

长春瑞滨磷脂复合物的制备及其性质研究

李艳贞, 阎 卉, 刘 欢, 靳文仙, 王成港

天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘 要: **目的** 制备长春瑞滨磷脂复合物, 提高药物的脂溶性, 以期进一步制备长春瑞滨微粒载药系统。**方法** 采用溶剂挥发法制备长春瑞滨磷脂复合物, 以复合率为评价指标进行单因素优化试验。采用差示扫描量热法、X 射线衍射法、紫外分光光度法对复合物进行鉴别, 并考察复合物的体外溶解性质变化。**结果** 优化条件下制备的磷脂复合物复合率为 89.3%~93.7%; 差示扫描量热法、X 射线衍射法、紫外分光光度法验证了复合物的形成; 形成磷脂复合物后, 长春瑞滨的脂溶性显著提高。**结论** 制备的长春瑞滨磷脂复合物能显著增加药物的脂溶性, 为进一步制备长春瑞滨微粒载药系统奠定基础。

关键词: 长春瑞滨磷脂复合物; 长春瑞滨; 复合率; 差示扫描量热法; X 射线衍射法; 紫外分光光度法

中图分类号: R944.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2012)06-0570-05

Preparation of vinorelbine-phospholipid complex and its characterization

LI Yan-zhen, YAN Hui, LIU Huan, JIN Wen-xian, WANG Cheng-gang

State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To prepare vinorelbine-phospholipid complex (VPC) for enhancing the liposolubility of vinorelbine. **Methods** The complex was prepared using solvent evaporation method. The preparation technology was optimized by single factor design, using the combining ratio as the assessment index. Differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffraction (XRD) spectrum, and UV spectrophotometry were carried out to investigate its characterization. The *in vitro* solubility change of the complex was also determined. **Results** The combining ratio of the complex prepared under the optimized conditions was between 89.3% and 93.7%; UV spectrum, DSC and XRD spectra confirmed the formation of the complex. After phospholipid complex being made, the liposolubility of vinorelbine was remarkably enhanced. **Conclusions** Prepared vinorelbine-phospholipid complex could effectively enhance the liposolubility of vinorelbine and provide the reference for preparation of vinorelbine microsomal drug-loaded system.

Key words: vinorelbine-phospholipid complex (VPC); vinorelbine; combining ratio; differential scanning calorimetry (DSC); X-ray diffraction (XRD); UV spectrophotometry

长春瑞滨是一种半合成的长春生物碱类抗肿瘤药物, 抗癌活性高, 抗癌谱广, 临床上广泛用于治疗非小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、恶性淋巴瘤等, 尤其作为治疗非小细胞肺癌的首选药物, 有着巨大的市场潜力^[1-4]。但现有的长春瑞滨注射液对血管有较强的刺激性, 容易引发静脉炎, 患者顺应性差, 严重影响其临床使用以及临床安全性和临床疗效。研究开发长春瑞滨新制剂成为解决上述问题的关键, 包括长春瑞滨纳米粒、胶束、脂质体、微球、微乳等微粒载药系统, 但由于长春瑞滨水溶性高,

导致微粒体的载药量较低^[5-7]。磷脂复合物是药物与磷脂分子通过电荷迁移作用而形成的较为稳定的络合物, 可改变药物的理化性质, 增强脂溶性, 有效提高药物在体内的吸收, 改善生物有效性和生物利用度^[8]。为此, 本实验进行了长春瑞滨磷脂复合物的研究, 以期增加药物的脂溶性, 有利于制备载药量高的长春瑞滨微粒载药系统。

1 仪器与试剂

Waters 2487 高效液相色谱仪, 岛津 2550 紫外分光光度仪, DSC—7 Series 差示扫描量热仪 (美国

收稿日期: 2012-08-15

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 课题 (2010CB735602, 2012CB724002); 国家重大新药创制科技重大专项——国家生物医药国际创新园 (天津) 创新药物孵化基地建设 (2010ZX09401)

作者简介: 李艳贞 (1985—), 女, 硕士, 主要从事药物新剂型研究。Tel: (022)23006879 E-mail: liyz@tjipr.com

Peak-Elmer 公司), D/MAX-rA 型 X 射线衍射仪(日本理学制作所), 旋转蒸发仪(瑞士步琦有限公司), 数显磁力搅拌器(巩义市予华公司), 真空干燥箱(天津药典标准仪器厂)。

