

甲氨蝶呤-烟酰胺共无定型物的体内性质评价及增溶机制研究

高慧冰, 李元春, 李甜甜, 杨彩琴* (河北医科大学药学院, 石家庄 050017)

摘要:目的 制备甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)-烟酰胺(nicotinamide, NIC)共无定型物(methotrexate-nicotinamide coamorphous, MTX-NIC CA),评价体外理化性质及大鼠体内药动学行为,探究其增溶机制。方法 采用熔融法制备并用粉末X射线衍射等技术表征共无定型物的形成;考察MTX-NIC CA物理稳定性和MTX与NIC结合的热力学稳定性;采用相溶解度法研究增溶机制;采用高效液相色谱法测定大鼠血浆中MTX的浓度,绘制药动曲线。结果 MTX-NIC CA的物理稳定性良好;MTX与NIC结合反应为自发的焓驱动反应,NIC对MTX的增溶机制是二者在溶液中生成了络合比为1:1的A_L型可溶性络合物。体内药动结果显示,MTX-NIC CA与MTX原料药相比, t_{max} 延长, c_{max} 、药时曲线下面积(area under the curve, AUC₀₋₄、AUC_{0-∞})、相对生物利用度均显著提高($P < 0.05$)。结论 采用熔融法成功制备了稳定性良好的MTX-NIC CA,共无定型物的形成提高了难溶性药物的生物利用度。

关键词:甲氨蝶呤;烟酰胺;共无定型;增溶机制;稳定性;生物利用度

doi:10.11669/cpj.2025.05.004 中图分类号:R944 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2025)05-0474-07

Evaluation of Properties of Coamorphous Methotrexate-Nicotinamide *in Vitro* and *in Vivo* and Research on the Solubilization Mechanism

GAO Huibing, LI Yuanchun, LI Tiantian, YANG Caiqin* (School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare methotrexate (MTX)-nicotinamide (NIC) coamorphous (MTX-NIC CA), evaluate its pharmacokinetic behavior in rats, and explore its solubilization mechanism. **METHODS** The coamorphous complex was prepared by melting method and characterized by powder X-ray diffraction and other techniques; the physical stability and thermodynamic stability of MTX-NIC CA were examined. The solubilization mechanism was studied by solubility profile method. The concentration of MTX in rat plasma was determined by high-performance liquid chromatography and the pharmacokinetic curve was drawn. **RESULTS** The physical stability of MTX-NIC CA was good; the reaction of MTX with NIC was a spontaneous enthalpy-driven reaction, and the mechanism of NIC for enhancing the solubility of MTX was that a soluble A_L-type complex with a ligand-to-metal ratio of 1:1 was formed in solution. Compared with the raw drug MTX, the t_{max} of MTX-NIC CA was prolonged, and the c_{max} , AUC₀₋₄, AUC_{0-∞} and F were significantly increased ($P < 0.05$). **CONCLUSION** The MTX-NIC CA is successfully prepared by melting method with good stability, and the formation of co-amorphous complex improves the bioavailability of poorly soluble drugs.

KEY WORDS: methotrexate; nicotinamide; coamorphous form; solubilization mechanism; stability; bioavailability

共无定型(coamorphous, CA)是由活性药物成分(active pharmaceutical ingredients, API)与共无定型前体(coamorphous forms, CAF)之间通过分子间相互作用而形成的多组分单相固态无定型体系^[1]。因其“无定型”本质,其对活性药物的溶解度、溶出度以及生物利用度的改善相比共晶^[2]更具吸引力,共无定型中CAF的存在约束了药物分子API的运动,减少了药物分子间的聚集,克服了单个无定型态易结晶的缺点,增加了无定型药物的稳定性。参与形成共无定型的CAF往往是小分子辅料,因此克服了无定型固体分散体中因使用大量聚合物而导致载药量低和制剂服用困难等应

用局限^[3-4]。共无定型体系为药物分子的新剂型设计提供了一个重要的选择,为药物研发注入了新的活力^[5-6]。虽然共无定型药物兼具无定型药物的优点,还能克服单个无定型药物不稳定的缺点,但其本质上仍是无定型态,是热力学上的高能态,容易向能量更低的晶态转变,因而稳定性研究是共无定型开发和应用的关键问题。

甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)是一种剂量依赖性药物,在较低剂量下具有免疫抑制特性,可治疗多种风湿疾病,在较高剂量下可作为抗癌药物,用于治疗恶性疾病,如骨肉瘤和膀胱癌等^[7-9]。但由于其属于生物药剂学分类系统(biopharmaceutics classifica-

基金项目:河北省自然科学基金项目资助(H2020206128)

