

## 微管蛋白抑制剂 SUD-35 固体分散体的制备、鉴定及初步体外药效学研究

潘振华<sup>1a</sup>, 刘焕龙<sup>2</sup>, 陈雪彦<sup>1b</sup>, 向柏<sup>1a</sup>, 方瑜<sup>1a</sup>, 张永健<sup>1b\*</sup> (1.河北医科大学, a.药学院, b.药理教研室, 石家庄 050017; 2.河北医科大学附属第二医院药剂科, 石家庄 050000)

**摘要:** 目的 将难溶性微管蛋白抑制剂 SUD-35 制备成固体分散体, 以增加其溶解度及溶出速率。方法 以聚乙二醇 6000 为载体, 溶剂-熔融法制备 SUD-35 固体分散体。采用差示扫描量热分析与 X-射线衍射观察药物在载体中的存在状态, 并进行溶解度和体外溶出度研究。采用 MTT 法对 SUD-35 固体分散体对小鼠白血病 L1210 细胞药效进行测定。结果 SUD-35 固体分散体中 SUD-35 的溶解度和溶出速率相对原料药和物理混合物均有明显提高, 差示扫描量热分析与 X-射线衍射结果显示 SUD-35 以无定型状态存在于固体分散体中, 细胞药效结果显示 SUD-35 固体分散体对小鼠白血病 L1210 细胞增殖抑制率强于 SUD-35 纯药。结论 聚乙二醇 6000 为载体制备 SUD-35 固体分散体, 可显著提高 SUD-35 的溶解度及溶出速率。

**关键词:** 微管蛋白抑制剂; 固体分散体; 溶出速率; 聚乙二醇 6000; 药效学

中图分类号: R944.2; R965.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2011)06-0533-04

### Preparation, Physicochemical Characterization and Pharmacodynamics *in Vitro* of Solid Dispersion of Antitubulin SUD-35

PAN Zhenhua<sup>1a</sup>, LIU Huanlong<sup>2</sup>, CHEN Xueyan<sup>1b</sup>, XIANG Bai<sup>1a</sup>, FANG Yu<sup>1a</sup>, ZHANG Yongjian<sup>1b\*</sup> (1.Hebei Medical University, a.College of Pharmacy, b.Department of Pharmacology, Shijiazhuang 050017, China; 2.Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To prepare antitubulin SUD-35 solid dispersion from poorly-soluble SUD-35 so as to improve its solubility and dissolution rate *in vitro*. **METHODS** Solid dispersions of SUD-35 were prepared by solvent-fusion method with PEG6000 as carrier. The status of SUD-35 in carrier was determined by differential scanning calorimetry(DSC) and X-ray diffractometry(XRD). The solubility and the dissolution rate of the solid dispersion *in vitro* were studied. The cytotoxicities of SUD-35 in solid dispersion to the L1210 cells were assayed by MTT method. **RESULTS** The results showed that the solubility and dissolution rate of SUD-35 was significantly improved by solid dispersion compared to that of the pure drug and physical mixture. The results of DSC and XRD showed that the SUD-35 in solid dispersion was amorphous form. Cytotoxicity study suggested that the inhibitory rates of SUD-35-PEG6000 solid dispersion to L1210 cells were higher than that of pure SUD-35. **CONCLUSION** The solubility and dissolution rates of SUD-35 were improved by solid dispersion technique.

**KEY WORDS:** antitubulin; solid dispersion; dissolution rate; PEG6000; pharmacodynamics

近年来有研究表明,微管微丝蛋白抑制剂是一类有效的抗肿瘤药物,随着紫杉醇的出现和人们对于微管微丝生物学特性的认识<sup>[1-2]</sup>,微管微丝抑制剂成为抗肿瘤药物的研究热点之一。SUD-35 是我院药物化学教研室研制的全合成的新型苯甲酰胺类小分子微管微丝蛋白抑制剂,毒性较小,有非常好的研究前景。由于 SUD-35 水溶性差,因此

有必要采用药剂学手段增加药物溶解度,加速药物释放以提高生物利用度。固体分散技术是将难溶性药物高度分散在另一种固体载体中的新技术,其特点是提高难溶性药物的溶出速率和溶解度,以提高药物的吸收和生物利用度<sup>[3]</sup>。本试验采用固体分散技术将 SUD-35 制成固体分散体,以提高其溶解度及溶出速率,并比较了其固体分散体

