

网络出版时间:2013-06-20 15:26

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130620.1526.002.html>

头孢克肟纳米乳的制备及其体外抑菌活性测定和安全性评价

郑星星, 欧阳五庆, 郭建军, 周莹, 宋冠男

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**制备头孢克肟纳米乳,考察其理化性质,并进行体外抑菌活性检测和安全性评价。**【方法】**利用伪三元相图法筛选头孢克肟纳米乳配方,制备头孢克肟纳米乳,用透射电镜、激光粒度分析仪对其进行形态和粒径分析;采用微量肉汤稀释法,检测头孢克肟纳米乳对致病性大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、无乳链球菌和不动杆菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌质量浓度(MBC),通过急性毒性试验考察其安全性。**【结果】**头孢克肟纳米乳中各组分的质量分数为:EL-40 27.1%、肉桂醛 6.8%、头孢克肟 2.0%、蒸馏水 64.1%。制备的头孢克肟纳米乳为浅黄色澄清透明液体,透射电镜下为规则圆球形,粒径分布在 6~20 nm,平均粒径为 12.1 nm,多分散系数(PDI)为 0.141,分散性良好。体外抑菌试验表明,头孢克肟纳米乳对致病性大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、无乳链球菌和不动杆菌的 MIC 分别为 1,4,4,2,8 $\mu\text{g/mL}$,MBC 分别为 2,8,8,4,16 $\mu\text{g/mL}$,抑菌效果明显优于其他对照药物。急性毒性试验表明,头孢克肟纳米乳的 LD_{50} 为 4 116 mg/kg,属于低毒药物,安全性良好。**【结论】**成功研制了头孢克肟纳米乳,体外抑菌效果明显,属于低毒药物,具有良好的安全性。

【关键词】 头孢克肟;纳米乳;伪三元相图;最小抑菌浓度;急性毒性试验

【中图分类号】 S859.5⁺3

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)07-0025-05

Preparation of cefixime nanoemulsion and determination of its bacteriostatic activity and acute toxicity *in vitro*

ZHENG Xing-xing, OUYANG Wu-qing, GUO Jian-jun, ZHOU Ying, SONG Guan-nan

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

Abstract: **【Objective】**Cefixime nanoemulsion was prepared and its quality and *in vitro* pharmacy and toxicity were evaluated. **【Method】**The preparation of the cefixime nanoemulsion was optimized by studying the pseudoternary phase diagram. Its configuration and particle size were measured by TEM and LPSA. Broth dilution method was used to determine the MIC and MBC of cefixime nanoemulsion on *Enteropathogenic E. coli*, cefixime nanoemulsion on *Enteropathogenic E. coli*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Streptococcus agalactiae* and *Acinetobacter*. Toxicity was also evaluated. **【Result】**The mass fractions of the components in cefixime nanoemulsion were EL-40 27.1%, cinnamaldehyde 6.8%, cefixime 2.0%, and distilled water 64.1%. The shape of cefixime nanoemulsion was spherical under TEM with an average diameter of 12.1 nm, and the polydispersity index(PDI) was 0.141. The susceptibility test revealed that MICs of ce-

【收稿日期】 2012-09-26

【基金项目】 陕西省重大科技创新专项(K332020916)

【作者简介】 郑星星(1987—),女,陕西榆林人,在读硕士,主要从事新兽药开发研究。E-mail:zhengxingxing119@sina.com

【通信作者】 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。

fixime nanoemulsion were 1,4,4,2, and 8 $\mu\text{g/mL}$, and MBCs were 2,8,8,4, and 16 $\mu\text{g/mL}$, better than control drug group. Its LD_{50} was 4 116 mg/kg. 【Conclusion】 Cefixime nanoemulsion was a clarity solution. The antibacterial effect of cefixime nanoemulsion on above bacteria *in vitro* was remarkable, and its toxicity was low.