作者简介:高慧冰,女,硕士研究生 研究方向:靶向给药系统 * 通讯作者:杨彩琴,女,硕士,教授 研究方向:超分子药物体系
Tel: (0311)86265627

tion system, BSC) IV类药物,水溶性和渗透性低,口服生物利用度差^[10],且治疗窗口较窄,需要大量服用才能达到预期疗效,从而限制了其治疗效果。国内外研究通过制备固体分散体、微球、包合物和脂质体等来提高甲氨蝶呤的溶解性能^[11-12],但存在载药量低、稳定性差、生物利用度提高有限等缺点。因此,寻找改善甲氨蝶呤生物利用度的新方法具有很高的研究价值。烟酰胺(nicotinamide, NIC)具有良好的水溶性和渗透性,且成本低、毒性小,其作为共晶/共无定型中的共前体已有报道,在优化难溶性API的溶解性和口服生物利用度方面具有很大潜力^[11-13],Liu等^[14]通过制备6,7-二羟基香豆素(Esculetin)-NIC共晶改善了Esculetin的溶出行为和生物利用度,Fael等^[15]证明了NIC作为共前体提高了吲哚美辛的溶解度和溶出速率。

本研究基于MTX低溶解性、低渗透性等缺点,以NIC为CAF构建MTX-NIC共无定型超分子体系,并对上述产物的纯度、稳定性、溶解性、渗透性及体内药代动力学方面进行探索,该研究为MTX高效剂型的研究和开发提供理论基础。

1 仪器、试剂与动物

1.1 仪器

差示扫描量热分析仪DSC214(德国耐驰仪器制造有限公司);X射线衍射仪SmartLab SE(美国Rigaku公司);红外光谱仪Spectrum Two(美国铂金埃尔默股份有限公司);核磁共振波谱仪WIPM-NMR-400(中科牛津波谱技术有限公司);高效液相色谱仪LC-1200(美国Agilent公司)。

1.2 试剂

MTX(批号:CQC059,纯度:99.1%)、阿魏酸(批号:BGX276,纯度:99%,毕得医药公司);NIC(批号:98-92-0,纯度:>99.0%,梯希爱化成工业发展有限公司);甲醇、乙腈为色谱纯;水为超纯水。

1.3 实验动物

雄性SD大鼠,体质量(250±10)g(河北伊维沃生物科技有限公司),饲养于河北医科大学实验动物中心,实验前12h禁食进水。动物实验经河北医科大学实验动物福利伦理委员会批准(2023040)。

2 方法

2.1 MTX-NIC CA的制备

采用熔融法制备MTX-NIC CA:取MTX

(88.16 mg)和NIC(11.84 mg)原料药混合均匀,置于管式炉,以5℃·min⁻¹的速率升温,升温范围25~140℃,140℃恒温5 min,骤冷,研细,干燥保存备用。

2.2 MTX-NIC CA的表征分析

粉末X射线衍射(powder x-ray diffraction, PXRD)分析:设2θ为5~40°,步长为0.02°,步速为10°·min⁻¹;差示扫描量热(differential scanning calorimetry, DSC)分析:升温速率:10℃·min⁻¹,N₂流速:40 mL·min⁻¹,温度范围:30~240℃;偏光显微镜成像(polarized light microscopy, PLM)分析:取适量干燥样品,20倍物镜,通过摄像机收集显微镜图像;傅里叶变换红外光谱(fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)分析:采用KBr压片法,用IR仪在4 000~400 cm⁻¹波数范围内进行分析。

2.3 MTX-NIC CA的纯度分析

高效液相色谱(HPLC)法:采用外标法^[16]测定共无定型物MTX和NIC的含量。色谱条件:C₁₈反向色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm, Agela);柱温30℃;流动相为乙腈-体积分数0.05%甲酸水溶液(20:80);流速0.6 mL·min⁻¹,进样量10 μL。紫外检测波长:MTX和NIC均为262 nm。氢核磁(¹H-NMR)分析:取适量样品于氘代DMSO中,在293.1 K下测定氢核磁谱图。光谱宽度:11 013 Hz,扫描次数:16,弛豫时间D1:1 s。

2.4 MTX-NIC CA的物理稳定性研究

2.4.1 高温、高湿、强光照射试验 参照《中国药典》2020年版原料药物与制剂稳定性试验指导原则^[17],检测第5天和第10天样品药物含量和PXRD图谱。高温条件:60℃;高湿条件:25℃,RH:(75±1)%;强光照射条件:25℃,4 000 lx。

2.4.2 引湿性试验 参照《中国药典》2020年版原料药物引湿性试验指导原则考察MTX-NIC CA引湿性。

2.5 MTX-NIC CA的理化性质研究

2.5.1 MTX-NIC CA的平衡溶解度 取过量的MTX原料药、MTX与NIC的物理混合物(methotrexate-nicotinamide physical mixture, MTX-NIC PM)和MTX-NIC CA各3份,分别置于棕色玻璃瓶内,加水10 mL,以37℃、100 r·min⁻¹的条件在空气摇床内振摇至平衡,经0.45 μm微孔滤膜过滤,采用紫外分光光度法在303 nm处测定溶液的吸光度(A),代入标准曲线:A=0.052 31c-0.003 28(r=0.999 9),计算不同样品的平衡溶解度(c)。

2.5.2 MTX-NIC CA的溶出度 精密称定MTX原

原料药、MTX-NIC PM 和 MTX-NIC CA,以蒸馏水为溶出介质,采用“浆法”进行测定^[17],转速: $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,温度: $(37 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$,并于 1、5、10、15、20、30、45、60、120、180、240 min 定时取样,同时补充同体积同温度的溶出介质。过滤,测定吸光度,计算溶出度,各样品平行 3 份。

