

抗肿瘤药H6聚合物胶束的制备及体外抗肿瘤作用研究

潘超^{1,2*}, 刘会丽², 许俊鹏¹, 唐俏欣¹, 万丽^{1#}(1.成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2.四川大学生物治疗国家重点实验室, 成都 610041)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)04-0533-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.04.28

摘要 目的:制备抗肿瘤药H6(内酯类化合物)聚合物胶束,考察其体外抗肿瘤作用。方法:以甲氧基聚乙二醇-聚(ϵ -己内酯)(mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀)为载药材料,制备H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束。以粒径、多分散系数(PDI)和48 h是否产生沉淀为指标筛选处方投料比、H6质量浓度、有机溶剂体积比,检测所制胶束的包封率和载药量。采用MTT法检测所制胶束与H6溶液对人非小细胞肺癌细胞A549、人肺癌细胞H460的毒性。结果:确定处方为投料比为1:25、H6质量浓度为2 mg/mL、乙醇-氯仿为1:1(V/V);所制备的H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束的粒径为(40.74 \pm 0.116 3) nm, PDI为0.101 \pm 0.006, 包封率为(94.87 \pm 0.016 3)% , 载药量为(7.07 \pm 0.001 5)% (n=3)。胶束和H6溶液对A549细胞的IC₅₀分别为15.62、12.57 nmol/L, 对H460细胞的IC₅₀分别为27.68、15.19 nmol/L。结论:成功制得H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束,其具有体外抗肿瘤作用。

关键词 抗肿瘤药H6; mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀; 胶束; 抗肿瘤作用

Study on Preparation of Anti-tumor Drug H6 Polymeric Micelles and Their *in vitro* Anti-tumor Effects

PAN Chao^{1,2}, LIU Huili², XU Junpeng¹, TANG Qiaoxin¹, WAN Li¹(1.School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2.State Key Lab of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare anti-tumor drug H6 (lactone compound) polymeric micelles, and to investigate its *in vitro* anti-tumor effects. METHODS: Using mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ as carrier, H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ micelles were prepared. Using particle size, PDI and 48 h whether to produce precipitation as indexes, feeding ratio, H6 concentration, volume ratio of organic solvent were screened. The encapsulation efficiency and drug-loading amount of micelle were all detected. MTT assay was used to detect the tox-

方法进行研究,后续拟进行相关试验。包含物的验证主要有红外光谱法、差示扫描热量法、紫外扫描法和薄层色谱法,本试验选取红外光谱法来验证包含物,具有特征性强、应用范围广、操作简便等优点。

星点设计较于传统正交试验设计和均匀试验设计采用非线性二项式方程拟合,预测值接近测得值,得到的预测模型良好、相对误差较小,但尚需结合实际情况对预测值进行优化。

参考文献

[1] Okubo T, Nagai F. The inhibitory effects of moutan cortex and paeoniae radix on oxidative DNA damage by t-butyl hydroquinone, phenolic antioxidant[J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis*, 1997, 379(1):S178.

[2] 廖正根,平其能,梁新丽,等.丹皮酚 β -环糊精包含物的

* 硕士研究生。研究方向:中药有效成分分析。电话:028-61800231。E-mail:1335126865@qq.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:药物分析、中药有效成分及质量标准研究。电话:028-61800231。E-mail:wani801@163.com

研究[J].中国新药杂志,2005,14(10):1173-1175.

[3] 张冕,王德堂,万芳.相溶解度法研究不同环糊精对丹皮酚的增溶作用[J].分子科学学报,2012,28(5):422-426.

[4] 何海云,黄华,王慧,等.伊潘立酮-羟丙基- β -环糊精包含物的制备及验证[J].中国药房,2012,23(29):2737-2739.

[5] 高锦红.牡丹皮中丹皮酚含量的测定[J].湖北农业科学,2013,52(3):669-671.

[6] 张冕. Box-Behnken 实验设计法优化丹皮酚-羟丙基- β -环糊精包含物的制备工艺[J].荆楚理工学院学报,2014(2):5-10.

[7] 李颖,曾茂贵,郑笈,等.星点设计-响应面法优化鱼腥草挥发油- β -环糊精包含物的制备工艺[J].中草药,2014,45(13):1855-1862.

[8] 杨涛,盛欢欢,李岩,等.星点设计-响应面法优化穿心莲提取工艺[J].中国药学杂志,2011,46(2):208-213.