基金项目: 河北省科技支撑计划项目(102761130)

作者简介: 潘振华,男,博士生,讲师 Tel: (0311)86265629  
E-mail: zhangyj@hebm.edu.cn

E-mail: aaapzh@sohu.com \*通信作者: 张永健,男,博士,教授 Tel:

和纯药对小鼠白血病细胞 L1210 的细胞毒性,为进一步研究制剂及临床运用提供了基础和依据。目前国内外尚无微管微丝蛋白抑制剂 SUD-35 固体分散体研究的相关报道。

## 1 材料与仪器

### 1.1 药品

SUD-35 原料药(自制,批号:091015,纯度:99.0%);SUD-35 对照品(河北医科大学药学院药物化学教研室,批号:20100105,纯度:99.3%);聚乙二醇 6000(PEG6000,上海化学试剂采购供应站);SUD-35-PEG6000 固体分散体(河北医科大学药学院药剂教研室自制,批号:20100312);十二烷基磺酸钠(SDSNa)、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、四氮甲基唑蓝(MTT)等均购自美国 Sigma 公司;RPMI21640 细胞培养基、小牛血清为 Gibico 公司产品;琼脂糖(agarose)(西班牙 Biowest 公司);其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器

差示分析仪(美国 Perkin Elmer 公司);D-800LS 智能药物溶出仪(天津大学无线电厂);TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器设备有限公司);D/max2400 转靶 X 射线衍射仪(日本 RIGAKU 电机株式会社);DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器厂);MCO-15AC 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(日本 Sanyo 公司);细胞培养板(美国 Corning Costar 公司)。

### 1.3 细胞株

小鼠白血病细胞株 L1210 细胞,由河北医科大学药理教研室提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 SUD-35 固体分散体的制备<sup>[3]</sup>

**2.1.1 溶剂-熔融法制备 SUD-35-PEG6000 固体分散体** 按 SUD-35 与 PEG6000 质量比分别为 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 的比例称取原料药 SUD-35 与载体材料。将 PEG6000 于 80~90 °C 水浴条件下熔融。将 SUD-35 溶于适量无水乙醇,微热使全溶,而后加入到上述 PEG6000 熔融液中,搅拌使无水乙醇挥干,于 -20 °C 条件下冷冻固化。固化 8 h 后将产品置真空干燥器中,真空干燥 12 h 后粉碎过 80 目筛,即得 SUD-35-PEG6000 固体分散体。

**2.1.2 SUD-35-PEG6000 物理混合物的制备** 将

原料药 SUD-35 及载体材料 PEG6000 分别研细过 80 目筛。按比例称取药物与载体,混合均匀即得。

### 2.2 SUD-35 的含量测定

**2.2.1 测定波长的确定** 精密称取 SUD-35 适量,配制成一定浓度的 80% 甲醇溶液,在 200~400 nm 波长内扫描,结果表明 SUD-35 在 232 nm 处有最大吸收,而相应浓度的 PEG6000 溶液对测定无干扰。故选择 232 nm 为测定波长。

**2.2.2 标准曲线的制备** 精密称取 SUD-35 对照品 20 mg,置 100 mL 量瓶中,加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度,作为贮备液。精密量取贮备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 mL,置 100 mL 量瓶中,加 80% 甲醇稀释至刻度,摇匀,在 232 nm 处测定吸光度,以浓度对吸光度进行线性回归,回归方程为:  $A=0.0802C+0.0003$ ,  $r=0.9997$ ,结果表明 SUD-35 吸光度与浓度在 1.0~12.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内呈良好的线性关系,其回收率  $\text{RSD}\leq 0.68\%$ ,日内精密度  $\text{RSD}\leq 0.96\%$ ,日间精密度  $\text{RSD}\leq 0.87\%$ 。

**2.2.3 溶液稳定性试验** 取 SUD-35 原料药,用 80% 甲醇制备浓度为 6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的样品溶液,于室温下放置,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 测定吸光度。结果吸光度  $\text{RSD}$  为 0.82%。表明样品置室温下放置 24 h 比较稳定,紫外吸收值基本无变化。

