

复方头孢泊肟酯纳米乳的研制及其药效与安全性研究

刘岳, 李梦云, 郑寅, 高娴, 欧阳五庆*, 杨鸣琦*

(西北农林科技大学 动物医学院, 杨凌 712100)

摘要: 为研究头孢泊肟酯与牛至油在纳米水平的联合药效, 首次制备复方头孢泊肟酯纳米乳并进行体外抑菌试验及急性毒性研究。在传统纳米乳制备方法筛选初步处方基础上, 采用多指标正交试验法确定最优处方。以 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验, 以抑菌圈直径和纳米乳稳定常数 Ke 为考察指标, 选择头孢泊肟酯和牛至油质量分数比(A)、纳米乳水相 pH(B)、乳化温度(C)作为考察因素; 体外抑菌试验采用微量肉汤稀释法; 急性毒性试验采用最大耐受剂量法并进行了组织病理学检查。结果显示: 针对致病性大肠杆菌、沙门菌最优处方为头孢泊肟酯 0.33%、牛至油 2.67%、1,2-丙二醇 1.13%、EL-40 22.51%、蒸馏水 73.36%, 纳米乳 pH 值为 6.17; 与原料药相比, 受试药物的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度差异显著 ($P < 0.05$); 小鼠经口急性毒性最大耐受剂量大于 $1\ 800\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 为低毒级药物, 无肾、肠毒性, 但可引起肝轻微病理损伤。结果表明, 牛至油在纳米水平提高了致病性大肠杆菌、沙门菌、奇异变形杆菌、巴氏杆菌、痢疾杆菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌对头孢泊肟酯敏感性。

关键词: 头孢泊肟酯; 牛至油; 纳米乳

中图分类号: S859.5

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)06-1026-11

Preparation, Efficacy and Safety Evaluation of Compound Nanoemulsion of Cefpodoxime Proxetil

LIU Yue, LI Meng-yun, ZHENG Yin, GAO Xian, OUYANG Wu-qing*, YANG Ming-qi*

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

Abstract: To study the efficacy of combined application of cefpodoxime proxetil and Origanum oil in nanoscale level, compound nanoemulsion of cefpodoxime proxetil was innovatively prepared. Furthermore, antibacterial activity tests *in vitro* and acute toxicity tests were conducted. Preliminary prescription was sieved on the base of traditional method of preparation of nanoemulsion. Then the multi-index orthogonal experiment was proceeded with $L_9(3^4)$ orthogonal test table, regarding bacteriostatic circle diameter and nanoemulsion stability constant Ke as examining index. Three elements, ratio of the mass fraction of cefpodoxime proxetil and Origanum oil, pH of aqueous phase and emulsifying temperature are selected as factors. Antibacterial activity tests *in vitro* and acute toxicity tests were done through trace broth dilution method and maximal tolerance dose test. Then histopathological examination was measured. The optimal prescription is composed of 0.33% of cefpodoxime proxetil, 2.67% of Origanum oil, 1.13% of 1,2-propylene glycol, 22.51% of EL-40, 73.36% of distilled water for enteropathogenic *E. coli* and *Salmonella* and pH value of nanoemulsion is 6.17. Compared with the active pharmaceutical ingredients, both of the minimum inhibitory concentrations and minimum bactericidal concentrations of test drug were significantly different ($P < 0.05$); the maximum tolerated dose of the oral acute toxicity of mice is higher than $1\ 800\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, showing low toxicity. Histopathological examinations show no toxic-

收稿日期: 2014-09-09

基金项目: 农业科技成果转化资金项目(2013GB2G000475)

作者简介: 刘岳(1989-), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 硕士生, 主要从事动物病理学研究, E-mail: aizaidangxia@yeah.net

* 通信作者: 欧阳五庆, E-mail: oywq506@sina.com; 杨鸣琦, E-mail: xbdymq@163.com

ity of kidney and small intestine, but can do pathological damage to the liver. When in the presence of Origanum oil, enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella*, *Proteus mirabilis*, *Pasteurella*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus*, *Streptococcus agalactiae* are more sensitive to CFP-OR-NE than cefpodoxime proxetil.

Key words: cefpodoxime proxetil; Origanum oil; nanoemulsion

头孢泊肟酯(cefepodoxime proxetil, CFP)作为口服,广谱,第三代头孢菌素类抗生素被广泛应用于治疗上呼吸道及尿路感染。130 mg 头孢泊肟酯片剂口服(相当于 100 mg 头孢泊肟)在人体内的绝对生物利用度仅为 50%。粪便中头孢泊肟酯仅为口服剂量的 0.5%,这表明 CFP 作为酯类前体药物在肠腔发生了水解。研究表明 CFP 被肠壁酯酶水解为亲脂性差的活性代谢产物头孢泊肟,后者无法穿过生物膜,不利于肠道吸收,这被认为是 CFP 生物利用度较低主要原因之一;另外,头孢泊肟酯在水中极微溶解($400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),这严重影响了肠腔对药物的吸收^[1-2]。

P. D. Preshita 等^[3]指出纳米技术为口服给药领域带来革命性变化,尤其对水溶性差和酶稳定性弱的口服药物效果显著。为有效阻止肠壁酯酶水解 CFP 并增加 CFP 在水中的溶解度,本试验综合纳米乳和头孢泊肟酯优势,采用传统纳米乳制备方法筛选出初步处方,采用多指标正交试验法设计试验得到抑菌效果好且稳定性高的最优纳米乳处方,通过比较发现牛至油(Origanum oil, OR)显著降低了 CFP 对多种革兰阳性菌(G^+)和革兰阴性菌(G^-)的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最低杀菌浓度(minimal bactericidal concentration, MBC),故本研究拟将 CFP 和 OR 制备成复方纳米乳,以提高其抗菌效果。

1 材料与方法

1.1 仪器

BS214S 电子天平,德国 Satorius 公司生产;JEM-1230 型电子透射显微镜,日本 JEOL 公司生产;UV2450 型紫外-可见分光光度计,岛津国际贸易(上海)有限公司生产。Zetasizer Nano ZS 型激光粒度分析仪,英国马尔文仪器有限公司生产。

