

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.04.006

甲氨蝶呤/蒙脱土纳米插层化合物的制备及缓释作用研究^{*}

全先高 王慧云 丁林 孙珊珊 宋雪艳 徐娜

(济宁医学院药学院,山东日照 276826)

摘要 **目的** 制备甲氨蝶呤(MTX)/蒙脱土(MMT)插层体系,研究插层化合物的体外释放性能,为新型药物载体材料及新剂型的开发提供依据和指导。**方法** 以 MTX 为插层客体,MMT 为插层主体,采用溶液插层技术制备了 MTX/MMT 插层体系,采用傅立叶红外变换光谱仪,X 射线衍射分析仪,差示扫描量热仪等手段进行了表征;考察了初始药物浓度、反应时间,反应温度等因素对 MMT 载药量的影响,并通过在模拟胃肠液的体外释放实验来考察插层体系的释放规律和内在机理。**结果** 在初始浓度为 0.8800mmol/g,反应温度为 323K,反应时间为 4h 时插层体系载药量最大,体外释放试验表明在模拟胃液和模拟肠液中均具有明显的缓释效果,且在模拟胃液中释放速率明显低于模拟肠液。**结论** MTX/MMT 插层体系具有明显的缓释作用,且其释放行为受到释放介质 pH 的影响。

关键词 蒙脱土;甲氨蝶呤;插层化合物;缓释

中图分类号:TB332 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9760(2014)08-251-06

Preparation and sustained-release action of Methotrexate/Montmorillonite Intercalation system

QUAN Xian-gao, WANG Hui-yun, DING Lin, et al

(School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective In order to provide basis and guidance for the development of the new materials for the drug delivery system and new drug forms, the Methotrexate(MTX)/ Montmorillonite(MMT) intercalation system was prepared and its Release Properties in vitro were investigated. **Methods** The MTX/MMT system was prepared with MTX as intercalating object and MMT as intercalating subject by solution intercalation technique, and the product was characterized by infrared spectra(FTIR), the X-ray diffraction(XRD), and the Thermogravimetric Analyzer(TG). Moreover, the factors such as the initial drug concentration, reaction time and temperature which influence the drug loading of the Methotrexate/Montmorillonite composite were investigated. Furthermore, the rules and the internal mechanism of the slow release in vitro of the MTX/MMT intercalation system was studied through the simulation fluid of gastric and intestinal. **Results** The results showed that the drug loading was the largest under the optimal conditions of the initial concentration of drug 0.8800mmol/g, reaction temperature 323 K, reaction time 4h. The release results in vitro indicated that the sustained release behavior of Methotrexate/Montmorillonite composite was obviously observed in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid. Moreover, the release rate in simulated gastric juice was significantly lower than that of in the simulated intestinal juice. **Conclusion** MTX/MMT intercalation composite was the sustained release system, and release behavior was affected by the pH values of the release medium. And Montmorillonite as a kind of inorganic drug carrier material has a broad application prospects in developing new dosage forms of drug.

Key words: Montmorillonite; Methotrexate; Intercalation compound; Sustained-release

近年来,伴随着缓控释制剂、靶向制剂等新剂型的开发^[1-3],新型药物载体材料的应用研究也应运而生^[4-6],其中无机材料在新型药物传递系统中

的应用已成为重要的研究方向之一^[7-9]。蒙脱土(MMT)具有比表面积大,吸附能力强,化学稳定性好、低毒或无毒等特点,是一种潜在的优良药物载体材料。目前部分医药工作者已成功地将某些

^{*} [基金项目]济宁医学院立项项目(编号:JY2013KJ022)

抗炎类药物等嵌入到蒙脱土的层间,得到药物-蒙脱土纳米插层化合物,体外释放研究表明该类插层体系具有明显的缓释效应^[10-13]。甲氨蝶呤(MTX)是一种抗叶酸类抗肿瘤药,具有明显的毒副作用。为降低其不良反应,本文将利用 MTX 结构中的羧基和胺基,与 MMT 相互作用制备插层纳米复合物,从而使其达到缓释效果,减少给药剂量,相关的研究还少见报道。