### 2.3 溶解度试验

在装有 20 mL 蒸馏水的三角瓶中,分别加入足量 SUD-35 原料及其与 PEG6000 配制的固体分散体(1:1, 1:3, 1:5, 1:7),25 °C 恒温振摇,至体系达到平衡时取样,经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,滤液在 232 nm 波长处测定吸光度,计算溶解度。测得溶解度结果如下: SUD-35 原料 0.32  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 SUD-35 固体分散体分别为 18.50, 66.85, 102.36, 125.69  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由此可见,随载体加入量的增大,溶解度的改善越明显。当 SUD-35 与 PEG6000 比例达到 1:7 时, SUD-35 固体分散体溶解度达到原药溶解度的 392.78 倍( $n=3$ )。故溶出速率测定、差示热分析试验和 X 射线粉末衍射实验中所用的固体分散体中 SUD-35 与 PEG6000 比例均为 1:7。

### 2.4 溶出度试验

采用中国药典 2010 年版二部附录 XC 第二法桨法测定。分别精密称取 SUD-35 原料药 10 mg

和含等量药物的 SUD-35 固体分散体以及物理混合物, 以蒸馏水为溶出介质, 转速为  $100 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 温度为  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  条件下依法进行溶出实验, 于第 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 150 min 时分别取溶液 10 mL, 并补充同温等量溶出液, 样品经  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 取续滤液, 在 232 nm 波长处测定吸收度, 代入回归方程计算药物浓度及累积溶出百分率。结果见图 1。结果表明: SUD-35-PEG6000 固体分散体和物理混合物的溶出度均高于原料药, 固体分散体中, 药物可能以无定型状态形式存在于载体中, 药物释放速度显著增加, 符合本实验设计要求。在物理混合物中, 由于 PEG6000 的亲水性, 部分增加了药物在水中的溶解。

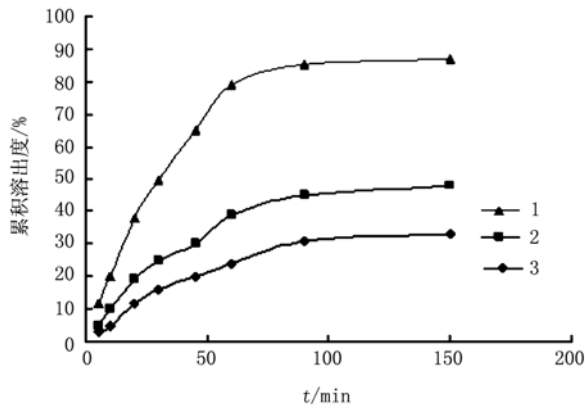


图 1 SUD-35-PEG6000 固体分散体、物理混合物和纯 SUD-35 累积溶出百分率比较( $n=6$ )

1-固体分散体; 2-物理混合物; 3-SUD-35

Fig 1 Release profiles of pure SUD-35-PEG6000 SD, physical mixtures and pure SUD-35( $n=6$ )

1-SUD-35-PEG6000 SD; 2-physical mixtures; 3-SUD-35

## 2.5 理化鉴别

**2.5.1 差示扫描量热分析(DSC)** 工作条件: 扫描范围  $20\sim 200^\circ\text{C}$ ;  $\text{N}_2$  流速  $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 升温速率:  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 参比物: 空铝坩埚; 绘制 SUD-35 原料、PEG6000、固体分散物粉末及物理混合物的 DSC 曲线图, 结果见图 2。DSC 结果表明, PEG6000 在  $50\sim 60^\circ\text{C}$  之间有个吸热峰, 即其吸热峰; SUD-35 在  $118^\circ\text{C}$  有一吸热峰, SUD-35-PEG6000(1:7) 固体分散体无药物吸热峰, 但在  $60^\circ\text{C}$  左右为少量 PEG6000 的吸收峰, 说明固体分散体以无定型状态存在载体材料中; 物理混合物在  $50\sim 60^\circ\text{C}$  和  $118^\circ\text{C}$  仍存在吸热峰。

