

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2011.04.003

非离子表面活性剂囊泡作为头孢匹胺钠药物载体的研究

张 波¹ 王慧云² 全先高²(¹ 济宁医学院基础医学与法医学院, 山东 济宁 272067; ² 济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

摘 要 **目的** 研究非离子表面活性剂囊泡对头孢匹胺钠的包封率及其释放行为的影响, 为新型药物传输系统的研究提供一定的依据。**方法** 以司盘 60 和胆固醇为主要原料, 通过薄膜分散法制备了非离子表面活性剂囊泡, 研究了该类囊泡对头孢匹胺钠的包封作用, 包封率的影响因素以及被包封的头孢匹胺钠在模拟胃液及模拟肠液中的释放情况。**结果** 0.10mol/L 司盘 60 : 胆固醇 = 4:3 时形成的非离子表面活性剂囊泡对 1.0mg/ml 的头孢匹胺钠的包封率是 88%; 药物释放实验显示, 在模拟胃液和模拟肠液中游离的头孢匹胺钠释放率为 96%, 包封于囊泡中的头孢匹胺钠的释放率为 25%。**结论** 非离子表面活性剂囊泡对头孢匹胺钠具有较高的包封率及明显缓释作用。

关键词 非离子表面活性剂囊泡; 头孢匹胺钠; 包封率

中图分类号: R943 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2011)08-236-05

Studies on niosomes as drug carrier of Cefpiramide Sodium for Injection

ZHANG Bo, WANG Hui-yun, QUAN Xian-gao

(Academy of Basic and Forensic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To investigate the entrapment efficiency and the release rate of Cefpiramide Sodium for Injection capsulated into niosomes, and provide the guidance for the study of the new drug delivery system. **Methods** Niosomes were prepared with nonion surfactant span60 and cholesterol by ultrasonication. And we measured the entrapment efficiency of Cefpiramide Sodium for Injection encapsulated into niosomes and release profiles in simulated gastric and intestinal fluid. **Results** The results showed that the entrapment efficiency of Cefpiramide Sodium for Injection by niosomes reached 88 % under the condition that the molar ratio of the span40:cholesterol equaled to 4:3 and the concentration of Cefpiramide Sodium for Injection was 1.0mg/ml. In simulated gastric and intestinal fluid the release rate of Cefpiramide Sodium for Injection entrapped in niosomes was 25 % after 6h, however the release rate of free Cefpiramide Sodium for Injection was 96 % under the same condition. **Conclusion** The entrapment efficiency of Cefpiramide Sodium for Injection entrapped by niosomes was high enough and the release rate of the entrapped drug was slow obviously.

Key words: Nonionic surfactant vesicles; Cefpiramide Sodium for Injection; encapsulation efficiency

非离子表面活性剂囊泡(英文名为 Nonionic surfactant based vesicles, 简称 niosomes)。它是以各种非离子表面活性剂为载体材料, 通过自身闭合形成的双分子层微型或多室囊泡状载体, 具有良好的生物相容性和可降解性。利用非离子表面活性剂囊泡包裹药物可以减少药物在达到有效部位前被破坏^[1]、延长药物的半衰期^[2]、从而延长药物的作用时间以及降低毒副作用, 改变药物在体内的分布, 达到被动靶向作用等, 在加入适当特殊辅料后也可以达到主动靶向的作用。与脂质体相比, 非

离子表面活性剂囊泡的载体材料不含磷脂, 避免了磷脂的氧化降解, 生产和贮存皆不需特殊条件, 可使工艺简化、成本降低, 是一种极有希望的新型药物载体。囊泡包封技术已经成为化学、药学和生命科学领域中的热点课题之一^[3-7]。

头孢匹胺钠(Cefpiramide Sodium for Injection, 简称 cPMS)为半合成的第四代头孢菌素类抗生素, 具有广谱抗革兰氏阳性菌和阴性菌的作用。作用机制为与青霉素结合蛋白(PBP)有很强的亲和性, 抑制细菌细胞壁的合成, 从而发挥杀菌作用。