[9] 王昌恩.丹皮酚对大鼠离体工作心脏作用研究[J].中国药理毒理学杂志,1993,7(6):351-353.

[10] 孙言才,沈玉先,孙国平.丹皮酚的主要药理活性研究进展[J].中成药,2004,26(7):579-582.

(收稿日期:2016-11-01 修回日期:2016-12-10)

(编辑:刘明伟)

icity of micelles and H6 solution to human non-small cell lung cancer cell A549 and human lung cancer cell H460. RESULTS: The screened formulation was as follows as feeding ratio of 1:25, H6 concentration of 2 mg/mL, the ratio of ethanol to chloroform of 1:1 (V/V). The parameters of prepared H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ micelles were as follows as particle size of (40.74 ± 0.116 3) nm, PDI of (0.101 ± 0.006), encapsulation efficiency of (94.87 ± 0.016 3)%, drug-loading amount of (7.07 ± 0.001 5)% (n=3). IC₅₀ of micelles and H6 solution to A549 cell were 15.62 and 12.57 nmol/L; IC₅₀ of micelles and H6 solution to H460 cell were 27.68 and 15.19 nmol/L. CONCLUSIONS: H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ micelles are prepared successfully and show *in vitro* anti-tumor effects.

KEYWORDS Anti-tumor drug H6; mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀; Micelles; Anti-tumor effect

H6为四川大学生物治疗国家重点实验室合成的小分子抗肿瘤药物,分子内含有酰胺及内酯,与其结构相似的化合物有CA4、MPC-6827、香豆素等。前期研究表明H6对多种肿瘤细胞具有抑制作用,且H6具有良好的肺靶向性和低心脏毒性,尤其能剂量依赖性地抑制卵巢肿瘤和乳腺肿瘤的生长,是一个很有前景的抗有丝分裂治疗癌症的化合物^[1]。但是由于H6在水中几乎不溶并且在给药过程中不稳定,极大地限制了其临床应用。

聚合物胶束为一种新型的药物给药传递系统,能够改善原型药物的溶解性、降低药物毒性,而且胶束的疏水性内核为难溶性药物提供了一个天然载药环境,使药物更加稳定^[2]。胶束作为药物载体,具有提高药物溶解度和安全性、降低毒副作用、增强药物疗效等优点^[3-5]。甲氧基聚乙二醇-聚(ε-己内酯)[Monomethoxyl poly(ethyleneglycol)-b-poly(ε-caprolactone), mPEG-PCL]由于具有两亲性且易于合成而成为理想的候选载体,在制备聚合物胶束中被广泛应用。本文以mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀为载药材料、H6为原型药物制备了一种新型的载药胶束传递系统(H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束),并对其物理表征和体外抗肿瘤作用研究。H6的化学结构式见图1。

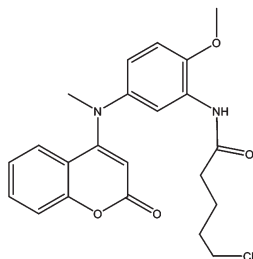


图1 H6的化学结构式

Fig 1 Chemical structural formula of H6

1 材料

1.1 仪器

AL204电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); Thermo Heraeus Fresco 17低温冷冻离心机(美国Thermo Scientific公司); Waters Alliance高效液相色谱仪(美国Waters公司); Malvern ZEN3600激光粒度仪(美国Malvern公司)。

1.2 药品与试剂

H6原料药(四川大学生物治疗国家重点实验室自制,批号:20160609,纯度:>98%); mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀(济南岱罡生物工程有限公司,批号:F1121002); 二甲基亚

砷(DMSO,美国Sigma公司); MTT细胞增殖及细胞毒性测试盒(北京索莱宝科技公司); DMEM细胞培养基、1640细胞培养基、Tyrpsin胰酶、胎牛血清(美国HyClone公司); 甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 细胞

人非小细胞肺癌细胞株A549、人肺癌细胞株H460均购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC),由四川大学华西生物治疗国家重点实验室细胞库培养保种。

2 方法

2.1 H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束的制备

按投料比称取H6原料药和相应质量的mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀于茄形瓶中,加入氯仿-乙醇,室温下超声完全溶解,在50℃水浴加热条件下减压旋转蒸发30 min除去有机溶剂成膜,将上述聚合物薄膜置于真空干燥箱中干燥过夜以除去残留的有机溶剂,加入预热至55℃的超纯水中,55℃水浴中振荡水化成胶束。胶束溶液趁热过0.22 μm注射式微孔滤膜以除去未包封的药物,加入15%蔗糖与6%甘露醇作为冻干保护剂,4℃下避光密封保存。