酒石酸长春瑞滨原料药(广州汉方现代中药研究开发有限公司, 批号 20110728, 质量分数 $\geq 98\%$), 酒石酸长春瑞滨对照品(北京北纳创联生物技术有限公司, 批号 1714506, 质量分数 $\geq 99.3\%$) PL-100M 蛋黄卵磷脂(日本进口, 上海艾韦特分装, 批号 20110913), 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 长春瑞滨的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钾 6.8 g, 加水约 800 mL 溶解, 加三乙胺 10 mL, 用磷酸水溶液调解 pH 4.0, 再加水至 1 L, 即得) - 甲醇(30:70), 检测波

长 267 nm, 进样量 20 μ L, 体积流量 1 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}$ C。

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取酒石酸长春瑞滨对照品适量, 加乙醇溶解制备质量浓度为 100 μ g/mL 储备液(按游离长春瑞滨计)。精密量取上述储备液适量, 加乙醇稀释制备质量浓度分别为 5、10、20、40、50 μ g/mL 溶液, 按上述色谱条件进样测定。以质量浓度对峰面积进行线性回归, 得回归方程 $A=17\,389\,C+2\,428$ ($r=0.999\,9$), 结果显示酒石酸的质量浓度在 5~50 μ g/mL 与峰面积的线性关系良好。

2.1.3 专属性试验 分别称取酒石酸长春瑞滨对照品、磷脂和长春瑞滨磷脂复合物适量, 置不同的量瓶中, 加乙醇溶解, 制备溶液。按上述色谱条件进行测定, 记录色谱图, 见图 1。可见该方法的专属性良好, 长春瑞滨在供试品溶液的位置上, 磷脂不干扰药物的测定。

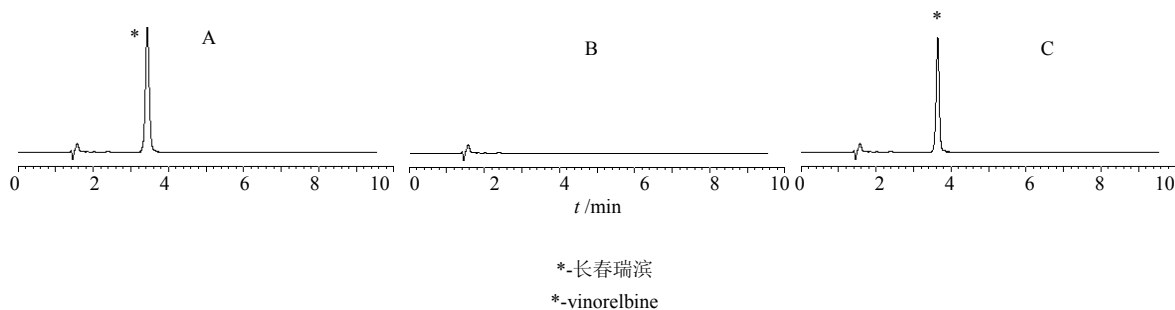


图1 长春瑞滨对照品(A)、磷脂(B)和长春瑞滨磷脂复合物(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of vinorelbine reference substance (A), phospholipid (B), and VPC (C)

2.1.4 测定方法 精密称取酒石酸长春瑞滨对照品、磷脂复合物适量, 置量瓶中, 加乙醇溶解制备对照品溶液和供试品溶液, 按上述色谱条件进行测定, 以外标法计算游离长春瑞滨的质量浓度。

2.2 指标复合率的规定

以长春瑞滨与磷脂的复合率为指标进行处方工艺优化。长春瑞滨与磷脂的复合率 $= (W_1 - W_2) / W_1$, 式中 W_1 为长春瑞滨的初始投料质量, W_2 为未反应的游离长春瑞滨质量。

2.3 磷脂复合物的制备

采用溶剂挥发法制备磷脂复合物。将一定量的长春瑞滨和卵磷脂溶于适量溶剂中, 在一定温度下搅拌反应一定时间, 旋转蒸发除去反应溶剂, 得长春瑞滨磷脂复合物粗品。将长春瑞滨磷脂复合物粗品重新分散在乙醚中, 经 0.22 μ m 滤膜滤过后, 收