1.2 主要试剂和药品

头孢泊肟酯原料药,湖北恒硕化工有限公司,纯度 99%;牛至油原料药,武汉远成共创科技有限公司,质量分数 98%;吐温-80(Tween-80),天津市登

封化学试剂厂,化学纯,批号:20121008;聚氧乙烯蓖麻油-40(EL-40),批号:12120416;聚氧乙烯氢化蓖麻油-40(RH-40),上海昌为医药辅料技术有限公司,化学纯,批号:210033;1,2-丙二醇(批号:3101885),天津科密欧化学试剂开发中心,分析纯。

1.3 菌种

致病性大肠杆菌、沙门菌、奇异变形杆菌、巴氏杆菌、痢疾杆菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌,由西北农林科技大学动物医学院微生物实验室提供。

1.4 CFP-OR-NE 处方初步筛选及确定

油相:预试验参照参考文献[4]方法确定 CFP 在 OR 中的溶解度;表面活性剂:参考文献^[5]筛选最优表面活性剂;增溶剂质量分数的确定:为进一步提高纳米乳对头孢泊肟酯的载药量,根据头孢泊肟酯的性质,选用 1,2-丙二醇作为增溶剂,考察在体系中不同质量分数的 1,2-丙二醇(1%、5%、10%)对纳米乳形成的影响。

根据上述筛选结果,将配方量的 OR、1,2-丙二醇充分混合后,加入配方量的 CFP,不断搅拌,待 CFP 完全溶解后,加入配方量的最佳表面活性剂,混合均匀后,逐滴加入配方量蒸馏水,直至体系经相变后最终稀薄且流动性如水一样时即筛选出 CFP-OR-NE 初步处方。

1.5 多指标正交试验筛选 CFP-OR-NE 最优处方

由预试验及参考文献^[1,6]可知影响纳米乳抑菌效果和稳定性的因素有 CFP 与 OR 质量分数比(A)、水相 pH(B)、乳化温度(C),因素水平见表 1。依据表 1 制备 9 个样品,编为试验号 1~9,以 9 个纳米乳分别对鸡大肠杆菌和赛鸽仙台沙门菌抑菌圈直径、各纳米乳稳定常数 Ke 为评价指标;参照文献[7],采用活菌平板计数法对菌液浓度进行计数。各所配菌液用生理盐水稀释为 $10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 备用。

1.5.1 抑菌圈直径测量 取 $100 \mu\text{L}$ 稀释好的菌液($10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)在普通平板上均匀涂布后,在平板上均匀打 3 个孔,每次取 $200 \mu\text{L}$ 纳米乳打入孔内,置于 4°C 冰箱待药液扩散 24 h,次日取出平板置于 37°C 下培养 24 h 用直尺量取抑菌圈直径,每个

样品重复 3 次。药物对照为 3% 头孢克肟 (cefixime, CFM), 后者与 CFP 同为第三代口服头孢菌素类, 剂量及步骤同上。

表 1 因素水平

Table1 Orthogonal factors and levels

水平 Levels	因素 Factors		
	CFP : OR (A)	水相 pH(B) pH of aqueous phase	乳化温度/°C(C) Emulsifying temperature
1	1 : 1	1.2	25
2	1 : 4	3.0	30
3	1 : 8	6.8	35

1.5.2 纳米乳稳定常数的测定 乳剂物理稳定性常数计算公式如下: $Ke = |A_0 - A| / A \times 100\%$ 。取 2 mL 纳米乳, 4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取最下层液体 100 μL, 试验号 1~3 稀释至含 CFP/OR 20 μg · mL⁻¹, 试验号 4~9 稀释至含 OR 30 μg · mL⁻¹, 以水为空白在纳米乳最大吸收波长处测定吸收度 A; 同法不经离心直接测定 A₀ 值。重复 3 次。

1.6 MIC 和 MBC 测定

根据 1.5 筛选出的最优处方制备 CFP-OR-NE, 用蒸馏水稀释至含 CFP 512 μg · mL⁻¹ 备用; 参考文献[8]方法用 60% 无水乙醇溶解并稀释 CFP、OR 及药物对照头孢克肟至 512 μg · mL⁻¹ 备用。采用二倍稀释法: 在 96 微孔板第 1 孔加 200 μL 培养基作阴性对照, 第 2 孔至第 12 孔依次加 100 μL 培养基后, 在第 2 孔加 100 μL 药液反复吹打混匀后移取 100 μL 至第 3 孔依次倍比稀释至第 11 孔, 从第 11 孔取出 100 μL 药液弃去, 第 12 孔再加 100 μL 菌液作阳性对照。各药液各菌种重复 3 次; 将所有完全清晰无细菌生长孔培养液分别接种普通营养琼脂平板, 37 °C 培养 24 h, 菌落数不超过 5 个的最后一个平板对应的 96 孔板药液浓度为该药的 MBC。

1.7 CFP-OR-NE 质量评价

将 CFP-OR-NE 于 4 000 r · min⁻¹ 离心 30 min, 观察是否有浑浊、分层及药物析出等现象; 将 CFP-OR-NE 分别于 -20 °C、4 °C、室温和 60 °C 下保存, 于 1、3、6 个月 after 取样观察是否存在上述现象; 纳米乳类型鉴别参照文献[7]方法; 光稳定性、形态

观察、粒径分析及 Zeta 电位测定试验参照文献[9]; 长期试验, 将 CFP-OR-NE 在 (25 ± 2) °C 相对湿度为 60% ± 5% 条件下放置 12 个月, 于 0、3、6、9、12 个月观察和取样, 观察性状并监测 CFP 和 OR 含量, 分别建立两者含量—时间回归方程, 计算药物有效期。

1.8 安全性评价

1.8.1 预试验 实验动物为健康小鼠, 设 10、100、1 000 mg · kg⁻¹ 3 个剂量组, 各以 2 只健康小鼠预试, 雌雄各半。根据 24 h 内死亡情况, 估计 LD₅₀ 的可能范围, 确定正式试验的剂量组。

