重分析仪对3种人参皂苷CK水合物进行表征; 通过高温、高湿、光照、研磨及悬浮转晶等实验对3种水合物的稳定性进行对比研究。**结果** 高温条件下, 人参皂苷CK一水合物和半水合物稳定而二水合物会失水变化, 而在高湿、光照、研磨条件下, 3种水合物的稳定性均良好; 一水合物在乙腈/水(3:1)的混合溶剂中稳定, 半水合物在丙酮溶剂中稳定, 二水合物在甲醇溶剂中稳定, 而在水中3种水合物均不会发生晶型转变。**结论** 本研究确定人参皂苷CK一水合物更适合作为药用晶型, 并为其结晶工艺和制剂工艺的开发提供了数据基础。

关键词: 人参皂苷CK; 水合物; 稳定性; 多晶型

中图分类号: R93, O723+.5 **文献标志码:** A

Study on the stability of ginsenoside compound-K hydrates

Zhu Wen-ming¹, Zhang Ling-jian¹, Fang Jia-shuang¹, and Zhang Hui²

(1 Zhejiang Key Laboratory of Antifungal Drugs, Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co., Ltd, Taizhou 318000; 2 Taizhou Vocational College of Science and Technology, Taizhou 318000)

Abstract Objective To estimate the difference and stability of ginsenoside compound-K hydrates. **Methods** X-ray powder diffraction (XRPD), differential scanning calorimetry (DSC), and thermogravimetric analysis (TGA) were used to perform detailed characterization of three ginsenoside compound-K hydrates. The stability of the three hydrates were evaluated by experiments of high temperatures, high humidity, strong illumination, grinding, and suspension. **Results** At high temperatures, the monohydrate and hemihydrate of ginsenoside compound-K are stable, while dihydrate can release water molecules. All of the hydrates showed good phase stability under high humidity, strong illumination, and grinding conditions. **Conclusion** This study confirms that the monohydrate of ginsenoside compound-K is more suitable for a commercialized solid state and provided data basis for the development of crystallization process and preparation process.

Key words Ginsenoside compound-K; Hydrate; Stability; Polymorphism

同一药物分子因晶体排列与填充方式的不同, 以不同晶体形式存在, 称之为药物的多晶型现象。固体药物广泛存在多晶型现象, 同一药物不同多晶型之间可能会存在理化性质差异, 如溶解度、稳定性、抗压缩性等, 从而进一步表现出不同的生物利用度等^[1-2]。因此, 对药物多晶型及其理化性质尤其是其稳定性进行研究, 在药物研发过程中具有重要

的意义。

人参皂苷CK(ginsenoside compound-K, GCK)是天然二醇型人参皂苷的肠道代谢产物, 于1972年被日本研究员分离鉴定出来^[3]。近几十年来的研究已经证实, GCK是人参皂苷类物质发挥理活性作用的实体物质。GCK不仅在抗炎^[4]、保肝^[5]、抗过敏^[6]、抗肿瘤^[7]等方面具有良好的药理活性, 而且在神经系

收稿日期: 2021-01-31

作者简介: 朱文明, 男, 生于1982年, 硕士, 研究方向为微生物药物, E-mail: 0212.com@163.com

*通讯作者, E-mail: zhanghui_6363@163.com

统和免疫系统方面 also 具有很好的调节作用^[8-9]。目前GCK口服片作为我国自主研发的1、2类新药治疗免疫系统疾病正处于临床研究阶段。

GCK已报道的晶型有二水合物和甲醇水溶剂化物^[10-12]。为获得无溶剂合物,本研究对GCK固体进行了系统的晶型筛选,得到其多种水合物和溶剂化物,并将其进行知识产权保护^[13-16]。近年来,又陆续有文献报道了新的GCK的溶剂合物,如甲醇溶剂化物和丙酮水溶剂化物^[17-18],但均未获得无溶剂合物。本研究制备了GCK的3种水合物(半水合物,一水合物和二水合物),并采用多种分析技术对3种水合物进行了固相表征,然后对各水合物的相对稳定性进行了研究。

