论著

文章编号:1000-5404(2010)20-2220-04

冬凌草甲素磷脂复合物的制备及其性质研究

陆国庆[1,2],郑 江[3],郑新川[3],鲁永玲[3],何凤慈[1] (400038 重庆,第三军医大学科研部[1];610083 成都,成都军区总医院临床药学科[2];400038 重庆,第三军医大学西南医院中心实验室[3])

【摘要】 **目的** 制备冬凌草甲素磷脂复合物,并研究其理化性质。**方法** 溶剂挥发法制备冬凌草甲素磷脂复合物,差示扫描量热法研究复合物的热力学性质变化,X射线衍射分析研究冬凌草甲素在复合物中的存在状态,紫外-可见分光光度法验证是否有新化学键生成,显微镜检复合物在水中分散情况。**结果** 磷脂复合物中冬凌草甲素熔点峰发生改变;冬凌草甲素在磷脂复合物中以无定型存在,晶体衍射峰消失;紫外-可见分光光度法分析显示无新化合物生成;显微镜镜检证实冬凌草甲素磷脂复合物在水中不稳定、易析出晶体。**结论** 成功制备冬凌草甲素磷脂复合物,但是该系统在水中不稳定,不能单独作为冬凌草甲素的药物传递系统。

【关键词】 冬凌草甲素;磷脂复合物;理化性质

【中图法分类号】 R914.5;R927;R961 【文献标志码】 A

Preparation and characterization of oridonin phospholipid complex

Lu Guoqing[1,2], Zheng Jiang[3], Zheng Xinchuan[3], Lu Yonglin[3], He Fengci[1] ([1]Division of Scientific Research Affairs, [3]Medical Research Center, Southwestern Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Clinical Pharmacy, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

【**Abstract**】 **Objective** To prepare and characterize oridonin phospholipid complex. **Methods** Oridonin phospholipid complex was prepared by solvent evaporation. The thermodynamic properties of oridonin phospholipid complex were studied by differential scanning calorimetry. The state of oridonin in the complex was studied by X-ray diffraction. Whether new chemical bonds existed were studied by UV-VIS spectrophotometry. The dispersion of oridonin phospholipid complex in water was studied through observing crystals of oridonin by microscopy. **Results** The peak of melting point changed in the DSC spectra. The crystallogram showed that oridonin dispersed in an amorphous form in phospholipid, meanwhile the peaks of crystal diffraction disappeared. There was no new chemical bonds appearance. The oridonin phospholipid complex was instable and could easily separate crystals out in water. **Conclusion** We successfully prepare oridonin phospholipid complex, but the system is instable in water, so can not be used as drug delivery system for oridonin alone.

【**Key words**】 oridonin; phospholipid complex; physicochemical properties

Corresponding author: He Fengci, Tel: 86-23-68752180, E-mail: furan19@126.com

冬凌草甲素(oridonin, ORI)是一种对多种肿瘤细胞具有较强抗癌活性的细胞毒性药物[1-4]。临床资料显示ORI尤其对消化系统肿瘤具有较好的治疗效果[5,6],其潜在的生物学效应已经引起广泛关注。然而其极微溶于水和油脂的理化性质[6,7],限制了其在临床的推广和应用,目前还没有适应的剂型上市。

天然磷脂具有无毒、无免疫原性、生物相容性好等优点,已经广泛应用于临床。本研究利用磷脂复合物新型药物传递系统,以期提高ORI的溶解性。利用磷脂与具有给电子效应的天然药物活性单体在一定条件下反应,以分子间作用力结合,发生物相变化,生成具有不同理化性质的复合物,称为磷脂复合物。其理化性质较原药将发生显著变化,如:脂溶性明显增强,熔点、吸收系数、晶体衍射特征峰等将发生明显变化[8-12]。基于以上设想,本研究对ORI与磷脂的复合

【通信作者】 何凤慈,电话:(023)68752180, E-mail: furan19@126.com

情况进行了研究,以期为构建ORI新型药物传递系统提供新思路。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

DSC Q100差示扫描量热仪(美国TA仪器公司),日本理学D/Max-2500pc X射线衍射分析仪,紫外-可见分光光度计(Ultrospec 4300pro),XSJ-2显微镜(重庆光电仪器有限公司),旋转蒸发仪(Büchi公司):V-800蒸发器、V-500真空装置、B-490水浴装置、B-740冷凝器、300 mm蛇型冷凝管、恒温磁力搅拌器(85-2),电子天平(METTLER TOLEDO AB135-S,max 31 g,d=0.01 mg),艾科普高端超纯水系统(ACD-6000-U),低温高速离心机(Eppendorf,5417R)。