1.8.2 最大耐受剂量法 (MTD 试验) 健康小鼠 20 只, 雌雄各半, 观察 3~5 d 后, 给予各小鼠最大灌胃容量 0.4 mL · 20 g⁻¹, 1 日 3 次, 连续观察 14 d。

1.8.3 组织病理学检查 14 d 后迅速解剖 1.8.2 给药小鼠, 取其肝、肾、肠等组织块, 10% 中性福尔马林溶液 (3.7%~4% 中性甲醛) 固定, 4 °C 保存, 常规制石蜡切片, HE 染色。

1.9 纳米乳测定方法的建立

1.9.1 试验原理及测定波长的确定 参考文献[10]以双波长紫外分光光度法为基本原理, 采用等吸收点法确定 CFP 的测定波长和参比波长; 参考文献[11]以三波长紫外分光光度法为基本原理, 以计算法确定 OR 测定组合波长。

1.9.2 供试液的制备 准确称取 CFP 原料药 50 mg, 加入 1 mL 乙腈, 再用 0.1 mol · L⁻¹ 稀盐酸稀释至 100 mL, 得到 500 μg · mL⁻¹ CFP 储备液; 准确称取 1 g OR, 加入 100 mL 无水乙醇溶解即制得 500 μg · mL⁻¹ OR 储备液; 制备 CFP、OR 空白辅料供试液。

1.9.3 方法专属性试验 CFP 原料药供试液用 0.1 mol · L⁻¹ 稀盐酸稀释至含 CFP 20 μg · mL⁻¹, CFP-OR-NE 供试液用蒸馏水稀释至含 CFP 20 μg · mL⁻¹, CFP 空白辅料稀释倍数同 CFP-OR-NE 即 750 倍; OR 原料药、CFP-OR-NE 分别用无水乙醇和蒸馏水稀释至含 OR 20 μg · mL⁻¹, OR 空白辅料稀释倍数同 CFP-OR-NE 即 750 倍。采用紫外分光光度法在 200~400 nm 波长范围进行扫描, 比较分析各紫外扫描图谱。

1.9.4 标准曲线的绘制 将 CFP 储备液用 0.1 mol · L⁻¹ 稀盐酸稀释成梯度浓度, 用 UV2450 紫外-可见分光光度计在 263 和 289.8 nm 波长处测定其吸光度, 将两波长下吸光度差值 (ΔA) 作为纵坐

标,浓度(C)为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程;同法在 261.6、273.2、284.4 nm 波长处测定梯度稀释的 OR 储备液吸光度,获得回归方程。

1.9.5 回收率试验 用蒸馏水分别稀释试验号 1~9 至含 CFP 浓度为 20、30、40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,OR 浓度为 30、40、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 并测量吸收值,每个样品重复测量 3 次,根据标准曲线方程,计算得出平均回收率及相对标准偏差(RSD)。

1.9.6 进样重复性试验与精密度试验 用蒸馏水分别稀释试验号 1~9 至含 CFP 质量浓度为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,OR 质量浓度为 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,重复 6 次,计算平均质量浓度和平均回收率及 RSD;分别制备含 CFP 为 2.5、7.5、12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 CFP-OR-NE 及含 OR 为 30、40、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 CFP-OR-NE,在 1、5、10、15、20、24 h 进行日内精密度试验。选择一个固定时间每天测定,连续测定 5 d 进行日间精密度试验。

1.10 数据处理

1.5 中评价指标数据用 PASW Statistics 18 软

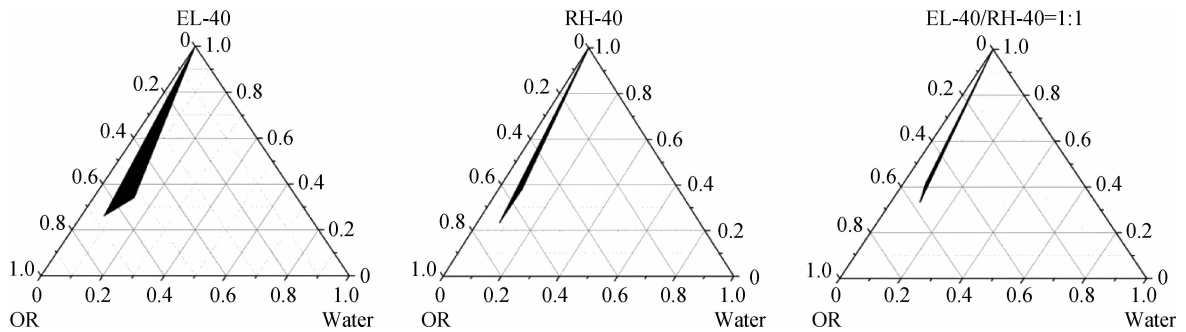


图1 表面活性剂对纳米乳形成的影响

Fig. 1 Effect of surfactant agents on nanoemulsion region

2.1.4 初步处方的确定 CFP-OR-NE 初步处方各组分质量分数:CP 1.5%、牛至油 1.5%、EL-40 22.51%、1,2-丙二醇 1.13%、蒸馏水 73.36%。按上述配方结合 1.4 方法制备初步 CFP-OR-NE。

2.2 确定 CFP-OR-NE 最优处方

试验方案及试验结果见表 2。筛选抑制大肠杆菌最优处方:对于因素 A,其对大肠杆菌抑菌圈直径影响大小排第 1 位,取 A_1 ;其对 Ke 影响大小也排第 1 位,取 A_3 ,因此 A 可取 A_1 或 A_3 ,但取 A_3 时纳米乳稳定性比取 A_1 提高 82.86%,而抑菌圈直径仅缩小 50.01%,故 A 取 A_3 ,B 对抑菌圈直径影响大小排第 2 位,在 Ke 中排第 3 位,故以抑菌圈直径为主 B 取 B_2 ,同理 C 取 C_2 ;筛选抑制沙门菌最优处方分

