

红霉素纳米乳的制备及其药效学研究

芮亚培, 欧阳五庆, 邱 刚, 董红宾, 李树珍

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**研制红霉素纳米乳制剂,并检测其体外药效。**【方法】**利用伪三元相图法,以 tween-80 为表面活性剂、无水乙醇为助表面活性剂、乙酸乙酯为油相、红霉素原料药为主药,制备红霉素纳米乳,并对其形态特征、稳定性和体外药效进行检测。**【结果】**红霉素纳米乳的最佳配方(质量分数,%)为:红霉素 1%,无水乙醇 10%,Tween80 30%,乙酸乙酯 4.4%,去离子水 54.6%。用该配方制备的红霉素纳米乳为澄清透明的液体,透射电镜下观察为球状液滴,粒径为 10~100 nm,具有良好的分散性。红霉素纳米乳经高速离心和在-4℃、室温、60℃条件下留样观察,均未见纳米乳发生变化。红霉素纳米乳对耐药金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌的最小抑菌浓度分别是 0.01563 和 0.125 mg/mL。**【结论】**研制的红霉素纳米乳为澄清透明的淡黄色液体,稳定性良好,其对耐药金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌均有较强的抑菌和杀菌作用。

[关键词] 红霉素;纳米乳;体外药效

[中图分类号] R978.1⁺5;R944.1⁺6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)03-0059-05

Study on preparation of erythromycin nanoemulsion and its pharmacy *in vitro*

RUI Ya-pei, OUYANG Wu-qing, QIU Gang, DONG Hong-bin, LI Shu-zhen

(College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** This research is to study the preparation and pharmacy of Erythromycin Nanoemulsion. **【Method】** The Erythromycin Nanoemulsion with suitable surfactant, cosurfactant, oil, water and Erythromycin was prepared by studying the pseudoternary phase diagrams. And its configuration, physical stability and pharmacy *in vitro* were evaluated. **【Result】** The optimal prescription of erythromycin nanoemulsion was erythromycin 1%, absolute ethylalcohol 10%, Tween 80 30%, acetic ether 4.4%, deionized water 54.6%. The erythromycin nanoemulsion prepared by the prescription was a kind of clear solution and it presented as small spherical drops under Transmission Electron Microscope (TEM), with the diameter of about 10—100 nm. Erythromycin nanoemulsion was stable after high speed centrifuge and reserving at -4℃, room temperature and 60℃. The MICs of Erythromycin on Staphylococcus and Streptococcus were respectively 0.015 63 and 0.125 mg/mL. **【Conclusion】** The erythromycin nanoemulsion was a kind of clear solution with very good stability. The antibacterial effect of erythromycin nanoemulsion on staphylococcus and streptococcus *in vitro* was remarkable.

Key words: erythromycin; nanoemulsion; pharmacy *in vitro*

* [收稿日期] 2007-04-02

[基金项目] 奶业发展重大关键技术研究与示范项目(2006 BAD 04A11)

[作者简介] 芮亚培(1981—),女,河南平顶山人,在读硕士,主要从事新兽药开发研究。E-mail: ruiyapei@163.com

[通讯作者] 欧阳五庆(1960—),男,陕西凤翔人,教授,博士生导师,主要从事新兽药开发、细胞生物学和泌乳生理研究。
E-mail: oywq506@sina.com

红霉素是大环内酯类抗生素,为白色碱性晶体状物质,味苦,极微溶解于水,极易溶于有机溶媒,如醇、丙酮、乙酸乙酯等。红霉素主要用于耐药金黄色葡萄球菌,溶血性链球菌所引起的严重感染(如肺炎、败血症、子宫内膜炎、乳腺炎等),对支原体所引起的慢性呼吸道疾病、霉形体肺炎也有较好疗效。红霉素不但用于人医,在兽医临床上也有广阔的应用前景。传统红霉素制剂因内服后易被胃酸破坏,体内半衰期短,且在肝内有部分药物会被灭活,致使服用剂量大,服用频繁和消化道反应明显。

