

甲砷霉素脂质体制备和体外抑菌效果

杨亚军,李引乾*,谢 云,秦金森,苑青艳,孙 黎,王 彬,赵 梁

(西北农林科技大学动物科技学院,陕西杨凌 712100)

摘 要: 采用逆相蒸发法制备甲砷霉素脂质体,以包封率为指标,通过正交试验优化处方及制备工艺;并对其体外抑菌试验。优化后的处方和制备工艺因素为:药脂比为 1:5(W:W),磷脂与胆固醇比为 4:1(W:W),PBS 缓冲液 pH 7.4;超声 7 min(连续超声裂解 10 s,间隔 1 s),蒸发温度为 40℃,冻融 3 次。甲砷霉素脂质体对致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌的体外抑菌效果较其原粉提高 4~8 倍;但在试验浓度下对上述 3 种病原菌的体外杀菌效果差异不显著。

关键词: 甲砷霉素;脂质体;正交试验;体外抑菌效果

中图分类号:S859

文献标识码:A

文章编号:1004-1389(2007)04-0213-03

Preparation and Antibacterial Effect *in vitro* of Thiamphenicol Liposome

YANG Ya-jun, LI Yin-qian*, XIE Yun, QIN Jin-miao, YUAN Qing-yan,
SUN Li, WANG Bin and ZHAO Liang

(College of Animal Sci-Tech, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: Thiamphenicol liposome was prepared by reverse-phase evaporation method. To optimize the prescription and technology, orthogonal design was made by means of entrapment efficiency. The liposome was evaluated by quality control and antibacterial effect *in vitro*. The orthogonal design results showed that prescription factors were: the ratio of thiamphenicol to egg phosphatidyl choline was 1:5, the ratio of egg phosphatidyl choline to cholesterol was 4:1, pH of PBS was 7.4. Technology factors were: 7 minutes treated with ultrasonic, evaporation at 40℃, freezing and thawing 3 times. The minimal inhibitory concentration of the liposome was 1/8 to 1/4 that of free thiamphenicol to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae in vitro*. However, the minimal bactericidal concentration of the liposome and free thiamphenicol were no different to those at experimental concentration *in vitro*.

Key words: Thiamphenicol; Liposome; Orthogonal design; Antibacterial effect *in vitro*

脂质体(liposome)作为药物载体可提高药物对靶器官的选择性、提高疗效并降低毒副作用,其研究越来越受到人们的重视^[1]。甲砷霉素(thiamphenicol, THP)是氯霉素类广谱抗生素,很好地克服了氯霉素的不良反应;而其抗菌谱、抗菌活性与氯霉素相似,对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及

支原体等均有很强的抑制作用。在临床中被广泛用于肠道、呼吸道、泌尿道等感染的治疗^[2]。将 THP 制成脂质体制剂,可以增强治疗的靶向性,从而减小药物剂量,减少毒副作用,降低残留等。

在脂质体的制备中,影响其包封率的因素很多,笔者应用正交试验对甲砷霉素脂质体(thiam-

收稿日期:2006-11-22 修回日期:2007-03-19

基金项目:国家生命科学与技术人才培养基地科技创新基金。

作者简介:杨亚军(1982—),男,陕西周至人,硕士研究生,主要从事兽药开发。

* 通讯作者:李引乾(1962—),男,陕西岐山人,博士,副教授,主要从事兽医药理学与毒理学研究。Email:liyinqian628@163.com

phenicol liposome, THPL) 的处方和工艺进行优化, 并对其体外抑菌试验, 为临床用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

SPECORD 50 紫外-可见分光光度计, 德国耶拿(jena); VC105 型超声波破碎仪, 美国 SONICS; RE-5298 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; JEM 1230 型透射电子显微镜, 日本电子株式会社; 透析袋: M21 Cat. 12-14K; 隔水式恒温培养箱。

