

黄体酮共晶制备及其体内安全性研究[△]

石文博^{1,2*}, 李 嫒², 曾华辉², 张 慧³, 赵文文³, 武香香^{3#}(1. 河南中医药大学医学院, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046; 3. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046)

中图分类号 R944.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)13-1567-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.13.05



摘要 目的 制备黄体酮-2-氯-4-硝基苯胺(CNA)共晶以提高黄体酮的水溶性,并初步评价其体内安全性。方法 选用黄体酮为共晶主体,CNA为共晶配体,采用溶剂挥发法制备黄体酮-CNA共晶。通过单晶X射线衍射、粉末X射线衍射、差示扫描量热、红外光谱等技术对共晶进行表征,并对比共晶与黄体酮原料药、黄体酮与CNA物理混合物之间的溶出度差异。将48只雌性KM小鼠随机分为正常组(含0.1%二甲基亚砷的磷酸盐缓冲液)、黄体酮组(16 mg/kg)、CNA组(9 mg/kg)和黄体酮-CNA共晶低、中、高剂量组(6、12.5、25 mg/kg),每组8只;肌内注射相应药物/溶剂,每天给药1次,连续14 d。通过测定/观察小鼠体质量、脏器指数、组织形态、血常规及肝肾功能指标变化来初步评价共晶的安全性。结果 单晶X射线衍射实验结果中新晶型结构的出现、粉末X射线衍射图谱里新特征峰的出现、差示扫描量热检测结果中熔点的改变以及红外光谱图中3 500~2 750、1 700~1 250 cm⁻¹范围内特征峰位置的改变,均表明黄体酮-CNA共晶制备成功,且所制共晶的溶出速率比黄体酮原料药提高了1倍以上。体内安全性实验结果显示,各组小鼠死亡率均为零。与正常组比较,黄体酮组及黄体酮-CNA共晶各剂量组小鼠子宫指数均显著升高($P>0.05$),子宫内膜也有所增厚;各组小鼠体质量、肝肾功能、肝脏指数、肾脏指数以及白细胞、淋巴细胞、中性粒细胞数量差异均无统计学意义($P>0.05$),肝肾组织形态无差异;黄体酮组小鼠红细胞数量显著减少($P<0.05$),但黄体酮-CNA共晶各剂量组小鼠红细胞数量差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 成功制备了黄体酮-CNA共晶,提高了黄体酮原料药的水溶性,且所制黄体酮-CNA共晶的体内安全性较好。

关键词 黄体酮;共晶;表征分析;体内安全性

Study on preparation and *in vivo* safety of progesterone cocrystal

SHI Wenbo^{1,2}, LI Man², ZENG Huahui², ZHANG Hui³, ZHAO Wenwen³, WU Xiangxiang³(1. School of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 3. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To prepare progesterone-2-chloro-4-nitroaniline cocrystal (CNA) so as to improve the solubility of progesterone and primarily evaluate the safety of the progesterone cocrystal *in vivo*. **METHODS** Using progesterone as the main body and CNA as the ligand, progesterone-CNA cocrystal was prepared with solvent evaporation method. The cocrystal was characterized by X-ray single crystal diffraction, X-ray powder diffraction (XRPD), differential scanning calorimetry (DSC) and Fourier transform infrared spectroscopy (IR). The dissolution rate of cocrystal was compared with those of progesterone and physical mixture. Forty-eight female KM mice were randomly divided into normal group (phosphate buffer containing 0.1% dimethyl sulfoxide), progesterone group (16 mg/kg), CNA group (9 mg/kg), progesterone-CNA cocrystal low-dose, medium-dose and high-dose groups (6, 12.5, 25 mg/kg), with 8 mice in each group. They were given relevant medicine/solvent intramuscularly, once a day, for consecutive 14 d. The safety of cocrystal was evaluated primarily by determining/observing the changes in body weight, organ index, tissue morphology, blood routine indicators, and liver and kidney function indicators. **RESULTS** The new crystal structure in the X-ray single crystal diffraction results, the new characteristic peak in the XRPD pattern, the change of melting point in the DSC results, and the change of the characteristic peak position in the range of 3 500-2 750 cm⁻¹ and 1 700-1 250 cm⁻¹ in the infrared spectrum all indicated that progesterone-CNA cocrystal was successfully prepared, and the dissolution rate of cocrystal was more than twice that of the progesterone raw material drug. The results of *in vivo* safety experiments showed that the mortality rate of all

△基金项目 国家重点研发计划项目(No.2022YFC3502100)