在临床上广泛应用于呼吸道感染、妇科感染等多种细菌感染。由于其水溶性强,难以穿透细胞膜,不能在细胞内聚集,造成胞内药物浓度较低,细菌等对药物不够敏感,治疗细胞内细菌感染效果不佳。而囊泡其生物相容性好;作为载体将药物包封后,可改善药物的理化性质,降低刺激性;同时,囊泡与细胞膜有较好的亲和作用,可以成功地将药物送达细胞内部,从而提高药物的生物利用度和靶向性^[8]。

1 实验部分

1.1 仪器

UV-2501 双光束紫外可见分光光度计(日本岛津制作所);Zeta-Sizer 粒度仪(英国 Malvern 公司);RE-52AA 旋转蒸发仪(上海嘉鹏科技有限公司);实验室 PH 计(上海雷磁有限公司 PHSJ-4A 型);KQ-500 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);智能溶出试验仪(天津大学无线电厂 ZRS-8G);透析袋(8000~14000,北京索莱宝科技有限公司);电子天平(BS224S 北京赛多利斯仪器有限公司)。

1.2 试剂

司盘 20、40、60、80(AR,天津市科密欧化学试剂有限公司),胆固醇(生化试剂,天津市大茂化学试剂厂),三氯甲烷(AR,烟台三和化学试剂有限公司),无水乙醇(AR,天津市凯通化学试剂有限公司),头孢匹胺钠标准品(山东鲁抗医药股份有限公司),头孢匹胺钠原料药(山东鲁抗医药股份有限公司),其余试剂均为化学纯。

1.3 贮备液

0.10 mol/L 司盘贮备液:司盘 20、40、60、80(溶剂:乙醇/氯仿体积比 1:4);0.10 mol/L 胆固醇溶液(溶剂与司盘系列相同);PBS 缓冲溶液:800 ml 去离子水中溶解 8.0g NaCl,0.2g KCl,1.4g Na_2HPO_4 ,0.4g KH_2PO_4 ,用 0.10 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 7.4,再加水定容至 1000 ml;模拟肠流体:称取 6.8g KH_2PO_4 ,加入 250 ml 水溶解,再加入 190 ml 0.2 mol/L NaOH 和 400 ml 水,用 0.2 mol/L NaOH 或 HCl 调节 pH 至 7.5,稀释为 1 L;模拟胃流体:将 0.2 g/L 的 NaOH 溶液用 HCl 调节 pH 至 1.2。

1.4 实验方法

1.4.1 标准曲线的绘制 精密称取头孢匹胺钠对照品 2.0mg,用蒸馏水配成浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液;

用蒸馏水作为空白对照,在 200~400nm 范围内进行扫描。结果显示头孢匹胺钠在 272.4nm 波长处有一稳定的吸收峰,故选定 272.4nm 为测定波长。结果见图 1。

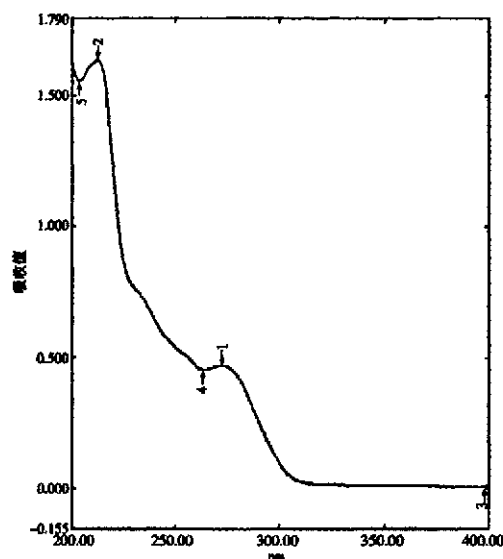


图 1 头孢匹胺钠光谱扫描图

线性关系考察:精密称取头孢匹胺钠对照品约 50 mg,置 100 ml 量瓶中,用蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取此溶液 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 ml,分别置 100 ml 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀即得每 1.0 ml 含头孢匹胺钠 10、15、20、25、30 μg 的标准溶液,以蒸馏水为空白在 272.4 nm 处测定吸光度。结果见图 2。由图 2 可见,在测定浓度范围内,头孢匹胺钠溶液的吸光度与浓度间存在良好的线性关系。以 A 对浓度 C 回归得回归方程 $A=0.00712 C-0.00509$, $r=0.99923$,