THP 标准品, 中国兽药药品监察所, 含量 99.8%, 批号: H030304; THP, 浙江海翔药业股份有限公司, 含量 99.45%, 批号: P-047-2005031; 蛋黄卵磷脂(egg phosphatidyl choline, ePC), 湖南益阳益威生化试剂有限公司, 批号: 051018; 胆固醇(cholesterol, Ch), 英国进口分装; 其他均为国产(分析纯)试剂。

致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌, 均由西北农林科技大学兽医微生物实验室鉴定、提供。

1.2 方法

1.2.1 制备方法 按比例称取 ePC、Ch、THP 于圆底烧瓶中, 加入 25 mL 氯仿-甲醇(1:1)使其充分溶解, 加入 25 mL PBS 液, 振摇使其成乳状;

水浴旋转蒸发除去有机溶剂, 充 N₂ 密封, 反复冻融; 超声处理, 置冰箱 4℃ 保存^[3]。

1.2.2 正交试验设计 选取药物与磷脂比例、磷脂与胆固醇比例、缓冲液 pH 为考察因素, 以包封率为指标, 用 L₉(3⁴) 正交表安排试验方案(表 1), 优化 THPL 处方; 以优化后的处方再对超声时间、蒸发温度和冻融次数等工艺条件进行优化(表 2)。每个处理重复 2 次, 取平均值进行方差分析。

表 1 处方因素水平

Table 1 Factor and level of prescription

水平 Level	药物、磷脂比(A) Ratio of THP to ePC	磷脂、胆固醇比(B) Ratio of ePC to Ch	PBS 缓冲 液 pH(C) pH of PBS
1	1:3	3:1	6.5
2	1:4	4:1	7.0
3	1:5	5:1	7.4

1.2.3 THPL 性状及电镜观察 按照优化后的处方及工艺, 制备 THPL 3 批, 进行外观观察; 应用 2% 磷钨酸负染制备样品, 于透射电镜下观察。

1.2.4 包封率、含量测定 依照参考文献[4]方法进行。

1.2.5 体外抑菌试验 采用试管双倍稀释法^[5]。

表 2 制备工艺因素水平

Table 2 Factors level of technics

水平 Level	超声时间(A') Ultrasonic time /min	蒸发温度(B')/℃ Evaporation temperature	冻融次数(C')/次 Freeze- thawing times
1	3	35	2
2	5	40	3
3	7	45	4

表 3 THPL 处方及制备工艺优化试验结果

Table 3 Result of orthogonal experiments

编号 No.	A(A')	B(B')	D(D')	C(C')	E/%	E' /%
1	1	1	1	1	21.14	48.37
2	1	2	2	2	33.75	59.41
3	1	3	3	3	30.86	48.52
4	2	1	2	3	41.96	43.06
5	2	2	3	1	31.02	48.11
6	2	3	1	2	40.30	51.36
7	3	1	3	2	45.62	55.38
8	3	2	1	3	49.18	59.74
9	3	3	2	1	35.93	56.21
$\bar{x}_1$	28.58	36.24	36.87	29.36		
$\bar{x}_2$	37.36	37.98	37.21	39.89		
$\bar{x}_3$	43.58	35.70	35.83	40.67		
R	15.00	2.28	1.38	11.31		
$\bar{x}_1$	52.10	48.94	53.16	50.90		
$\bar{x}_2$	47.51	55.75	52.89	55.38		
$\bar{x}_3$	57.11	52.03	50.67	50.44		
R'	9.60	6.81	2.49	4.94		

2 结果与分析

2.1 正交试验结果

L₉(3⁴) 优化 THPL 处方和制备工艺, 试验结果见表 3。

由 R 值直观分析可知, 因素 A(药物与磷脂比)影响最大, 因素 C(PBS 液 pH)次之, 因素 B(磷脂与胆固醇比)影响最小。比较 $\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$ 、 $\bar{x}_3$ 可得最佳处方为 A₃B₂C₃, 即药脂比为 1:5(W:W), 磷脂与胆固醇比为 4:1(W:W), PBS 缓冲