件进行极差分析,确定影响各指标主次因素,确定 CFP-OR-NE 最优处方;1.5 数据用 PASW Statistics 18 软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 CFP-OR-NE 处方筛选

2.1.1 油相确定 试验表明 CFP 在 OR 中溶解度达到 500 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.1.2 表面活性剂的确定 表面活性剂初选时 Tween-80 不能成乳,故在 EL-40、RH-40、EL-40/RH-40 质量比 1:1 混合表面活性剂三者中选择。由图 1 可知,3 种表面活性剂形成的纳米乳区的大小顺序:EL-40>RH-40>EL-40/RH-40(图 1)。故选择 EL-40 作为 CFP-OR-NE 的表面活性剂。

2.1.3 增溶剂质量分数的确定 当 1,2-丙二醇为 10%时,不能形成纳米乳,当 1,2-丙二醇为 5%时,形成的纳米乳不稳定,因此选择增溶剂质量分数为 1%,经进一步精确试验确定 1,2-丙二醇质量分数为 1.13%。

析方法同上,确定 A 取 A_3 ,B 取 B_2 ,C 取 C_2 ,故抑制两种细菌优组合同为 $A_3B_2C_2$,据此制备 CFP-OR-NE。

2.3 MIC 和 MBC 测定

CFP-OR-NE 体外抑菌试验结果见表 3。

2.4 质量评价

各温度下保存的 CFP-OR-NE 在 1、3、6 月均为澄清透明且无分层现象;离心试验和光照试验 CFP-OR-NE 稳定,无分层、絮凝、转型、破乳、酸败等现象;染色结果显示 CFP-OR-NE 为 O/W 型;经透射电镜观察 CFP-OR-NE 乳滴呈圆球形,分布均匀,见图 2;粒径分析结果表明,CFP-OR-NE 平均粒径为 18.94 nm,多分散系数(PDI)为 0.258,见图 3;在环

表 2 试验方案及试验结果

Table 2 The test scheme and test results

试验号 Test number	因素 Factors					评价指标 ($\bar{x} \pm s$) Evaluation index ($\bar{x} \pm s$)			稳定 常数 Ke
	A (CFP : OR)	B (水相 pH) B (pH of aqueous phase)	C (乳化温度/ ℃) C (Emulsify temperature)	D (空列) D (Null column)	抑菌圈直径/mm Inhibitory zone diameter				
		致病性大肠杆菌 Enteropathogenic <i>E. coli</i>	沙门菌 <i>Salmonella</i>						
1	1 (1 : 1)	1 (1.2)	1 (25)	1	39.67±2.89	32.33±0.58	15.32±0.56		
2	1 (1 : 1)	2 (3.0)	2 (30)	2	38.67±0.58	28.33±0.58	9.20±0.48		
3	1 (1 : 1)	3 (6.8)	3 (35)	3	39.67±2.08	31.00±1.00	36.20±2.36		
4	2 (1 : 4)	1 (1.2)	2 (30)	3	31.00±1.00	25.00±1.00	6.17±0.90		
5	2 (1 : 4)	2 (3.0)	3 (35)	1	29.67±1.53	21.67±1.53	3.05±0.69		
6	2 (1 : 4)	3 (6.8)	1 (25)	2	29.33±0.58	27.67±0.58	2.12±0.62		
7	3 (1 : 8)	1 (1.2)	3 (35)	2	25.67±0.58	17.33±0.58	1.48±0.27		
8	3 (1 : 8)	2 (3.0)	1 (25)	3	28.67±0.58	24.33±0.58	6.79±0.48		
9	3 (1 : 8)	3 (6.8)	2 (30)	1	26.00±1.00	21.33±1.16	2.14±0.27		

	致病性大肠杆菌抑菌圈直径 Inhibitory zone diameter of enteropathogenic <i>E. coli</i>			沙门菌抑菌圈直径 Inhibitory zone diameter of <i>Salmonella</i>			稳定常数 Ke			
K1	118.01	96.34	95.00	91.66	74.66	84.33	60.72	22.97	24.23	
K2	90.00	97.01	95.67	74.34	74.33	74.66	11.34	19.04	17.51	
K3	78.67	95.00	95.01	62.99	80.00	70.00	10.41	40.46	40.73	
k1	39.34	32.11	31.67	30.55	24.89	28.11	20.24	7.66	8.08	
k2	30.00	32.34	31.89	24.78	24.78	24.89	3.78	6.35	5.84	
k3	26.22	31.67	31.67	21.00	26.67	23.33	3.47	13.49	13.58	
R	13.12	0.67	0.22	9.55	1.89	4.78	16.77	7.14	7.74	
因素主次水平 Primary and secondary level factors		A>B>C			A>C>B			A>C>B		
优水平 Optimum levels		A ₁ B ₂ C ₂			A ₁ B ₃ C ₁			A ₃ B ₂ C ₂		
优组合 Optimum combination		A ₁ B ₂ C ₂			A ₁ B ₃ C ₁			A ₃ B ₂ C ₂		

试验号 1~9 CFP 和 OR 质量分数之和均为纳米乳体系的 3%；药物对照 2:3% 头孢克肟，对致病性大肠杆菌抑菌圈直径 (27.33±2.52)mm，对沙门菌抑菌圈直径(27.67±1.16)mm

The sum of CFP and OR in test No. 1-9 all account for 3% of system of nanoemulsion; Inhibitory zone diameters of 3% of cefixime as positive control of drug are 27.33±2.52 mm for enteropathogenic *E. coli* and 27.67±1.16 mm for *Salmonella*, respectively

境温度 25 ℃条件下，Zeta 电位为 -9.96±6.35 mv (pH 为 6.39)。

长期试验结果(表 4)，各时间点纳米乳均为澄清透明淡黄色液体。CFP 含量—时间回归方程为

$y = -0.428x + 100.04 (R^2 = 0.989)$ ，CFP 的时间有效期为 23.45 个月；OR 含量—时间回归方程为 $y = -0.467x + 100.05 (R^2 = 0.982)$ ，OR 的时间有效期为 21.52 个月；故 CFP-OR-NE 的有效期为 21 个月。

