

醋酸棉酚—PVP固体分散体研究 及体外杀精子活性的观察

黄 焯 陈兰英
李冶夫* 朱蓬弟*

(中国医学科学院北京协和医院; *国家计划生育委员会科学技术研究所, 北京)

提要 本文对溶剂法制备醋酸棉酚—PVP 固体分散体作了改进。以二氯甲烷为溶剂在 45 °C 常压下完成, 结果与 Waller 方法一致, 并具有更大的安全性。经溶出实验筛选确定以 1:7 醋酸棉酚—PVP 配比可比 Waller 等人的 1:4 配比提高药物溶出速率 8 倍, 不同比例的固体分散体释药曲线均服从 $Q-t^{1/2}$ 规律, 且速度常数随固体分散体中 PVP 比例增加而线性递增。

利用 X 射线衍射和 ^1H NMR 研究了固体分散机制, 认为是形成了间充型固体溶液, 且 PVP 与醋酸棉酚之间有氢键结合。

1:7 棉酚—PVP 抑动精子实验结果表明 10^{-5}M (0.052%) 时 20 秒钟可抑制全部精子的向前运动。棉酚和 醋酸棉酚结果一致, 无统计学差异。PVP 与生理盐水结果一致, 表明 PVP 本身无抑制精子运动作用。

关键词 醋酸棉酚; 固体分散体

棉酚抗生育活性的研究已受到许多国家的重视。但由于棉酚几乎不溶于水, 其吸收和利用受到溶解速率的影响, 给研究工作带来困难。已有作者提出, 利用无生理活性、亲水性强的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)为棉酚的载体, 可以达到水溶性目的⁽¹⁾。但目前尚未见到有关醋酸棉酚 PVP 固体分散体的进一步研究。本文以溶剂法制成含不同比例或不同聚合度 PVP 的醋酸棉酚 PVP 固体分散体, 利用紫外分析、X 射线衍射、 ^1H NMR 谱、溶出实验以及生物学方法对其分散机制、晶态变化、溶出速率及体外抑制精子运动进行了研究。

实 验 部 分

仪器和材料

DU-7 Beckman 紫外分光光度计。FX-100Q 核磁共振仪; D/MaX-3 型 X 射线衍射仪; ZFQ 81 旋转蒸发器; 82-2 型释放度测定仪; 普通生物光学显微镜。醋酸棉酚由南京药物研究所提供。PVP(K 15), PVP(K 30) 均为进口分装。正常人精液由志愿者提供。

(一) 醋酸棉酚—PVP 固体分散体的制备

按 1:1 到 1:7 比例分别精密称取醋酸棉酚和 pvp 一定量于茄型瓶中, 逐渐加入二氯甲烷使其完全溶解后立即用旋转蒸发器于 45 °C 水浴蒸除溶剂, 待瓶内液体变粘稠后倒入平皿中, 室温挥去剩余溶剂。固化后于室温干燥至恒重。乳研后闭光保存备用。

(二) 紫外标准曲线

将上述各比例固体分散体分别制备相当于含醋酸棉酚 5~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间 5 个比例浓度的溶液各 3 份, 以蒸馏水为空白进行光密度扫描和吸收度测定, 同时记录 PVP 水溶液吸收光

谱。对各比例作回收实验。

(三) X 射线衍射分析

利用 D/Max-3 型 X 射线衍射仪进行晶相分析。工作条件: $\text{CuK}\alpha$, 高压 35 kV, 管流 20 mA, 光程 1° , 0.3° , 0.6° , 量程 2 K, 扫描速率 2θ , $2^\circ/\text{min}$ 。以醋酸棉酚-PVP 固体分散体 X 射线衍射强度作为衍射角的函数, 分别测定醋酸棉酚、PVP (K 15) 以及 1:1~1:7 各比例固体分散体 x 射线衍射谱。

(四) ^1H NMR 谱测定

分别对精制醋酸棉酚⁽²⁾、PVP 和固体分散体 (1:7) 测定 ^1H NMR 谱, 同时对固体分散物作 D_2O 交换, 扫描范围均为 1~20 ppm。

(五) 药物溶出速率实验

实验装置采用药物释放度测定仪, 以转篮法进行。内配 100 目吊篮。水浴温度 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 烧杯内盛 1000 ml 蒸馏水。吊篮转速为 $70 \pm 1 \text{ r/min}$ 。每份样品过 80 目和 100 目筛。取其中 80~100 目样品备用。称样量约 1 g, 置 100 目吊篮内。当样品投入后开始计时, 分别于 1, 3, 5, 7, 10, 20 min 各取样 5 ml, 同时补加 5 ml 蒸馏水。所取样本于 380 nm 处测定吸收度。依标准曲线法计算相应浓度, 进而求出溶解百分数。以每次溶出百分数作为时间的函数作图, 每一实验重复五次。