1 材料和方法

1.1 材料

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);IR-21 红外分光光度计(日本岛津);差示扫描量热仪(北京恒久科学仪器厂);D/max-UltimaIII 型 X 射线衍射仪(日本理学公司);KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TB-215D 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);ZRS-8G 智能溶出试验仪(天津大学无线电厂);DZF-6020 型真空干燥器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);SHB-B 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。甲氨蝶呤原料药(北京亚希尔化工科技有限公司);甲氨蝶呤化学对照品(中国药品生物制品检定所);氢氧化钠(AR,莱阳经济技术开发区精细化工厂);磷酸二氢钾(AR,天津市广成化学试剂有限公司);蒙脱土(上海晶纯试剂有限公司);碳酸铵(AR,上海化学试剂总厂所属上海试剂四厂);盐酸(AR,莱阳经济技术开发区精细化工厂)

1.2 甲氨蝶呤标准曲线的绘制

1.2.1 储备液的制备 精密称取 MTX 5.0mg,加 0.5% 碳酸铵溶液 1ml 溶解后,加盐酸溶液(9→1000)稀释至 50ml,使之形成 100 μ g/ml 的溶液,备用(避光保存)。

1.2.2 甲氨蝶呤的稳定性 取上述储备液 5.00ml 置于 50ml 的容量瓶中,加入 0.1mol/L 的盐酸稀释至刻度,使其浓度为 10.00 μ g/ml,分别于 1、1.5、2、3、6、24h 测定吸光度。结果甲氨蝶呤吸光度保持稳定。

1.2.3 标准曲线的绘制 以溶剂为空白,用紫外-可见分光光谱仪在不同波长下测定 MTX 的吸光度,其在 306.5nm 有最大吸收。

精密量取 2.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00ml,储备液分别置于 50ml 容量瓶中,用

0.1mol/L 盐酸稀释至刻度,使其浓度分别为 4.00、8.00、12.00、16.00、20.00、24.00 μ g/ml,以 0.1mol/L 盐酸为空白,在 306.5nm 处测其吸光度。结果表明,在 4.0~24 μ g/ml 范围内吸光度与浓度之间具有良好的线性关系。回归方程为: $y=0.05132x+0.00008$, $R=0.9997$, $(n=6)$ 。标准曲线如图 1。

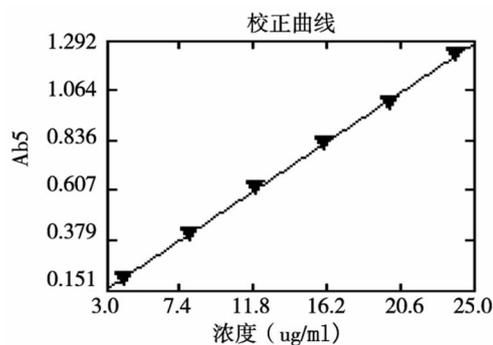


图 1 甲氨蝶呤的标准曲线

1.3 MTX/MMT 插层体系的制备

精密称取 0.0200g MMT 粉末,加入到 20ml 0.1mol/L 的盐酸溶液中,在室温下超声 1h,然后静置 2h。精确称取适量 MTX,溶于 20ml 盐酸溶液(0.1mol/L)中,将此溶液加到 MMT 悬浮液中,然后在 50 $^{\circ}$ C 条件下恒温超声持续反应 4 h。待反应结束后,在 3500rpm 下离心 30min,然后轻轻倒出上清液,用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤,用紫外-可见分光光谱仪测定其吸光度,离心管中沉淀取出于 60 $^{\circ}$ C 真空干燥,备用。

1.4 MMT 载药量的计算

MMT 中药物的质量 = MTX/MMT 沉淀的质量 - MMT 的质量 (1)

$$\text{MMT 载药量} = \frac{\text{MMT 中药物的质量}}{\text{MMT 的质量}} \times 100\% \quad (2)$$

1.5 MTX/MMT 插层体系的表征

1.5.1 XRD 表征 采用日本理学公司 D/max-UltimaIII 型 X 射线衍射仪,连续记谱扫描,Cu Ka 辐射($\lambda=0.154$ nm),后单色器,管电压 40kV,管电流 200mA,扫描范围:1.2 $^{\circ}$ ~10.0 $^{\circ}$,扫描速率 1.5 $^{\circ}$ /min。