表 3 CFP-OR-NE 体外抑菌试验结果 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Bacteriostatic effects of CFP-OR-NE ($\bar{x} \pm s$)

受试细菌 Test bacteria	复方头孢泊肟酯纳米乳 CFP-OR-NE			头孢泊肟酯 CFP			牛至油 OR			头孢克肟 CFM		
	MIC	MBC	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	MIC	MBC	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	MIC	MBC	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	MIC	MBC	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
致病性大肠杆菌 Enteropathogenic <i>E. coli</i>	5.33±2.31*	42.67±18.48#	53.33±18.48	53.33±18.48	106.67±36.95	53.33±18.48	106.67±18.48	106.67±36.95	42.67±18.48	106.67±36.95	42.67±18.48	106.67±36.95
沙门菌 <i>Salmonella</i>	6.67±2.31*	42.67±18.48#	53.33±18.48	53.33±18.48	106.67±36.95	85.33±36.95	106.67±36.95	106.67±36.95	42.67±18.48	106.67±36.95	42.67±18.48	106.67±36.95
奇异变形杆菌 <i>Proteus mirabilis</i>	13.33±4.62*	42.67±18.48#	85.33±36.95	106.67±36.95	53.33±18.48	53.33±18.48	106.67±36.95	53.33±18.48	53.33±18.48	106.67±36.95	53.33±18.48	106.67±36.95
巴氏杆菌 <i>Pasteurella</i>	6.67±2.31*	42.67±18.48#	53.33±18.48	106.67±36.95	26.67±9.24	106.67±36.95	53.33±18.48	106.67±36.95	53.33±18.48	106.67±36.95	53.33±18.48	106.67±36.95
痢疾杆菌 <i>Shigella dysenteriae</i>	3.33±1.16*	42.67±18.48#	42.67±18.48	106.67±36.95	42.67±18.48	42.67±18.48	106.67±36.95	53.33±18.48	53.33±18.48	106.67±36.95	53.33±18.48	106.67±36.95
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i>	13.33±4.62*	42.67±18.48#	53.33±18.48	106.67±36.95	85.33±36.95	106.67±36.95	53.33±18.48	106.67±36.95	53.33±18.48	128.00±0.00	53.33±18.48	128.00±0.00
无乳链球菌 <i>Streptococcus agalactiae</i>	5.33±2.31*	42.67±18.48#	53.33±18.48	106.67±36.95	42.67±18.48	42.67±18.48	106.67±36.95	85.33±36.95	85.33±36.95	128.00±0.00	85.33±36.95	128.00±0.00

* 和 # 表示 CFP-OR-NE 分别与 CFP、OR、CFM 相比,差异显著 ($P < 0.05$); 空白辅料各组分质量分数为 1.13% 1,2-丙二醇,22.51% EL-40,76.36% 蒸馏水,无抑菌及杀菌作用
* and # indicates significant difference compared to CFP, OR and CFM, respectively ($P < 0.05$); Blank excipients are composed of 1.13% 1,2-propanediol, 22.51% EL-40, 76.36% distilled water, showing neither bacteriostatic nor bactericidal action

表 4 长期试验结果

时间/月 Time/Month	颜色变化 Color change	CFP 含量 Content of CFP	OR 含量 Content of OR
0	无变化 No change	100.00	100.00
3	无变化 No change	98.90	98.65
6	无变化 No change	97.20	97.10
9	无变化 No change	96.45	96.35
12	无变化 No change	94.80	94.15

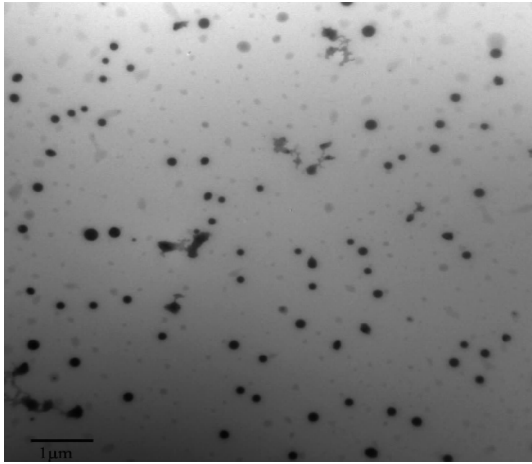


图2 透射电镜下 CFP-OR-NE 的形态(50 000×)
Fig.2 Shape of CFP-OR-NE under the transmission electron microscope(50 000×)