Key words: cefixime; nanoemulsion; pseudoternary phase diagram; minimum inhibitory concentration; acute toxicity test

头孢克肟(Cefixime, CFM) 为第 3 代口服头孢菌素类抗生素, 由日本藤泽药品工业株式会社于 1987 年首次开发上市, 其特点是广谱高效, 血药浓度高而持久。CFM 对革兰氏阳性菌和阴性菌均有广谱抗菌作用, 特别是对革兰氏阳性菌中的链球菌属、肺炎球菌及革兰氏阴性菌中的淋球菌、黏膜炎布兰汉球菌、大肠杆菌、克雷伯菌属、沙雷菌属、变形杆菌属、流感菌属^[1] 抗菌效果明显。临床上, CFM 常用于敏感菌株引起的支气管炎、感染性支气管扩张、慢性呼吸器官疾病的继发感染及肾盂肾炎、膀胱炎、淋球菌性尿道炎、胆囊炎、胆管炎、猩红热、中耳炎等的治疗^[2], 目前主要的制剂有片剂、颗粒剂、胶囊剂等, 但由于头孢克肟不溶于水, 这些常规剂型使其临床应用效果受到一定影响。因此, 为了进一步提高 CFM 的生物利用度, 增强其疗效, 急需开发出一种新剂型。

纳米乳(Nanoemulsion)也称微乳(Microemulsion), 粒径一般为 1~100 nm, 是由油相、水相和表面活性剂按适当比例混合而成的一种透明或半透明的低黏度动力学和热力学稳定体系^[3]。纳米乳作为药物载体, 具有许多优点, 诸如提高难溶性药物的溶解度, 增强不稳定药物的稳定性, 黏度低、粒径小且均匀, 使被包容的药物分散度提高, 促进药物在体内的吸收, 提高药物生物利用度, 降低药物毒副作用等^[4]。本研究根据头孢克肟的理化性质将其制成纳米乳, 并检测了其体外抑菌效果和安全性, 旨在为头孢克肟纳米乳的制备及其在人医、兽医上的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和药品 CFM 原料药, 湖北恒硕化工有限公司生产, 纯度 99%; 肉桂醛, 武汉远成共创科技有限公司生产; 头孢氨苄胶囊, 国药准字 H23020936, 哈药集团制药总厂生产; 阿莫西林分散片, 国药准字 H20046510, 中诺药业有限公司生产; 三乙酸甘油酯, 国药集团化学试剂有限公司产品; 吐

温-80、聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH-40)、聚氧乙烯醚蓖麻油(EL-40), 天津市恒星化学试剂制造有限公司生产; 乙酸丁酯, AR 级, 西安化学试剂厂产品; 苏丹红Ⅲ, AR 级, 上海试剂三厂生产; 亚甲基蓝, 天津市福晨化学试剂厂生产; 二甲基亚砜(DMSO), 天津市天力化学试剂有限公司生产。

1.1.2 菌株 (1) 临床菌株。致病性大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、无乳链球菌和不动杆菌, 由西北农林科技大学动物医学院兽医微生物实验室提供。(2) 质控菌株。大肠埃希菌 ATCC25922, 购自中国药品生物制品检定所。

1.1.3 主要仪器 JEM-1230 型透射电子显微镜, 日本 JEOL 公司产品; Nicomp 388/Zeta PALS 激光粒度测定仪(Zetasizer Nano ZS 型), 英国 Malvern instrument 公司产品; DS224S 电子天平, 德国 Sartorius 公司生产; TGL 16B 型台式高速离心机, 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。

1.1.4 试验动物 昆明种小白鼠, 体质量 18~22 g/只, 由西安交通大学医学院实验动物中心提供。

1.2 CFM-NE 的配方筛选

1.2.1 油相的选择 由于 CFM 难溶于水, 因此将该药溶于油脂中, 作为油相部分。测量 CFM 在不同油相中的溶解度, 选择溶解度较大的作为油相, 供筛选的油相有乙酸丁酯、肉桂醛和三乙酸甘油酯。