冬凌草甲素(>98.07%,西安旭煌生物科技有限公司,081216),大豆磷脂(soya Phosphatidylcholine, SPC)(PC>90%,上海太伟药业有限公司,20080320),定量滤纸,水为超纯水,其他试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 制备方法 将适量的ORI和SPC加入反应溶剂溶解(可超声溶解),一定温度下恒温磁力搅拌至反应时间,转移至旋转蒸发仪,减压除去反应溶剂,再加入适量非质子溶剂复溶,充分溶解其中的SPC及复合物,滤去沉淀,挥干有机溶剂,即得,充氮绝氧,室温贮存[7-11]。

1.2.2 复合效果影响因素考察 反应溶剂、药脂比、反应时间、反应温度等因素均可以影响复合效果。参考文献[8-12]以复合率作为评价指标。计算公式如下。

$$复合率=(W_1-W_2)/W_1\times100\%$$

其中,W_1为ORI的加入量,W_2为沉淀质量(非质子溶剂复溶后,将液体转入铺垫有无灰滤纸的三角漏斗中(滤纸提前称量W_1),过滤,过夜,称量滤纸质量W_2,以W_2-W_1作为沉淀质量)。结合预实验,本研究拟定旋转蒸发后的成膜质量即均匀与否、药物是否析出,也作为观察、评价指标。

1.2.2.1 反应溶剂考察 常用反应溶剂包括:甲醇、乙醇、四氢呋喃、乙酸乙酯、丙酮、二氯甲烷及其混合溶剂。

1.2.2.2 药脂比考察 拟定药脂比为ORI:SPC=1:5、1:4、1:3、1:2、1:1(物质的量比),加入30 ml四氢呋喃,55 ℃水浴恒温磁力搅拌4 h,旋转蒸发除尽有机溶剂,正己烷复溶,过滤,称量沉淀质量,观察成膜质量。

1.2.2.3 反应时间考察 拟定反应时间为2、3、4、5、6 h,加入30 ml四氢呋喃,55 ℃水浴恒温磁力搅拌至反应时间,旋转蒸发除尽有机溶剂,正己烷复溶,过滤,称量沉淀质量,观察成膜质量。

1.2.3 复合物验证 磷脂复合物是磷脂与天然产物之间以分子间作用力相互结合,其理化性质和生物学活性均较原药发生显著变化。涉及到熔点、光谱特征等变化,可采用差式扫描量热分析(differential scanning calorimetry, DSC)、X射线衍射分析、紫外-可见分光光度法(UV-Vis)、显微镜检等手段来对磷脂复合物生成与否进行验证。

1.2.3.1 DSC分析 按照ORI:SPC=1:1(物质的量比),甲醇:二氯甲烷=1:1混合溶剂30 ml,40 ℃水浴,恒温搅拌2 h,旋转蒸发除尽有机溶剂,制备两批ORI-SPC复合物。准备ORI-SPC复合物、ORI+SPC物理混合物、ORI、SPC各10~20 mg,以空坩埚为参比,扫描速度20 ℃/min,范围25~300 ℃。

1.2.3.2 X射线衍射分析 按照ORI:SPC=1:1(物质的量比),乙酸乙酯30 ml,40 ℃水浴,恒温搅拌2 h,旋转蒸发除尽有机溶剂,制备ORI-SPC复合物。准备ORI-SPC复合物、ORI+SPC物理混合物、ORI、SPC各350 mg左右,Cu靶、40 kV、150 mA、扫描角度5°~90°、4°/min。

1.2.3.3 UV-Vis 按照ORI:SPC=1:1(物质的量比),乙酸乙酯30 ml,40 ℃水浴,恒温搅拌2 h,旋转蒸发除尽有机溶剂,制备ORI-SPC复合物。UV-Vis扫描范围为200~400 nm。

1.2.3.4 ORI-SPC复合物在水中的分散情况 按照ORI:SPC=1:1/1:2/1:3/1:4(物质的量比),乙酸乙酯/四氢呋喃20~30 ml,40 ℃/55 ℃水浴,恒温搅拌2~6 h,旋转蒸发除尽有机溶剂,制备ORI-SPC复合物。称取适量,超纯水稀释至ORI为1 mg/ml左右,吸取适量,涂抹至玻片,40×10显微镜下观察晶体。