集沉淀, 干燥并称定质量, 滤液旋转蒸发除去反应溶剂, 将所得残余物经真空减压干燥 12 h 以上, 得长春瑞滨磷脂复合物, 冷冻保存。

在预试验中发现, 影响磷脂复合物复合率的因素主要包括反应溶剂、药脂比、反应时间、药物质量浓度和反应温度, 因此采用单因素试验进行相关条件的选择。

2.3.1 反应溶剂的选择 设定长春瑞滨与卵磷脂的投料物质的量比为 1:1, 长春瑞滨原料反应质量浓度为 50 mg/mL, 30 $^{\circ}$ C 反应 2 h, 旋转蒸发除去反应溶剂, 以复合率为评价指标, 考察乙醇、丙酮、二氯甲烷和醋酸乙酯对制备工艺的影响, 优选出最佳反应溶剂, 结果见表 1。可知当反应溶剂为乙醇时, 所制备复合物的复合率为 75.2%, 明显高于其他溶剂的结果, 因此选择乙醇作为反应溶剂。

表 1 反应溶剂对复合率的影响

Table 1 Effect of reaction solvent on the combining ratio

反应溶剂	复合率/%
乙醇	75.2
丙酮	61.4
二氯甲烷	54.7
醋酸乙酯	43.4

2.3.2 药脂比的选择 根据反应溶剂的筛选结果,选定乙醇为反应溶剂,其余条件同上,考察长春瑞滨与卵磷脂的物质的量比分别为 3:1、2:1、1:1、1:2、1:3 时对复合率的影响,结果见表 2。可知磷脂复合物的复合率随着卵磷脂用量的增加而显著增加,说明药物与磷脂的物质的量比对结果影响较大,但当磷脂用量由 1:2 增到 1:3 时,复合率变化不大,因此选择长春瑞滨与卵磷脂的物质的量比为 1:2。

表 2 药脂比对复合率的影响

Table 2 Effect of vinorelbine-phospholipid ratio on the combining ratio

药脂比	复合率/%
3:1	20.4
2:1	30.7
1:1	75.2
1:2	90.1
1:3	93.4

2.3.3 反应时间的选择 根据以上结果,选定反应溶剂为乙醇以及药脂比为 1:2,其余条件相同,考察反应时间分别为 1、2、3、4 h 时对复合率的影响,结果见表 3。可知反应时间对制备工艺亦有较大影响,随着反应时间的延长,复合率有逐渐增加的趋势,但当反应时间延长至 4 h 时,复合率反而有所下降,因此选择反应时间为 2 h。

表 3 反应时间对复合率的影响

Table 3 Effect of reaction time on combining ratio

反应时间/h	复合率/%
1	60.6
2	90.1
3	93.3
4	85.5

2.3.4 药物质量浓度的选择 根据以上筛选结果,以乙醇为反应溶剂,药脂比为 1:2,反应时间为 2 h,其余条件相同,考察药物质量浓度分别为 10、20、50、100 mg/mL 时对制备工艺的影响,结果见表 4。可知药物质量浓度对复合率的影响不大,但当质量浓度超过 100 mg/mL 时,复合率有所下降。为方便有机溶剂的去除,本研究选择较高药物质量浓度即 50 mg/mL。

表 4 药物质量浓度对复合率的影响

Table 4 Effect of vinorelbine concentration on combining ratio

药物质量浓度/(mg·g ⁻¹)	复合率/%
15	89.3
20	85.4
50	90.1
100	72.2

2.3.5 反应温度的选择 根据以上结果,以乙醇为反应溶剂,药脂比为 1:2,反应时间为 2 h,药物质量浓度为 50 mg/mL,考察反应温度分别为 20、30、40、50 °C 时对复合率的影响,结果见表 5。可知反应温度对复合率的影响不大,温度超过 50 °C 时复合率降低。为方便操作,选择 30 °C 为反应温度。

表 5 反应温度对复合率的影响

Table 5 Effect of the temperature on combining ratio

反应温度/°C	复合率/%
20	87.6
30	90.1
40	89.3
50	72.2

2.3.6 处方工艺的确定 根据上述单因素试验筛选结果,确定长春瑞滨磷脂复合物的最终处方工艺为:以乙醇为反应溶剂,药物反应质量浓度为 50 mg/mL,药脂比为 1:2,溶解于反应溶剂后于 30 °C 条件下搅拌 2 h,所得混悬液减压除去乙醇,得磷脂复合物粗品。然后加入适量乙醚充分溶解,抽滤除去沉淀,滤液旋转蒸发除去乙醚,即得长春瑞滨磷脂复合物,冷冻保存。