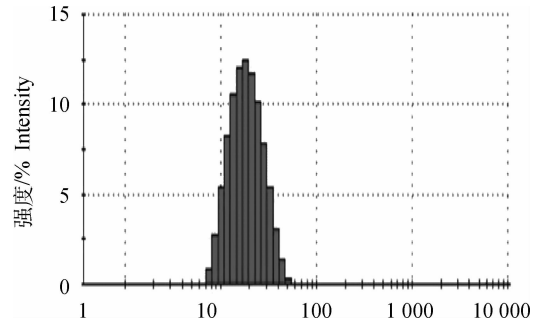


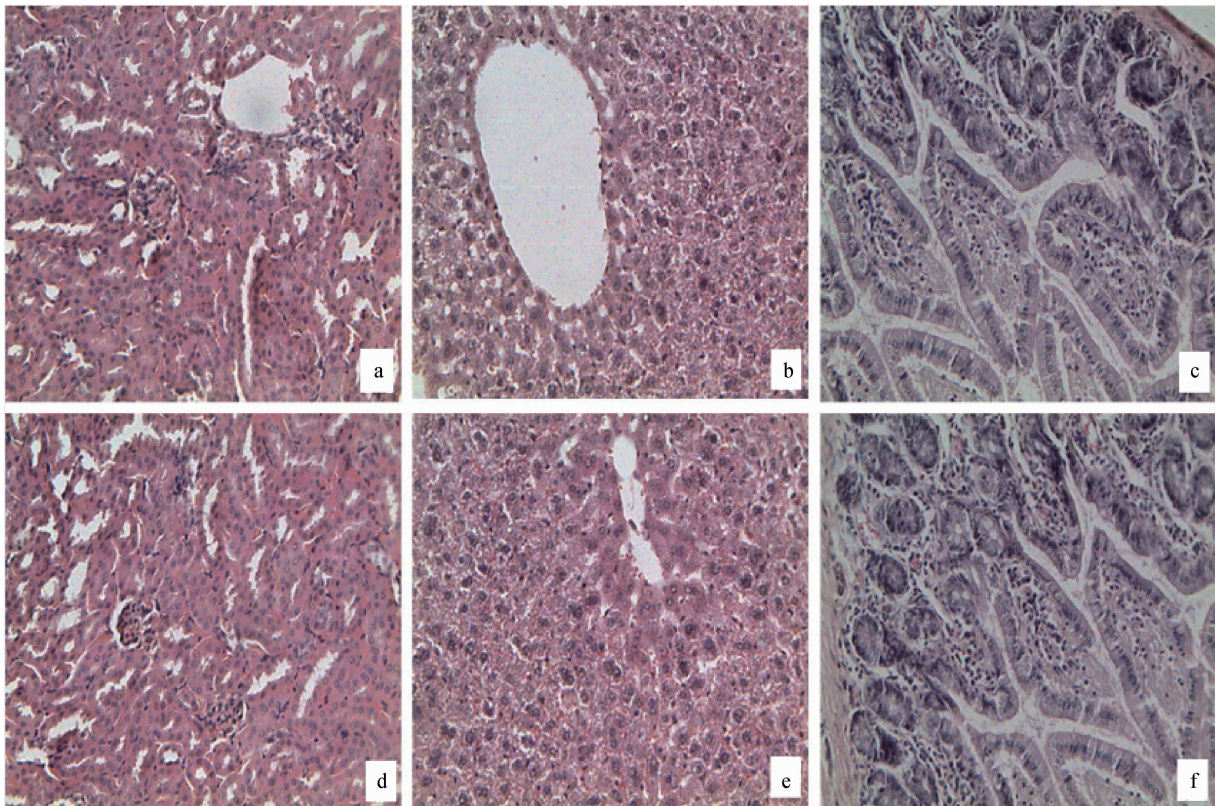
图3 CFP-OR-NE 粒径分布
Fig.3 Droplet size distribution of CFP-OR-NE

果:连续观察 7~14 d,灌胃后 2 d 小鼠出现不同程度精神萎靡,食欲不振等现象,灌胃后 3 d 均恢复正常,小鼠未出现死亡,CFP-OR-NE 对小鼠经口急性毒性最大耐受剂量大于 $1\ 800\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.5 安全性评价

2.5.1 急性毒性试验 预试验结果:各试验组小鼠 24 h 内均未死亡,CFP-OR-NE 的 LD_{50} 不可测,因此对 CFP-OR-NE 采取 MTD 试验;MTD 试验结

2.5.2 组织病理学检查 与对照组相比,给予小鼠最大耐受剂量 CFP-OR-NE 时,试验组肾及小肠组织结构无明显变化(图 4d 和图 4f),可初步认为 CFP-OR-NE 没有肾毒性及肠毒性;试验组肝,轻微



a. 对照组肾;b. 对照组肝;c. 对照组小肠;d. 试验组肾,肾小管上皮细胞排列整齐,管腔清晰可见;e. 试验组肝,轻微出血,少许细胞变性坏死,分界不清;f. 试验组小肠,上皮细胞排列整齐,结构完整,小肠腺发达
a. The kidney of control group;b. The liver of control group;c. The small intestine of control group;d. The epithelial cells of renal tubule arrange neatly and the cavity of renal tubule show visibility in the kidney of test group;e. A small amount of liver cells show minor bleeding, degeneration, necrosis, and unclear boundaries in test group;f. The small intestine epithelial cells arrange neatly, showing structural integrity and developed intestinal glands

图4 56 日龄小鼠肾、肝和小肠(HE,400×)
Fig.4 The kidney, liver and small intestine of mice at 56 days of age(HE,400×)

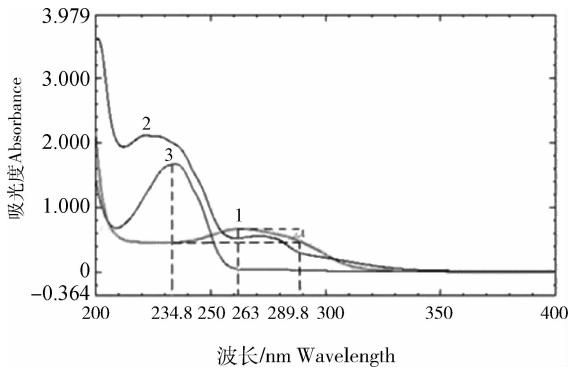
出血,少许细胞变性坏死,分界不清(图 4e),但未引起小鼠死亡。

2.6 方法专属性试验

由图 5、6 可见,CFP 和空白乳的最大吸收峰分别为 263 和 234.8 nm,空白乳在 CFP 最大吸收峰处有一定的吸收。用 UV2450 选点检测功能确定空白乳等吸收点波长为 289.8 nm。选择 263 nm 为 CFP 检测波长,289.8 nm 为参比波长。确定 OR 测定组合波长为 261.6、273.2、284.4 nm。