*第一作者 硕士研究生。研究方向:药物制备技术与工艺。

E-mail:SWB_1221@163.com

#通信作者 教授,硕士生导师,博士。研究方向:药物制备技术与

工艺。E-mail:wuxx-415@126.com

groups was zero. Compared with normal group, uterine indexes of mice in progesterone group and progesterone-CNA cocrystal groups were significantly increased ($P>0.05$), and endometrium was also thickened; there was no statistical difference in the changes of body mass, liver and kidney function, liver index, kidney index, the number of leukocyte, lymphocyte and neutrophil in routine blood test among those groups ($P>0.05$), and the morphology of liver and kidney tissue has also no significant difference. However, the number of plasma red blood cells in the progesterone group decreased significantly ($P<0.05$), and there was no statistical significance in the number difference of red blood cells among progesterone-CNA cocrystal groups ($P>0.05$).

CONCLUSIONS The progesterone-CNA cocrystal is successfully prepared with good safety *in vivo*, which significantly improve the solubility of progesterone.

KEYWORDS progesterone; cocrystal; characterization analysis; safety *in vivo*

共晶是利用晶体工程原理将药物活性成分和共晶形成物通过氢键、 π - π 共轭、范德华力等非共价键结合在同一晶格中形成的超分子^[1]。近年来,共晶被应用于不同领域,尤其是在药学领域应用广泛^[2-3]。选择合适的共晶形成物与药物活性成分组成药物共晶,可以在很大程度上改变药物的各种理化性质及药学性质^[4],如改变药物的熔点、溶解度、引湿性、化学稳定性等^[5],从而提高药物的生物利用度^[6]。黄体酮是卵巢分泌的具有生物活性的主要孕激素,属天然孕激素类药物,在功能失调性子宫出血、痛经、功能性闭经等妇科疾病的临床治疗上有广泛运用,且有较好的治疗效果^[7]。但黄体酮的水溶性差、生物利用度低且个体差异大,口服后易在胃、肠、肝等多个组织代谢^[8]。2-氯-4-硝基苯胺(2-chloro-4-nitroaniline, CNA)是一种毒性较低、结构简单的有机小分子化合物,相对于黄体酮有更高的水溶性^[9],并且其结构中含有的硝基或氨基可作为氢键受体或氢键供体与黄体酮中的终端羰基形成丰富的氢键超分子网格结构,从而改变黄体酮的各项理化性质。本研究利用溶剂挥发技术,以黄体酮为共晶主体,CNA为共晶配体形成黄体酮-CNA共晶,并对其表征分析及动物体内安全性评价,以期提高黄体酮在水中的溶解度,为难溶性药物的制剂研究提供数据参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有 INVENIO 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Bruker 公司)、Free Zone 2.5L 型冷冻干燥机(美国 Labconco 公司)、LC-2030C 3D Plus 型高效液相色谱仪[岛津企业管理(中国)有限公司]、1510 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、BX61 型荧光显微镜及成像系统(日本 Olympus 公司)、Smartlab 9kW 型智能 X 射线衍射仪(日本 Rigaku 公司)、DSC3 型差示扫描量热仪(美国 Mettler Toledo 公司)、RC-806D 型溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司)、BC-2800vet 型兽用全自动血液细胞分析仪(迈瑞医疗国际有限公司)、X'Pert3 Powder 型多功能粉末 X 射线衍射仪(荷兰 Malvern Panalytical 公司)等。

1.2 主要药品与试剂

黄体酮原料药(批号 L1909153,纯度 $\geq 99\%$)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;CNA(批号 201706271,分析纯)购自成都艾科达化学试剂有限公司;丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)、血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(creatinine, CR)检测试剂盒(批号分别为 20210609、20210914、20210913、20210610)均购自南京建成生物工程研究所;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 动物

本研究所用动物为 SPF 级 KM 小鼠,共 48 只,均为雌性,体质量为 30~32 g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物生产许可证号为 SCXK(鲁)2019-0003。小鼠购入后,饲养于明暗交替(12 h/12 h)、温度(22 \pm 2) °C、相对湿度 50% 左右的环境中。饲养期间小鼠自由饮水、摄食,适应性喂养 1 周后开始实验。本实验由河南中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(批号为 DWLL202108004)。

2 方法

2.1 黄体酮-CNA 共晶的制备

采用溶剂挥发法制备黄体酮-CNA 共晶。将 314.162 mg 黄体酮溶解于甲醇中,将 172.569 mg CNA 溶解于水中,再将两者混合并加热搅拌至溶液完全澄清,即得黄体酮-CNA 混合溶液(黄体酮与 CNA 的摩尔比为 1:1)。将混合液在室温下静置 7 d,直到析出晶体,过滤,即得透明的黄体酮-CNA 共晶。