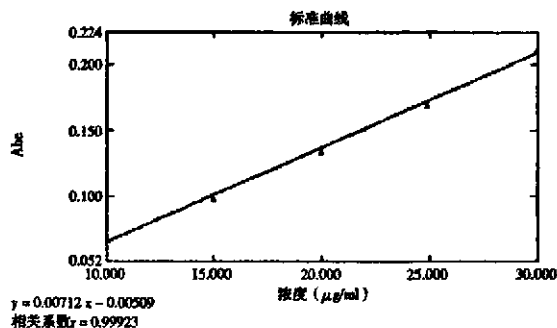


图 2 头孢匹胺钠标准曲线图

1.4.2 囊泡的制备 向 100ml 圆底烧瓶中加入不同比例的 0.10mol/L 司盘 20,司盘 40,司盘 60,司盘 80 和 0.10mol/L 胆固醇各 4.0ml,然后用旋转蒸发仪于 40~50 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发有机溶剂,再加入 5.0ml 蒸馏水或 5.0ml 一定浓度的头孢匹胺钠溶液,超声 30min 后,即制得空白囊泡或载药囊泡溶

液。然后取 2ml 上述溶液于透析袋中,在 100ml pH = 7.4 的 PBS 缓冲液中透析 24h。取一定量的透析液,于紫外可见分光光度计上在 272.4nm 处测定吸光度,扣除空白囊泡的吸收即可算得包封率。

$$EE\% = (C_{总} - C_{游离}) / C_{总} \times 100\%$$

1.4.3 囊泡的体外释放 量取制备好的包裹有药物的囊泡溶液 2.0ml,放入透析袋中,同时另取 2.0ml 相同浓度的头孢匹胺钠的游离药物溶液放入另一个透析袋中,将装有囊泡或药物的透析袋放入装有模拟胃液或模拟肠液的智能溶出仪中,设定温度为 37℃,转速为 50r/min,模拟体内环境进行药物缓释性实验。每小时取 1 次样,于紫外可见分光光度计上在 272.4nm 处测量吸光度,可算得释药情况。

1.4.4 囊泡粒径 囊泡的粒径大小及粒度分布用 Zeta-Sizer 粒度仪测定。

2 结果和讨论

2.1 头孢匹胺钠囊泡包封率的研究

2.1.1 表面活性剂的影响 取 0.10mol/L 的表面活性剂溶液 4.0 ml、0.10 mol/L 胆固醇溶液 4.0 ml,40~50℃ 水浴真空蒸干有机溶剂,加入 1.00 g/L 头孢匹胺钠溶液 5.0 ml,30℃ 超声 30min,取 2.0 ml 超声液于 100ml PBS 缓冲溶液中透析 24 h,结果见表 2。由表 2 可见,由司盘 60 和胆固醇构成的囊泡对头孢匹胺钠的包封效果较好。

表 2 司盘种类对包封率的影响表

司盘种类	司盘 20	司盘 40	司盘 60	司盘 80
包封率%	0.861	0.816	0.905	0.866

2.1.2 司盘 60 浓度的影响 取 4.0 ml 不同浓度的司盘 60 溶液、0.10 mol/L 胆固醇溶液 4.0 ml,40~50℃ 水浴真空蒸干有机溶剂,加入 1.00 g/L 头孢匹胺钠溶液 5.0 ml,30℃ 超声 30min,取 2.0 ml 超声液于 100ml PBS 缓冲溶液中透析 24 h,结果见图 4。当司盘 60 浓度为 0.10mol/L 时包封率最高。原因是在制备囊泡的过程中加入胆固醇一般可提高膜的稳定性,降低药物的通透性,提高包封率与载药量。当膜的流动性太强时囊泡不能形成,加入胆固醇可使膜的流动性降低,刚性增强,有利于囊泡的形成。

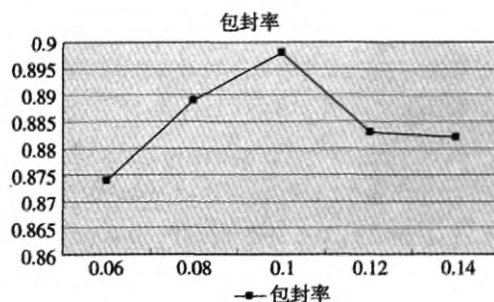


图 3 司盘 60 浓度的影响图

2.1.3 胆固醇用量的影响 胆固醇(CHOL)是常用的膜添加剂,可增加膜的稳定性,降低渗透性,提高包封率。我们采用固定司盘 60 用量为 4.0 ml,考察胆固醇用量对 5.0 ml 1.00 g/L 头孢匹胺钠包封率的影响,结果见图 4。由图 4 可知,当司盘 60 : CHOL=4 : 3 时,包封效率较高。