2.7 标准曲线的绘制

CFP 和 OR 分别在各自含量测定线性范围线



1. CFP 原料药;2. CFP-OR-NE;3. CFP 空白辅料
1. CFP drug; 2. CFP-OR-NE; 3. Blank excipients of CFP

图 5 CFP 相关紫外吸收图谱

Fig. 5 The UV absorbance spectrum on CFP

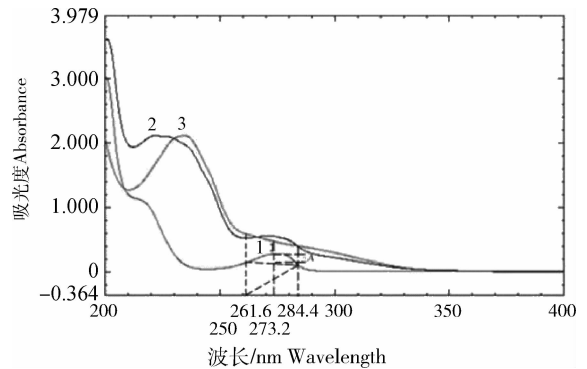
性良好(表 5)。

2.8 回收率试验

平均回收率符合 70%~110%^[12] 的要求(表 6),证明运用多波长紫外分光光度法建立 CFP-OR-NE 有效成分含量分析方法准确度高,适用于该药质量控制。

2.9 试样重复性试验与精密度试验

各试验号 CFP 及 OR 测定的 RSD 均小于 0.6%,进样重复性良好,见表 7。CFP-OR-NE 中 CFP 和 OR 测定的日内、日间精密度 RSD 均小于 5%,日内日间精密度良好,见表 8。



1. OR 原料药;2. CFP-OR-NE;3. OR 空白辅料
1. OR drug; 2. CFP-OR-NE; 3. Blank excipients of OR

图 6 OR 相关紫外吸收图谱

Fig. 6 The UV absorbance spectrum on OR

表 5 CFP 和 OR 含量测定线性方程

Table 5 Linear equations of measurement of CFP and OR concentrations

药物	线性方程	相关系数(r^2)	线性范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
Drug	Linear equation	Correlation coefficient	Linear range
CFP	$A=0.010\ 41C+0.002\ 73$	0.999\ 22	1~100
OR	$A=0.007\ 46C+0.000\ 47$	0.999\ 70	1~100

表 6 回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 6 Results of recovery test($\bar{x} \pm s, n=9$)

试验号	平均回收率 Average recovery		RSD	
	头孢泊肟酯 CFP	牛至油 OR	头孢泊肟酯 CFP	牛至油 OR
1	94.77±2.51	92.70±3.24	2.65	3.50
2	93.79±8.39	89.31±0.86	8.95	0.96
3	87.76±0.35	97.94±1.26	0.40	1.29
4	89.25±2.43	102.50±1.22	2.72	1.19
5	85.34±3.71	91.42±0.59	4.35	0.65
6	72.41±1.24	79.31±0.21	1.71	0.26
7	92.99±3.06	91.82±0.96	3.29	1.05
8	96.20±2.70	102.60±5.71	2.81	5.57
9	88.80±4.03	108.35±1.89	4.54	1.74

表 7 进样重复性试验结果($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 7 Results of repeatability($\bar{x} \pm s, n=6$)

%

试验号 Test number	平均质量浓度 Average mass concentration		平均回收率 Average recovery		RSD	
	头孢泊肟酯 CFP	牛至油 OR	头孢泊肟酯 CFP	牛至油 OR	头孢泊肟酯 CFP	牛至油 OR
1	19.54±0.01	38.83±0.05	97.71±0.05	97.07±0.13	0.05	0.13
2	20.91±0.04	34.96±0.03	104.56±0.19	87.39±0.06	0.18	0.07
3	17.48±0.02	39.76±0.07	87.41±0.12	99.39±0.17	0.14	0.17
4	17.27±0.05	41.05±0.03	86.35±0.27	102.62±0.08	0.31	0.08
5	16.91±0.07	36.62±0.03	84.57±0.35	91.55±0.08	0.41	0.09
6	14.68±0.06	31.71±0.04	73.42±0.29	79.28±0.10	0.39	0.13
7	18.17±0.04	36.83±0.04	90.84±0.23	92.06±0.09	0.25	0.10
8	19.44±0.07	40.04±0.05	97.22±0.35	100.09±0.11	0.36	0.11
9	17.07±0.10	43.34±0.04	85.34±0.48	108.35±0.11	0.56	0.10

表 8 精密度试验结果($\bar{x} \pm s$)Table 8 Determination results of precision($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Concentration	日内精密度 Intra-day precision		日间精密度 Inter-day precision	
		$\bar{x} \pm s$	RSD	$\bar{x} \pm s$	RSD
CFP	2.5	2.37±0.02	0.97	2.37±0.03	1.39
	7.5	7.52±0.07	0.96	7.47±0.12	1.61
	12.5	12.88±0.06	0.47	12.78±0.16	1.25
OR	30	30.64±0.18	0.59	29.59±1.25	4.22
	40	40.83±0.21	0.51	39.39±1.62	4.11
	50	50.65±0.34	0.67	49.76±1.41	2.83

3 讨论

试验选择的水相 pH、CFP 载药量、乳化温度三个因素对 CFP-OR-NE 稳定性影响存在内在联系,推测三者均通过调整表面活性剂有效浓度影响纳米乳稳定性。A. A. Date 等^[1]报道的 CFP 自乳化释药系统在 pH1.2 缓冲液中最为稳定,本试验分别用 pH3.0 和 pH1.2 水相制备纳米乳,发现前者稳定性高于后者。说明 CFP 在中强酸度水相酸性条件下所形成的纳米乳理化性质最为稳定,CFP-OR-NE 的最终 pH 为 6.17,符合口服乳剂相关要求;本试验表明 CFP 载药量越高,纳米乳越不稳定,试验结果与 A. A. Date 等^[1]报道一致,分析原因为部分 CFP 定位在油相与表面活性剂界面干扰了 OR 与

表面活性剂的充分作用,降低了表面活性剂有效浓度。值得注意的是水相 pH 和 CFP 载药量对纳米乳稳定性影响可能并不是孤立的,由于 CFP 在酸性条件下溶解度增加,水相 pH 为 3.0 时位于混合界面的 CFP 可能向水相移动,相对增加了表面活性剂的有效浓度,使纳米乳趋于更加稳定;试验表明最适乳化温度为 30℃,25℃ 温度偏低,界面张力降低效果有限,而 35℃ 温度偏高部分 EL-40 聚氧乙烯链与水之间的氢键可能发生断裂,降低了表面活性剂有效浓度,纳米乳稳定性亦不高。