2.2 黄体酮-CNA 共晶的晶体结构检测

采用 Smartlab 9kW 型智能 X 射线衍射仪检测黄体酮-CNA 共晶的结构,收集衍射强度数据。X 射线衍射仪的检测条件为:温度 296.15 K,光源 Mo K α 射线,衍射波长 0.710 73 Å,最大管电压 20 kV,电流 5 mA。

2.3 黄体酮-CNA 共晶的晶相特征检测

采用 X'Pert3 Powder 型多功能粉末 X 射线衍射仪检测黄体酮-CNA 共晶的晶相特征。将 50 mg 左右的样品装入带有蚀刻正方形的平面石英玻璃样品载玻片中,

采用Cu K α 射线作为光源,波长为1.540 6 Å,扫描角度为 2θ ,扫描范围为 $5^\circ\sim 50^\circ$,扫描步长为 0.02° ,扫描速度为 $10^\circ/\text{min}$ 。

2.4 黄体酮-CNA共晶的红外光谱检测

采用傅里叶变换红外光谱法检测黄体酮-CNA共晶、黄体酮及CNA的红外光谱。取上述样品各2 mg,分别置于玛瑙研钵中,加入干燥的溴化钾细粉200 mg作为分散剂,充分研磨混匀后,置于压片模具中制成供试片。设置扫描范围为 $4\ 000\sim 450\text{ cm}^{-1}$ 。

2.5 黄体酮-CNA共晶的物相鉴别

采用差示扫描量热法检测黄体酮-CNA共晶的物相。将2~3 mg黄体酮-CNA共晶置于盖上扎孔的氧化铝坩埚中,密封后进行分析。实验过程中,流速保持在 $50.0\text{ mL}/\text{min}$,加热速率保持在 $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 。

2.6 黄体酮-CNA共晶的溶出度考察

2.6.1 黄体酮含量测定方法的建立

采用高效液相色谱法进行黄体酮含量测定。色谱条件为:采用Shim-pack GIST C₁₈柱,以水(A)-乙腈溶液(B)(30:70, V/V)为流动相进行等度洗脱;流速为 $1\text{ mL}/\text{min}$;柱温为 $35\text{ }^\circ\text{C}$;进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$;检测器为紫外检测器,检测波长为241 nm。按照2020年版《中国药典》(四部)“通则9101”项下方法进行方法学考察^[10],结果符合相关要求。

2.6.2 黄体酮-CNA共晶的溶出度检测

按照2020年版《中国药典》(四部)“通则0931”项下溶出度测定方法进行测定^[10]。具体方法如下:以纯净水为溶出介质,在100 mL溶出介质中加入30 mg黄体酮、与黄体酮单体相当量的黄体酮-CNA共晶以及黄体酮与CNA的物理混合物(其中黄体酮与CNA的摩尔比为1:1)。设置转速为 $100\text{ r}/\text{min}$,溶出温度为 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 。分别在5、10、15、20、30、40、60、90、120、180 min时取样(每个时间点取样3份),采用建立的高效液相色谱法测定溶液中黄体酮的浓度,并绘制溶出曲线。

2.7 黄体酮-CNA共晶的体内毒性考察

2.7.1 分组与给药

将48只KM小鼠随机分为正常组、黄体酮组、CNA组和黄体酮-CNA共晶低、中、高剂量组,每组8只。参考黄体酮肌肉注射的临床给药剂量 $0.33\sim 1\text{ mg}/\text{kg}$ ^[11],按照“千克体质量剂量折算系数法”进行换算,选择6、12.5、25 mg/kg作为黄体酮-CNA共晶的低、中、高给药剂量(分别为临床最大剂量的0.42、0.88、1.77倍),以含0.1%二甲基亚砷的磷酸盐缓冲液(phosphate balanced solution, PBS)溶解;正常组给予含0.1%二甲基亚砷的PBS溶液;黄体酮组给予16 mg/kg黄体酮(与黄体酮-CNA共晶高剂量组中黄体酮给药量一致);CNA组给予9 mg/kg CNA溶液(与黄体酮-CNA共晶高剂量组中

CNA给药量一致)。肌肉注射相应药物/溶剂;每天给药1次,连续14 d,给药体积为 $10\text{ }\mu\text{L}/\text{g}$ 。每天称定小鼠体质量,并记录小鼠的死亡情况。