1.5.2 红外光谱表征 采用红外分光光度计 IR-21(岛津制作所)测定纯 MMT,纯 MTX 和 MTX/MMT 插层体系的红外吸收图谱,采用 KBr 压片法,波长扫描范围 400~4000 cm^{-1} 。

1.5.3 热重分析 用差示扫描量热仪(北京恒久科学仪器厂)测定纯 MMT、纯 MTX、MMT 与 MTX 的简单混合物、MTX/MMT 插层体系的 DTA 曲线。测试条件:初始温度为 25℃,最后温度 900℃,升温速率为 20℃ / min。

1.6 缓释性能研究

精确称取 0.0100g MTX/MMT 产品(含有 0.0021g MTX)和 0.0021g MTX 原料药,分别置于两个透析袋中,加入 5.00ml 配置好的预热的释放液,密封后将透析袋放入装有释放液的智能溶出仪中,每个释放瓶中含有释放液 800ml,设定温度为 37℃,转速为 80r/min,在适当的时间间隔取样,每次取样 5.00ml,同时用已经预热的 5.00ml 释放介质补充。用紫外分光光度计测试所取释放液的吸光度,通过公式(3)计算累积释放量:

$$E = \frac{5 \sum_{i=1}^{n-1} C_i + 800C_n}{M_{drug} D} \times 100\% \quad (3)$$

其中:E 为 MTX 的累积释放量,C 为第 i 次置换时,释放液中药物浓度,μg/ml;n 为置换介质的次数;M 为起始 MTX/MMT 的质量,μg;D 为 MMT 载药量。

2 结果与讨论

2.1 药物初始浓度对载药量的影响

精密称取不同质量的 MTX 加入到反应体系中,反应温度为 50℃,反应时间为 4h,反应完成后离心,测定上清液的紫外吸光度,根据公式(2)计算不同初始药物浓度下 MMT 的载药量,绘制不同初始药物浓度对 MMT 载药量的影响曲线,如图 2。

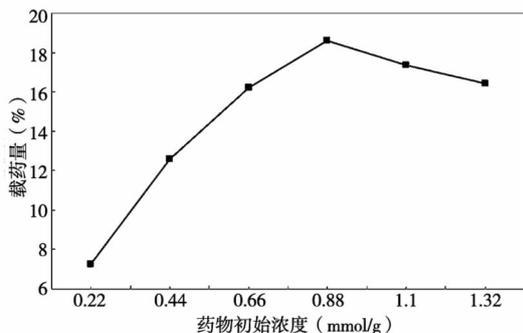


图 2 初始药物浓度对 MMT 载药量的影响曲线

由图 2 可以看出,在一定范围内,MMT 的载药量随着药物初始浓度的增加而增加,当初始浓度

达到 0.88 mmol/g 时载药量达到最大,而后出现了略微下降趋势。其原因是当药物浓度增加时,更多的药物离子通过离子交换反应进入 MMT 层间,从而使载药量增加,然而 MMT 上的载药位点是一定的,当这些载药位点接近饱和时,离子交换也就达到了平衡,载药量也就不再增加。随着药物初始浓度的继续增加,由于溶液中离子密度增加,其相互碰撞次数必然增加,致使载药位点上结合的离子数会略有下降,从而使载药量出现了稍微下降的趋势。因此采用药物初始浓度为 0.88mmol/g。

2.2 反应时间对药物载药量的影响

精确称取 0.0200gMTX,按上述实验步骤将其加到装有 MMT 悬浮液中,在 50℃ 恒温超声分别持续反应 0.5、1、2、4、6h,反应完毕后离心,测定上清液的紫外吸光度,根据公式(2)计算不同反应时间下 MMT 的载药量,绘制不同反应时间对 MMT 载药量的影响曲线,如图 3。