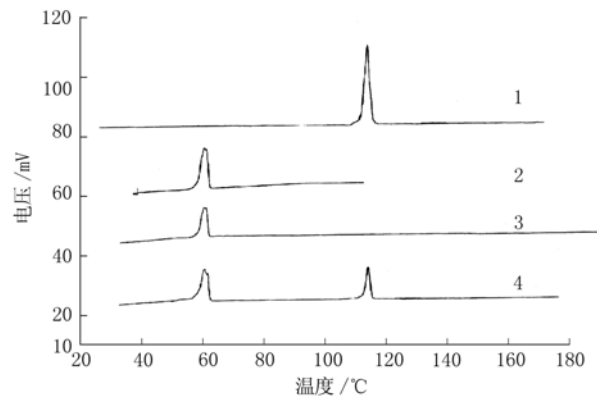


图 2 差示热分析

1-SUD-35; 2-PEG6000; 3-SUD-35-PEG6000(1:7) 固体分散体; 4-SUD-35 和 PEG6000 的物理混合物

Fig 2 DSC curves

1-SUD-35; 2-PEG6000; 3-SUD-35-PEG6000(1:7) SD; 4-physical mixture of SUD-35 and PEG6000

**2.5.2 X 射线粉末衍射(XRD)实验** 分别将 SUD-35、PEG6000、SUD-35 与 PEG6000 物理混合物、固体分散体约 0.05 g 放 XRD 池中进行谱图测定, 测定条件: 靶 Cu; 滤波器 Ni; 电压: 20 kV; 电流: 20 mA; 接受裂缝宽度: 0.3 mm; 扫描范围:  $5\sim 40^\circ(2\theta)$ ; 步长:  $0.05^\circ\cdot\text{s}^{-1}$ 。XRD 图谱见图 3。结果表明, SUD-35 在  $12.5^\circ$ ,  $23.5^\circ$  有特征晶体衍射峰, PEG6000 在  $5^\circ\sim 40^\circ$  之间有 2 个特征的晶体衍射峰。物理混合物的 XRD 峰是 SUD-35 和 PEG6000 的叠加, 固体分散体中 SUD-35 的结晶受到抑制, 可能以无定型状态存在载体材料中。

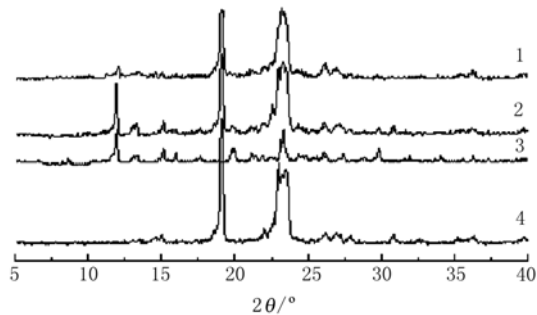


图 3 XRD 图

1-固体分散体; 2-物理混合物; 3-SUD-35; 4-PEG6000

Fig 3 X-ray diffraction patterns

1-SUD-35-PEG6000 SD; 2-physical mixture of SUD-35 and PEG6000; 3-SUD-35; 4-PEG6000

## 2.6 稳定性研究

取“2.1.1”项下的固体分散体贮存在真空干燥器中, 室温下放置, 分别于制备后 30, 60, 90 d 进行体外溶出试验。结果与制备初时所测体外溶

出度数据相似,表明不同比例的固体分散体在规定时间内其溶出度基本不变,稳定性较好。

## 2.7 SUD-35-PEG6000固体分散体与SUD-35纯药对小鼠白血病L1210细胞的初步药效学实验

**2.7.1 细胞培养<sup>[4]</sup>** 小鼠白血病 L1210 细胞用含 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养基(内含青、链霉素各 100 IU·mL<sup>-1</sup>)制成细胞悬液,在培养瓶中置于 37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。在倒置显微镜下观察细胞生长情况,2~3 d 换一次培养液,取对数生长期细胞进行实验。