纳米乳,也称微乳,是由表面活性剂、助表面活性剂、油相及水在适当比例下形成的澄清透明的热力学稳定体系,液滴粒径为 10~100 nm。纳米乳在药剂学上的应用始于 20 世纪 90 年代,其作为药物载体具有多方面的优点:是热力学稳定体系,制备时无需外界做功,只要组分的比例合适可自发形成,且一旦形成即保持稳定;通过内核的油相和表面活性剂的烃链 2 部分的增溶,可极大地提高难溶性药物在水中的溶解性;可以同时增溶不同脂溶性的药物;纳米乳的粒径小、粘度低、药物在其中分散性好,有利于机体迅速吸收,提高药物的生物利用度,降低其毒副作用。纳米乳的制备简单、易行、耗材少、费用低。

近年来,国内外用新型纳米乳载体对传统的、难溶性的,药效低的药物进行改造的研究很多^[1],如印度的 Sheikh 等^[2]制备了 Ramipril 纳米乳,法国的 Trimaille 等^[3]制备了 Cationic 纳米乳等;在国内,华北制药集团也已经开始生产环孢素 A 口服纳米乳^[4],北京大学的何蕾等^[5]制备了紫杉醇纳米乳,湖北襄樊学院的李先红等^[6]制备了醋酸泼尼松龙纳米乳,中国药科大学的龚明涛等^[7]制备了羟喜树碱纳米乳,第四军医大学的杨青艳等^[8]制备了氟尿嘧啶纳米乳等。但目前尚未见关于红霉素纳米乳研制方面的报道,为此本试验制备了红霉素的 O/W 型纳米乳口服液,并对其理化性质及体外药效进行了考察,以期红霉素纳米乳的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌菌种,由西北农林科技大学预防实验室提供。

1.1.2 主要试剂 吐温-80(化学纯、天津市登峰化学试剂厂产品),无水乙醇(中国医药集团上海化学试剂公司产品),乙酸乙酯(西安化学试剂厂生产),

红霉素原料药(广东省韶关集琦药业有限公司产品),红霉素肠溶片(西安利君制药有限公司生产),罗红霉素片(陕西华西制药股份有限公司生产)。

1.1.3 主要仪器 JEM1230 型透射电子显微镜(日本日立电子公司生产),TGL-16B 型高速离心机(湖南星科科学仪器有限公司生产),SKP02.420 电热恒温培养箱(黄山市恒丰医疗器械有限公司生产),XSZ-HS7 偏光显微镜(重庆光学仪器厂生产)。

1.2 红霉素纳米乳的制备及最佳配方的筛选

利用伪三元相图法制备红霉素纳米乳。以无水乙醇作为红霉素原料药的溶剂(亦把其当作助表面活性剂)、Tween80 为表面活性剂、乙酸乙酯为油相,使表面活性剂/助表面活性剂($k_m=3:1$)与油相分别按照 9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,4:6,3:7,2:8,1:9 的比例(质量比),精密称取各组份将其混合后置恒温磁力搅拌器上,滴加蒸馏水充分搅拌,直到形成淡黄色、澄清透明的体系。把红霉素含量较高且体系最稳定的配方作为最佳配方。

1.3 红霉素纳米乳及其类型的鉴别^[9]

纳米乳的鉴别采用离心法^[10-11],将制备的纳米乳 4 000 r/min 离心 20 min,观察是否分层,如仍维持透明可判为纳米乳。纳米乳类型的鉴别采用染色法^[10],利用红色的油溶性染料苏丹红Ⅲ和蓝色的水溶性染料亚甲兰在纳米乳中扩散的快慢来判断,如果蓝色的扩散速度大于红色,则纳米乳为 O/W 型;反之则为 W/O 型;二者一样快,则为双连续型。

1.4 红霉素纳米乳的稳定性考察

1.4.1 外观 肉眼观察纳米乳的外观,若澄清透明,表明稳定性良好;若浑浊、絮状、分层,表明不稳定。

1.4.2 高速离心试验 将纳米乳置 10 cm 离心管中,放入高速离心机中,以 10 000 r/min 的速度离心 20 min,观察是否有沉淀、浑浊、分层等外观现象发生。若外观仍透明、流动性良好,则用 100 倍重力加速度离心 5 min 观察,若不发生相分离,即为稳定纳米乳^[12]。

1.4.3 留样观察试验^[13] 制备 3 批红霉素纳米乳,熔封于 5 mL 安瓿瓶中,分别置于-4℃冰箱、室温和 60℃恒温烘箱内,于 0,3,6 个月时取样品,进行外观考察和 PH 值检测。