2.7.2 小鼠血清及组织样本的采集及处理

末次给药12 h后,所有小鼠均禁食不禁水12 h,称定其体质量后,摘眼球取血。取部分血样于EDTA-k2抗凝管中用于血常规分析;其余血样于室温下静置1 h后在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下以 $3\ 000\text{ r}/\text{min}$ 离心15 min,分离上层血清,用于生化指标检测。取血后,立即用颈椎脱臼法处死小鼠,打开其腹腔,于冰台上迅速取出肝脏、肾脏和子宫,用预冷的生理盐水冲洗除去组织上的血渍,用滤纸吸去多余水分,称定各脏器的质量后,置于4%多聚甲醛溶液中固定,备用。

2.7.3 小鼠脏器指数的计算

根据各组小鼠肝脏、肾脏、子宫的质量以及其“2.7.2”中称定的末次体质量,计算各组小鼠的脏器指数:脏器指数(%)=脏器质量(g)/小鼠体质量(g) $\times 100\%$ 。

2.7.4 小鼠血常规及血清中生化指标检测

取“2.7.2”项下的抗凝血,使用全自动血液细胞分析仪检测血液中的血细胞数量及种类。采用微板法检测小鼠血清中ALT、AST水平,采用比色法检测小鼠血清中BUN水平,采用肌氨酸氧化酶法检测小鼠血清中CR水平。具体操作严格按照相应试剂盒说明书进行,均使用酶标仪检测。

2.7.5 小鼠肝、肾、子宫组织的病理形态学观察

取“2.7.2”项下经固定的肝、肾、子宫组织适量,常规制备石蜡切片(厚度为 $3\text{ }\mu\text{m}$)后,行苏木精-伊红(HE)染色,再经常规乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树脂封片后,使用显微镜观察各组小鼠肝、肾、子宫组织的病理形态学变化。

2.8 统计学方法

采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 黄体酮-CNA共晶的晶体结构检测结果

单晶X射线衍射分析结果表明,该共晶的化学计量式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2\cdot\text{C}_6\text{H}_5\text{ClN}_2\text{O}_2$,相对分子量为487.02,晶体密度为 $1.281\text{ g}/\text{cm}^3$ 。该晶体属于斜方晶系,空间群为 $P2_12_12_1$ 。温度为296.15 K时,晶胞参数为: $a=7.721(3)\text{ }\text{Å}$, $b=11.783(5)\text{ }\text{Å}$, $c=27.762(11)\text{ }\text{Å}$; $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$,晶胞体积 $V=2\ 525.8(17)\text{ }\text{Å}^3$,晶胞内不对称单位数 $Z=4$, 2θ 角范围为 $1.47^\circ\sim 23.53^\circ$ 。衍射指标范围为: $-8\leq h\leq 8$, $-13\leq k\leq 12$, $-30\leq l\leq 31$ 。拟合优度 $R^2=0.950$ 。

在晶体结构中可以观察到2种不同的分子间氢键

(用虚线表示):CNA中的氨基与黄体酮分子中的羰基形成异质氢键,另外相邻的CNA分子通过三重碳-氢-氧(C-H...O)氢键以R₃²(12)模式形成了同质分子间氢键,以上2种氢键共同构筑了共晶稳定的三维网络结构。结果见图1。

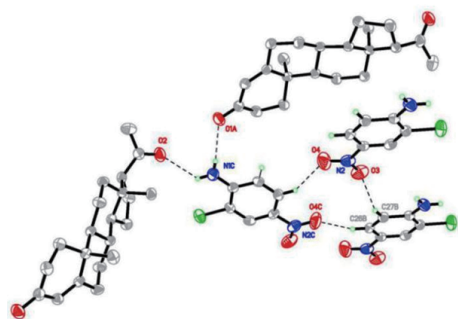


图1 黄体酮-CNA共晶的氢键连接模式椭球图

3.2 黄体酮-CNA共晶的晶相特征检测结果

黄体酮-CNA共晶粉末X射线衍射图包含以下主要的 2θ 角:8.18°,14.06°,15.38°,16.38°,17.86°,19.77°,21.25°,22.02°,24.65°,26.08°,27.84°。从粉末X射线衍射图谱中可看到,黄体酮-CNA共晶衍射峰的拓扑结构与黄体酮、CNA有明显差异,共晶中出现了新的衍射峰,表明形成了新的共晶相。结果见图2。