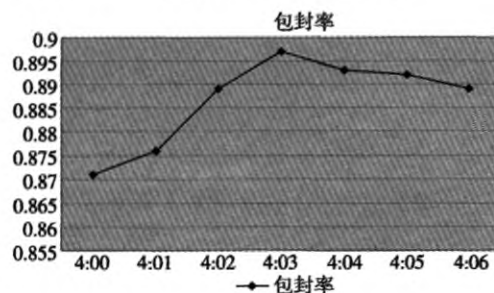


图 4 胆固醇用量的影响图

2.1.4 药物浓度的影响 固定类脂的用量(0.10 mol/L 司盘 60 4.0ml 和 0.10 mol/L CHOL 4.0 ml),考察药物浓度对囊泡包封率的影响,结果见图 6,当头孢匹胺钠的浓度为 0.8g/L 时的包封率最高,浓度较低时包封率随头孢匹胺钠浓度增加而上升,当浓度足够高时包封率又开始下降。这是因为在低浓度时,囊泡捕获药物分子的概率较小,因此随着药物浓度的增加,囊泡捕获药物分子的概率也增加,包封率随之增加。但是在同样的条件下产生的囊泡的数目是一定的,它对药物分子的包封能力也是一定的,所以随着药物浓度的继续增加,包封率反而下降。

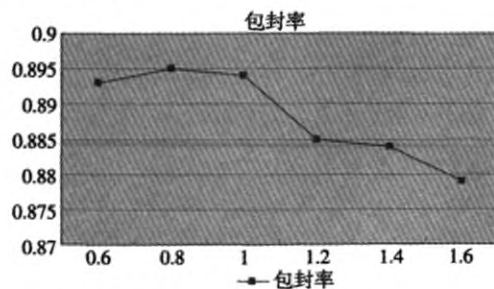


图 5 药物浓度的影响图

2.1.5 超声时间的影响 取 0.10 mol/L 司盘 60 4.0 ml 和 0.10mol/L CHOL 4.0ml, 40~50℃ 水浴真空抽干有机溶剂, 加入 5.0 ml 1.00 g/L 头孢匹胺钠, 30℃ 超声, 考察超声时间在 20~60min 范围内对头孢匹胺钠包封率的影响, 结果见图 7。由图 7 可知, 超声时间在 30min 左右时, 包封率较高。超声有利于药物的包封, 但超声时间过长会打碎一些比较大的多室囊泡, 使得包容药物的体积减小, 同时囊泡打碎的过程中也有一些药物释放出来, 造成包封率下降。

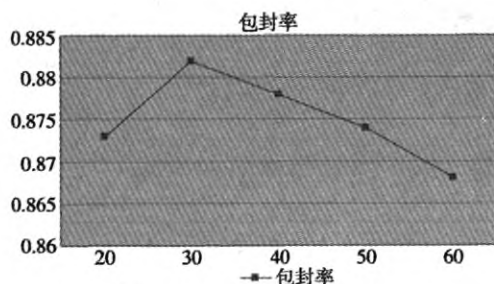


图 6 超声时间的影响图

2.1.6 超声温度的影响 固定超声时间为 30min, 考察超声温度在 20~60℃ 范围内对头孢匹胺钠包封率的影响, 结果见图 8。实验表明, 超声温度在 30~40℃ 时, 包封率较高。在一定范围内, 随温度升高, 包封率呈上升趋势, 当超声温度在 30~40℃ 时, 药物可获得较高包封率。温度过高时, 囊泡结构被破坏, 包封率反而下降。