1.5 红霉素纳米乳的微观形态观察

参考文献[14],用透射电镜检测纳米乳的微观形态,将铜网置于蜡板上,在铜网上滴加一小滴红霉素纳米乳,自然晾干,把 2% 磷钨酸滴在蜡板上,将

晾干的铜网倒置于染液上,负染 15 min 后晾干,在电镜下观察纳米乳液滴的形态。

1.6 红霉素纳米乳最小杀菌浓度(MBC)和最低抑菌浓度(MIC)的测定

参考文献[15]的方法,测定红霉素纳米乳的 MBC 和 MIC。用蒸馏水将红霉素纳米乳稀释成 0.5 mg/mL 的溶液,对照药物红霉素肠溶片、罗红霉素片分别以无水乙醇溶解后用蒸馏水配制成 0.5 mg/mL 的溶液。取 9 支试管,每管加肉汤 1 mL,第 1 管加红霉素纳米乳 1 mL,依次作倍比稀释至第 7 管,各管红霉素纳米乳的质量浓度分别为 0.25, 0.125,0.062 5,0.031 25,0.015 625,0.007 812 5 和 0.003 906 25 mg/mL;第 8 管为细菌对照,不用药;第 9 管为药液(0.25 mg/mL)对照,不加菌液。1~8 管每管加金黄色葡萄球菌菌液 0.1 mL(细菌浓度为 $10^5\sim10^6$ mL⁻¹),37 ℃ 培养 24 h 后取出,备用。分别吸取各试验管的培养物 0.1 mL,用接种棒均匀涂抹于琼脂平板培养基上,37 ℃ 培养 24 h 后,观察各平板上的细菌菌落数,每试验重复 3 次,结果取平均值。平板上菌落数小于 5 个的最小药物浓度即为 MBC;平板上没有细菌生长的最低药物浓度为细菌的 MIC。同法测定红霉素纳米乳对溶血性链球菌的 MBC 和 MIC。红霉素肠溶片和罗红霉素

片对照组试验依法进行。

2 结果与分析

2.1 红霉素纳米乳的最佳配方

通过伪三元相图法筛选出的红霉素纳米乳的最佳配方为:红霉素 1%、无水乙醇 10%、Tween80 30%、乙酸乙酯 4.4%、去离子水 54.6%(以上各组分均为质量分数)。

2.2 红霉素纳米乳及其类型鉴别

结果显示,按上述配方制取的药液,经离心后仍为澄清透明的淡黄色液体,判定为红霉素纳米乳。染色结果显示,在红霉素纳米乳中蓝色的扩散速度大于红色的扩散速度,证明该体系为 O/W 型纳米乳。

2.3 红霉素纳米乳的稳定性

红霉素纳米乳外观为淡黄色澄清透明的液体,无浑浊、絮凝、分层等现象;将红霉素纳米乳以 10 000 r/min 的速度离心 20 min 后仍为淡黄色、澄清透明、均一液体,表明其稳定性良好。留样观察结果(表 1)显示,3 批红霉素纳米乳样品在不同温度下长期放置,均能保持外观透明、均一和 pH 值稳定不变。

表 1 红霉素纳米乳留样观察试验结果

Table 1 Results of sample observation tests on Erythromycin nanoemulsion

样品 Sample	留样时间/月 Term	外观 Appearance			pH		
		-4 ℃	25 ℃	60 ℃	-4 ℃	25 ℃	60 ℃
060902	0	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
		透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
	3	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
		透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
	6	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
		透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
060904	0	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
		透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
	3	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
		透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
	6	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
		透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
060906	0	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
		透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
	3	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
		透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
	6	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50
		透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	透明均一 Transparent and homogeneous	6.50	6.50	6.50

2.4 红霉素纳米乳的微观形态

微观形态观察结果显示,纳米乳的液滴呈球形(图 1),粒径在 20~80 nm,液滴分布均匀,无团聚现象,表明分散性良好。

2.5 红霉素纳米乳的体外药效

体外抑菌试验结果(表 2)表明,红霉素纳米乳对金黄色葡萄球菌的 MIC、MBC 较红霉素肠溶片小而与罗红霉素片相同,表明红霉素纳米乳对金黄色葡萄球菌的体外抑菌作用强于红霉素肠溶片;对溶血性链球菌的 MBC、MIC 则分别为 0.125 和 0.0625 mg/mL,显著低于红霉素肠溶片和罗红霉素片,表明其对溶血性链球菌的体外抑菌效果强于红霉素肠溶片和罗红霉素片。