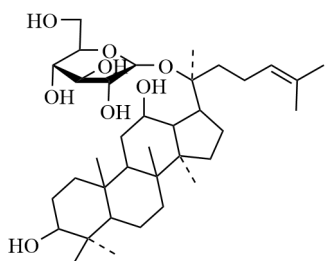


图1 人参皂苷CK的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of ginsenoside compound-K

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

研磨仪:德国莱驰公司混合型,MM200;高效液相色谱仪:安捷伦科技中国有限公司,1260;分析色谱柱:菲罗门,luna C18液相色谱柱,5 μ m,460 mm \times 200 mm;X-射线粉末衍射仪:日本理学D/max2500VL/PC;差式扫描量热仪:美国TA公司Q2000;热重分析仪:美国TA公司Q500。

GCK样品:浙江海正药业股份有限公司,纯度 $\geq 99\%$;有机溶剂:国药化学试剂公司,分析纯;蒸馏水:浙江海正药业股份有限公司自制。

1.2 水合物的制备

1.2.1 半水合物的制备

取GCK粗品1 g,置于结晶器中,加入100 mL丙酮,升温至50 $^{\circ}$ C溶解,热过滤,以2 $^{\circ}$ C/min的速度冷却至20 $^{\circ}$ C后,继续搅拌1 h,将悬浮液过滤,并将所得固体在室温条件下真空干燥24 h。

1.2.2 一水化物的制备

取GCK粗品6 g,置于结晶器中,向其中加入30 mL正丙醇和10 mL水,开启搅拌,溶质慢慢溶解,待完全溶解后向其中慢慢滴加水,直到析出固体,继续

加入60 mL水,将悬浮液过滤,并将所得固体置于50 $^{\circ}$ C真空干燥箱中干燥16 h。

1.2.3 二水合物的制备

取GCK粗品6 g,置于结晶器中,向其中加入56 mL甲醇,升温至50 $^{\circ}$ C,搅拌使其完全溶解,热过滤,并以0.5 $^{\circ}$ C/min的速率冷却至20 $^{\circ}$ C时析出固体,搅拌0.5 h后,继续冷却至10 $^{\circ}$ C,过滤,滤饼置于室温条件下真空干燥24 h。

1.3 水合物的固相表征

1.3.1 X-射线粉末衍射分析(XRD)

实验条件为石墨单色器,Cu-K α 系射线($\lambda=1.54180\text{\AA}$),电流40 kV,电流40 mA,2 θ 角扫描范围3 $^{\circ}$ ~45 $^{\circ}$,扫描速度8 $^{\circ}$ /min,扫描步长0.02 $^{\circ}$,温度室温。

1.3.2 差式扫描量热分析(DSC)

将精确称量的样品置于带盖铝坩埚中,升温速率10 $^{\circ}$ C/min,温度范围30 $^{\circ}$ C~250 $^{\circ}$ C,氮气吹扫速率50 mL/min。

1.3.3 热重分析(TGA)

将精确称量的样品置于带盖铝坩埚中,升温速率10 $^{\circ}$ C/min,温度范围20 $^{\circ}$ C~250 $^{\circ}$ C,氮气吹扫速率60 mL/min。

