

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2015.04.005

正交实验优化甲氨蝶呤囊泡的制备^{*}

张 波¹ 王启平² 王慧云³ 全先高³ 王盈盈¹ 王 宁¹

(¹ 济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067; ² 济宁任城区卫生监督所, 济宁 272100; ³ 济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

摘 要 **目的** 制备甲氨蝶呤囊泡并通过正交实验优化甲氨蝶呤囊泡的制备工艺, 探索最适宜的药物包封条件。**方法** 采用 $L_9(3^4)$ 正交法优化甲氨蝶呤囊泡对药物包封率的影响因素, 以囊泡包封率为考察指标, 确定最佳制备工艺条件。**结果** 司盘 40(Span40)与胆固醇形成的囊泡($V_{Span40} : V_{CHOL} = 4 : 2$), 在 50℃ 超声 40 min 的条件下, 对 0.60 g/L 的甲氨蝶呤包封率最高, 可达 60% 以上。**结论** 通过正交实验优化制得的甲氨蝶呤囊泡可获得较高的包封率。

关键词 甲氨蝶呤; 囊泡; 包封率; 正交实验

中图分类号: R943 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2015)08-247-04

Optimizing the preparation of methotrexate niosomes using the orthogonal test

ZHANG Bo, WANG Qiping, WANG Huiyun, WANG Yingying, WANG Ning

(School of Basic Sciences, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective The preparation process of the methotrexate niosomes were optimized by means of orthogonal experiment to explore the most suitable drug coating conditions. **Methods** The methotrexate encapsulation rate affecting factors was optimized by an $L_9(3^4)$ orthogonal test. The niosomes encapsulation rate as evaluation index was used to determine the best preparation program. **Results** The results showed that the entrapment efficiency of the niosomes prepared under the condition which were as follows; Span40 and cholesterol ($V_{Span40} : V_{CHOL}$) was 2 : 1, the dosage of methotrexate, Ultrasonic temperature and time were 0.60g/L, 50℃ and 40min, and the entrapment rate could reach more than 60%. **Conclusion** The methotrexate niosomes optimized by orthogonal test had a higher entrapment rate.

Keywords: Methotrexate; Niosomes; Entrapment efficiency; Orthogonal test

非离子表面活性剂囊泡(niosome, 以下简称囊泡), 是由非离子表面活性剂和胆固醇构成的新型药物载体, 其结构组成与脂质体相似, 具有单层或多层结构, 而且化学性质稳定, 能降低药物的毒副作用, 提高药物治疗效果, 是一种很有发展前途的新型给药系统^[1-3]。甲氨蝶呤(MTX)是常见的抗肿瘤化疗药物, 但其毒副作用较大, 有严重的肝、肾损害, 骨髓抑制, 肠道反应等。为提高甲氨蝶呤的抗癌疗效, 降低其毒副作用, 国内外学者已做了许多研究工作。如制备甲氨蝶呤脂质体、磁导向甲氨蝶呤缓释药物、甲氨蝶呤淀粉纳米粒等^[4-6]。本文采用非离子表面活性剂和胆固醇作为包封甲氨蝶呤的膜材, 选用 $L_9(3^4)$ 因素水平表, 对甲氨蝶呤囊泡的制备工艺条件进行优化, 确定最佳制备方案。

报道如下。

1 实验部分

1.1 仪器

UV-2600 紫外可见分光光度计(岛津公司); RE-52A A 旋转蒸发器(上海嘉鹏科技有限公司); PHSJ-4A 酸度计(上海元析仪器有限公司); KQ-600GDV 医用超声波清洗器(河南巩义予华仪器有限公司); 透析袋(北京索莱宝科技有限公司); 电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司)。

1.2 试剂

甲氨蝶呤(中国药品生物制品检定所); 司盘(Span)20、40、60、80(天津凯通化学试剂有限公司, 均为分析纯); 胆固醇(天津科密欧化学试剂有限公司); 三氯甲烷(分析纯, 国药集团试剂有限公

* [基金项目] 济宁市科技局课题资助项目(编号: 2009-19)

司);无水乙醇(分析纯,国药集团试剂有限公司);其它试剂均为分析纯。

1.3 贮备液

配制一系列 Span40 浓度分别为 0.10、0.12、0.14 mol/L 的溶液,以 $V_{\text{CHCl}_3} : V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}} = 4 : 1$ 的混合溶剂配制。