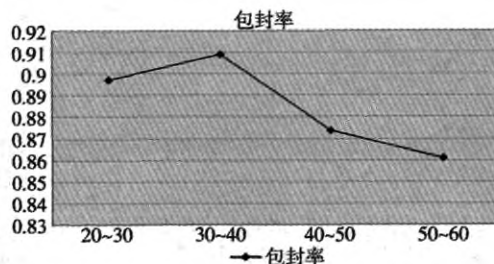


图 7 超声温度的影响图

2.2 囊泡的体外释放

量取制备好的包裹有药物的囊泡溶液 2.0ml, 放入透析袋中, 同时另取 2.0ml 相同浓度的头孢匹胺钠的游离药物溶液放入另一个透析袋中, 将装有囊泡或药物的透析袋放入装有模拟胃液或模拟肠液的智能溶出仪中, 设定温度为 37℃, 转速为 50r/min, 模拟体内环境进行药物缓释性实验。每小时取 1 次样, 于紫外可见分光光度计上在 272.4nm 处测量吸光度, 可算得释药情况。见图

8、9。在体外释放的研究中, 囊泡中包裹的药物远比游离的药物释放速度慢。

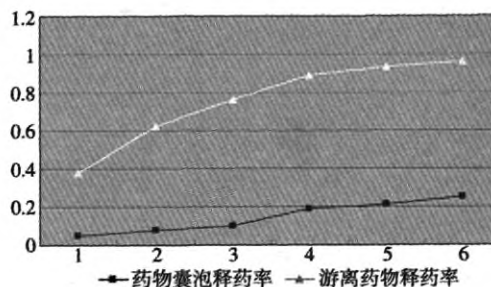


图 8 模拟胃液中释药情况图

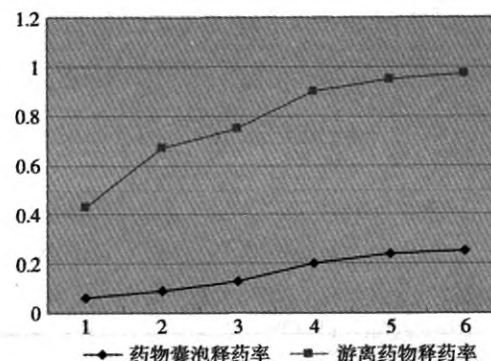


图 9 模拟肠液中释药情况图

2.3 囊泡的粒度检测

用 Zeta-Sizer 分析仪检测囊泡的粒度, 囊泡颗粒的直径主要分布于 222nm~252nm 之间, 平均粒径为 235nm (见图 10), 粒径大小符合要求, 适合进一步的研究^[9]。

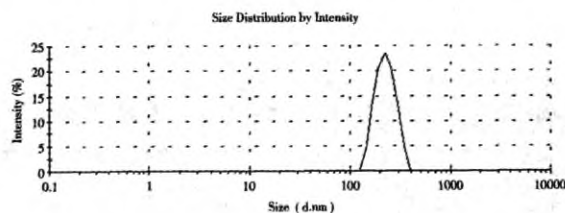


图 10 囊泡颗粒直径分布图

3 结论

以司盘类非离子表面活性剂和胆固醇为主要原料, 采用薄膜分散法制备抗炎药物头孢匹胺钠类脂囊泡, 以包封率为考察指标, 确定了较优处方和制备工艺条件, 包载于非离子表面活性剂囊泡体系中的头孢匹胺钠具有较为缓慢的释放速率, 可以明显延长药物的作用时间。囊泡粒径大小符合要求, 适合进一步的研究。

(下转第 242 页)

由表 5 可以看出高脂饲料组与对照组相比 CPT1mRNA 相对表达量明显降低。

表 5 长期高脂饲料喂养对小鼠肝脏和骨骼肌 CPT1mRNA 相对表达量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	肝脏 CPT1	骨骼肌 CPT1
对照组	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.05
高脂饲料组	0.38 $\pm$ 0.08	0.38 $\pm$ 0.02
<i>t</i>	10.1	19.94
<i>P</i>	<0.01	<0.01

3 讨论

肥胖、脂代谢紊乱和胰岛素抵抗密切相关,当今社会由于膳食结构不合理,高糖高脂食物摄入过多,从而导致血脂异常现象,如高胆固醇、高甘油三酯、高游离脂肪酸。长期研究发现脂代谢紊乱和胰岛素抵抗互为因果,是一系列代谢相关疾病产生的重要原因^[1]。