1.4 不同水合物的稳定性实验

考察原料药在温度、湿度、光照等条件下的晶型和纯度变化,在不同溶剂中的纯度变化等为其后续样品的制备与储存、包装和运输,以及制剂工艺的开发等提供科学依据。

1.4.1 高温处理

分别将3种GCK水合物置于80 $^{\circ}$ C的高温环境下放置10 d,取出后测试。

1.4.2 高湿度处理

准确称取GCK 3种水合物各15 mg置于温度为40 $^{\circ}$ C,相对湿度为75%的高湿环境下放置10 d,取出后测试。

1.4.3 光照处理

准确称取GCK 3种水合物置于光强度为3500 Lx的光照实验装置10 d,取出后测试。

1.4.4 研磨处理

在研磨过程当中,物质在机械力的作用下,比表面积增大,分子排列有可能会发生改变,从而形成新的晶型。通过此实验可检验药物晶型在此过程中的稳定性。本实验采用干磨法(不加溶剂)。3种水合物各取1 g放入研磨仪中研磨,研磨频率25 Hz,研

磨时间25 min, 分析其晶型是否发生了变化。

1.4.5 悬浮实验

不同晶型在同一溶剂中的溶解度差异, 导致其在溶液中的相对稳定性存在差异, 研究不同溶液中各个水合物的相对稳定性, 可以对其结晶工艺的开发及优化提供数据基础。根据水合物制备工艺, 实验分别对3种水合物在水、丙酮、甲醇和乙腈/水=3:1的混合溶剂中的晶体稳定性进行了考察。

(1)室温下, 将3种GCK水合物100 mg分别投入1 mL蒸馏水中, 悬浮振荡一周后过滤, 样品经室温真空烘干。

(2)25℃下, 向1 mL丙酮中加入分别加入100 mg GCK半水合物、一水合物和二水合物, 搅拌一周后过滤, 样品经室温真空烘干。

(3)分别将100 mg的GCK 3种水合物加入25℃下的1 mL乙腈-水= 3:1的混合溶剂中, 悬浮振荡一周后过滤, 样品经室温真空烘干。

(4)室温下, 将过量的3种GCK水合物100 mg分别投入1 mL甲醇中, 悬浮振荡一周后过滤, 样品经室温真空烘干。

2 结果与分析

2.1 PXRD分析

通过X-射线粉末衍射分析来确定实验所得固体产物的晶型, 实验所得样品分析结果见图2。3种水合物的主要衍射峰有明显区别, 其晶体结构堆积排列方式存在明显的不同。其中, 半水合物^[14]在2θ值为5.52°、6.72°、11.08°、13.28°、14.60°、15.44°、15.84°、20.60°和22.32°附近处有主要衍射峰, 一水合物^[13]在2θ值为6.39°、12.71°、13.30°、15.79°、16.14°、16.44°、20.03°和24.29°附近处有主要衍射峰; 而二水合物^[11]在2θ值5.66°、9.31°、12.08°、13.46°、14.80°、15.41°、16.76°、17.33°和19.68°处有主要衍射峰。

2.2 DSC分析

GCK的半水合物、一水合物和二水合物的DSC图谱如图3所示。在分解前的整个升温过程中, 半水合物只有一个吸热峰, 峰值为184.6℃; 一水合物和二水合物类似, 都有两个吸热峰, 峰值分别为150.4℃、163.3℃、149.2℃和164.4℃。

2.3 TGA分析

GCK的半水合物、一水合物和二水合物的TGA分析图谱如图3所示。半水合物和一水合物的失重量

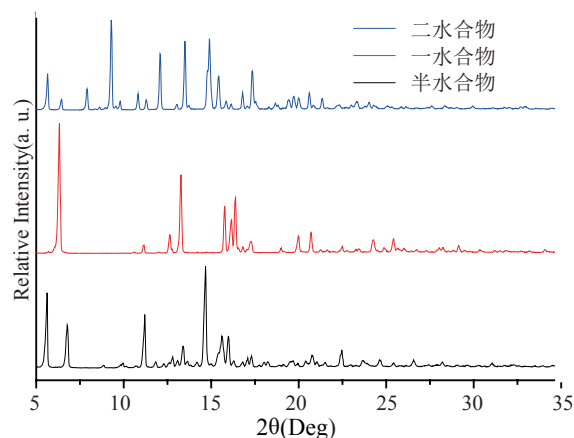


图2 人参皂苷CK水合物的PXRD图

Fig. 2 The PXRD patterns of Ginsenoside Compound-K hydrates

分别为1.6%和2.9%, 与各自的理论失重量(1.4%和2.8%)基本一致, 而二水合物的失重量为4.1%, 其理论失重量为5.4%, 实际值与实验值相差较大, 这可能是由于二水合物晶体结构中水分子与GCK分子的结合力较弱, 造成晶体结构极易脱水^[11]。