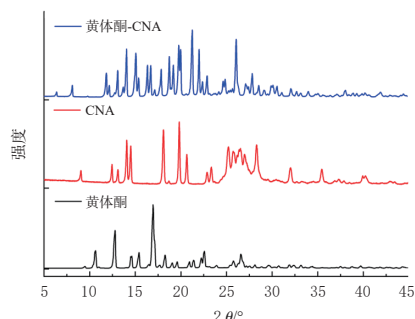


图2 黄体酮-CNA共晶等的粉末X射线衍射图

3.3 黄体酮-CNA共晶的红外光谱检测结果

傅里叶变换红外光谱检测结果显示,黄体酮-CNA共晶中羰基的峰分别出现在 $1\,627.91\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,585.48\text{ cm}^{-1}$ 处,而黄体酮中羰基的峰主要位于 $1\,674.20\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,612.49\text{ cm}^{-1}$ 处,这可能是因为黄体酮分子的羰基与CNA的氨基之间形成了氢键,使黄体酮-CNA共晶中的一C=O伸缩振动频率出现蓝移。与黄体酮分子相比,黄体酮-CNA共晶中黄体酮的C-H峰发生了红移,由原来的 $2\,943\text{ cm}^{-1}$ 处移至 $3\,371\text{ cm}^{-1}$ 处,这可能是因为共晶中存在一个较弱的C-H键与氧原子或苯环的 π 键相互作用,从而诱导形成了更稳定的结构。该结果提示,黄体酮-CNA共晶与原料药相比在 $3\,500\sim 2\,750\text{ cm}^{-1}$ 以及 $1\,700\sim 1\,250\text{ cm}^{-1}$ 范围内有较明显的差异,初步预示了黄体酮-CNA共晶化合物的形成。结果见图3。

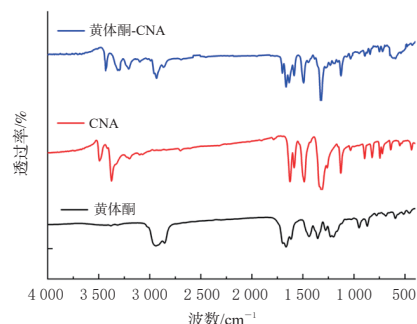


图3 黄体酮-CNA共晶等的傅里叶变换红外光谱图

3.4 黄体酮-CNA共晶的物相鉴别结果

差式扫描量热检测结果显示,黄体酮-CNA共晶的熔点为 $115.16\text{ }^{\circ}\text{C}$,高于CNA($108.88\text{ }^{\circ}\text{C}$),低于黄体酮($131.66\text{ }^{\circ}\text{C}$),符合共晶的一般特征。结果见图4。

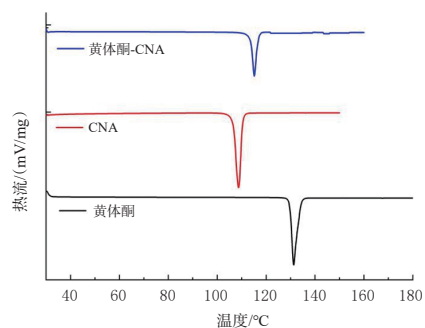


图4 黄体酮-CNA共晶等的差式扫描量热图

3.5 黄体酮-CNA共晶的溶出度检测结果

黄体酮-CNA共晶在水中的溶出速率和溶出度明显大于黄体酮原料药及黄体酮和CNA的物理混合物。黄体酮-CNA共晶的溶出速率比黄体酮原料药提高了1倍以上,表明黄体酮与CNA形成共晶后可以提高黄体酮的水溶性。结果见图5。

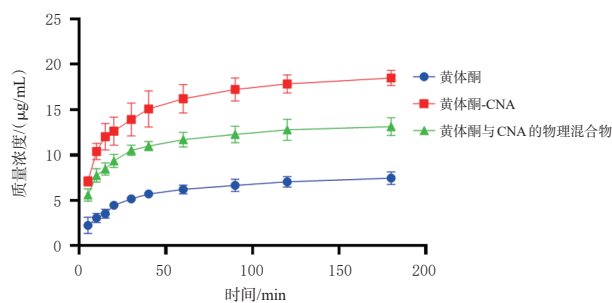


图5 黄体酮-CNA共晶等的溶出曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.6 黄体酮-CNA共晶的体内毒性考察结果

3.6.1 体质量及存活率变化

各组小鼠在给药期间体质量均呈上升趋势,且给药的14 d内各组小鼠的死亡率均为零。结果见图6。

3.6.2 脏器指数测定结果

与正常组比较,其余各组小鼠的肝脏指数、肾脏指数差异均无统计学意义($P>0.05$),黄体酮组及黄体酮-CNA共晶各剂量组小鼠的子宫指数均显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