2.3.7 验证试验 按照上述制备工艺,同时制备 3 批磷脂复合物,其复合率分别为 89.3%、91.3%、

93.7%。

2.4 磷脂复合物的鉴别

2.4.1 X 射线衍射 (XRD) 分析^[9-11] 实验条件为衍射角范围: 0.00~60.00°; 步宽: 0.02°; 步时间: 0.4 s; X 射线源: Cu K α 射线; 温度为室温。分别取长春瑞滨、卵磷脂、复合物以及长春瑞滨与磷脂的物理混合物进行 X-射线衍射分析, 结果见图 2。

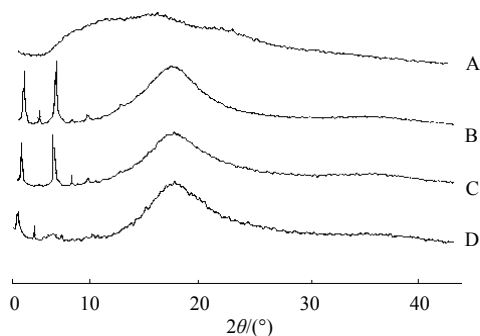


图2 长春瑞滨(A)、卵磷脂(B)、物理混合物(C)和磷脂复合物(D)的X射线衍射分析图谱

Fig. 2 XRD spectra of vinorelbine (A), phospholipid (B), physical mixture (C), and VPC (D)

可以看出, 长春瑞滨没有明显的晶形峰出现, 说明长春瑞滨是以无定型状态存在的; 磷脂大约在 3.7°、7.2°有明显的衍射峰, 由此可证明其晶型特征; 物理混合物在 3.7°、7.2°仍然有明显的衍射峰, 而在磷脂复合物图谱中磷脂 7.2°的晶体衍射峰消失了。由此可以看出复合物与简单的物理混合物有明显的区别。推测其原因可能是在形成磷脂复合物的过程中长春瑞滨与磷脂分子中的极性部分发生定向结合, 因此长春瑞滨和磷脂实际上均处于一个高度分散的状态, 而其自身的晶体特征则被掩蔽了。

2.4.2 差示扫描量热 (DSC) 分析^[9-11] 实验条件为温度范围: 0~300 °C; 升温速度: 10 °C/min; 氮气流保护, 体积流量: 0.2 mL/min。分别取长春瑞滨、卵磷脂、长春瑞滨磷脂复合物以及长春瑞滨与磷脂的物理混合物进行差示扫描量热分析, 结果见图 3。可知卵磷脂在 218 °C 有一个吸热峰, 物理混合物的吸热峰为 205 °C, 两者的峰形相似, 吸热峰位置差别较小, 可认为差异无显著性。长春瑞滨的图谱没有明显的吸热峰、放热峰, 这可能是由于长春瑞滨呈无定型态。制备成磷脂复合物后, 磷脂的吸热峰消失, 这可能是由于磷脂复合物中磷脂与药物形成无定型态所导致。

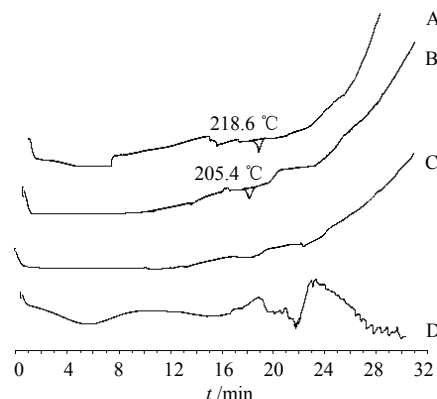


图3 卵磷脂(A)、物理混合物(B)、磷脂复合物(C)和长春瑞滨(D)的差示扫描量热图谱

Fig. 3 DSC spectra of phospholipid (A), physical mixture (B), VPC (C), and vinorelbine (D)

2.4.3 紫外光谱 (UV) 分析^[9-11] 分别取长春瑞滨、卵磷脂、长春瑞滨磷脂复合物以及长春瑞滨与磷脂的物理混合物, 溶解于无水乙醇中, 配成一定质量浓度的溶液, 于 200~400 nm 波长进行扫描, 结果见图 4。可以看出, 长春瑞滨及其磷脂复合物和物理混合物的紫外扫描图谱形状几乎完全重叠, 在 220、267 nm 处均有吸收峰。提示长春瑞滨与磷脂形成复合物后, 其原有的发色团结构并未发生改变。