2.2 处方筛选

以粒径、多分散系数(PDI)和48 h是否产生沉淀(肉眼观察)为指标,采用单因素试验对H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束的处方进行筛选。

2.2.1 投料比 按“2.1”项下方法制备胶束,H6用量为5 mg,超纯水体积为5 mL,氯仿-乙醇为1:1(V/V),考察投料比(H6:mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀, m/m)分别为1:20、1:25、1:30时对胶束的影响。

2.2.2 H6质量浓度 按“2.1”项下方法制备胶束,H6用量为20 mg,投料比为1:25,氯仿-乙醇为1:1(V/V),考察超纯水体积分别为5、10、20 mL时(H6质量浓度分别为1、2、4 mg/mL)对胶束的影响。

2.2.3 有机溶剂体积比 按“2.1”项下方法制备胶束,H6用量为5 mg,投料比为1:25,超纯水体积为5 mL,考察氯仿-乙醇(V/V)分别为1:1、1:2时对胶束的影响。

2.3 质量控制指标测定方法

2.3.1 含量测定 精密量取H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束溶液100 μL,加入900 μL甲醇,超声,13 000 r/min(离心半径8.6 cm)离心3 min,取上清液,采用高效液相色谱法按预试验得出的色谱条件进样测定,计算H6含量。色谱

柱: Sunfire(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(70:30), 流速: 1 mL/min; 柱温: 25 ℃; 进样量: 10 μL; 检测波长: 310 nm。按方法学考察本方法的回归方程、线性范围、回收率、精密度的。

2.3.2 包封率(EE)与载药量(DL)测定 参考文献[6-7]方法, 采用过滤法分离所制 H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ 胶束和游离的 H6。取过滤后的 H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ 胶束溶液 50 μL, 加入 950 μL 乙腈稀释, 超声 1 min 使包封的 H6 释放出来, 13 000 r/min(离心半径 8.6 cm) 离心 3 min, 取上清液测定 H6 含量, 平行测定 3 次。按公式 $EE(\%) = \frac{\text{胶束中包载的 H6 含量}}{\text{H6 的投料量}} \times 100\%$, $DL(\%) = \frac{\text{胶束中包载的 H6 含量}}{\text{H6 的投料量} + \text{mPEG}_{2000}\text{-PCL}_{4000}\text{ 的投料量}} \times 100\%$ 计算 EE 和 DL。

2.3.3 粒径测定 将所制 H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ 胶束稀释 10 倍, 设置测定温度为 25 ℃, 采用 Malvern 激光粒度仪测定粒径和 PDI, 测定 3 次取平均值。

2.4 体外抗肿瘤试验

2.4.1 细胞培养 取 A549 和 H460 细胞分别置于含 10% 胎牛血清、10 u/mL 青霉素、10 μg/mL 链霉素和 10% 非必需氨基酸的 1640 培养基中, 于饱和湿度、37 ℃ 的 5% CO₂ 恒温培养箱培养。

2.4.2 溶液的制备 以 DMSO 为溶剂, 分别配制质量浓度为 1 mg/mL 的 H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ 胶束溶液和质量浓度为 10 mg/mL 的 H6 溶液(均以 H6 计)。

2.4.3 体外抗肿瘤试验 采用 MTT 法^[8-9] 评价 H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ 胶束对 A549、H460 细胞的毒性, 以 H6 溶液为对照。分别收集对数生长期的 A549、H460 细胞, 用培养基稀释成约 3×10^3 个/mL 的细胞悬液, 每孔 100 μL 接种到 96 孔板中, 待细胞生长 24 h 后, 每孔加入 100 μL 含不同浓度(1、10、50、200、500 nmol/L) H6 的培养基溶液, 每个浓度 3 个复孔; 同时设不加药物的阴性对照。放入恒温培养箱中培养 48 h, 取出, 在避光条件下每孔加入 20 μL MTT(5 mg/mL), 继续培养 3 h。取出, 吸去上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 置于摇床上室温振荡 10 min, 待蓝色结晶充分溶解后, 用酶标仪在 570 nm 波长处测定光密度(OD)^[10]。计算细胞抑制率($\% = (1 - \frac{\text{加药孔的测定值}}{\text{阴性对照孔的测定值}}) \times 100\%$), 以及半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.5 统计学方法