本研究中,采用高脂饮食喂养致脂代谢紊乱的肥胖模型。实验中通过观察动物体重的变化发现,高脂饲料组小鼠体重明显高于对照组,表明肥胖模型已经形成。高脂饲料组小鼠的脂体系数明显高于对照组,说明高脂饲料组小鼠体重的增加部分原因是脂肪组织在动物体内积聚的结果;高脂饲料组小鼠肝体系数与对照组相比虽无统计学差异,但在体重明显增加的同时也有增大,取材时发现高脂饲料组小鼠肝脏重量增加,肝脏组织 HE 染色显示高脂饲料喂养小鼠与对照组相比肝脏中脂肪含量增加,进一步证明了肝脏增大的原因是脂肪在肝脏积聚的结果。长期高脂饲料喂养形成肥胖模型后,高脂饲料组小鼠甘油三酯、总胆固醇、游离脂肪酸水

平均高于对照组,表明小鼠在形成肥胖的同时也出现了脂代谢的紊乱。体内脂肪代谢,是分解代谢和合成代谢综合作用的结果,涉及多基因表达的调控,其中 CPT1 是脂肪酸转运入线粒体进行氧化的关键酶^[3],高脂饲料组与对照组相比 CPT1mRNA 相对表达量明显降低,脂类物质氧化利用减少,可以部分的解释高脂饲料组体内脂类物质积聚的原因,其具体机制有待进一步研究。

肝脏是胰岛素产生作用的主要器官,脂类物质在肝脏的积聚是产生胰岛素抵抗的重要原因^[2-3],肥胖小鼠伴有葡萄糖耐量异常,呈胰岛素抵抗状态^[4],在本实验中高脂饲料组小鼠在葡萄糖耐量 AUC、餐后血糖值常均高于对照组,表明长期高脂饲料喂养的肥胖小鼠可能存在胰岛素抵抗。

通过本实验我们发现肥胖小鼠伴有脂代谢紊乱和糖耐量的异常,本模型可为高脂血症、肥胖及相关药物的研究提供稳定的实验模型。

参考文献:

- [1] 陈金仲,邵豪.脂代谢紊乱与胰岛素抵抗的相关研究进展[J].中国实用医学,2008,3(7):147-149.
- [2] Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acid β -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome[J]. PNAS, 2003, 100(6):15924-15929.
- [3] Bruce CR, Hoy AJ, Turner N, et al. Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance[J]. Diabetes, 2009, 58(3):550-558.
- [4] Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance[J]. J Clin Invest, 2000, 106:473-481.

(收稿日期 2011-07-03)

(上接第 239 页)

参考文献:

- [1] Sanyog Jain, Rakesh Kumar Sharma, S. P. Vyas. Chitosan nanoparticles encapsulated vesicular systems for oral immunization: p reparation, in-vitro and in-vivo characterization [J]. Journal of Pharmacy & Pharmacology, 2006, 58(3): 303-310.
- [2] Khaksa G, D'Souza R, Lewis S, et al. Pharmacokinetic study of Niosome encapsulated insulin[J]. Indian Journal Of Experimental Biology, 2000, 38(9):901-905.
- [3] 赵晓宇,李慧,张保献.新型药物载体非离子囊泡的制备和研究进展[J].国际药学研究杂志,2007,34(6):439-441.
- [4] Manconi M, Sinico C, Valenti D, et al. Niosomes as carriers

fort retinoin III. A study into the in vitro cutaneous delivery of resicle tretinoin[J]. Int J Pharm, 2006, 311(1):11-19.

- [5] 陆彬.作为载体系统的聚合物胶束和囊泡的研究[J].河南大学学报(医学版),2008,27(1):1-3.
- [6] Pardakhty A, Varshosaz J, Rouholamini A, et al. In vitro study of polyoxyet H       alkyl niosomes for delivery of insulin[J]. Int J Pharm, 2007, 328(2):130-132.
- [7] 时明.抗菌新药头孢匹胺的脂质体的研究[J].山东大学硕士学位论文,2009,11(25).
- [8] 陈璐,余锦芬.头孢匹胺钠与木糖醇注射液配伍的稳定性考察[J].中国药师,2007,3(22):832-833.
- [9] 袁悦,王红霞,刘岩,等.类脂囊泡作为 5-氟尿嘧啶药物载体的研究[J].分子科学学报,2010,12(6):420-423.

(收稿日期 2011-07-03)