2.5.3 MTX-NIC CA 的渗透性 称取过量的 MTX 原料药、MTX-NIC PM、MTX-NIC CA(均相当于 MTX 2 mg)分别加入 1 mL 水中混悬,将混悬液置于供体室中,在接收池加入一定体积的 pH = 6.8 空白缓冲溶液,通过聚四氟乙烯 (PTFE) 人工膜将两侧隔开,温度: $37 \text{ }^\circ\text{C}$,转速: $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,分别于 1、5、10、15、20、30、45、60、90、120、180、240 min 取样 200 μL ,并补充相同体积缓冲液,测定吸光度。计算累积渗透量 Q ^[18] 及终点渗透速率 J ^[19],各样品平行 3 份。

2.6 MTX-NIC CA 的增溶机制研究

精密配置不同浓度的 NIC 水溶液 (0、0.008、0.016、0.032、0.064 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。取上述溶液 10 mL,加入过量的 MTX 原料药,将混合溶液放置在摇床中以 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速在 5 个不同温度下振荡至平衡,过滤,测定吸光度,计算溶液中 MTX 的物质的量浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),以 MTX 的浓度对 NIC 的浓度做线性回归,得到不同温度下的相溶解度曲线。根据公式 1 计算 MTX 和 NIC 之间的结合常数 K 。根据范特霍夫 (Van't Hoff) 方程 (公式 2) 和吉布斯-亥姆霍兹 (Gibbs-Helmholtz) 方程 (公式 3) 计算热力学函数:焓变 (ΔH)、熵变 (ΔS) 与吉布斯自由能变 (ΔG)。

$$K = \frac{\text{斜率}}{\text{截距}} \times (1 - \text{斜率}) \quad \text{公式(1)}$$

$$\text{Van't Hoff 方程: } \ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{公式(2)}$$

$$\text{Gibbs-Helmholtz 方程: } \Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{公式(3)}$$

其中 R 为通用气体常数, T 为温度。

2.7 MTX-NIC CA 在 SD 大鼠内的体内药动学研究

2.7.1 液相色谱 色谱条件:色谱柱为 C_{18} 反向色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm , Agela); 流动相: A: 乙腈, B: 体积分数 0.05% 甲酸水溶液。梯度洗脱条件: 0 ~ 5 min, 8% A; 5 ~ 7 min, 8% ~ 30% A; 7 ~ 12 min, 30% A; 12 ~ 13 min, 30% ~ 8% A; 13 ~ 15 min, 8% A。柱温为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 洗脱速度为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 303 nm, 内标物: 阿魏酸对照品 (FA, 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.7.2 分组与给药 将 SD 大鼠随机分为 MTX 原料药组、MTX-NIC PM 组以及 MTX-NIC CA 组, 每组

6 只。分别精密称取含 MTX 60 mg 的原料药, MTX-NIC PM 以及 MTX-NIC CA 样品, 悬浮于 5 mL 含质量分数 0.5% 的羧甲基纤维素钠水溶液中, 超声 20 min, 涡旋 5 min, 得 MTX 质量浓度为 $12.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药物混悬液。实验前 12 h 禁食进水, 按照 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给药^[20], 分别于 5、15 min、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12、24 h 大鼠眼内眦取血, 加入到肝素化离心管, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 置于冰箱 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下避光储存。

2.7.3 血浆样品的处理及含量测定 吸取血浆样品 100 μL , 加入 20 μL FA 工作液、乙腈 300 μL , 涡旋混匀 2 min, 于 $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 吸取上层清液, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 下氮气吹干。残余固体用 100 μL 体积分数 80% 甲醇水溶液复溶, 超声 30 s 后, 涡旋 2 min, 于 $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 吸取上清液 80 μL 进样分析。将对照品的 MTX 与 FA 的峰面积比 (Y) 代入线性方程: $Y = 0.00034c + 0.02541$ ($r = 0.9998$), 计算血浆中 MTX 的浓度 (c)。

2.7.4 药动参数计算 以大鼠的测定血浆结果为基础, 借助 DAS 2.0 软件对数据进行处理, 计算相应的药动学参数, 主要包括: 最大血药浓度 (c_{max})、达峰时间 (t_{max})、消除半衰期 ($t_{1/2}$) 和药时曲线下面积 (area under the curve, AUC_{0-t} , $\text{AUC}_{0-\infty}$), 相对生物利用度 (F)。 $F = \text{AUC}_{0-\infty} (\text{共无定型}) / \text{AUC}_{0-\infty} (\text{原料药}) \times 100\%$