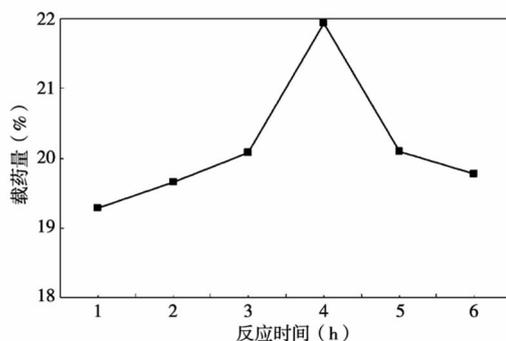


图 3 反应时间对载药量的影响曲线

由图 3 可以看出,随着反应时间的增加,MMT 载药量略有增加,在反应时间 4h 时载药量达到最大,反应时间继续增加则载药量降低,但是整体上反应时间对 MMT 载药量影响不大,主要原因:溶液插层法反应机制为离子交换,反应时间非常快,迅速达到了平衡。因此采用反应时间为 4h。

2.3 反应温度对药物载药量的影响

精确称取 0.0200gMTX,按上述实验步骤将其加到装有 MMT 悬浮液中,分别在 20、30、40、50、60、70、80℃ 恒温超声 4h,反应完毕后离心,测定上清液的紫外吸光度,根据公式(2)计算不同反应温度下 MMT 的载药量,绘制不同反应温度对 MMT 载药量的影响曲线,如图 4。

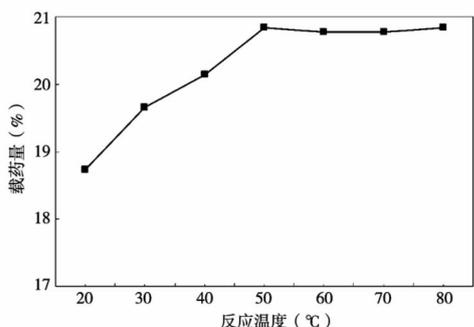


图4 不同反应温度对MMT载药量的影响曲线

由图4可以看出,随着反应温度的不断升高,MMT的载药量也不断增加,在50℃时MMT载药量达到最大,当温度继续升高时,MMT的载药量趋于稳定。其原因可能是MMT的层间距随着温度升高而不断增大,由于其空间效应,其容纳的药物离子也有所增加,但是由于蒙脱土单位晶胞结构由二层硅氧四面体中间夹一层铝(镁)氧(氢氧)八面体组成,因此当温度增加到一定程度后,其层间距也增大到一定值,随着温度的继续增加,可能会破坏其2:1三层结构,因此不能采用过高温。因此采用反应温度为50℃。

2.4 MTX/MMT插层体系的表征

2.4.1 XRD表征 图5为纯MMT和MTX/MMT插层体系的XRD图,图中MTX/MMT的d001峰与MMT的相比,发生了明显位移。衍射峰向小角度偏移,并且峰形变宽,变矮。根据Bragg方程^[14]: $\lambda = 2d\sin\theta$ 可以计算出MMT的层间距由原来的1.23nm增大到1.53nm。这说明MTX插入到MMT片层中,形成了插层结构。

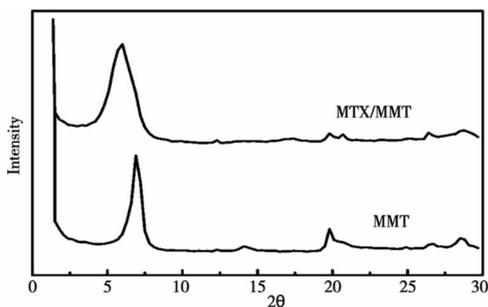


图5 纯MMT和MTX/MMT插层体系的XRD图

2.4.2 红外表征 图6为纯MTX(a),纯MMT(b)和MTX/MMT(c)插层体系的红外光谱图。从图6(a)可以看出,在1650cm⁻¹为MTX的羧基的伸缩振动,3375cm⁻¹为MTX中的一NH₂伸缩振动;图6(b),在3650cm⁻¹处的Al-O-H的伸缩振动,在1250~1000cm⁻¹处为Si-O-Si伸缩振