液 pH 7.4。方差分析结果表明,A 因素差异极显著($P<0.01$);B 因素差异不显著($P>0.05$),C 因素差异显著($P<0.05$)。

由 R' 值直观分析可知,因素 A' (超声裂解时间)影响最大,因素 B' (蒸发温度)次之,因素 C' (冻融次数)影响最小。比较 $\bar{x}_1'$ 、 $\bar{x}_2'$ 、 $\bar{x}_3'$ 可得最佳处方为 $A_3B_2C_2$,即超声 7 min(连续超声裂解 10 s,间隔 1 s),蒸发温度为 40℃,冻融 3 次。方差分析结果表明,各因素差异均不显著($P>0.05$)。

2.2 THPL 性状及电镜观察

THPL 混悬液为淡黄色均一乳液,光学显微镜下(10×100)呈均一的针尖大小的单室囊泡;视野中没有可见的药物结晶。透射电镜观察呈近球状(图 1),粒径在 180~300 nm 之间。

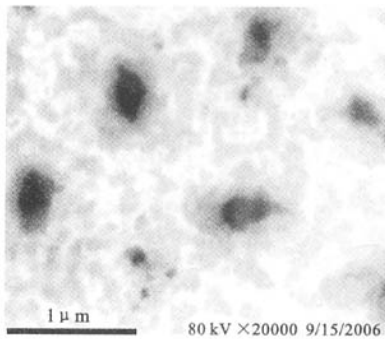


图 1 THPL 透射电镜照片(×20 000)

Fig. 1 Transmission electron photomicrogram of THPL(×20 000)

2.3 包封率、含量测定

包封率为(62.37±0.86)%($n=3$),THP 含量为(8.78±0.20)mg/mL($n=3$)。

2.4 体外抑菌试验

THP 和 THPL 对致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌的体外抑菌试验结果见表 4。

表 4 THP 和 THPL 体外抑菌试验结果

Table 4 The results of MIC and MBC of THP and THPL

试验菌 Strains	THP /(mg·L ⁻¹)		THPL /(mg·L ⁻¹)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
致病性大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	8	>128	2	>128
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	2	>128	0.5	>128
无乳链球菌 <i>Streptococcus agalactiae</i>	4	>64	0.5	>64

3 讨论

3.1 影响脂质体包封率的因素很多,如处方因素:药物与脂质的比例、磷脂与胆固醇的比例、缓冲液 pH 等。在 THPL 制备过程中,随着药物与

磷脂比例的增大,包封率升高,这与一些文献报道的研究结果一致^[6,7];药物与磷脂的比例对包封率的影响也较磷脂与胆固醇的比例、缓冲液 pH 等因素大。同时试验中发现,当药物与磷脂的比例为 1:3 和 1:4 时,制备的脂质体悬液在 4℃ 避光放置 4 d 以后,瓶底出现一层白色沉淀,光学显微镜观察为较规则的柱状结晶;当药物与磷脂的比例为 1:5 时,制备的脂质体悬液在 4℃ 避光放置 30 d 后,未见类似现象出现。因而可以推断,按前两种比例制备的 THPL 不稳定。当制备方法拟定后,制备工艺(如蒸发温度、冻融次数、超声裂解时间等)也与包封率有关。但在本试验中,以上工艺因素对 THPL 包封率的影响均不显著($P>0.05$)。

3.2 THPL 对致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和无乳链球菌的 MIC 分别是 THP 水溶液的 1/4、1/4 和 1/8(表 4),这与脂质体可以提高细菌对抗菌药敏感性的多篇报道^[8,9]一致。脂质体的磷脂双分子膜与细菌膜亲和力强,与其发生融合,直接使抗菌药物进入菌体,发挥抑菌作用。THPL 和 THP 对上述 3 种常见病原菌的 MBC 值较大,且两者之间无差异,这是因为 THP 主要作为一种抑菌剂,在试验浓度下不能杀死培养基上 99% 的细菌。THPL 的体内抑菌试验有待进一步证实。

参考文献:

[1] 吴小宁,王 军,欧阳五庆. 脂质体在生物领域内的研究进展[J]. 动物医学进展,2005,26(6):44~47.
[2] 中国兽药典委员会编. 兽药使用指南——化学药品卷(2005 年版)[M]. 北京:中国农业出版社,2006. 50~51.
[3] 朱盛山. 药物新剂型[M]. 北京:化学工业出版社,2003. 408~470.
[4] 杨亚军,李引乾,黄勇旗,等. 甲砒霉素脂质体包封率的测定方法[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2006,34(增刊):161~164.
[5] 徐叔云,卞如瀛,陈 修 主编. 药理实验方法学(第三版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2003. 1647~1660.
[6] 徐丽洒,邓树海,孙 勇,等. 左旋多巴脂质体的制备及影响因素[J]. 齐鲁药事,2005,24(15):305~307.
[7] 任卫琼,陈维旗,廖建萍. 正交试验优选冰片脂质体制备工艺的研究[J]. 中医药导报,2005,11(1):67~68.
[8] 杨永胜,刘明远. 青霉素脂质体对耐药金黄色葡萄球菌的抑菌效果观察[J]. 中国兽药杂志,1996,30(1):30~31.
[9] 陈小军,孙志良,崔建国,等. 阿米卡星脂质体的研制及体外抑菌试验[J]. 动物医学进展,2004,25(6):97~98.

甲磺霉素脂质体制备和体外抑菌效果

作者: [杨亚军](#), [李引乾](#), [谢云](#), [秦金森](#), [苑青艳](#), [孙黎](#), [王彬](#), [赵梁](#), [YANG Ya-jun](#), [LI Yin-qian](#), [XIE Yun](#), [QIN Jin-miao](#), [YUAN Qing-yan](#), [SUN Li](#), [WANG Bin](#), [ZHAO Liang](#)

作者单位: [西北农林科技大学动物科技学院. 陕西杨凌, 712100](#)

刊名: [西北农业学报](#)  

英文刊名: [ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OccIDENTALIS SINICA](#)

年, 卷(期): 2007, 16(4)

被引用次数: 3次

参考文献(9条)

1. 吴小宁, 王军, 欧阳五庆 [脂质体在生物领域内的研究进展](#)[期刊论文]-[动物医学进展](#) 2005(6)
2. 中国兽药典委员会 [兽药使用指南—化学药品卷\(2005年版\)](#) 2006
3. 朱盛山 [药物新剂型](#) 2003
4. [杨亚军](#); [李引乾](#); [黄勇旗](#) [甲磺霉素脂质体包封率的测定方法](#) 2006(zk)
5. [徐叔云](#); [卞如濂](#); [陈修](#) [药理实验方法学](#) 2003
6. [徐丽洒](#), [邓树海](#), [孙勇](#), [徐斌](#) [左旋多巴脂质体的制备及影响因素](#)[期刊论文]-[齐鲁药事](#) 2005(5)
7. [任卫琼](#), [陈维旗](#), [廖建萍](#) [正交试验优选冰片脂质体制备工艺的研究](#)[期刊论文]-[中医导报](#) 2005(1)
8. [杨永胜](#); [刘明远](#) [青霉素脂质体对耐药金黄色葡萄球菌的抑菌效果观察](#) 1996(01)
9. [陈小军](#), [孙志良](#), [崔建国](#), [唐小武](#), [杨惠麟](#), [刘利跃](#) [阿米卡星脂质体的研制及体外抑菌试验](#)[期刊论文]-[动物医学进展](#) 2004(6)

本文读者也读过(10条)