0.10 mol/L 胆固醇溶液的配制 取 9.67 g 胆固醇溶于上述混合溶剂中,再加混合溶剂定容至 250 ml。

PBS 缓冲溶液的配制 800 ml 去离子水中溶解 8.0 g NaCl、0.20 g KCl、1.44 g Na_2HPO_4 、0.42 g KH_2PO_4 ,用 NaOH 溶液调 pH 至 7.4,再加水定容至 1000 ml。

1.4 实验方法

1.4.1 囊泡的制备 分别取 0.10 mol/L 20、40、60、80 和 0.10 mol/L 胆固醇 4.0 ml 加入至 100 ml 圆底烧瓶中,用旋转蒸发器于 40~50℃ 水浴真空旋转蒸干有机溶剂,再加入 5.0 ml 一定浓度的甲氨蝶呤溶液或 5.0 ml 蒸馏水,超声 40 min,即制得载药囊泡或空白囊泡。

以 Span40 浓度、Span40 和胆固醇的比例、药物浓度、超声时间为考察因素,每个因素各取 3 个水平进行优选,以包封率为指标进行试验,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计。见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 因素和水平

水平	A 司盘 40 浓度/mol·L ⁻¹	B 司盘 40 : 胆固醇	C 药物浓度/g·L ⁻¹	D 超声时间/min
1	0.10	4 : 1	0.4	30
2	0.12	4 : 2	0.6	40
3	0.14	4 : 3	0.8	50

1.4.2 标准曲线的建立 精密称取 5.0 mg 甲氨蝶呤标准品溶于 0.01 mol/L 的氢氧化钠溶液中,转置于 50 ml 容量瓶中,用 0.01 mol/L 的氢氧化钠溶液定容。分别取上述溶液 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 ml,置于 50 ml 容量瓶中,用 0.01 mol/L 的氢氧化钠溶液定容,得其浓度分别为 4、8、12、16、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。以 0.01 mol/L 的氢氧化钠溶液作空白对照,在 303 nm 处测定其吸光度。见图 1。

由图 1 可见,在测定浓度范围内,甲氨蝶呤溶液的浓度 $C(\mu\text{g}/\text{ml})$ 与吸光度 A 之间存在良好的线性关系,其回归方程为: $Y = 0.05397C - 0.00307$, $R = 0.9999$ 。

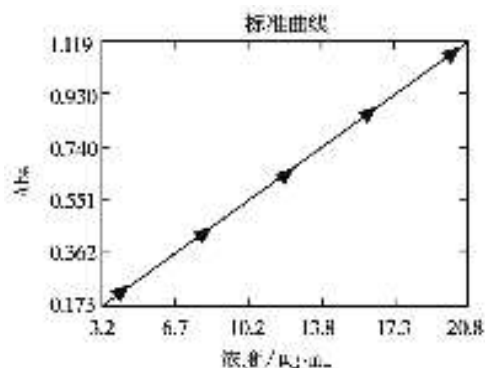


图 1 甲氨蝶呤标准曲线图

1.4.3 包封率的测定 取 2 ml 空白囊泡或载药囊泡溶液于透析袋中,在 100 ml pH=7.4 的 PBS 缓冲液中透析 24 h,取一定量的透析液,用紫外分光光度计测定其在 303 nm 处的吸光度,扣除空白囊泡的吸收,即可算得包封率^[4]。

2 结果与讨论

2.1 影响甲氨蝶呤囊泡包封率的研究

2.1.1 表面活性剂的影响 分别采用 20、40、60、80 制备甲氨蝶呤囊泡,考察不同表面活性剂对包封率的影响,其结果见图 2。由 Span40 和胆固醇构成的囊泡对甲氨蝶呤的包封效果较好。见图 2。

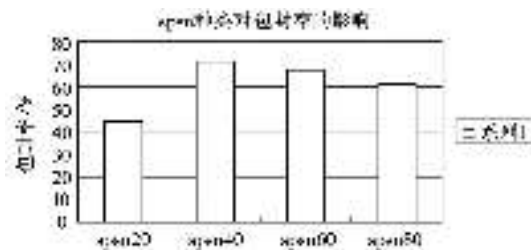


图 2 Span 种类对包封率的影响

2.1.2 Span40 浓度的影响 分别采用不同浓度的 Span40 溶液,考察表面活性剂浓度对甲氨蝶呤囊泡包封率的影响。见表 2。

表 2 Span40 浓度对包封率的影响

Span40/mol·L ⁻¹	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16
包封率/%	57.3	62.0	68.4	70.3	67.5	64.7

由表 2 可知,当 Span40 浓度为 0.12 mol/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。胆固醇具有填充效应,它能