动,在400~600cm⁻¹为Si-O,Al-O弯曲振动吸收峰,在800cm⁻¹处为Al-Al-O伸缩振动,530cm⁻¹的Al-O-Si的伸缩振动。从图6(c)可知,插层体系中在1000~1250cm⁻¹,400~600cm⁻¹出现了MMT特征吸收峰,在1650cm⁻¹和3375cm⁻¹出现了甲氨蝶呤的特征峰。说明两者确实形成了插层结构,并且发生了某种化学键合。

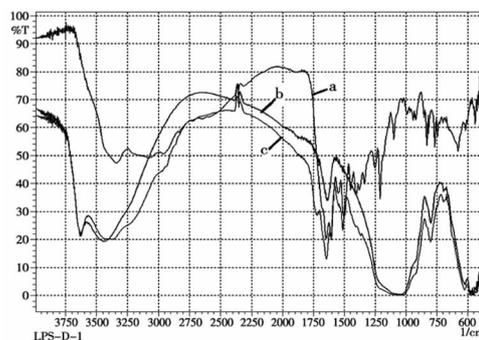
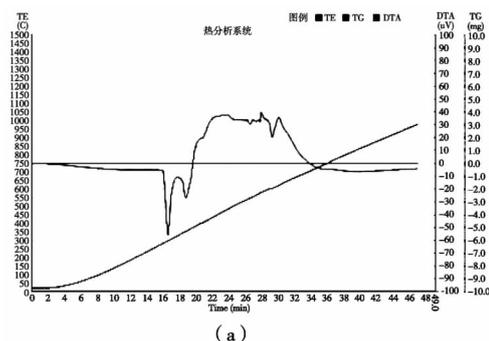
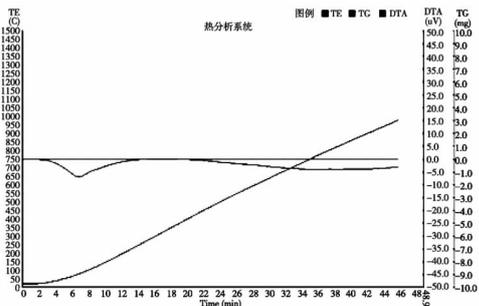


图6 纯甲氨蝶呤(a),纯蒙脱土(b)和甲氨蝶呤/蒙脱土插层体系(c)的红外光谱图

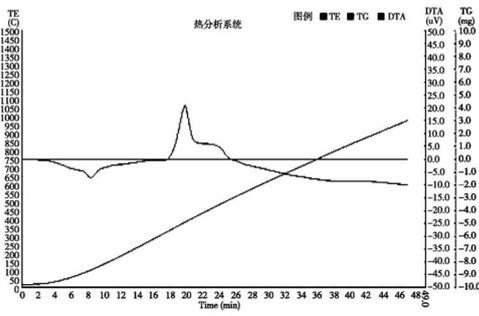
2.4.3 热重分析 如图7所示,为MTX(a),MMT(b),MTX/MMT插层体系(c)和MTX与MMT的简单混合物的DTA曲线。图7(a)显示在200℃左右MTX出现了一个吸热峰,应该为MTX的熔化吸热峰,400~600℃出现了燃烧放热峰;图7(b)显示在100℃左右MTX出现了一个小吸热峰,应该为MMT的脱水过程所致,而在600℃以上出现的热量变化,应该为蒙脱土受高温影响结构发生变化导致;图7(c)则显示在100℃左右出现了MMT脱水吸热峰,在400~600℃出现了放热峰,在600℃以上出现了轻微吸热峰,都说明MTX和MMT确实形成了插层结构,而图7(d)和(c)则有明显的区别,MTX与MMT的简单混合物在200℃左右出现了MTX的熔化吸热峰,而MTX/MMT插层体系则没有,说明两者确实不仅形成了插层结构,并且发生了某种化学键合。



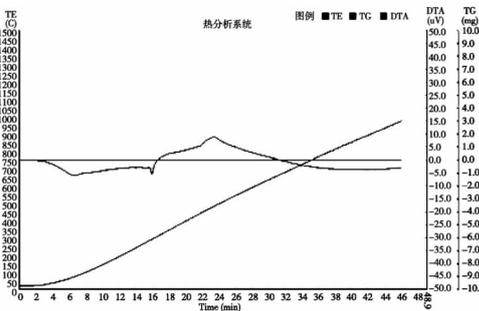
(a)