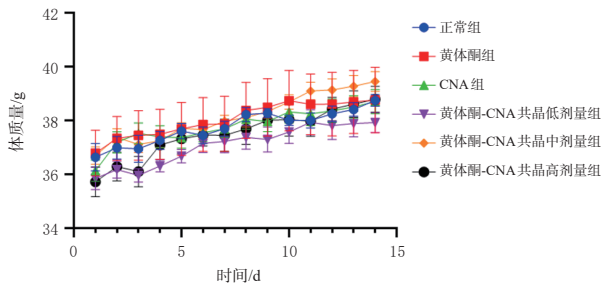


图6 各组小鼠给药期间的体质量变化($\bar{x} \pm s, n=8$)

表1 各组小鼠肝脏指数、肾脏指数及子宫指数测定结果($\bar{x} \pm s, n=8, \%$)

组别	肝脏指数	肾脏指数	子宫指数
正常组	4.576 ± 0.287	1.239 ± 0.084	0.409 ± 0.159
黄体酮组	4.463 ± 0.133	1.266 ± 0.058	0.502 ± 0.044 ^a
CNA组	4.500 ± 0.192	1.258 ± 0.013	0.427 ± 0.112
黄体酮-CNA共晶低剂量组	4.460 ± 0.142	1.248 ± 0.065	0.521 ± 0.175 ^a
黄体酮-CNA共晶中剂量组	4.567 ± 0.178	1.257 ± 0.107	0.530 ± 0.039 ^a
黄体酮-CNA共晶高剂量组	4.598 ± 0.110	1.268 ± 0.121	0.561 ± 0.044 ^a

a: 与正常组比较, $P < 0.05$ 。

3.6.3 血常规指标测定结果

与正常组比较, 其余各组小鼠的白细胞、淋巴细胞及中性粒细胞数量差异均无统计学意义($P > 0.05$), 但黄体酮组小鼠的红细胞数量显著减少($P < 0.05$)。结果见表2。

表2 各组小鼠血常规指标测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	白细胞/ $\times 10^9 L^{-1}$	红细胞/ $\times 10^{12} L^{-1}$	淋巴细胞/ $\times 10^9 L^{-1}$	中性粒细胞/ $\times 10^9 L^{-1}$
正常组	8.90 ± 1.10	11.97 ± 0.49	5.68 ± 2.19	2.37 ± 0.61
黄体酮组	8.52 ± 1.22	10.59 ± 0.78 ^a	5.41 ± 1.09	1.91 ± 0.37
CNA组	8.17 ± 1.47	11.03 ± 0.42	5.58 ± 1.34	2.12 ± 0.69
黄体酮-CNA共晶低剂量组	8.00 ± 1.27	11.61 ± 0.77	5.22 ± 0.54	1.90 ± 0.42
黄体酮-CNA共晶中剂量组	8.98 ± 1.30	12.01 ± 1.38	5.91 ± 1.16	2.12 ± 0.35
黄体酮-CNA共晶高剂量组	8.85 ± 1.84	11.50 ± 0.71	6.09 ± 1.52	1.94 ± 0.22

a: 与正常组比较, $P < 0.05$ 。

3.6.4 生化指标测定结果

与正常组比较, 其余各组小鼠血清中ALT、AST、BUN、CR水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表3。

表3 各组小鼠血清生化指标测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	BUN/(mmol/L)	CR/(μ mol/L)
正常组	18.67 ± 3.31	29.40 ± 3.90	4.15 ± 0.74	17.12 ± 1.95
黄体酮组	17.83 ± 2.97	30.21 ± 6.47	4.55 ± 0.61	17.57 ± 1.43
CNA组	17.34 ± 2.56	28.10 ± 6.83	4.26 ± 0.77	16.88 ± 1.98
黄体酮-CNA共晶低剂量组	17.34 ± 1.70	28.79 ± 5.07	4.43 ± 0.58	16.74 ± 1.18
黄体酮-CNA共晶中剂量组	18.34 ± 1.09	27.63 ± 3.94	4.46 ± 0.67	17.03 ± 1.62
黄体酮-CNA共晶高剂量组	17.39 ± 1.96	28.48 ± 6.07	4.98 ± 0.58	17.39 ± 1.94

3.6.5 肝、肾、子宫组织的病理形态学观察结果

各组小鼠肝细胞无水腫, 肝索排列整齐, 肝小叶结构清晰; 肾小球结构完整, 组织形态正常; 子宫组织形态及子宫的基层、内膜、腺体形态均正常。与正常组比较, 黄体酮组和黄体酮-CNA共晶各剂量组小鼠子宫内膜均有所增厚。结果见图7。