填充在表面活性剂单体形成的分子空隙中,赋予双层膜一定的刚性^[7]。

2.1.3 胆固醇用量的影响 固定 Span40 用量,改变胆固醇与 Span40 的比例来考察胆固醇用量对甲氨蝶呤囊泡包封率的影响(见表 3)。由表 3 可知,当 Span40 : CHOL = 4 : 2 时,包封效率较高。比例继续增加,包封率反而下降。原因是胆固醇是助表面活性剂,可以增加双分子层中脂质分子排列的紧密程度,起到稳定类脂质体的作用,有利于囊泡的形成,但过多的胆固醇分子插入双层膜增加了双分子层的不对称性,使药物泄漏概率增加,包封率反而下降^[8]。

表 3 胆固醇用量对包封率的影响

Span40:CHOL	4 : 0	4 : 1	4 : 2	4 : 3	4 : 4	4 : 5	4 : 6
包封率/%	48.9	52.7	67.5	64.7	60.1	59.2	53.9

2.1.4 药物浓度的影响 改变加入甲氨蝶呤溶液的浓度,考察药物浓度对甲氨蝶呤囊泡包封率的影响。见表 4。

表 4 药物浓度对包封率的影响

药物浓度/g·L ⁻¹	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
包封率/%	50.3	58.8	61.4	59.0	49.8	46.5	42.2

由表 4 可知,当药物浓度在 0.6g/L 时,药物包封率达到最高。浓度较低时包封率随甲氨蝶呤浓度增加而上升,说明囊泡的包封容量是有限的。

2.1.5 超声时间的影响 固定其他制备条件,改变超声时间,考察超声时间对甲氨蝶呤包封率的影响。见表 5。

表 5 超声时间对包封率的影响

时间/min	10	20	30	40	50	60
包封率/%	14.9	48.0	48.9	63.2	60.0	52.3

由表 5 可知,超声时间在 40min 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。

2.2 甲氨蝶呤囊泡制备最佳工艺确定
正交实验见表 6,方差分析见表 7。

表 6 正交设计及结果

NO.	Span40 浓度 A	Span40 : CHOL B	药物浓度 C	超声时间 D	包封率/%
1	1	1	1	1	57.45
2	1	2	2	2	65.375
3	1	3	3	3	63.275
4	2	1	2	3	61.35
5	2	2	3	1	61.425
6	2	3	1	2	64.5
7	3	1	3	2	60.85
8	3	2	1	3	63.7
9	3	3	2	1	60.875
K1	62.033	59.883	61.883	59.917	
K2	62.425	63.500	62.533	63.575	
K3	61.808	62.883	61.850	62.775	
R	0.617	3.617	0.683	3.658	

表 7 正交实验方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P
Span40 浓度/mol·L ⁻¹ (A)	0.584	2	0.792	6.940	>0.05
Span40 : CHOL(B)	22.461	2	30.456	6.940	<0.05
药物浓度/g·L ⁻¹ (C)	0.891	2	1.208	6.940	>0.05
超声时间/min(D)	22.193	2	30.092	6.940	<0.05
误差	1.47	4			

由表 6 可知,4 个因素的级差大小顺序为 D>B>C>A,其中超声时间对甲氨蝶呤囊泡制备工艺影响最大,胆固醇用量影响较大,药物浓度和 Span40 浓度影响最小,由表 6 可见因素 B(胆固醇用量)和因素 D(超声时间)有显著性,因素 A(Span40 浓度)和因素 C(药物浓度)无显著性。即囊泡制备的最佳工艺条件为 A₂B₂C₂D₂,即当司盘 40 浓度为 0.12mol/L,司盘 40 : CHOL 为 4 : 2,药物浓度为 0.6g/L,超声时间为 40min 时,药物的包封率达到最高。

2.3 最佳工艺验证试验

按优选的最佳工艺进行 3 次平行试验,得出甲氨蝶呤囊泡的平均包封率为 62.09%。

3 结论

本文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甲氨蝶呤类脂囊泡,以包封率作为考察指标,通过 L₉(3⁴) 正交实验优选了甲氨蝶呤囊泡的制备工艺条件,确定了较优

处方,实验结果显示优选得到的最佳制备工艺条件是可行的,为新型药物传输系统的研究提供一定的依据,适合进一步研究。

参考文献:

- [1] Lu B. Study on polymersome micelles and niosomes as the vehicle of medicational system[J]. Journal of Henan University (Medical Science), 2008, 27(1): 1-3.
- [2] Yang R, Wang X J. Progress of study on niosomes[J]. Chinese Journal of Pharmaceutics, 2008, 6(3): 124-129.
- [3] Manconi M, Sinico C, Valenti D, et al. Niosomes as carriers for tretinoin III. A study into the in vitro cutaneous delivery of tretinoin[J]. Int J Pharm, 2006, 311(1): 11-19.
- [4] 杜美菊, 凌翠霞, 李娜, 等. 甲氨蝶呤的制备和体外释放性能

研究[J]. 应用化工, 2005, 34(12): 757-759.