(b)



(c)



(d)

图 7 MTX(a), MMT(b), MTX/MMT 插层体系(c) 和 MTX 与 MMT 的简单混合物(d)的 DTA 曲线

2.5 插层体系的缓释性能研究

体外释放实验是研究了 MTX/MMT 插层体系在模拟胃液和模拟肠液中的释放行为。模拟胃液是采用稀盐酸溶液(PH=1.2),模拟肠液是磷酸盐缓冲溶液(PH=7.4),根据公式(3)计算累计释放量,绘制释放曲线如图 8,9 和 10。

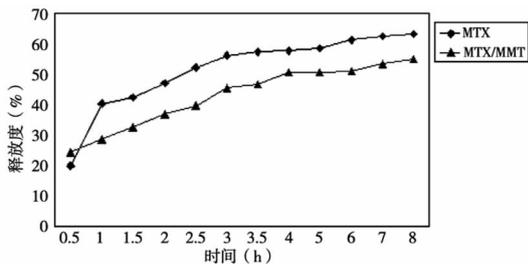


图 8 在模拟肠液中的释放曲线

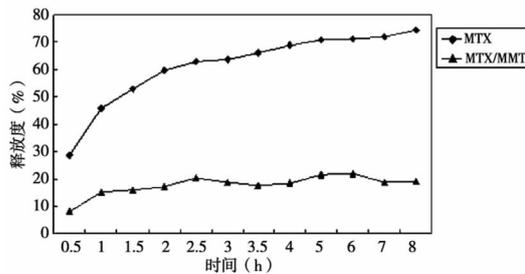


图 9 模拟胃液中的释放曲线

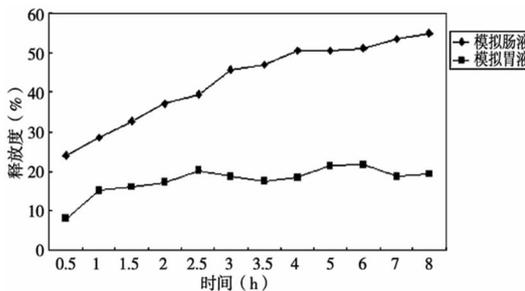


图 10 MTX/MMT 插层体系在模拟胃液和模拟肠液中的释放曲线

从图 8, 9 可以看出 MTX/MMT 插层体系在模拟肠液和模拟胃液中的释放度较游离药物低,说明 MTX/MMT 插层药物具有缓释作用;由图 10 可知,MTX/MMT 插层体系在模拟肠液比模拟胃液的释放度要高。原因可能因为 MTX/MMT 插层体系的释放可认为是由扩散和离子交换两种形式组成的释放行为。一方面,由于插层体系和释放介质中的 MTX 的浓度有差别,插入到 MMT 的 MTX 不断地从插层体系中扩散到释放介质。这个过程和释放介质中的 pH 值有较大关系,另一方面,插入到 MMT 的 MTX 与释放介质中阳离子,如 K^+ 和 Na^+ 等进行置换,这一过程与释放介质中阳离子浓度和强度以及层间 MTX 和 MMT 的结合力的强弱有关。

3 结论

1) 药物初始浓度对 MMT 载药量有很大影响,MMT 随着药物初始浓度的增大而大幅度增加,反应时间、反应温度对于 MMT 载药量的影响不是很显著,当初始药物浓度为 0.8800mmol/g,反应温度为 323K,反应时间为 4h 时插层体系载药量最大。

2) MTX/MMT 插层体系的释放机理为扩散和离子交换两种形式同时存在的释放行为。

3) MTX/MMT 插层体系在模拟肠液和模拟胃液中均具有明显的缓释作用; (下转第 259 页)

bility to Behcet's disease in a Chinese Han population[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(7):1325-1328.

[7] Figueroa Vega N, Alfonso Pérez M, Benedicto I, et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in hashimoto's thyroiditis[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(2):953-962.