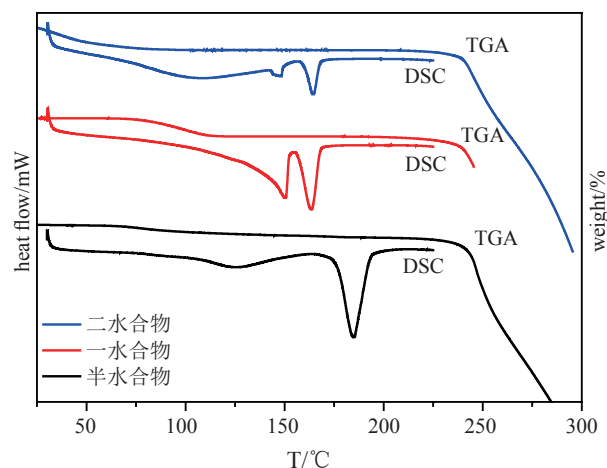


图3 人参皂苷CK水合物的DSC和TGA图谱

Fig. 3 The DSC and TGA thermograms of ginsenoside compound-K hydrates

2.4 不同水合物的稳定性试验

2.4.1 高温处理

高温处理实验结果表明, 80℃, GCK半水合物和一水合物晶型稳定性良好, 而GCK二水合物在温度为80℃、放置5 d后水分含量减少, 说明其热稳定性要比前两种水合物差。虽然在温度较高时, GCK二水合物会脱去水分子, 但是实验也发现, GCK二水合物在高温脱水后放置室温会重新吸湿, 脱水前后其PXRD图谱基本不变^[11]。

2.4.2 高湿处理

高湿实验结果显示, GCK的二水合物、一水合物和半水合物高湿条件下未发生晶型转变, 高湿稳定性良好。

2.4.3 光照处理

光照实验结果显示, 3种GCK的水合物在光照条件下未发生晶型转变。

2.4.4 悬浮实验

实验分别对GCK3种水合物在水、丙酮、甲醇和乙腈-水=3:1的混合溶剂中的晶型稳定性进行了考察。实验结果表明, 25℃下, 在丙酮溶剂中, 半水合物相对稳定性最好; 在乙腈-水=3:1溶剂中, 一水合物相对稳定性好; 在甲醇溶剂中二水合物的相对稳定性最好, 而在水中3种水合物的稳定性均良好。

2.4.5 机械研磨

本实验结果显示, GCK的3种水合物在研磨过程中晶型均未发生变化, 稳定性均良好。

3 结论

本研究考察了高温、高湿、研磨及悬浮转晶等条件对GCK的3种水合物的稳定性影响, 结果表明, 高温条件下, 一水合物和半水合物稳定而二水合物会失水变化, 而在高湿、光照和研磨条件下, 3种水合物的稳定性均良好; 悬浮实验中, 一水合物在乙腈-水=3:1的混合溶剂中稳定, 半水合物在丙酮溶剂中稳定, 二水合物在甲醇溶剂中稳定, 而在水中3种水合物均不会发生晶型转变。半水合物和一水合物在所研究条件下均稳定, 考虑到半水合物为长针状晶体^[14], 在后续生产制剂等过程中可能会发生静电效应, 流动性差, 从而不利于处理, 而一水合物为棒状晶体^[13], 流动性良好, 因此优选一水合物为优势晶型。根据上述结果, 在实际生产过程中选用溶剂时, 研究人员应充分考虑晶型对溶剂的依赖性, 避免GCK结晶过程中形成混晶或不理想的晶型。因此, 本研究为GCK一水合物结晶工艺和制剂工艺的开发提供了数据基础。