1.2.2 表面活性剂的选择 在室温下, 选择 3 种常见的非离子型表面活性剂吐温-80、EL-40、RH-40, 分别与 1.2.1 节中筛选出的油相按质量比 9.8 : 0.2, 9.5 : 0.5, 9 : 1, 8.75 : 1.25, 8.5 : 1.5, 8 : 2, 7 : 3, 6 : 4, 5 : 5, 4 : 6, 3 : 7, 2 : 8, 1 : 9 混匀, 边搅拌边逐滴加入蒸馏水, 直至形成透明、澄清的乳液。记录当体系由黏稠突然变稀时的临界加水量, 并计算体系中各成分的质量分数。分别以表面活性剂、油相、水相作为相图的 3 个顶点, 利用 Origin Pro 8.0 软件绘制伪三元相图, 根据纳米乳区域面积的大小筛选最佳表面活性剂^[5-6]。

1.2.3 CFM-NE 的制备 根据 1.2.1 和 1.2.2 的

筛选结果,确定制备 CFM-NE 的配方。在室温条件下,将配方量的 CFM 溶于油中,再加入表面活性剂混合均匀,最后一边搅拌一边滴加适量的蒸馏水,即可制备出澄清透明的 CFM-NE。

1.3 CFM-NE 的类型鉴别

采用离心法^[7]鉴别所制备的 CFM-NE 是否为纳米乳,即将制备的乳液以 4 000 r/min 离心 20 min,观察是否分层、沉淀和透明,如不分层并维持透明,可判定该乳液为纳米乳。

采用染色法^[8]鉴别 CFM-NE 的类型。将水溶性的亚甲基蓝和油溶性苏丹红Ⅲ分别滴加到同批次的纳米乳中,观察 2 种染色剂在纳米乳中扩散速度的快慢。如果蓝色的扩散速度大于红色,则纳米乳为水包油(O/W)型,反之则为油包水(W/O)型。若二者速度相同,则为双连续型。

1.4 CFM-NE 的形态观察

参考文献^[9],用透射电镜检测 CFM-NE 的形态。取 CFM-NE 适量,用蒸馏水稀释 5 倍后,取 1 滴稀释液滴在覆有支持膜的铜网上,静置 10 min,再滴加质量分数 2% 的磷钨酸溶液于铜网上负染 5 min,自然晾干,在透射电镜下观察纳米乳液滴的形态,并拍照。

1.5 CFM-NE 的粒径分析

取 CFM-NE 适量,用蒸馏水稀释 5 倍,用激光粒度分析仪测定其粒径分布。

1.6 CFM-NE 体外抑菌活性的测定

采用美国国家临床实验标准委员会(NCCLS)制定的微量肉汤稀释法^[10],检测 CFM-NE 对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、无乳链球菌、不动杆菌的最小抑菌质量浓度(MIC)和最小杀菌质量浓度(MBC),试验设 CFM-NE 组、CFM 原料药组、阿莫西林分散片组和头孢氨苄胶囊组共 4 个处理。将各受试抗菌药物制成质量浓度为 2 560 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,然后倍比稀释为系列浓度梯度,使药物最终质量浓度为 128.0, 64.0, 32.0, ..., 0.5, 0.25 $\mu\text{g/mL}$,过滤除菌后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,用营养肉汤培养基培养各受试菌株,将生长后的菌液用生理盐水校正浓度至 0.5 麦氏比浊标准,再用营养肉汤培养基将菌液浓度稀释成 $10^5 \sim 10^6 \text{ mL}^{-1}$,备用。将 96 孔平底 U 型微量板在紫外灯下灭菌 30 min 后,在每排第 1 孔至第 10 孔,按照高浓度至低浓度分别加入受试药液各 100 μL ,分别吸取 100 μL 稀释好的菌液,加入第 1 至第 10 孔内。第 11 孔不加菌液而只加 200 μL 药液作为药物对照,