4 讨论

黄体酮是一种天然孕激素类药物, 在临床上有口服和注射2种给药方案, 但均存在明显缺陷, 突出表现为水溶性差、生物利用度低等^[12]。基于晶体工程的共晶策略可以不改变原料药的结构, 而是利用原料药和配体的各种分子间相互作用形成特定的超分子网络结构, 从而实现在不降低原料药活性的前提下改变原料药的各种理化性质。但由于体系中引入了配体小分子, 共晶的安全性问题成为共晶体系能否成功上市的主要制约因素。

得到溶出度更高且安全性良好的黄体酮共晶是本研究的主要研究目的。本研究基于黄体酮和CNA的氢键供体和氢键受体特点, 结合晶体工程策略, 成功使用溶剂挥发法制备了二者的共晶, 单晶X射线衍射实验证实CNA中的氨基与黄体酮分子中的羰基形成了异质氢键, 另外相邻的CNA分子形成了同质分子间氢键, 共同构筑了共晶稳定的三维网络结构, 并且该结构同时得到了粉末X射线衍射、差示扫描量热和红外光谱实验的进一步验证。溶出度实验结果证明, 黄体酮-CNA共晶在水中的溶出速率和溶出度明显大于黄体酮原料药, 说明共晶技术可以有效提高黄体酮的水溶性, 这可能与共晶的多重氢键网络丰富了共晶结构与水分子间的氢键接触位点有关。本研究初步达到了实验预期目的。

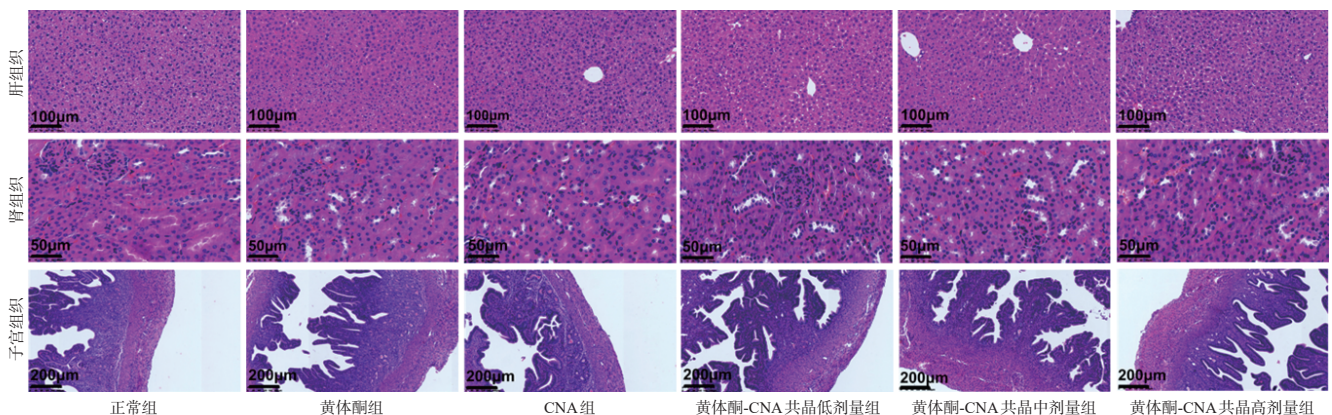


图7 各组小鼠肝、肾、子宫组织病理形态学观察显微图(HE染色)

为了进一步考证该共晶的安全性,本研究选择雌性KM小鼠进行体内毒性实验,主要从体质量、肝肾功能、HE染色、脏器指数、血常规等方面进行安全性考察。动物的体质量变化在一定程度上可以反映药物毒性情况^[3]。在本研究中,黄体酮-CNA共晶低、中、高剂量组小鼠体质量同正常组比较差异均无统计学意义,均呈现缓慢增加的趋势。AST、ALT、BUN、CR分别是判断肝肾功能的指标,其检测水平越高,说明肝肾功能损伤越严重^[4]。本研究结果显示,与正常组比较,其余各组小鼠血清中AST、ALT、BUN、CR水平差异均无统计学意义,表明黄体酮-CNA共晶对肝肾功能没有造成损伤。此外,HE病理切片的结果也进一步证明黄体酮-CNA共晶对小鼠肝、肾无明显影响。脏器指数是实验中用于检测毒性强度的常用指标,当脏器发生退行性萎缩等变化时,脏器指数也会随即改变^[3]。本研究结果显示,与正常组比较,其余各组小鼠的肝脏指数、肾脏指数差异均无统计学意义,但黄体酮-CNA共晶各剂量组和黄体酮组小鼠的子宫指数均显著升高;同时子宫HE病理切片的结果也显示,与正常组比较,黄体酮-CNA共晶各剂量组和黄体酮组小鼠子宫内膜有所增厚,这在一定程度上证明了黄体酮-CNA共晶与黄体酮同样具备保护子宫的作用。血常规指标测定结果显示,黄体酮-CNA共晶各剂量组与正常组比较各指标水平差异均无统计学意义,而黄体酮组小鼠红细胞数量与正常组比较显著降低。该差异可能是由于黄体酮肌内注射容易引起不良反应造成的——黄体酮为油性制剂,不溶于水,常因注射时间长、药物蓄积、渗漏等原因引起皮肤红肿、瘙痒、疼痛、质硬等局部不适以及红细胞减少、红细胞性贫血等血液方面副作用^[15-17]。而黄体酮-CNA共晶与黄体酮相比,不仅溶出度得到很大改善,而且因黄体酮水溶性差引起的不良反应也得到了相应改善。