参考文献

- [1] 吕扬, 杜冠华. 晶型药物[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 6-7.
- [2] 杜冠华, 吕扬. 仿制药一致性评价相关药物晶型的问题分析[J]. 医药导报, 2017, 36(6): 593-596.
- [3] Akao T, Kida H, Kanaoka M, *et al.* Intestinal bacterial hydrolysis is required for the appearance of compound K in rat plasma after oral administration of ginsenoside Rb1 from *Panax ginseng*[J]. *J Pharm Pharmacol*, 1998, 50(10): 1155-1160.
- [4] Zhang J, Cao L, Wang H, *et al.* Ginsenosides regulate PXR/NF- κ B signaling and attenuate dextran sulfate sodium-induced colitis[J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43(8): 1181-1189.
- [5] 张雷明, 傅风华, 王天, 等. 人参皂苷CK对四氯化碳致大鼠慢性肝损伤的影响[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(1): 38-39.
- [6] Choo M K, Park E K, Han M J, *et al.* Antiallergic activity of ginseng and its ginsenosides[J]. *Planta Medica*, 2003, 69(6): 518-522.
- [7] Chen H F, Wu L X, Li X F, *et al.* Ginsenoside compound K inhibits growth of lung cancer cells via HIF-1 α -mediated glucose metabolism[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2019, 65(4): 48-52.
- [8] Jang S, Ryu J H, Kim D H, *et al.* Changes of [3H]MK-801, [3H]muscimol and [3H] flunitrazepam binding in rat brain by the prolonged ventricular infusion of transformed ginsenosides[J]. *Neurochem Res*, 2004, 29(12): 2257-2266.
- [9] Chen X J, Li H, Yang Q, *et al.* Ginsenoside compound K ameliorates Alzheimer's disease in HT22 cells by adjusting energy metabolism[J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(5): 5323-5332.
- [10] Zhou W, Feng M Q, Li J Y, *et al.* Studies on the preparation, crystal structure and bioactivity of ginsenoside compound K[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2006, 8 (6): 519-527.
- [11] 周佩, 周伟, 李继扬, 等. 一种制备人参皂苷Compound-K的方法: CN, 200410018000[P]. 2004-04-27.
- [12] 文孟良, 李明刚, 杜刚. 一种链霉菌发酵三七皂苷制备稀有人参皂苷compound K的方法: CN, 101139562 B[P]. 2007-07-02.
- [13] Chen J, Zhu W, Ji W, *et al.* Crystal structure and physical stability of ginsenoside compound-K solvates[J]. *Cryst Eng Comm*, 2019, 21(47): 7313-7321.
- [14] 任国宾, 代常亮, 陈金瑶, 等. 人参皂苷C-K的两种晶型及其制备方法: CN, 103360450B[P]. 2012-04-01.
- [15] 龚俊波, 李润妍, 代常亮, 等. 一种人参皂苷C-K一水合物晶体及制备方法: CN, 103087138B[P]. 2013-01-10.
- [16] 龚俊波, 李润妍, 代常亮, 等. 一种人参皂苷C-K半水合物晶体及制备方法: CN, 103073611B[P]. 2013-01-10.
- [17] Li R, Dong W, He H, *et al.* Isolation, characterization and phase transformation of new ginsenoside compound k hydrate and methanol solvates[J]. *Cryst Res Technol*, 2012, 47(4): 377-384.
- [18] Gu H, Li R, Sun Y, *et al.* Molecular modeling of crystal morphology of ginsenoside compound K solvates and its crystal habit modification by solvent molecules[J]. *J Cryst Growth*, 2013, 373: 146-150.