第 12 孔只加 200 μL 菌液作为菌液对照。将微孔板置微型振荡器上振荡 1 min,使各孔内溶液充分混合,然后将其置于培养箱内,35~37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16~20 h 后进行观察记录。

肉眼观察各孔,以无细菌生长药液的最低质量浓度为 MIC,将所有完全清晰无细菌生长孔的培养液分别接种于不含抗菌药物的营养肉汤琼脂平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,在菌落数不超过 5 个的平板中,最低药物质量浓度即为该药物的 MBC。本试验所用质控菌为大肠埃希菌 ATCC25922,美国国家临床实验标准化协会(CLSI,前身为 NCCLS)推荐的阿莫西林的 MIC 参考值为 1~8 $\mu\text{g/mL}$,只有当本试验的阿莫西林对质控菌的 MIC 值位于该范围,才可接受试验结果,否则该批数据作废,找出失败原因后重复试验。所有试验至少重复 3 次。

1.7 CFM-NE 急性毒性试验^[11-12]

1.7.1 预试验 随机选取少量小鼠,每个试验组 4 只,雌雄各半。按照 500, 1 500, 2 500, 3 500, 4 500, 5 500, 6 500, 7 500 mg/kg 的剂量给小鼠灌胃给药,连续 7 d 观察其死亡情况,确定引起小鼠零死亡的最大剂量(D_n)及 100% 死亡的最小剂量(D_m),以便决定分组的组数和正式试验的剂量。

1.7.2 正式试验 根据预试验的结果设计正式试验。将 70 只小鼠随机分成 7 组,每组 10 只,雌雄各半,相邻 2 组间的计量比 $r = \sqrt[a-1]{D_m/D_n}$ (其中 a 为分组数),计算各组小鼠的给药剂量,进行灌胃给药,连续 7 d,观察给药后小鼠的毒性反应,并记录小鼠的外观体征、食欲、行为活动、精神状态、分泌物、排泄物及死亡情况。用改良寇氏法计算 CFM-NE 的 LD_{50} 及 LD_{50} 的 95% 平均可信区间。

2 结果与分析

2.1 CFM-NE 配方的确定及制备

2.1.1 油相的确定 CFM 在乙酸丁酯、肉桂醛、三乙酸甘油酯中的溶解度分别为 0.15, 0.22, 0.08 g/mL,为了提高载药量,最终确定的油相为肉桂醛。

2.1.2 表面活性剂的确定 由图 1 可以看出,3 种表面活性剂形成的纳米乳区域大小顺序表现为 EL-40>RH-40>吐温-80。故选择 EL-40 作为本体系的表面活性剂。