3 结果

3.1 MTX-NIC CA 的表征分析

3.1.1 PXRD 和 DSC 如图 1A 所示, MTX 的特征衍射峰为 9.37° , 11.56° , 12.99° , 27.08° , 27.99° 等, NIC 的特征衍射峰为 14.57° , 22.19° 等。MTX-NIC PM 存在 MTX 和 NIC 特征晶体衍射峰。而 MTX-NIC CA 呈现为一个驼峰状衍射晕, 无明显的晶体衍射峰, 表明以无定型形式存在。如图 1B 所示, MTX 的 DSC 曲线上 $139.4 \text{ }^\circ\text{C}$ 处为其脱水吸热峰, 熔点为 $213.7 \text{ }^\circ\text{C}$, NIC 的熔点为 $131.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 。在 MTX-NIC CA 中属于 MTX 和 NIC 的熔点峰消失, 且在 $70.9 \text{ }^\circ\text{C}$ 具有单一的玻璃转化温度 (T_g), 表明 MTX 和 NIC 之间形成了单相的共无定型体系。而 MTX-NIC PM 中, 分别在 $227.7 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $124.8 \text{ }^\circ\text{C}$ 出现了 MTX 和 NIC 的熔点峰, 推断物理混合物中 MTX 和 NIC 分子依然保持其晶态形式, 但二者在加热熔融过程中彼此相互影响, 导致熔点出现不同程度的变化, 该结果与文献^[21]报道的结果一致。

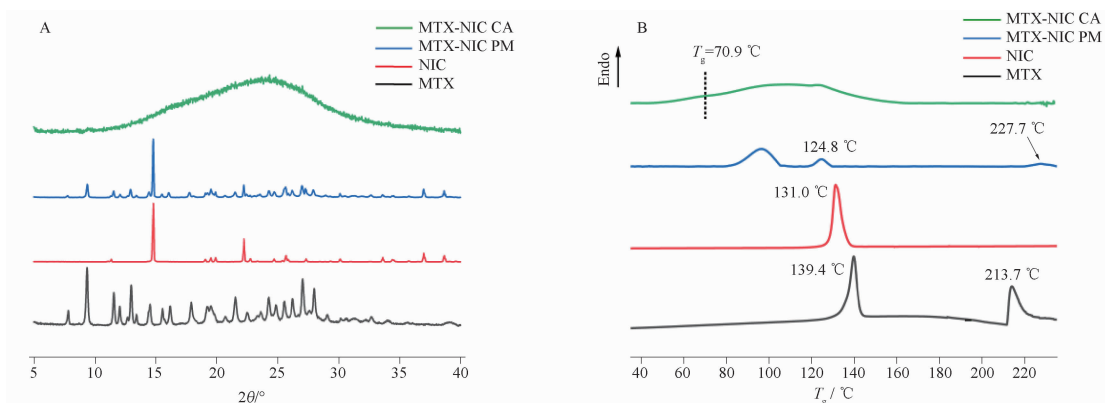


图1 甲氨蝶呤-烟酰胺(MTX-NIC)共无定型物(CA)的粉末X射线衍射(PXRD)图谱(A)和差示扫描量热(DSC)图谱(B)

Fig. 1 PXRD(A) and DSC(B) curves of MTX-NIC CA

3.1.2 PLM 如图2所示,MTX原料药的PLM图呈现不规则块状,具有明暗交替变化的双折射现象,表明其以晶态形式存在;MTX-NIC CA的PLM图呈现暗视野,无明显的双折射现象,表明以无定型态存在。

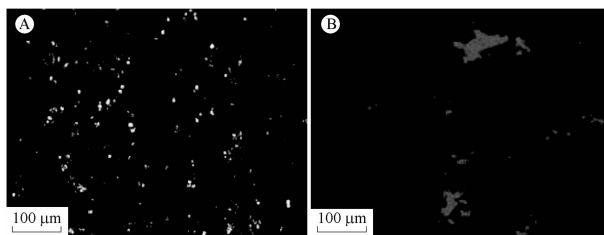


图2 MTX原料药(A)和MTX-NIC CA(B)的偏光显微镜成像(PLM)图

Fig. 2 PLM images of MTX(A) and MTX-NIC CA(B)

3.1.3 FT-IR MTX-NIC PM的图谱基本为两个原料药图谱的简单叠加(图3),说明二者之间并无相互作用。在MTX-NIC CA中,MTX的 ν -OH振动峰从 3367 cm^{-1} 移动到了 3336 cm^{-1} , ν C=O振动峰从 1647 cm^{-1} 移动至 1640 cm^{-1} ;NIC中的 ν -NH振动峰从 3366 cm^{-1} 移动到了 3336 cm^{-1} , ν C=O振动峰从 1680 cm^{-1} 移动到了 1673 cm^{-1} 。综合以上结果推测,共无定型物中MTX与NIC之间以O-H...O=C和C=O...H-N两种氢键连接。

3.2 MTX-NIC CA的纯度分析

HPLC分析:图4显示MTX-NIC CA谱图中出现了NIC和MTX的峰,且与两原料药的出峰时间基本相同,无杂质峰。计算得到MTX与NIC的摩尔比为2:1.048,近似于2:1,这与MTX和NIC的投料比一致,进一步证明了该制备条件下得到的MTX-NIC CA纯度较高,不存在分解现象。