(六) 体外抑制精子实验

分别配制含棉酚、醋酸棉酚 $3 \times 10^{-4}\text{M}$, $3 \times 10^{-3}\text{M}$, $3 \times 10^{-2}\text{M}$ 的固体分散体水溶液。每次精液与药液按 2:1 比例混合, 放置 37°C 温育。分别于 20 s, 1, 5, 15 min 取样, 放置普通光学显微镜下观察精子活动情况。并利用生理盐水和 PVP 为对照组进行了同样的观察。

结果和讨论

(一) 固体分散体

本实验溶剂法制备醋酸棉酚-PVP 固体分散体较文献方法⁽¹⁾有很大改进。二氯甲烷作为溶剂对棉酚和 PVP 同时具有较好的溶解能力, 常压下即可完成, 操作安全。经薄层、紫外检查与甲醇法结果一致。

我们用不同比例固体分散体扫描发现最大吸收峰为 380 nm (图 1)。不同比例固体分散相得到的标准曲线数据见表 1。经方差分析各组间均无显著性差异, 得到回归方程 $A = 0.01889 + 0.0181 C (\mu\text{g/ml})$ 对每一比例固体分散相作回收实验, 平均回收率为 100.16%, $\text{SD} = 0.0021$ 。此标准曲线不受 PVP 含量影响, 具有良好的线性。

进行了 X 射线晶态分析。分别测定了醋酸棉酚、PVP 以及不同比例固体分散体的衍射谱 (图 2, 3), 从图 3 可见醋酸棉酚与 PVP 以 1:1~1:7 分散时均呈现棉酚吸收峰消失现象。

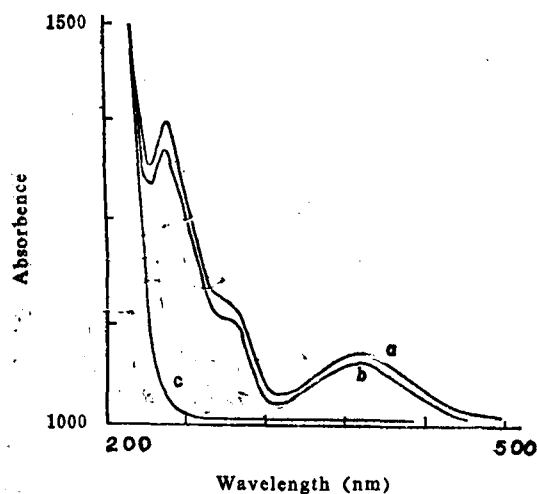


Fig 1. Spectral absorption curves of gossypol acetic acid-PVP in water

a. 1:7 Gossypol acetic acid-PVP; b. 1:5 gossypol acetic acid-PVP; c. water solution of PVP

Tab 1. Data of relation between concentration of gossypol acetic acid-PVP ($\mu\text{g/ml}$) and UV absorbance at 380 nm

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				Absorbance			
1:4	1:5	1:6	1:7	1:4	1:5	1:6	1:7
12.19	10.02	8.17	5.96	0.241	0.191	0.169	0.125
19.37	15.09	16.30	8.98	0.351	0.277	0.321	0.185
25.82	20.12	24.50	11.34	0.468	0.374	0.469	0.236
32.28	25.15	32.70	14.39	0.599	0.469	0.611	0.300
38.73	30.18	40.90	17.18	0.710	0.563	0.780	0.358

$$A = 0.01889 + 0.0181C \quad r = 0.9976 \quad n = 20$$

$$\text{Average recovery} = 100.16\% \quad \text{SD} = 0.0021$$

Chiou 等⁽³⁾认为, 一个典型的间充型固体溶液的 X 射线衍射谱中, 溶质组分的衍射峰消失, 而溶剂组分的衍射峰可以有变化, 也可能无变化。从图来看, 我们认为该固体分散体是一种间充型固体溶液。