2 结果

2.1 单因素考察结果

2.1.1 反应溶剂 四氢呋喃、乙酸乙酯、丙酮及甲醇/二氯甲烷=1:1均可以取得较好的复合效果,按照复合率计算公式计算,均>99%;甲醇、乙醇组则有药物析出,可能是由于甲醇、乙醇的介电常数较高,溶剂对形成的溶质分子(复合物)溶剂化能力较强,能够迅速隔开本身以分子间作用力进行复合的ORI和SPC,因此,宜选用介电常数较低的四氢呋喃、乙酸乙酯、二氯甲烷等作为反应溶剂。见表1。

表1 反应溶剂考察

反应溶剂	沉淀质量(g)	复合率(%)	成膜质量
甲醇	0.005 0	94.5	不均匀,药物析出
乙醇	0.010 5	88.3	不均匀,药物析出
甲醇/二氯甲烷=9:1	0.001 5	98.3	不均匀,药物析出
四氢呋喃	<0.000 1	>99	均匀
乙酸乙酯	0.000 5	>99	均匀
丙酮	<0.000 1	>99	均匀
甲醇/二氯甲烷=1:1	<0.000 1	>99	均匀

2.1.2 药脂比 结果显示,只要药脂比小于1:1,即SPC的摩尔比大于ORI,即可对冬凌草甲素形成有效包裹,但是,为避免磷脂浪费及考虑磷脂在水中的溶解性不佳,考虑药脂比=1:1即可。见表2。

2.1.3 反应时间和温度 结果显示,反应时间和复合率高低、成膜质量无关,为节约时间,拟定反应时间为2 h(表3)。

由上述实验可知，反应温度为 40、55 ℃时均可取得较好的复合效果。考虑到溶剂的沸点、防止 SPC 变性，拟定更为温和的反应温度 40 ℃。

表 2　药脂比考察

药脂比（物质的量比）	沉淀质量(g)	复合率(%)	成膜质量
1∶5	<0.000 1	>99	均匀
1∶4	<0.000 1	>99	均匀
1∶3	<0.000 1	>99	均匀
1∶2	<0.000 1	>99	均匀
1∶1	<0.000 1	>99	均匀

表 3　反应时间考察

反应时间(h)	沉淀质量(g)	复合率(%)	成膜质量
2	<0.000 1	>99	均匀
3	<0.000 1	>99	均匀
4	<0.000 1	>99	均匀
5	<0.000 1	>99	均匀
6	<0.000 1	>99	均匀

2.2　复合物验证

2.2.1　差式扫描量热分析（DSC）　ORI、SPC、ORI-SPC 复合物、物理混合物的 DSC 图谱见图 1。263.78 ℃为 ORI 熔点峰，无其他吸收峰出现，也证明 ORI 原料药含量单一。SPC 出现 4 个较为明显的吸收峰，与其不同成分分解或者氧化的温度不同有关。ORI-SPC 复合物中，ORI 的特征吸收峰消失，证明 ORI 晶型发生变化，可能是 ORI 的极性基团与 SPC 的极性基团部分发生分子间相互作用，SPC 的 2 条长脂肪酸链对 ORI 进行包裹，使 ORI 高度分散于 SPC 中，进而改变了 ORI 的相变温度，使特征吸收峰明显改变[13]，形成新的物相-磷脂复合物。物理混合物中，ORI 的特征吸收峰没有发生改变。

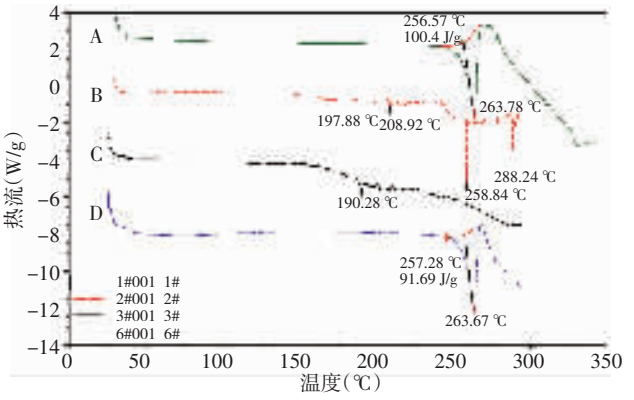
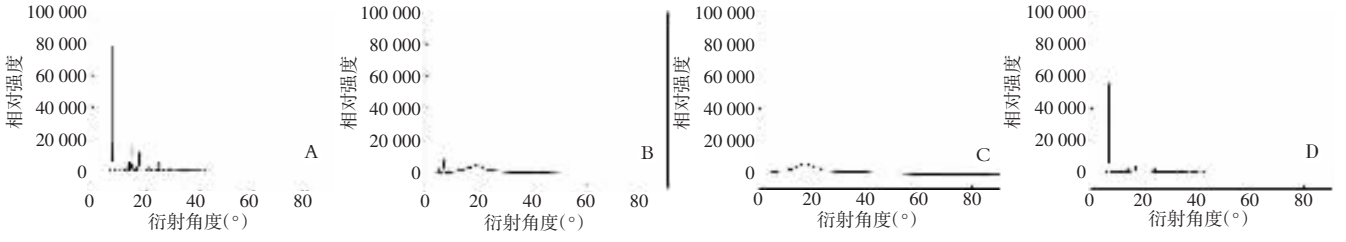