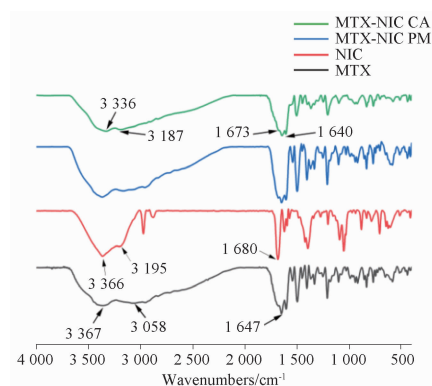


图3 MTX,NIC,MTX-NIC物理混合物(PM)和MTX-NIC CA的傅里叶变换红外光谱(FT-IR)图

Fig. 3 FT-IR spectra of the MTX, NIC, MTX-NIC PM and MTX-NIC CA

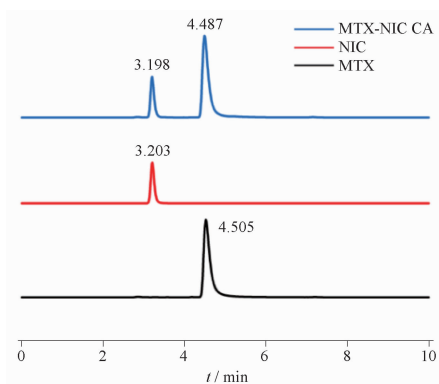


图4 MTX,NIC和MTX-NIC CA的高效液相色谱图

Fig. 4 HPLC of MTX,NIC and MTX-NIC CA

$^1\text{H-NMR}$ 分析:在MTX-NIC CA氢谱中,所有峰的位置都和原料药均能对应(图5)。8.57对应MTX中的H原子,积分为1;9.03对应NIC中的H原子,积分为0.59。根据MTX和NIC的H原子的积分比可知共无定型物中两组分的物质的量比为2:1。

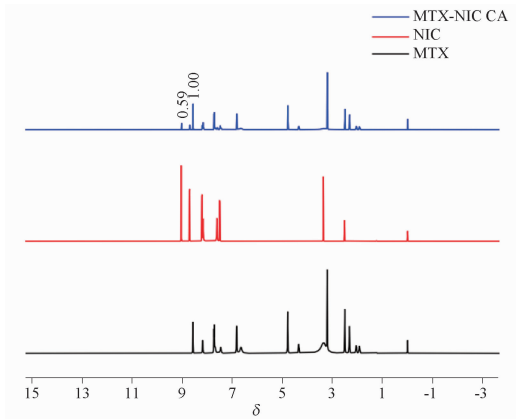


图5 MTX, NIC 和 MTX-NIC CA 在氘代二甲亚砜(DMSO- d_6) 中的 $^1\text{H-NMR}$ 图

Fig. 5 $^1\text{H-NMR}$ spectra of MTX, NIC and MTX-NIC CA in DMSO- d_6

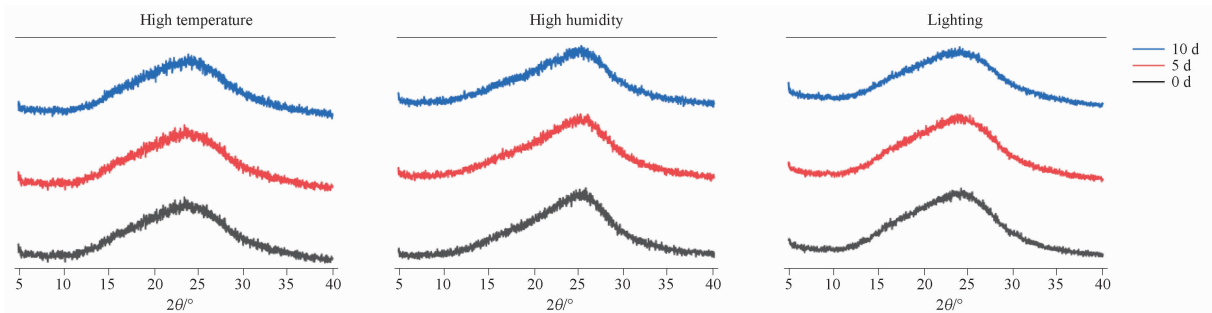


图6 高温、高湿和光照实验后 MTX-NIC CA 的 PXRD 图

Fig. 6 PXRD patterns of MTX-NIC CA under high temperature and high humidity and lighting test

3.3.2 引湿性试验 MTX-NIC CA 吸湿增重为 6.59%, 介于 2% 和 15% 之间, 共无定型具有引湿性。

3.4 MTX-NIC CA 的理化性质研究

3.4.1 体外溶解度和溶出度 制备为 MTX-NIC CA 后, MTX 溶解度由 $102.45 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 提高到 $178.79 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 4 h 内 MTX 的溶出度由 73.50% 上升到 81.36%, MTX 原料药与 MTX-NIC CA 的溶解度和溶出度均具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3.4.2 渗透性研究 MTX-NIC CA 的终点 Q 值 ($3080.56 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) 相比于 MTX 原料药 ($2830.84 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) 提高了 8.8% ($P < 0.05$), 其渗透速率保持快速上升趋势, 4 h 的渗透速率由 $3.21 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ 提高到 $4.45 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ 。药物形成共无定型后, 溶解度得到了明显的改变, 增大了膜两侧的浓度梯度, 浓度差作为驱动力使渗透性增加^[22-23]。综合体外溶解性与渗透

3.3 MTX-NIC CA 的物理稳定性研究

3.3.1 高温、高湿和强光照照射实验 MTX-NIC CA 样品在高温和光照条件下稳定, 其含量和无定型轮廓并未发生变化; 虽具有一定吸湿性, 但在 PXRD 图中仍保持驼峰衍射晕。表明 MTX-NIC CA 具有较好的物理稳定性, 结果见表 1、图 6。