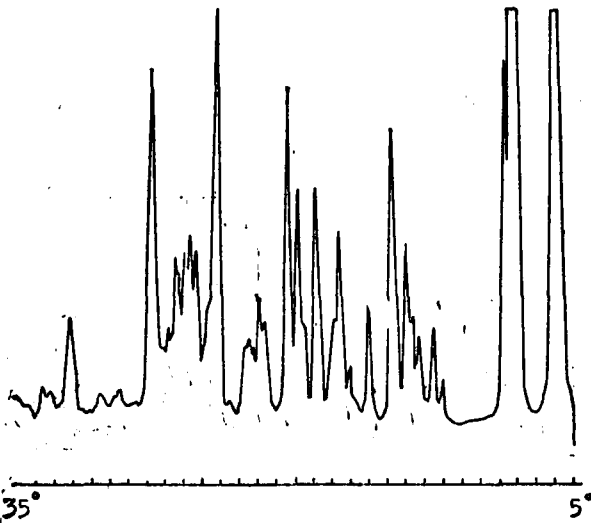


Fig 2. X-ray diffraction spectra of gossypol acetic acid

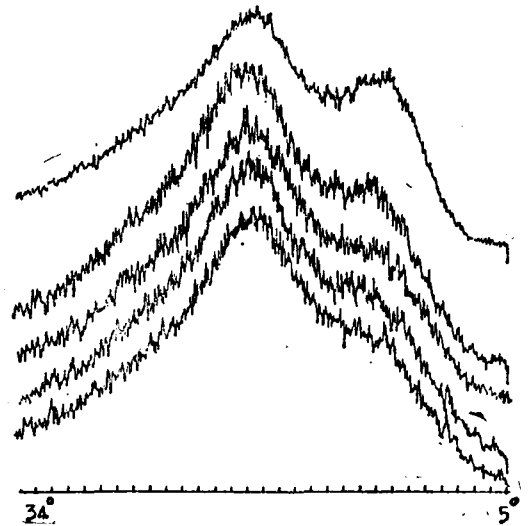


Fig 3. X-ray diffraction spectra of pure PVP and solid dispersion of gossypol acetic acid-PVP. The top spectrum was obtained from pure PVP and the other spectra (from second to fifth) were obtained from 1:7; 1:6; 1:5; 1:1 gossypol acetic acid-PVP

有关醋酸棉酚与 PVP 之间结合方式的研究, 我们分别对醋酸棉酚、PVP、1:7 固体分散体以及固体分散体重水交换后的 ^1H NMR 谱进行了测定。发现醋酸棉酚图谱中 δ 15.2 有一个尖峰信号, 这是由于分子内氢键产生的化学位移。当利用 PVP 分散后 δ 15.2 消失, 但在 δ 14.2 和 δ 16.2 出现两个钝型化学位移信号, 重水交换后消失。这是 PVP 对醋酸棉酚氢键磁场干扰而出现的自旋分裂现象。这提示我们 PVP 很可能破坏了醋酸棉酚本身分子内氢键, 而形成了两者之间的分子间氢键。

利用溶出实验, 对不同比例固体分散体溶出力进行了筛选 (见图 4)。发现每一比例溶出曲线均基本服从 $Q - t^{1/2}$ 释药规律。1:7 固体分散体的溶出速度 K 为 38.46。即在 7 分钟可

溶出药量 95% 以上。这一比例比美国学者 Waller 曾经使用的 1:4 比例溶出速率 ($K=4.796$) 高出 8 倍。

实验还发现 PVP 比例增加与溶出速率之间有线性关系, 符合方程 $K=11.4 A-39.75$, 见图 5。

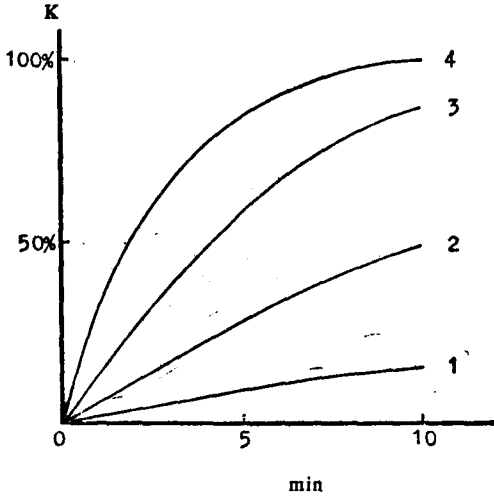


Fig 4. Rates of dissolution for different proportion of gossypol acetic acid-PVP

- 1. 1:4 Gossypol acetic acid-PVP $K=4.796$;
- 2. 1:5 Gossypol acetic acid-PVP $K=17.78$;
- 3. 1:6 Gossypol acetic acid-PVP $K=30.81$;
- 4. 1:7 Gossypol acetic acid-PVP $K=38.46$

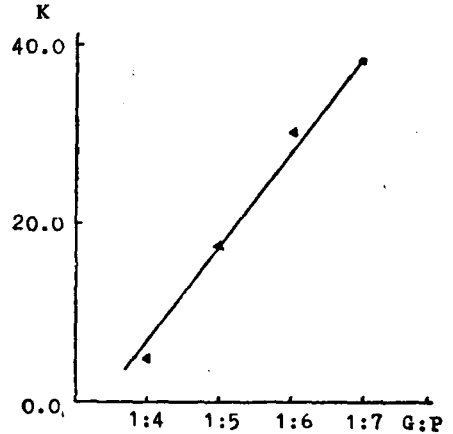


Fig 5. Relation between PVP proportions and dissolution rate of gossypol acetic acid