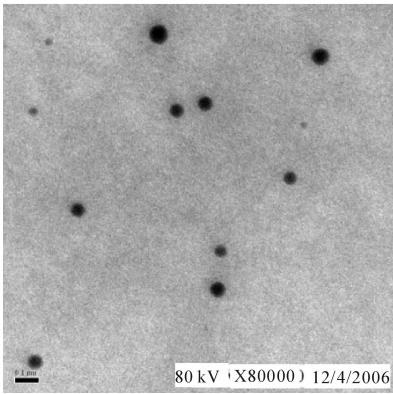


图 1 红霉素纳米乳的电镜照片
Fig. 1 Transmission electron micrograph of Erythromycin nanoemulsion

表 2 红霉素纳米乳与红霉素肠溶片及罗红霉素的体外药数比较

细菌 Bacterium	Tablets and Roxithromycin Tablets					
	红霉素纳米乳 Erythromycin Nanoemulsion		红霉素肠溶片 Erythromycin Enteric-coated Tablet		罗红霉素片 Roxithromycin Tablet	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
金黄色葡萄球菌 Staphylococcus	0.031 25	0.015 63	0.062 5	0.031 25	0.031 25	0.015 63
溶血性链球菌 Hemolytic streptococcus	0.125	0.062 5	0.5	0.25	0.5	0.25

3 讨 论

本试验采用伪三元相图法筛选出最适合的配方制备红霉素纳米乳。纳米乳是自发形成的,只要配方合适,不需要外力做功,但本试验发现,采用将各组分简单混合在一起的方法,虽能形成透明的纳米乳,但不如采用转相乳化法形成的速度快。转相乳化法是先将表面活性剂/助表面活性剂相与油相混合,搅拌均匀,然后向体系中缓慢滴加水相,边加边搅拌,直到将水加到足够量,即可得到所需要的 O/W 型纳米乳。

纳米乳是由水相、油相、表面活性剂和助表面活性剂形成的透明均一的热力学稳定体系,纳米乳液滴呈球形,粒径为 10~100 nm。本试验制备的红霉素纳米乳为淡黄色、澄清透明、均一的液体,稳定性好,符合纳米乳的一般性质特点;在透射电镜下其液滴呈球形,粒径在 10~100 nm,且分布均匀、无团聚现象,表明分散性良好。

纳米乳体系是热力学稳定体系,一旦形成就非常稳定,几乎不受外界条件的干扰。对纳米乳自发形成和其所具有的较高稳定性,有人提出了瞬时负界面张力机制^[16]。该机制认为,油/水界面张力在

表面活性剂存在时大大降低;在助表面活性剂存在时可产生混合吸附;在某些非离子表面活性剂达到一定浓度时,会进一步下降至超低值(10⁻³~10⁻⁵ mN/m),以至产生瞬时负界面张力。由于负界面张力不能存在,体系将自发扩张界面,使更多的表面活性剂和助表面活性剂吸附于界面而使其体积浓度降低,直至界面张力恢复至零或微小的正值。这种由瞬时负界面张力导致的体系界面自发扩张的结果就形成了纳米乳。如果纳米乳发生聚结,则界面面积缩小,又产生负界面张力,从而对抗纳米乳的聚结,使其保持稳定。本试验结果显示,高速离心和在-4℃、室温、60℃时留样观察,红霉素纳米乳体系均未发生肉眼可见的外观变化,表明制备的红霉素纳米乳稳定性良好。

本试验结果还表明,红霉素纳米乳具有较好的抑菌和杀菌作用,其原因很可能是红霉素纳米乳的粒径小,更易于使药物附着于细菌上,并渗透进入细菌的内部干扰细菌代谢而发挥抑菌或杀菌作用。从这个层面上讲,若将红霉素纳米乳制成外用药物也有非常好的应用前景。

[参考文献]