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析。多组数据间比较采用单因素方差分析和 SNK 法。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

制得 H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ 胶束为带黄色乳光的澄清透明溶液。

3.1 处方筛选结果

3.1.1 投料比 投料比为 1:20、1:25、1:30 时, 胶束粒

径分别为 40.08、42.58、44.61 nm, PDI 分别为 0.199、0.121、0.318; 除投料比为 1:20 时胶束放置 24 h 未见沉淀、48 h 后有颗粒状沉淀外, 其余胶束放置 48 h 均未见沉淀。这提示随着投料比增加, 胶束更加稳定, 但粒径也略有增大。综合考虑稳定性好的同时粒径要小, 选择投料比为 1:25。

3.1.2 H6 质量浓度筛选结果 当 H6 质量浓度为 1、2、4 mg/mL 时, 胶束粒径分别为 42.09、40.74、45.13 nm, PDI 分别为 0.130、0.101、0.113, 放置 48 h 均未见沉淀。这提示 H6 质量浓度间的粒径和 PDI 差异并不明显, 综合考虑选择胶束浓度为 2 mg/mL。

3.1.3 有机溶剂体积比筛选结果 当氯仿-乙醇分别为 1:1、1:2 时, 胶束粒径分别为 40.74、40.25 nm, PDI 分别为 0.101、0.236, 放置 48 h 均未见沉淀。这提示随着乙醇的增加, 胶束粒径和稳定性无明显变化, 但考虑到乙醇含量较高时, 在旋蒸过程中消耗的时间会延长, H6 易氧化且见光分解, 最终选择乙醇-氯仿为 1:1(V/V)。

3.2 质量控制指标测定结果

3.2.1 方法学考察结果 以峰面积(y)与 H6 质量浓度(x)进行回归得回归方程为 $y = 23\ 306x + 66\ 404$ ($r^2 = 0.999\ 7$), H6 检测质量浓度的线性范围为 0.2~1 000 μg/mL, 平均回收率为 99.7% (RSD=0.41%, n=9), 日内 RSD=0.12% (n=6), 日间 RSD=0.27% (n=6)。

3.2.2 粒径、包封率及载药量测定结果 所制 H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ 胶束的平均粒径为 $(40.74 \pm 0.116\ 3)$ nm, PDI 为 0.101 ± 0.157 , 包封率为 $(94.87 \pm 0.016\ 3)\%$, 载药量为 $(7.07 \pm 0.001\ 5)\%$ (n=3)。

3.3 体外抗肿瘤活性测定结果

结果显示, H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ 胶束和 H6 溶液对 A549、H460 细胞均表现出细胞抑制作用, 且呈剂量依赖性, 随着 H6 浓度增加, 细胞抑制率增加, 其中对 A549 细胞的抑制作用较强。H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ 胶束和 H6 溶液对 A549 的 IC₅₀ 分别为 15.62、12.57 nmol/L, 对 H460 细胞的 IC₅₀ 分别为 27.68、15.19 nmol/L。H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ 胶束和 H6 溶液对 A549、H460 细胞抑制率的影响见图 2。

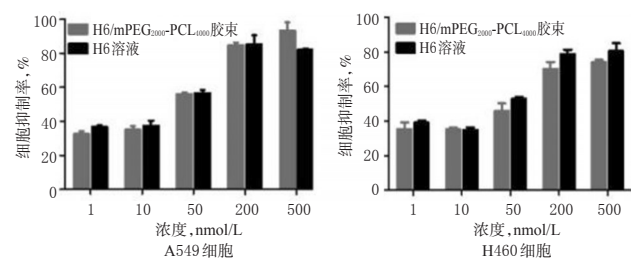


图2 H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ 胶束和 H6 溶液对 A549、H460 细胞抑制率的影响 (n=3)

Fig 2 Inhibition ratio of H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀ micelles and H6 solution to A549 cell and H460 cell (n=3)

左乙拉西坦可溶片的制备工艺及质量研究

孙家跃*,左靖(宿州市立医院药剂科,安徽宿州 234000)

中图分类号 R943;971⁺.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)04-0536-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.04.29