表1 MTX-NIC CA 在高温、高湿和强光照照射后的药物含量变化。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 1 Change of drug content of MTX-NIC CA under high temperature and lighting test and high humidity test. $n = 3, \bar{x} \pm s$

t/d	Content	Content (High humidity	Content (Lighting
	(High temperature	25 °C, RH: 75% \pm 1%)	25 °C, 4 000 lx)
	60 °C) / %	/%	/%
0	102.55 \pm 0.09	100.76 \pm 0.60	102.18 \pm 0.63
5	98.41 \pm 1.45	96.37 \pm 0.94	102.68 \pm 0.27
10	100.59 \pm 0.31	95.26 \pm 0.62	101.26 \pm 1.50

性的实验结果: 将 MTX 制成共无定型后, 不仅促进了药物的溶解, 还提高了药物的渗透性, 这对于提高 MTX 的生物利用度具有潜在的优势。

3.5 MTX-NIC CA 的增溶机制研究

不同温度下, MTX 浓度随着 NIC 浓度的增加而呈现线性增加 (图 7), 由此表明 MTX 与 NIC 能够形成物质的量比 1:1 的 A_L 型可溶性络合物^[24-25]。由 5 个不同温度下对应的 MTX 溶解度绘制标准曲线, 通过回归方程 $\ln K = 2065.44/T - 3.74$ 求出不同温度下结合常数, 根据公式 2 和公式 3 计算焓变 (ΔH)、熵变 (ΔS) 与吉布斯自由能变 (ΔG), 结果见表 2, 在实验温度条件下, 该结合反应的 $\Delta G < 0$, 属于自发反应, 并且随着温度的升高, ΔG 值增大, 说明温度升高不利于 MTX-NIC CA 的形成。 $\Delta S < 0$, 说明 MTX 和 NIC 相互作用的过程是熵值减小的过程, 根据 Gibbs-Helmholtz 方程,

熵值减小不利于反应的进行,但是较大的负焓变弥补了不利的熵变,使得反应可以顺利进行,说明此反应为焓驱动反应^[26]。本部分计算了 MTX 与 NIC 的结合常数及热力学函数,评估了二者相互作用的稳定性,从能量观点分析阐述了 MTX 与 NIC 结合的驱动力。

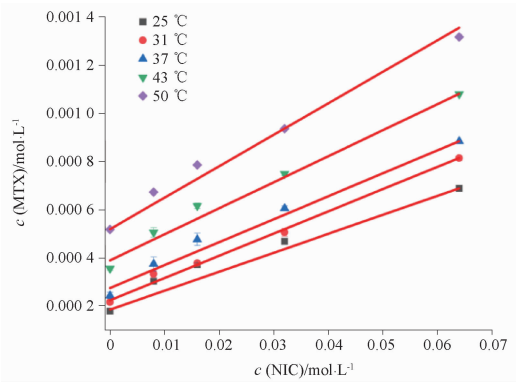


图7 MTX 和 NIC 在不同温度下结合的相溶解度图
Fig. 7 Phase solubility diagrams for MTX with NIC at different temperatures

表2 MTX 和 NIC 的在不同温度下结合的热力学函数
Tab. 2 Thermodynamic functions of MTX and NIC combined at different temperatures

$T/^\circ\text{C}$	K /L · mol ⁻¹	ΔG /kJ · mol ⁻¹	ΔH /kJ · mol ⁻¹	ΔS /J · mol ⁻¹ · K ⁻¹
25	46.08	-7.90	-17.17	-31.09
31	41.91	-7.72	-	-
37	36.61	-7.53	-	-
43	31.02	-7.34	-	-
50	25.83	-7.12	-	-

3.6 MTX-NIC CA 在 SD 大鼠内的体内药动学研究
MTX 经口服给药后体内吸收情况并不理想,血药浓度较低,吸收差(图 8)。MTX 制备为共无定型物后,可以明显提高其在体内的药物浓度,改善体内吸收情况。药动学参数见表 3, MTX-NIC CA 与 MTX 或 MTX-NIC PM 相比, t_{\max} 延长, c_{\max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 F 均显著提高($P < 0.05$)。这些结果说明,与 MTX 或 MTX-NIC PM 相比, MTX-NIC CA 具有更高的生物利用度。在 MTX-NIC CA 中,生物利用度的改善一方面归因于水溶性的提高,另一面也与共无定型体系的脂溶性和渗透性提高密切相关, MTX 生物利用度的提高是其溶解性和渗透性的综合效应。

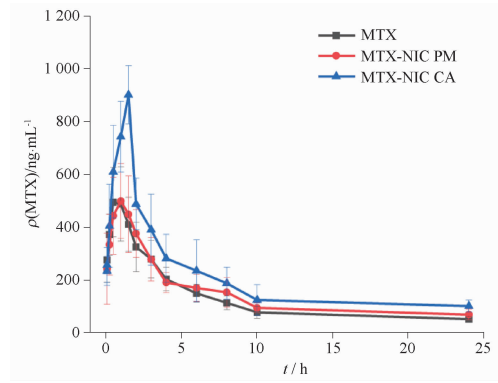


图8 MTX 的血药浓度-时间曲线。 $n = 6, \bar{x} \pm s$
Fig. 8 The blood concentration-time curves of MTX. $n = 6, \bar{x} \pm s$