图 1　ORI(A)、SPC(B)、ORI-SPC 复合物(C)、物理混合物(D)的 DSC 图谱

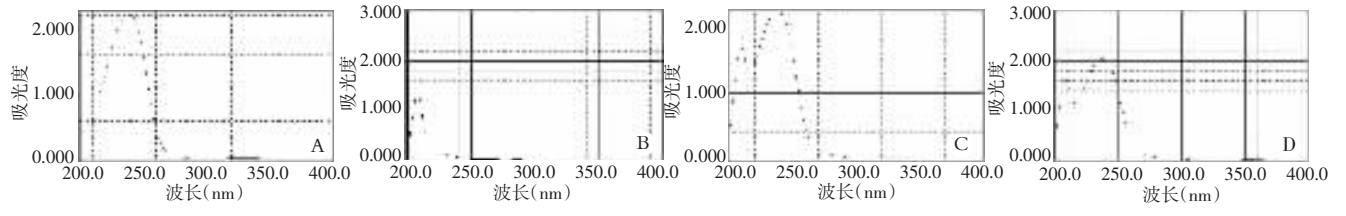
2.2.2　X 射线衍射分析　ORI、SPC、ORI-SPC 复合物、物理混合物的 X 射线衍射图谱见图 2。图 2A 所示为 ORI 主要以晶体形式存在，晶体衍射峰强烈；图 2B 所示 SPC 在 8°以后主要以无定型特征存在，仅有少量晶体衍射峰，且强度很弱；图 2C 所示复合物在 8°以后，ORI 的晶体衍射峰消失，完全表现为无定型特征，且 SPC 自身的少量晶体衍射峰也已消失，进一步说明在复合物中，ORI 可能与 SPC 的极性端发生定向结合，处于一种高度分散的状态，其自身的晶体特征被抑制；图 2D 所示，物理混合物仍然表现出 ORI 的晶体衍射峰，但是部分衍射峰已经被 SPC 的无定型衍射宽带所掩盖，且强度有所减弱，说明 ORI 的晶体性质可能在与 SPC 的物理混合过程中（如研磨），部分发生改变。

2.2.3　UV-Vis ORI、SPC、ORI-SPC 复合物、物理混合物的紫外吸收光谱图　ORI 在 240 nm 附近有最大吸收，按照处方比例配制的 SPC 甲醇溶液在此波段的吸收值对 ORI 的测定没有影响；ORI-SPC 复合物和物理混合物的紫外扫描图谱峰型基本一致，表明 ORI 与 SPC 只是通过分子间作用力形成复合物，并无新化学键生成，即无新的化合物生成。见图 3。