**2.7.2 细胞增殖分析** 采用 MTT 法。取对数生长期 L1210 细胞,消化、计数,以每孔 5 000 个接种于 96 孔培养板中,置于 37℃,5% CO<sub>2</sub>温箱中培养 24 h,每组设 6 个平行孔,24 h 后分别加入不同浓度的 SUD-35 纯药及 SUD-35-PEG6000 固体分散体,空白对照组加入等量培养基,继续培养 48 h,每孔加入 MTT 溶液(5 g·L<sup>-1</sup>)20 μL,37℃ 孵育 4 h 后小心吸除培养液,每孔加入 200 μL DMSO,震荡 10 min 混匀,用酶标仪测定 550 nm 处各孔吸光度值。按公式计算:增殖抑制率(%)=(对照组平均吸光度值-加药细胞平均吸光度值)/对照组平均吸光度值×100%。同时取 PEG6000 进行上述操作,考察其对 L1210 细胞增殖有无影响。结果见图 4。结果表明:SUD-35 纯药及 SUD-35-PEG6000 固体分散体均能明显地抑制小鼠白血病 L1210 细胞的增殖,在一定范围内,随着浓度增加,抑制作用逐渐增强,并呈现明显的浓度效应关系,其 SUD-35 纯药的 IC<sub>50</sub> 值为(115.35±3.58)μg·L<sup>-1</sup>,SUD-35-

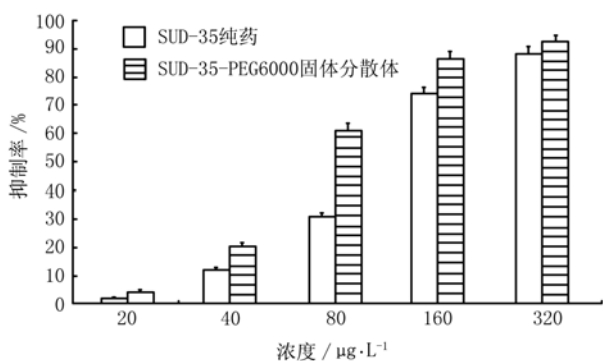


图 4 不同浓度 SUD-35 纯药及 SUD-35-PEG6000 固体分散体对 L1210 细胞增殖抑制率

**Fig 4** Growth inhibition ratio of L1210 cells treated by different concentrations of pure SUD-35 and SUD-35-PEG6000 SD

PEG6000 固体分散体的 IC<sub>50</sub> 值为(78.23±2.32)μg·L<sup>-1</sup>;同时部分浓度 SUD-35 固体分散体的抑制率明显高于同浓度纯药对 L1210 细胞的抑制率。可能与固体分散体增加药物的溶解度或纯药可能从培养基中有少量结晶析出有关,PEG6000 对 L1210 细胞增殖无影响。

## 3 讨论

近年来,难溶性药物的制剂研究是药学研究的一个热点<sup>[5-8]</sup>,本试验以 PEG6000 为载体,以溶剂-熔融法制备了 SUD-35 固体分散体,在固体分散体制备过程中,随着乙醇的蒸发,SUD-35 和载体 PEG6000 产生了一定的物理化学作用,致使 SUD-35 的晶型消失,以无定形态存在载体中,从而增加了其在水中的溶解性,该作用在一定范围内随固体分散体中辅料量比例的增大而增大。其细胞药效学实验显示,SUD-35 固体分散体对小鼠白血病 L1210 细胞增殖抑制率比其纯药更强,其原因还需今后进行更进一步的研究。本研究结果为今后 SUD-35 剂型的进一步研究及临床实验创造了条件。

## REFERENCES

- [1] LI J N, JIANG J D. Biological characteristics of microtubule and related drug research [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2003, 38(4): 311-315.
- [2] LI J N, SONG D Q, LIN Y H, et al. Inhibition of microtubule polymerization by 3-bromopropionylamino benzoylurea (JIMB01), a new anticancer tubulin ligand [J]. Biochem Pharmacol, 2003, 65(10): 1691-1699.
- [3] LU B. New Techniques and New Dosage Forms of Drugs(药物新技术与新剂型) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 40.
- [4] XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Methodology of Pharmacological Experiment(药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006: 1647-1659.
- [5] LEUNER C, DRESSMAN J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2000, 50(1): 47-60.
- [6] VERHEYEN S, BLATON N, KINGET R, et al. Mechanism of increased dissolution of diazepam and temazepam from polyethylene glycol 6000 solid dispersions [J]. Int J Pharm, 2002, 249(1): 45-58.
- [7] YEH M K, CHANG L C, CHIOU A H. Improving tenoxicam solubility and bioavailability by cosolvent system [J]. AAPS PharmSciTech, 2009, 10(1): 166-171.
- [8] LAMPRECHT A, SAUMET J L, ROUX J, et al. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment [J]. Int J Pharm, 2004, 278(2): 407-414.

收稿日期: 2010-08-17