表3 给药后大鼠体内 MTX 的药动学平均参数。 $n = 6, \bar{x} \pm s$
Tab. 3 Mean pharmacokinetic parameters of MTX in rats after administration. $n = 6, \bar{x} \pm s$

Parameters	MTX	MTX-NIC PM	MTX-NIC CA
$t_{1/2}/\text{h}$	11.69 ± 1.32	10.56 ± 2.96 ¹⁾	11.40 ± 0.20 ¹⁾
t_{\max}/h	0.88 ± 0.22	0.92 ± 0.22 ¹⁾	1.25 ± 0.25 ²⁾
$\rho_{\max}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	585.07 ± 72.20	578.63 ± 80.85 ¹⁾	898.06 ± 85.56 ²⁾
$AUC_{0-t}/\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	3 066.40 ± 265.23	3 305.65 ± 348.95 ¹⁾	4 951.40 ± 888.13 ²⁾
$AUC_{0-\infty}/\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	4 129.52 ± 625.22	3 794.66 ± 614.80 ¹⁾	5 788.43 ± 738.65 ²⁾
$F/\%$	-	91.89	140.17 ²⁾

注:与 MTX 组比较, ¹⁾无显著差异, ²⁾ $P < 0.05$ 。
Note: ¹⁾no significance, ²⁾ $P < 0.05$, vs MTX group.

4 讨论

本研究选择具有优异的水溶性和渗透性的药物 NIC 作为共无定型形成物,利用熔融法制备 MTX-NIC CA 体系,与喷雾干燥法和旋转蒸发法相比^[27-28],制备方法简单环保,不产生溶剂残留。通过 PXRD 和 DSC、PLM 表征了共无定型物的形成,采用 FT-IR 技术分析了共无定型物中潜在的分子间作用力,利用 HPLC 和 ¹H-NMR 评价了共无定型物的纯度及定量计算了两组分的物质的量比。

由于共无定型物本质上仍然是无定型态,其容易向能量更低的晶态转变,因而共无定型物稳定性研究是其开发和应用的 key 问题。本研究系统地考察了共无定型物的物理稳定性及热力学稳定性,从能量观点分析阐述了 MTX 与 NIC 结合的驱动力和 MTX-NIC CA 的增溶机制,为药物储存和制剂开发提供了保障。

本研究中制备的 MTX-NIC CA 改善了药物的低渗透性和低水溶性,从而提高了 MTX 的生物利用度,这与 Meng^[29] 和 Chen 等^[30] 研究一致。从临床应用角度来看,共无定型物的形成可以使 MTX 在更小剂量下发挥更大的疗效,减少单次 MTX 的使用

量,在临床治疗中有更大优势。本研究为改善 BSC IV 类药物的溶解性、渗透性和生物利用度提供技术支持和指导作用。下一步还需展开对 MTX 共无定型物的体内外药效学评价,综合评估其临床应用价值。