2.1.3 CFM-NE 配方的确定 经过以上筛选最后确定 CFM-NE 中各组分的质量分数分别为:EL-40 27.1%,肉桂醛 6.8%,CFM 2.0%,蒸馏水 64.1%。

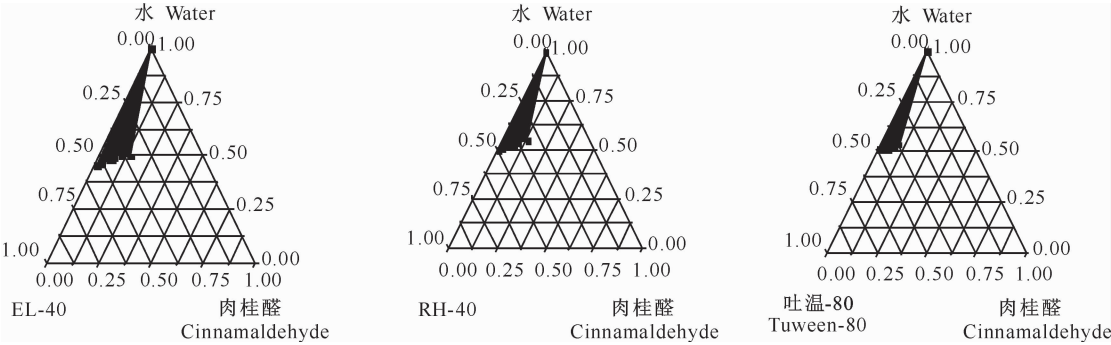


图 1 不同表面活性剂对 CFM-NE 形成区域的影响

图中阴影部分即为纳米乳区

Fig. 1 Effect of surfactants on CFM-NE region

The shaded area is nanoemulsion region

2.2 CFM-NE 的类型鉴别

CFM-NE 经离心后仍保持澄清透明,无分层、絮凝等现象,判定该乳液为纳米乳;通过染色发现,亚甲基蓝在纳米乳中的扩散速度大于苏丹红Ⅲ,说明 CFM-NE 为 O/W 型。

2.3 CFM-NE 的形态观察

在透射电镜下,CFM-NE 呈规则圆球形,分布均匀,无粘连,分散性良好(图 2)。

2.4 CFM-NE 的粒径分析

CFM-NE 的粒径为 6~20 nm,平均粒径为 12.1 nm,多分散系数(PDI)为 0.141。可见 CFM-NE 的粒径分布范围较窄,纳米颗粒大小比较均匀(图 3)。



图 2 CFM-NE 的透射电镜观察(×70 000)

Fig. 2 Transmission electron micrograph of CFM-NE(×70 000)

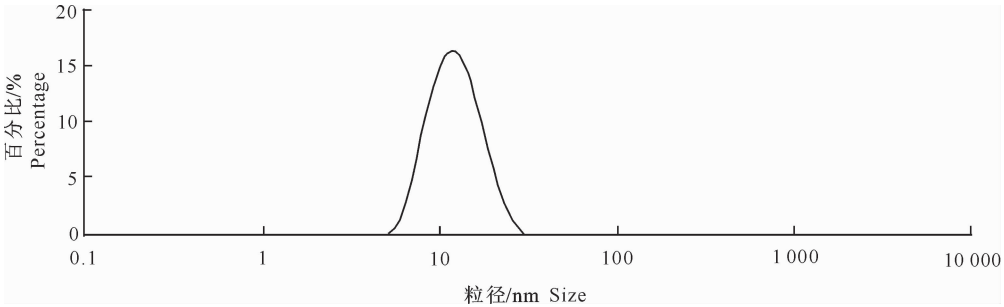


图 3 CFM-NE 的粒径分布

Fig. 3 The distribution of particle diameter of CFM-NE

2.5 CFM-NE 的体外抑菌活性

试验中发现,质控菌株结果稳定,阿莫西林对质控菌株的 MIC 值在 CLSI 规定的标准范围内,而且菌液对照孔中菌株生长状况良好,说明此次试验结果准确,数据可靠。从表 1 可以看出,CFM-NE 的体外抑菌效果明显优于 CFM 原料药、阿莫西林分散片和头孢氨苄胶囊,值得在临床上进行推广应用。

2.6 CFM-NE 急性毒性试验

预试验测得 CFM-NE 的 D_n 为 2 100 mg/kg, D_m 为 6 900 mg/kg,计算得计量比 r 约为 1.22。由上述预试验设计的正式试验结果见表 2,经计算得出 CFM-NE 的 LD_{50} 为 4 116 mg/kg, LD_{50} 的 95%平均可信区间为 3 641~4 653 mg/kg。根据世界卫生组织(WHO)颁布的化学物质急性毒性分级标准,判定该纳米乳属低毒范围(500~5 000 mg/kg)^[13]。