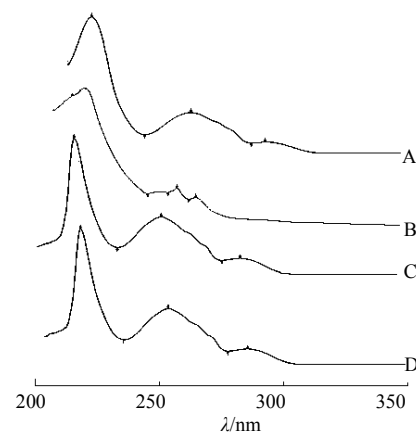


图4 长春瑞滨(A)、卵磷脂(B)、物理混合物(C)和磷脂复合物(D)的紫外光谱图谱

Fig. 4 UV spectra of vinorelbine (A), phospholipid (B), physical mixture (C), VPC (D)

2.5 磷脂复合物溶解性研究

精密量取 3.0 mL 去离子水或正辛醇于磨口瓶中, 分别加入过量的长春瑞滨、磷脂复合物以及物理混合物, 每个样品各 3 份, 密闭后在室温下于振荡器内振摇, 24 h 后将磨口瓶内的液体转移至离心管内, 10 000 r/min 离心 10 min。各取上清液 100 μ L,

用乙醇稀释一定倍数,按上述色谱条件进样,测定各个样品的溶解度。结果见表 6。可见长春瑞滨在水中的溶解度远高于其在正辛醇中的溶解度,而形成磷脂复合物后,长春瑞滨在水中溶解度显著降低,在正辛醇中的溶解度为水中溶解度的 8 倍;表明形成磷脂复合物后,药物的溶解性质发生变化,脂溶性显著增强,有利于制备载药量高的亚微乳制剂。

表 6 溶解性试验

Table 6 Results of solubility test

样 品	溶解度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	水	正辛醇
长春瑞滨	114.5 ± 6.9	15.2 ± 3.5
物理混合物	104.2 ± 6.8	25.2 ± 5.7
磷脂复合物	12.2 ± 2.3	95.7 ± 7.7

3 讨论

本研究以复合率为评价指标,通过单因素试验确定了长春瑞滨磷脂复合物的处方工艺。由于长春瑞滨不溶于乙醚,但磷脂与磷脂复合物能溶于乙醚,利用各物质溶解性的差异,对所得的磷脂复合物粗品进行纯化。在优化条件下制备的磷脂复合物复合率为 $91.4\%\pm 2.4\%$ 。差示扫描量热、X 射线衍射图谱分析结果表明,磷脂复合物与物理混合物有显著差异,推测其原因可能是在形成磷脂复合物的过程中长春瑞滨与磷脂分子中的极性部分发生定向结合,因此长春瑞滨和磷脂实际上均处于一个高度分散的状态,而其自身的特征峰则被掩蔽了。长春瑞滨与磷脂结合形成复合物后,表现出与原化合物显著不同的溶解性能,药物的脂溶性显著提高,达到

了预期的实验目的,为进一步制备载药量高的长春瑞滨微粒载药系统提供了便利。

参考文献

- [1] Gregory R K, Smith I E. Vinorelbine—a clinical review [J]. *Br J Cancer*, 2000, 82(12): 1907-1913.
- [2] Vogel C, O'Rourke M, Winer E, *et al.* Vinorelbine as first-line chemotherapy for advanced breast cancer in women 60 years of age or older [J]. *Ann Oncol*, 1999, 10(4): 397-402.
- [3] Spiridonidis C H, Laufman L R, Jones J J, *et al.* Daily times four vinorelbine plus cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase II trial of a novel schedule [J]. *Ann Oncol*, 1999, 10(8): 989-991.
- [4] 习利平, 宋新波, 张丽娟. 长春碱类抗肿瘤药的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(1): 59-62.
- [5] 唐 星, 赵少春, 漆新国. 长春瑞滨脂质微球注射液及其制备方法 [P]. 中国: 200510115556, 2006-05-17.
- [6] 游 剑, 胡富强, 袁 弘, 等. 长春瑞滨固体脂质纳米粒与其冻干制剂及制备方法 [P]. 中国: CN101129375A, 2008-02-27.
- [7] 全新勇, 王海凤, 崔双进, 等. 长春花生物碱纳米乳剂注射液及其制备方法 [P]. 中国: 200910050689, 2010-11-10.
- [8] 梁 娜, 石 凯, 王永圣, 等. 阿魏酸-磷脂复合物的制备及其物理特性 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2008, 25(3): 163-168.
- [9] 李 颖. 葛根素磷脂复合物的制备技术及体内外特性研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [10] 董武军. 黄芩素磷脂复合物及其亚微乳剂的研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.
- [11] 田 野. 羟基喜树碱磷脂复合物纳米胶束的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.