实验还探讨了不同聚合度 PVP 对棉酚释药速率的影响, 结果表明 10 分钟时 PVP ($K=15$) 比 PVP ($K=30$) 溶出药量高 10%, 这说明短链 PVP 更有利于醋酸棉酚的溶出。

上述结果均表明利用溶剂法制备醋酸棉酚 PVP (1:7) 固体分散体可以大大增加难溶性醋酸棉酚的溶解度、溶出速率, 进而提高其生物利用度。

(二) 体外抑精实验

自从 1975 年我国科学工作者首先发现棉酚在体外有杀精活性以来⁽⁴⁾, 其它国家的学者也相继进行了多种实验研究, 进一步证实了棉酚对精子有直接作用。我们利用本实验制备的棉酚-PVP (1:7)、醋酸棉酚-PVP (1:7) 固体分散体对四名志愿者的精液进行了体外抑动实验, 结果见表 2。结果表明当药物浓度为 $10^{-3}M$ (0.052%) 时 20 秒内可抑制全部精子的向前运动。

Tab 2. Effect of gossypol-PVP and gossypol acetic acid-PVP on the forward motility of human spermatozoa (forward motility%)

Concentration	Gossypol-PVP				Gossypol acetic acid-PVP			
	20"	1'	5'	15'	20"	1'	5'	15'
PVP				77.25 (74~80)				77.25 (74~80)
$10^{-4}M$	25 (10~72)	25 (6~71)	24.75 (10~72)	25.75 (6~75)	23.5 (8~64)	24.25 (8~71)	24.5 (7~75)	25 (7~70)
$10^{-3}M$	—	—	—	—	—	—	—	—

Means (range)

棉酚和醋酸棉酚的作用效果无显著性差异。这与 Tso⁽⁶⁾ 和 Waller⁽¹⁾ 的工作相近。

关于棉酚在体外对精子作用的机制问题, 目前尚不十分清楚。有作者提出棉酚对精子细胞膜、顶体膜有破坏⁽⁶⁾; 还可使精子氧化磷酸化解偶联; 并抑制线粒体内和电子传递链中的某些酶的活性⁽⁷⁾。有关棉酚对精子直接作用的途径和机制问题, 我们还在继续研究中。

参 考 文 献

1. Waller DP, et al. *In vitro* spermicidal activity of gossypol. *Contraception* 1980; 12:183.
2. 袁久荣等. 棉酚的提取工艺及其精制方法. 男性避孕药研究资料汇编. 1971~1979.
3. Chion WL, et al. Pharmaceutical application of solid dispersion systems. *J Pharm sci* 1971; 69:1281.
4. 浙江医科大学. 棉酚的体外杀精作用. 第四届全国男性抗生育会议论文集. 1975:10.
5. Tso WW, et al. Effect of gossypol on boars spermatozoa *in vitro*. *Arch Androl* 1981; 7:85.
6. 王一飞. 棉酚对人类精子直接作用的观察. 解剖学通报 1984; 7:121.
7. Tso WW, et al. Gossypol uncoupling of respiratory chain and oxidative phosphorylation in ejaculated boar spermatozoa. *Contraception* 1982; 25:649.

STUDY ON THE PREPARATION AND STABILITY OF SOLID DISPERSION OF GOSSYPOL ACETIC ACID—PVP AND ITS SPERMICIDAL ACTIVITY *IN VITRO*

HUANG Ye, CHEN Lan-Ying,*LI Ye-Fu and *ZHU Peng-Di

(Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing; *National Research Institute For Family Planning, Beijing)

ABSTRACT The solid dispersion of gossypol acitic acid-PVP was prepared at 45°C and atmospheric pressure using dichloromethane as a solvent. The same result was achieved as using Waller's method, but our improved method was safer and easier than that of Waller's. The mechanism of gossypol acitic acid-PVP solid dispersion was investigated by using X-ray diffraction and ¹HNMR. It was found that hydrogen bonds were present as a binding force between gossypol and PVP. The X-ray diffraction spectra of the solid dispersion showed the typical characteristics of an interstitial solid solution.

The dissolution rate of solid dispersion of 1:7 gossypol-PVP is eight times higher than that of the 1:4 product reported by Waller. All dissolution curves follow the rule of $Q-t^{1/2}$. There is a linear relationship between the proportion of PVP and dissolution rate constant.

The effect of different concentrations of gossypol-PVP and gossypol acitic acid-PVP on human spermatozoa were investigated *in vitro*. The percentage of motility was observed by counting the motile spermatozoa under the microscope. The forward motility of human spermatozoa were completely inhibited at a concentration of 10^{-3} (0.052%) in 20 seconds. PVP itself has no spermicidal properties.

Key words Gossypol acitic acid; Solid dispersion