REFERENCES

- [1] LIU J, GROHGANZ H, LÖBMANN K, *et al.* Co-amorphous drug formulations in numbers: recent advances in co-amorphous drug formulations with focus on co-formability, molar ratio, preparation methods, physical stability, *in vitro* and *in vivo* performance, and new formulation strategies [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(3):389. DOI:10.3390/pharmaceutics13030389.
- [2] ZHAO Y F, FAN Y, ZHANG Y, *et al.* Preparation, characterization and properties of famotidine-p-toluene sulfonic acid co-crystals [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2024, 59(3):263-269.
- [3] JELIĆ D. Thermal stability of amorphous solid dispersions [J]. *Molecules*, 2021, 26(1):238. DOI: 10.3390/molecules26010238.
- [4] KELSALL K N, FOROUGH L M, FRANK D S, *et al.* Structural modifications of polyethylenimine to control drug loading and release characteristics of amorphous solid dispersions [J]. *Mol Pharm*, 2023, 20(3):1779-1787.
- [5] KARAGIANNI A, KACHRIMANIS K, NIKOLAKAKIS I. Co-amorphous solid dispersions for solubility and absorption improvement of drugs: composition, preparation, characterization and formulations for oral delivery [J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(3):98. DOI:10.3390/pharmaceutics10030098.
- [6] NEWMAN A, ZOGRAFI G. What are the important factors that influence API crystallization in miscible amorphous API-excipient mixtures during long-term storage in the glassy state? [J]. *Mol Pharm*, 2022, 19(2):378-391.
- [7] XIE L Y, ZHONG S, LI Y X, *et al.* Antitumor effects of methotrexate phospholipid complex nanoparticles on breast cancer MCF-7 cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin J Pharm Biotechnol*(药物生物技术), 2021, 28(5):465-468.
- [8] ZHENG J L, MO Y Y, WU X, *et al.* Efficacy analysis of high-dose methotrexate, epirubicin combined with cisplatin neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma [J]. *J Baotou Med Coll*(包头医学院学报), 2022, 38(9):10-14.
- [9] RAJALINGAM K, KRISHNASWAMI V, ALAGARSAMY S, *et al.* Solubility enhancement of methotrexate by solid nanodispersion approach for the improved treatment of small cell lung carcinoma [J]. *Curr Top Med Chem*, 2021, 21(2):140-150.
- [10] CHELLAMPILLAI B, KASHID S, PAWAR A, *et al.* Investigation of dimyristoyl phosphatidyl glycerol and cholesterol based nanocochleates as a potential oral delivery carrier for methotrexate [J]. *J Liposom Res*, 2022, 32(4):308-316.
- [11] DING F, CAO W, WANG R, *et al.* Mechanistic study on transformation of coamorphous baicalein-nicotinamide to its cocrystal form [J]. *J Pharm Sci*, 2023, 112(2):513-524.
- [12] JIA Z Z, SUN J M, XIN Y, *et al.* Preparation and stability of anthocyanin-nicotinamide coamorphous complex [J]. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业), 2024, 50(4):184-190.
- [13] WANG Z M, SHANG H Z, GAO L H, *et al.* Study on thermodynamic behavior of flufenace-nicotinamide cocrystal [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2023, 58(2):165-169.
- [14] LIU F, LI J Y, HAN C B, *et al.* First cocrystal of esculetin: simultaneously optimized *in vitro/vivo* properties and antioxidant effect [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2023, 187:106469. DOI:10.1016/j.ejps.2023.106469.
- [15] FAEL H, DEMIREL A L. Indomethacin co-amorphous drug-drug systems with improved solubility, supersaturation, dissolution rate and physical stability [J]. *Int J Pharm*, 2021, 600:120448. DOI:10.1016/j.ijpharm.2021.120448.
- [16] WANG L. Determination of lamotrigine, carbamazepine and ox-carbamazepine in human serum by high performance liquid chromatography with external standard [J]. *Lab Med Clin*(检验医学与临床), 2023, 20(4):481-483, 489.
- [17] *Ch. P*(2020) Vol IV(中国药典 2020 年版. 四部)[S]. 2020:132,457-459.
- [18] ZENG L J, FU Y R, KE Y J, *et al.* Preparation of a highly permeable oxibunine cubic liquid crystal gel [J]. *China Pharm*(中国药师), 2024, 27(1):17-26.
- [19] MA L Y, WANG L N, ZHANG G C, *et al.* The *in vitro* penetration rate of quetiapine fumarate tablets from different manufacturers was measured by parallel artificial membranes [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2023, 58(14):1327-1333.
- [20] WANG X, YAN H. Methotrexate-loaded porous polymeric adsorbents as oral sustained release formulations [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 78:598-602.
- [21] LI B, HU Y, WU T, *et al.* Apigenin-oxymatrine binary co-amorphous mixture: enhanced solubility, bioavailability, and anti-inflammatory effect [J]. *Food Chem*, 2022, 373(Pt B):131485. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131485.
- [22] JI X, WU D, LI C, *et al.* Enhanced solubility, dissolution, and permeability of abacavir by salt and cocrystal formation [J]. *Cryst Growth Des*, 2021, 22(1):428-440.
- [23] HAO H, REN T, QUAN C, *et al.* Chiral 5-fluorouracil-arginine cocrystals screened by wet powder grinding method: leading to synergistic anti-tumor and alleviate cardiotoxicity [J]. *Powder Technol*, 2024, 436:119487. DOI: 10.1016/J.POWTEC.2024.119487
- [24] SHEN P Y, DOU H T, QIAN S, *et al.* Study on the mechanism of niacinamide complexation solubilizing ibuprofen [J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 2019, 54(1):41-47.
- [25] TENJARLA S, PURANAJOTI P, KASINA R, *et al.* Preparation, characterization, and evaluation of miconazole-cyclodextrin complexes for improved oral and topical delivery [J]. *J Pharm Sci*, 1998, 87(4):425-429.
- [26] YOUNG KL II, KASSOUF C, DOLINSKA M B, *et al.* Human tyrosinase: temperature-dependent kinetics of oxidase activity [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3):895. DOI: 10.3390/ijms21030895.
- [27] YANG Y, KE Y, XIE W, *et al.* Amphiphilic disodium glycyrrhizin as a co-former for ketoconazole co-amorphous systems: bio-pharmaceutical properties and underlying molecular mechanisms [J]. *Int J Pharm*, 2024, 665:124673. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2025.124673.
- [28] SONG X, LUO Y, ZHAO W, *et al.* Preparation and characterization of lutein co-amorphous formulation with enhanced solubility and dissolution [J]. *Foods*, 2024, 13(13):2029. DOI:10.3390/foods13132029.
- [29] MENG J, QIU C, LU C, *et al.* A new crystalline daidzein-piperazine salt with enhanced solubility, permeability, and bioavailability [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15:1385637. DOI:10.3389/fphar.2024.1385637.
- [30] CHEN H, MA J, ZHOU F, *et al.* A potential cocrystal strategy to tailor *in-vitro* dissolution and improve Caco-2 permeability and oral bioavailability of berberine [J]. *Int J Pharm*, 2024, 666:124789. DOI:10.1016/j.ijpharm.2024.124789.

(收稿日期:2024-11-04)