摘要 目的:制备左乙拉西坦可溶片并评价其质量。方法:通过考察原料药的流动性指标(堆密度、紧密度等)和制剂的中间体混合颗粒的粒径分布、流动性指标和水分等建立片剂制备工艺;采用高效液相色谱法测定左乙拉西坦含量,并评价可溶片的外观、崩解时限、主成分含量等质量指标。结果:确立了左乙拉西坦可溶片的制备工艺为湿法制粒压片法。所制可溶片规格为100 mg/220 mg,外观片表面光洁,崩解时限均在1 min内,左乙拉西坦平均含量为100.1%,硬度为7.5 kg,脆碎度合格。结论:左乙拉西坦可溶片处方及制备工艺合理、可控,成品各项质量指标均符合要求。

关键词 左乙拉西坦;可溶片;流动性指标;处方;制备工艺;质量评价

Study on Preparation Technology and Quality of Levetiracetam Soluble Tablets

SUN Jiayue, ZUO Jing (Dept. of Pharmacy, Suzhou Municipal Hospital, Anhui Suzhou 234000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Levetiracetam soluble tablets and evaluate its quality. METHODS: The liquidity indexes of raw material (bulk density, tap density, etc.) and the particle size distribution, liquidity indexes, moisture of the intermediate,

4 讨论

本实验成功制备了H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束,并对其理化性质进行了一系列的表征;体外抗肿瘤活性表明,H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束与H6溶液具有相同活性。

本研究发现,H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束的包封率和载药量不是很高,提示mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀材料对H6的包合效果不是很理想,笔者后期会尝试其他类型的聚合物载体;另外,本文中有机溶剂用到了氯仿,虽然已通过长时间真空干燥来除去,但是氯仿毒性较强,后期会尝试采用二氯甲烷来代替氯仿。

H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束和H6溶液对A549、H460细胞均有抑制作用。H460细胞中,H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束的IC₅₀相比H6溶液略大,可能是由于胶束溶液具有一定的缓释效应,降低了药物在细胞周围的浓度,从而降低了药物对细胞的抑制作用。对于A549细胞,H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束的IC₅₀与H6溶液相差不大。综上所述,H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束很好地保持了H6的抗肿瘤活性。

下一步,笔者还需对H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束的体内药动学进行研究,考察其在体内的吸收代谢情况;而且要对其组织分布进行研究,验证H6/mPEG₂₀₀₀-PCL₄₀₀₀胶束载药系统在体内的靶向分布情况。

参考文献

[1] Cao D, Liu YB, Yan W, *et al.* Design, synthesis, and evaluation of in vitro and in vivo anticancer activity of 4-sub-

stituted coumarins: a novel class of potent tubulin polymerization inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2016, 59(12): 5721-5739.

[2] 马晓星,韩翠艳,刘畅,等.葛根素聚合物胶束的制备及包封率的测定[J]. *中国药房*, 2016, 27(22): 3122-3124.

[3] Tan BJ, Liu Y, Chang KL, *et al.* Perorally active nanomolecular formulation of quercetin in the treatment of lung cancer[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7(9): 651-661.

[4] Tan Y, Qi J, Lu Y, *et al.* Lecithin in mixed micelles attenuates the cytotoxicity of bile salts in Caco-2 cells[J]. *Toxicology In Vitro*, 2013, 27(2): 714-720.

[5] Craparo EF, Teresi G, Bondi ML, *et al.* Phospholipid-polyaspartamide micelles for pulmonary delivery of corticosteroids[J]. *Int J Pharm*, 2011, 406(1/2): 135-144.

[6] 李继昭,袁志强,闫萌,等. cRGD介导的pH敏感性紫杉醇羧甲基壳聚糖-软脂酸胶束[J]. *药学学报*, 2016, 51(4): 642-649.

[7] 霍美蓉,周建平,魏彦,等.紫杉醇壳聚糖聚合物胶束的制备及表面电荷对其在小鼠体内组织分布的影响[J]. *药学学报*, 2006, 41(9): 867-872.

[8] 高萌,蒋妮,徐红,等.注射用姜黄素温敏凝胶体内外抗肿瘤实验研究[J]. *中国药房*, 2014, 25(7): 605-607.

[9] 雷湘,李娟,陈科力.大黄素与姜黄素联用对肝癌细胞BEL7402生长抑制的协同作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2009, 29(12): 971-973.

[10] 吴晶,贾忠,刘渊,等.抗肿瘤化合物CENPOANU的体外抗肿瘤活性研究[J]. *中国药房*, 2013, 24(41): 3864-3867.

(收稿日期:2016-08-22 修回日期:2016-11-11)

(编辑:邹丽娟)

*副主任药师。研究方向:药事管理、药物的开发与利用。电话:0557-3022635。E-mail: sjy0579@163.com