[1] 杨惊宇,严冬. 新型药物剂型——微乳[J]. 中国医学工程,

- 2005,13(4):378-382.
- Yang J Y, Yan D. Drug delivery system-Microemulsion[J]. China Medical Engineering, 2005, 13(4): 378-382. (in Chinese)
- [2] Sheikh S, Faiyaz S, Sushma T, et al. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2006, (6): 10.
- [3] Trimailke T, Chaix C, Delair T, et al. Interfacial deposition of functionalized copolymers onto nanoemulsions produced by the solvent displacement method [J]. Colloid Polym Sci, 2001, 279(10): 784-792.
- [4] 梅兴国. 生物技术药物制剂——基础与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 270-271.
- Mei X G. Biotechnology pharmaceutical preparation—base and application[M]. Beijing chemical industry Publishing House, 2004: 270-271. (in Chinese)
- [5] 何 蕾, 王桂玲, 张 强. 紫杉醇纳米乳剂的体内外考察[J]. 药学报, 2003, 38(3): 227-230.
- He L, Wang G L, Zhang Q. Studies on hypersensitivity and pharmacokinetics of paclitaxel microemulsion[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2003, 38(3): 227-230. (in Chinese)
- [6] 李先红, 刘榛榛. 醋酸泼尼松龙纳米乳的制备[J]. 海峡药, 2006, 18(1): 31-33.
- Li X H, Liu Z Z. Preparation of Prednisolone Acetate Nanoemulsion[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2006, 18(1): 31-33. (in Chinese)
- [7] 龚明涛, 张钧寿, 戴晓鸣, 等. 羟喜树碱纳米乳在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(4): 324-327.
- Gong M T, Zhang J S, Dai X M, et al. Pharmacokinetics of Hydroxycamptothecin Microemulsions in rats[J]. Journal of China Pharmaceutical university, 2004, 35(4): 324-327. (in Chinese)
- [8] 杨青艳, 吴道澄, 吴 红, 等. 氟尿嘧啶纳米乳剂的制备与性质[J]. 解放军药, 2005, 21(3): 170-173.
- Yang Q Y, Wu D C, Wu H, et al. The Preparation and Characteristics of Fluorouracil Nanoemulsion [J]. Phaym J Chin PLA, 2005, 21(3): 170-173. (in Chinese)
- [9] Suchat W, Nigel M D, Thomas R, et al. Preparation of biodegradable insulin nanocapsules from biocompatible microemulsions [J]. Pharm Res, 2000, 6: 684-689.
- [10] 黄仁杰. 低毒药用微乳的研制[J]. 海峡药, 2003, 15(6): 19-21.
- Huang R J. The Preparation of Micro-emulsions of low toxicity drug [J]. Strait Pharmaceutical, 2003, 15(6): 19-21. (in Chinese)
- [11] Schechter R S, Bourrel M. Micro-emulsions and related systems [M]. New York: Marcel Dekker, 1998.
- [12] Lawrence M J. Surfactant system; Microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery [J]. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 1994, 19: 257.
- [13] 王晓黎, 蒋雪涛, 刘皋林, 等. 环孢素 A 微乳口服液的制备及稳定性研究[J]. 中国现代应用药理学杂志, 2004, 21(2): 40-43.
- Wang X L, Jiang X T, Liu G L, et al. The preparation and stability of cyclosporine A microemulsion oral solution [J]. Chin J Med, 2004, 21(2): 40-43. (in Chinese)
- [14] 叶海英, 张忠义, 高 申, 等. 法莫替丁微乳的研制及其质量评价[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(1): 68-70.
- Ye H Y, Zhang Z Y, Gao S, et al. Preparation of famotidine microemulsion and its quality evaluation [J]. First Mil Med Univ, 2003, 23(1): 68-70. (in Chinese)
- [15] 何月英, 宁玲忠, 曾德年, 等. 二甲脂和富马酸抗菌药对常见病原菌的作用效果试验[J]. 湖南畜牧兽医, 2005, (2): 4-6.
- He Y Y, Ning L Z, Zeng D N, et al. The effect of antibiotic drugs of dimethyl ester and fumaric acid on familiar pathogenic bacteria [J]. Animal & Veterinary Sciences of Hunan, 2005, (2): 4-6. (in Chinese)
- [16] Prince L M. Microemulsions theory and practice [M]. New York: Academic Press, 1977: 83-88.