[8] Torchinsky MB, Blander JM. T helper 17 cells; discovery, function, and physiological trigger[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(9):1407-1421.

[9] McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(3):314-324.

[10] Morrison PJ, Sarah J. Interleukin-23 and T helper 17-type responses in intestinal inflammation; from cytokines to T-cell plasticity[J]. *Immunology*, 2011, 133:397-408.

[11] Ferguson LR, Han DY, Fraser AG, et al. IL23R and IL12B

SNPs and haplotypes strongly associate with crohn's disease risk in a New Zeal and population[J]. *Gastroenterology Res Pract*, 2010, 539461. doi:10.1155/2010/539461.

[12] Duerr DH, Taylor KD, Brant SR, et al. "A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene" [J]. *Science*, 2006, 314(5804):1461-1463.

[13] Hu D, Hu G, Zhu J, et al. Association between polymorphisms of the IL-23R gene and allergic rhinitis in a Chinese Han population[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e63858.

[14] Karaderi T, Harvey D, Farrar C, et al. Association between the interleukin 23 receptor and ankylosing spondylitis is confirmed by a new UK case-control study and meta-analysis of published series[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2009, 48(4):386-389.

(收稿日期 2014-05-22)

(上接第 255 页)且在模拟胃液中释放量明显小于模拟肠液,说明该体系在 pH 值较高的体系中释放速率较快。蒙脱土可以作为药物载体必将具有广阔的应用前景。

参考文献:

[1] Bouxin F, Baumberger S, Pollet B, et al. Acidolysis of a lignin model; investigation of heterogeneous catalysis using montmorillonite clay[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(2):736-744.

[2] Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs[J]. *Drug Discov Today*, 2007, 12(23):1068-1075.

[3] Lertsutthiwong P, Noomun K, Khunthon S, et al. Influence of chitosan characteristics on the properties of biopolymeric chitosan-montmorillonite[J]. *Prog Nat Sci*, 2012, 22(5):502-508.

[4] Nestic AR, Velickovic SJ, Antonovic DG. Characterization of chitosan/montmorillonite membranes as adsorbents for Bez-actin Orange V-3R dye[J]. *J Hazard Mater*, 2012, 209-210:256-263.

[5] Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59(7):645-666.

[6] Costantino U, Ambroggi V, Nocchetti M, et al. Hydrotalcite-like compounds; versatile layered hosts of molecular anions with biological activity[J]. *Microporous Mesoporous Mater*,

2008, 107(1-2):149-160.

[7] Monvisade P, Siriphannon P. Chitosan intercalated montmorillonite; preparation, characterization and cationic dye adsorption[J]. *Appl Clay Sci*, 2009, 42(3-4):427-431.

[8] Sarier N, Onder E. Organic modification of montmorillonite with low molecular weight polyethylene glycols and its use in polyurethane nanocomposite foams, *Thermochim[J]. Acta*, 2010, 510:113-121.

[9] Wu J, Li B, Liao J, et al. Behavior and analysis of cesium adsorption on montmorillonite mineral[J]. *J Environ Radioact*, 2009, 100(10):914-920.

[10] Zheng JP, Luan L, Wang HY, et al. Study on ibuprofen/montmorillonite intercalation composites as drug release system[J]. *Appl Clay Sci*, 2007, 36(4):297-301.

[11] 陈有梅, 刘博, 周安宁, 等. 盐酸西替利嗪/蒙脱土纳米复合物的制备及其结构与性能[J]. *复合材料学报*, 2010, 27(01):43-50.

[12] Joshi GV, Patel HA, Kevadiya BD, et al. Montmorillonite intercalated with vitamin B as drug carrier[J]. *Appl Clay Sci*, 2009, 45(4):248-253.

[13] Joshi GV, Kevadiya BD, Patel HA, et al. Montmorillonite as a drug delivery system; intercalation and in vitro release of timolol maleate[J]. *Int J Pharm*, 2009, 374(1-2):53-57.

[14] Reed-Hill RE, Abbaschian R. *Physical metallurgy principles [M]*. Boston: PWS-Kent Co, 1994:33-37.

(收稿日期 2014-06-03)