A：ORI；B：SPC；C：ORI-SPC 复合物；D：物理混合物

图 2　4 种物质的 X 射线衍射图谱



A：ORI；B：SPC；C：ORI-SPC 复合物；D：物理混合物

图 3　4 种物质的紫外吸收光谱图

2.2.4 ORI-SPC复合物在水中的分散情况考察结果 显微镜下观察晶体结构,发现复合物均有少量晶体存在,与ORI直接镜检所看到的晶体形状一致,表明ORI析出,但是晶体数量已经有很大程度减少。

3 讨论

本研究以复合率和成膜质量作为评价指标,单因素考察了ORI磷脂复合物的制备工艺,按此工艺制备的磷脂复合物复合率>99%。反应条件温和、耗时较短。ORI与SPC可以在一定条件下发生分子间作用,生成复合物,物相发生变化,晶体特征衍射消失,可能与ORI含有的较多羟基结构有关。DSC分析显示,磷脂复合物中ORI在260 ℃左右的特征熔点吸收峰被掩盖,推测是由于ORI与SPC的极性基团相互结合所致,使ORI高度分散于SPC中,说明生成了新的复合物。X射线衍射分析也证实,在磷脂复合物中,ORI的晶体衍射消失,取而代之的是磷脂的无定型特征,且磷脂本身少量的晶体衍射特征也明显减少,混合物中晶体衍射相对强度的减少可能和研磨过程有关。UV-Vis方法证实,在磷脂复合物中,ORI的发色基团并未发生改变,即说明并无新的化学键生成,复合物为分子间作用力。

但是,ORI与SPC之间的分子间作用力较弱,遇到较高介电常数的水,则容易被迅速隔开。比较ORI与其他成功制备磷脂复合物的天然药物的结构发现,具有较好水分散性磷脂复合物的天然产物,大多具有羧基或酚羟基结构[8-11],所带的氧原子具有更强的电负性,更容易给出电子,从而与SPC中带正电性的季胺氮产生分子间作用力,形成复合物。而ORI虽然羟基数量较多,但多为醇羟基,故不容易给出电子,因此,ORI与SPC之间的分子间连接并不紧密,作用力较弱。另外,分析ORI的理化性质发现,ORI在正辛醇-水中表观油水分配系数lgP=1.66,介于-0.3~4.5[6],属于脂、水均难溶物质,若利用单一脂质作为载体,可能结合力不够牢固,容易解离。因此单一成分SPC对ORI的荷载和结合能力不够强,虽然能够改变物相,具备一定的增溶能力,但距离实际应用还有差距,不能直接应用于药物传递系统。本研究为制备脂、水均难溶药物ORI的新型药物传递系统提供了有益的思路。

参考文献:

[1] Mei Y H, Xu J, Zhao J H, *et al*. An HPLC method for determination of oridonin in rabbits using isopsoralen as an internal standard and its application to pharmacokinetic studies for oridonin-loaded nanoparticles [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008, 869(1/2): 138-141.

[2] Ikezoe T, Chen S S, Tong X J, *et al*. Oridonin induces growth inhibition and apoptosis of a variety of human cancer cells[J]. Int J Oncol, 2003, 23(4): 1187-1193.

[3] Chen S, Gao J, Halicka H D, *et al*. The cytostatic and cytotoxic effects of oridonin (Rubescenin), a diterpenoid from Rabdosia rubescens, on tumor cells of different lineage[J]. Int J Oncol, 2005, 26(3): 579-588.

[4] Huang J, Wu L, Tashiro S, *et al*. Reactive oxygen species mediate oridonin-induced HepG2 apoptosis through p53, MAPK, and mitochondrial signaling pathways[J]. J Pharmacol Sci, 2008, 107(4): 370-379.

[5] 赵清治, 晁金华, 王汉清. 注射剂"癌得宁"中冬凌草甲素含量的紫外分光光度定量测定[J]. 郑州大学学报:医学版, 1981, 16(2): 351-354.

[6] 张典瑞, 任天池. 冬凌草甲素的药学研究进展[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(11): 817-820.

[7] 徐文, 孙进, 张婷婷, 等. HPLC法测定冬凌草甲素的平衡溶解度和表观油水分配系数[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(4): 220-222.

[8] 翟光喜, 娄红祥, 邹立家, 等. 药物磷脂复合物的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(12): 800-803.

[9] Xiao Y Y, Song un Y M, Chen Z P, *et al*. The preparation of silybin-phospholipid complex and the study on its pharmacokinetics in rats [J]. Int J Pharm, 2006, 307(1): 77-82.

[10] Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, *et al*. Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats[J]. Int J Pharm, 2007, 330(1/2): 155-163.

[11] Cui F, Shi K, Zhang L, *et al*. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, in vitro characterization and *in vivo* evaluation[J]. J Control Release, 2006, 114(2): 242-250.

[12] Peng Q, Gong T, Zuo J, *et al*. Enhanced oral bioavailability of salvianolic acid B by phospholipid complex loaded nanoparticles [J]. Pharmazie, 2008, 63(9): 661-666.

[13] 何静, 王章阳, 刘松青. 格列齐特-羟丙基-β-环糊精包合物的制备[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(11): 984-986.

(收稿:2010-06-01 修回:2010-07-01)

(编辑 王小宴)