- [5] Zhao X Y, Li H, Zhang B X, et al. Preparation and evaluation of non-ionic surfactant based vesicle as a new drug delivery system[J]. International Journal of Pharmaceutical Research, 2007, 34(6): 439-441.
- [6] Zhang W T, Huang Q B, Lin L F, et al. Determination of the entrapment efficiency of docetaxol liposome[J]. Chinese Journal of Hospital pharmacy, 2008, 28(14): 1179-1181.
- [7] 张波, 王慧云, 全先高. 非离子表面活性剂囊泡作为头孢匹胺钠药物载体的研究[J]. 济宁医学院学报, 2011, 34(4): 236-239
- [8] 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 2015-06-15)

(上接第 246 页)

3.2 阿米洛利减弱高浓度 CO₂ 引起的呼吸兴奋作用

本文结果显示,吸入高浓度 CO₂ 1min 大鼠表现为呼吸兴奋。吸入高浓度 CO₂ 引起呼吸兴奋的效应可通过刺激外周化学感受器和中枢化学感受器两条途径发挥作用。脑室内注射阿米洛利后,减弱了由吸入高浓度 CO₂ 引起的呼吸兴奋作用,即减弱了刺激中枢化学感受器的作用,故吸入高浓度 CO₂ 刺激中枢化学感受器引起的呼吸兴奋效应可能与 ASICs 有关。宋娜娜等^[7]研究表明,在下丘脑外侧区注射阿米洛利,再注射酸化的人工脑脊液能阻断注射酸化人工脑脊液引起的呼吸兴奋效应。脑室内预注射阿米洛利也能阻断脑室内注射酸化人工脑脊液引起的呼吸兴奋效应^[8]。以上结果提示,ASICs 是使中枢化学感受器受到刺激进而产生呼吸效应的关键通道,由于吸入高浓度 CO₂ 引起呼吸兴奋可通过刺激外周和中枢化学感受器两条途径发挥作用。因此,脑室内注射阿米洛利可阻断中枢化学感受器的作用,但刺激外周化学感受器的作用依然可以显现出来。因此,脑室内注射 ASICs 阻断剂阿米洛利不能完全阻断吸入高浓度 CO₂ 引起呼吸兴奋效应,只能减弱此效应。

综上所述,ASICs 阻断剂阿米洛利既对缺氧性呼吸抑制有保护作用,也可以减弱吸入高浓度

CO₂ 引起的呼吸兴奋效应,提示 ASICs 在缺氧和高 CO₂ 引起的呼吸效应中具有重要的调节作用。在上述两种呼吸反应中,究竟是 ASICs 哪种亚型发挥作用,还需更为深入地研究。

参考文献:

- [1] 李丽,王超,张静. 缺氧性呼吸抑制的中枢机制[J]. 医学综述, 2007, 13(17): 1341-1343.
- [2] 李丽. 酸敏感的离子通道研究[J]. 中华生物医学工程杂志, 2010, 5(1): 79-82.
- [3] 杜芸兰,朱立菁,陆生地,等. 酸敏感离子通道 1α 介导缺氧皮质神经损伤及相关机制的探讨[J]. 中风与神经疾病杂志, 2007, 24(5): 516-519.
- [4] Miyake T, Nishiwaki A, Yasukawa T, et al. Possible implications of acid-sensing ion channels in ischemia-induced retinal injury in rats[J]. Jpn J Ophthalmol, 2013, 57(1): 120-125.
- [5] 李丽,刘文彦,刘莹. 丹红注射液延迟缺氧性呼吸抑制的发生及其机制[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(6): 1123-1126.
- [6] 向军,唐宇平,蔡定芳. 非谷氨酸依赖的钙毒性机制在急性脑缺血损伤中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(6): 1224-1228.
- [7] 宋娜娜. 中枢酸敏感离子通道对呼吸的调节及机制研究[D]. 上海:复旦大学, 2010.
- [8] 李丽,刘文彦,高波. 酸敏感离子通道在中枢化学感受器呼吸调节中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(8): 1400-1403.

(收稿日期 2015-06-02)