1. [韩召敏](#). [徐楚鸿](#). [吕永宁](#). [陈华庭](#). [HAN Zhao-min](#). [XU Chu-hong](#). [L\(U\) Yong-ning](#). [CHEN Hua-ting](#) [甲磺霉素胶囊在健康人体药动学及生物等效性研究](#)[期刊论文]-[中国新药杂志](#)2006, 15(4)
2. [胡盛松](#). [袁梅蕊](#). [Hu Shengsong](#). [Yuan Meirui](#) [甲磺霉素缓释片的制备及释放度研究](#)[期刊论文]-[中国药业](#) 2010, 19(24)
3. [禹玉洪](#). [李雪春](#). [吴涛](#). [屠鹏飞](#) [注射用柴胡挥发油脂质体制备工艺研究](#)[期刊论文]-[中国中药杂志](#)2004, 29(6)
4. [张小华](#). [张龙](#). [范斌](#) [紫外分光光度法测定甲磺霉素片的含量](#)[期刊论文]-[化学分析计量](#)2002, 11(1)
5. [张小华](#). [葛竹兴](#). [郁杰](#). [陶冠红](#). [ZHANG Xiao-hua](#). [GE Zhu-xing](#). [YU Jie](#). [TAO Guan-hong](#) [羟丙基-β-环糊精对甲磺霉素包合作用的研究](#)[期刊论文]-[泰州职业技术学院学报](#)2007, 7(6)
6. [池王青](#) [多西他赛脂质体制备工艺研究](#)[期刊论文]-[中国医药指南](#)2011, 09(23)
7. [谢云](#). [李引乾](#). [杨亚军](#). [黄勇旗](#). [XIE Yun](#). [LI Yin-qian](#). [YANG Ya-jun](#). [HUANG Yong-qi](#) [甲磺酸培氟沙星在山羊体内的药物动力学研究](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#)2007, 16(3)
8. [张海亮](#). [薛芬](#). [李引乾](#). [曹光荣](#). [梅雪洁](#). [庞利娜](#). [黄冻](#). [王婷](#). [赵力](#). [刘阳](#). [ZHANG Hai-liang](#). [XUE Fen](#). [LI Yin-qian](#). [CAO Guang-rong](#). [MEI Xue-jie](#). [PANG Li-na](#). [HUANG Dong](#). [WANG Ting](#). [ZHAO Li](#). [LIU Yang](#) [伊维菌素HP-β-CD包合工艺的优化](#)[期刊论文]-[畜牧与兽医](#)2009, 41(8)
9. [许洁](#). [杨志强](#). [潘萍](#). [张学农](#). [吴珊珊](#). [XU Jie](#). [YANG Zhi-qiang](#). [PAN Ping](#). [ZHANG Xue-nong](#). [WU Han-shan](#) [环孢素A脂质体制备及其体外释药方法学考察](#)[期刊论文]-[抗感染药学](#)2008, 5(4)
10. [熊永洁](#). [李引乾](#). [朱晓娟](#). [张冠世](#). [关永娟](#). [梁冠祥](#). [王军](#). [尚红梅](#). [XIONG Yongjie](#). [LI Yinqian](#). [ZHU Xiaojuan](#). [ZHANG Guanshi](#). [GUAN Yongjuan](#). [LIANG Guanxiang](#). [WANG Jun](#). [SHANG Hongmei](#) [复方泰乐菌素颗粒剂的品质控制](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#)2010, 19(3)

引证文献(3条)

1. 薛琴, 李引乾, 王龙坛, 秦金森, 张海亮, 王婷, 庞利娜, 董钊 甲磺霉素纳米乳的制备及其质量评价[期刊论文]-畜牧与兽医 2009(06)
2. 孙江才, 欧阳五庆, 许利耕, 杨雪峰 复方呋喃西林纳米乳对子宫内膜炎主要致病菌体外抗菌活性研究[期刊论文]-西北农业学报 2008(05)
3. 张小华 甲磺霉素-羟丙基- β -环糊精包合物的制备、鉴定与药代动力学研究[学位论文]硕士 2009

引用本文格式: 杨亚军, 李引乾, 谢沅, 秦金森, 苑青艳, 孙黎, 王彬, 赵梁. YANG Ya-jun, LI Yin-qian, XIE Yun, QIN Jin-miao, YUAN Qing-yan, SUN Li, WANG Bin, ZHAO Liang 甲磺霉素脂质体制备和体外抑菌效果[期刊论文]-西北农业学报 2007(4)