表 1 CFM-NE 体外抑菌试验结果

Table 1 Bacteriostatic effects of CFM-NE

μg/mL

细菌 Bacterium	CFM-NE		CFM 原料药 CFM material drug		阿莫西林分散片 Amoxicillin dispersible tablets		头孢氨苄胶囊 Cefalexin capsules	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
致病性大肠埃希菌 <i>Enteropathogenic E. coli</i>	1	2	2	4	8	16	8	16
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i>	4	8	8	16	32	64	16	32
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	4	8	8	16	16	32	32	64
无乳链球菌 <i>Streptococcus agalactiae</i>	2	4	4	8	8	16	16	32
不动杆菌 <i>Acinetobacter</i>	8	16	16	32	64	128	64	128
大肠埃希菌 ATCC25922 <i>E. coli</i> ATCC25922	0.25	1	0.5	1	2	4	4	8

表 2 CFM-NE 的急性毒性试验结果

Table 2 The acute toxicity of CFM-NE

分组 Groups	剂量/(mg·kg ⁻¹) Dose	供试小鼠数 Number of mice	死亡小鼠数 Number of mortality	死亡率/% Mortality ration
1	2 100	10	0	0
2	2 562	10	1	10
3	3 126	10	2	20
4	3 814	10	4	40
5	4 653	10	6	60
6	5 677	10	8	80
7	6 900	10	10	100

3 讨 论

纳米乳通常是由水相、油相和表面活性剂在一定条件下按一定比例组成的分散体系,其外观澄清透明。亲水-亲油平衡值(HLB)是设计纳米乳配方时选择油相和表面活性剂的主要依据,HLB 为 8~18 时易形成 O/W 型纳米乳^[14]。纳米乳作为药物载体,其配方设计要求非常严格,不仅要求能够在较大配方范围内形成稳定的纳米乳,而且要符合纳米乳作为药物载体的特殊要求,如无毒、无刺激、无不良作用,具有良好的生物相容性等。同时,要求纳米乳既能够增加药物的溶解能力,又不能影响药物的药效和稳定性。为了提高药物在油相中的溶解度,增大纳米乳形成区域,应尽可能选择溶解度大且无毒无刺激的短链油相。试验通过筛选发现,CFM 在肉桂醛中的溶解度最大。在选择表面活性剂时,通过绘制伪三元相图发现,EL-40 作为表面活性剂时形成的纳米乳区最大。经过筛选,确定 CFM-NE 各组分的质量分数为:EL-40 27.1%、肉桂醛 6.8%、头孢克肟 2.0%、蒸馏水 64.1%。

本研究成功地研制了 CFM-NE,并对其进行了理化性质的考察和体外抑菌活性测定及安全性评价。CFM 为第 3 代口服头孢类抗生素,其抗菌谱超广且作用强。本研究制备的 CFM-NE 粒径小,其抗

菌活性明显优于其他对照药物;急性毒性试验表明,CFM-NE 的 LD₅₀ 为 4 116 mg/kg,属于低毒药物,安全性良好。这主要是由于纳米乳作为口服药物载体时,可以减少药物在胃肠道的酶解,口服后药物可经淋巴管吸收,避免了肝脏的首过效应,还可克服多肽、蛋白质等生物大分子药物通过胃肠道上皮细胞膜时的障碍,促进药物吸收,因而提高了药物抗菌效果,但其具体机理还有待进一步研究验证。

[参考文献]

[1] 张明发,季珉.国内对头孢克肟的临床研究与评价[J].抗感染药学,2010,7(1):1-9.
Zhang M F, Ji M. Evaluation and clinical application of Cefixime in China [J]. Anti Infect Pharm, 2010, 7 (1): 1-9. (in Chinese)

[2] 闫志刚,白树华,陈振阳,等.头孢克肟的临床抗感染研究[J].中国临床药理学杂志,2001,17(2):150-153.
Yan Z G, Bai S H, Chen Z Y, et al. Advances of Cefixime in the infection disease [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2001, 17(2): 150-153. (in Chinese)

[3] 奉建芳.我国纳米给药系统的研究与应用[J].中南药学,2004,2(1):29-33.
Feng J F. The research and application of our country nanoparticle drug delivery system [J]. Central South Pharmacy, 2004, 2(1): 29-33. (in Chinese)