综上,本研究成功制备了黄体酮和CNA的共晶体系,其溶出度和溶出速率较黄体酮原料药均有明显的提高。体内毒性实验表明,在黄体酮的临床安全剂量范围内,黄体酮-CNA共晶与原料药相比,未产生明显的毒性。以上研究表明,CNA的引入不会增加安全风险,可以为黄体酮的新型给药系统设计提供新思路。但本研究对于药物的后遗效应、停药反应以及全面的药效性等方面未进行考察,后续还需对这些问题进行进一步的考察。

参考文献

- [1] GUAN D, XUAN B F, WANG C G, et al. Improving the physicochemical and biopharmaceutical properties of active pharmaceutical ingredients derived from traditional Chinese medicine through cocrystal engineering[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(12): 2160.
- [2] WANG J E, DAI X L, LU T B, et al. Temozolomide-hesperetin drug-drug cocrystal with optimized performance in stability, dissolution, and tableability[J]. *Cryst Growth Des*, 2021, 21(2): 838-846.
- [3] 刘立新, 邹冬玉, 张羽男, 等. 木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶对小鼠巨噬细胞RAW_{264.7}的抗炎作用研究[J]. *中国药房*, 2018, 29(5): 602-606.
- [4] ROSS S A, LAMPROU D A, DOUROUMIS D. Engineering and manufacturing of pharmaceutical co-crystals: a review of solvent-free manufacturing technologies [J]. *Chem Commun*, 2016, 52(57): 8772-8786.
- [5] ZHOU W X, ZHAO H W, CHEN H H, et al. Characterization of drug-drug salt forms of metformin and aspirin with improved physicochemical properties[J]. *Cryst Eng Comm*, 2019, 21(25): 3770-3773.
- [6] THAKURIA R, SARMA B. Drug-drug and drug-nutritional cocrystal/salt as alternative medicine for combination therapy: a crystal engineering approach[J]. *Crystals*, 2018, 8(2): 101.
- [7] 杨通飞, 李庆琼, 邱璐. 黄体酮临床应用现状及研究进展[J]. *中国现代医生*, 2022, 60(18): 220-224.
- [8] 李学娥, 张蜀, 闵杰. 黄体酮的新剂型及其相关应用研究进展[J]. *广东药科大学学报*, 2019, 35(5): 697-701.
- [9] 夏勇涛. 2-氯-4-硝基苯胺在UASB+A/O电化学耦合系统中降解特性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2022.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[M]. 2020年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 107.
- [11] 王安妮, 冯欣, 赵志刚. 先兆流产药物治疗策略进展[J]. *临床药物治疗杂志*, 2019, 17(2): 32-35.
- [12] FRIŠČIĆ T, LANCASTER R W, FÁBIÁN L, et al. Tunable recognition of the steroid α -face by adjacent π -electron density[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(30): 13216-13221.
- [13] 严银银, 闫敏, 武香香, 等. 藏红花素对雷公藤甲素致小鼠脏器损伤的保护作用研究[J]. *中国药房*, 2021, 32(19): 2320-2326.
- [14] WANG X, JIANG Z, XING M, et al. Interleukin-17 mediates triptolide-induced liver injury in mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 71: 33-41.
- [15] 孙青苗, 金彦, 陈捷, 等. 肌肉注射黄体酮致局部不良反应相关因素分析[J]. *中国药物应用与监测*, 2009, 6(5): 300-302.
- [16] BENCAIOVA G, BREYMAN C. Acquired sideroblastic anaemia following progesterone treatment in pregnancy [J]. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 2009, 49(2): 235-236.
- [17] 陈英, 孟茜, 刘佳, 等. 黄芩酊涂擦对肌肉注射黄体酮所致局部皮肤不良反应的疗效观察[J]. *当代护士*, 2021, 28(9): 144-145.

(收稿日期: 2022-12-09 修回日期: 2023-05-14)

(编辑: 林 静)