研究表明某些表面活性剂如 Tween-20 胶束溶液具有阻止肠壁酯酶水解 CFP 作用,机制为 CFP 进入 Tween-20 胶团核心,且聚山梨醇酯类表面活性剂本身对肠壁酯酶有抑制作用^[2,15]。本试验制备

的 CFP-OR-NE 从胶束增溶理论分析可认为是 EL-40 胶束溶液增溶之后形成的,即 CFP 溶解在 OR 中作为油相增溶于 EL-40 胶束溶液,推测 EL-40 和 OR 的双重保护可有效阻止肠壁酯酶将 CFP 水解为亲脂性差的 CPD,有效促进肠腔对 CFP 的吸收。

本试验发现各受试菌对 CFP-OR-NE 的敏感性与对 CFP 和 OR 的敏感性相比相差显著 ($P < 0.05$),推测 EL-40 和 OR 的表面活性和脂溶性增加了 CFP 对细菌细胞膜的渗透作用,从而极大地降低了各受试菌对 CFP 的 MIC 及 MBC。CFP-OR-NE 的抗菌谱广泛,且 CFP 质量分数仅为 0.33%,将 OR 与 CFP 联合应用极大地减少了 CFP 用量,对于减少各受试细菌临床耐药菌株的产生具有重要意义。ORI 为天然植物抗生素具有单药不产生耐药性、与目前使用的抗生素和合成抗菌药无交叉耐药性等优点^[13-14]。本试验为 CFP 与 OR 在临床上的联合应用奠定了一定的基础。测定了 CFP-OR-NE 对常见致病性细菌的 MIC 和 MBC,为 CFP-OR-NE 的药效学研究提供了基础数据。

组织病理学检查给予小鼠最大给药剂量未见肾、肠毒性,虽可引起肝轻微病理损伤,但未致小鼠死亡。本试验制备的 CFP-OR-NE 对小鼠的经口急性毒性最大耐受剂量大于 $1\ 800\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,CFP-OR-NE 为低毒级药物^[16-18],肝轻微出血可能为脱颈致死小鼠未放血引起,少许肝细胞变性的原因可能为药物的首过效应。本试验首次运用多波长紫外分光光度法,针对自制 CFP-OR-NE 中 CFP 和 OR 的含量测定建立了分析方法,CFP 和 OR 平均回收率均在 70%~110%的一般要求范围内^[12],通过此法对 CFP-OR-NE 进行质量监测得出有效期为 21 个月,结合质量评价其他试验结果说明 CFP-OR-NE 稳定性高。

4 结 论

首次制备出 CFP-OR-NE,且质量评价符合规定要求;体外抑菌试验表明 OR 显著降低 CFP 对各受试菌的 MIC 及 MBC;MTD 试验表明 CFP-OR-NE 为低毒药物,组织病理学检查无肾、肠毒性;采用多波长紫外分光光度法成功建立了纳米乳中有效成分含量分析方法,实现了 CFP-OR-NE 的质量监测,计算出其有效期为 21 个月。

参考文献 (References):

[1] DATE A A, NAGARSENKER M S. Design and eval-

uation of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for cefpodoxime proxetil [J]. *Int J Pharm*, 2007, 329(1-2): 166-172.

[2] SYLVIE C M, BROSSARD D, DECROX M O. Cefpodoxime-proxetil protection from intestinal lumen hydrolysis by oil-in-water submicron emulsions [J]. *Int J Pharm*, 1998, 165: 97-106.

[3] PRESHITA P D, ABHIJIT A D, VANDANA B P. Overcoming poor oral bioavailability using nanoparticle formulations-opportunities and limitations [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2012, 9(2): e71-e174.

[4] 吴敬超. 乙酰甲喹纳米乳的制备及药效研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2012.

WU J C. Studies on preparation and efficacy of mequindox nanoemulsion [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2012. (in Chinese)

[5] 曹发昊, 欧阳五庆, 王艳萍. 人参皂苷纳米乳的制备及其免疫佐剂效应研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(4): 439-443.

CAO F H, OUYANG W Q, WANG Y P. Preparation of O/W ginseng saponins-based nanoemulsion and its amplified immune response [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2010, 35(4): 439-443. (in Chinese)

[6] 胡功政. 兽医药剂学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 62.

HU G Z. Veterinary pharmacy [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2008: 62. (in Chinese)

[7] 刘安刚, 李引乾, 孙 娇, 等. 氟苯尼考纳米乳的制备及品质评价[J]. 西北农业学报, 2011, 20(5): 44-49.

LIU A G, LI Y Q, SUN J, et al. Preparation and quality evaluation on florfenicol nanoemulsion [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2011, 20(5): 44-49. (in Chinese)

[8] 吴敬超, 欧阳五庆, 芮 弦, 等. 肉桂醛微乳的制备及其抑菌活性研究[J]. 中草药, 2012, 43(7): 1310-1313.

WU J C, OUYANG W Q, RUI X, et al. Studies on cinnamaldehyde microemulsion preparation and its antibacterial activity [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2012, 43(7): 1310-1313. (in Chinese)

[9] 何 欣, 赵兴华, 欧阳五庆. 雷公藤多苷纳米乳的制备及其理化性质评价[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(14): 1152-1155.

HE X, ZHAO X H, OUYANG W Q. Preparation and physicochemical characteristics of the *Tripterygium wilf ordii* polyglycoside nanoemulsion [J]. *Chinese*

- Journal of Hospital Pharmacy*, 2011, 31(14): 1152-1155. (in Chinese)
- [10] VASILVEV B K, TEREZ E, TEREZ G, et al. Determination of total ozone content from solar radiance measurements at the Terscol Station[J]. *Phys Chem Earth Pt B*, 2000, 25(5-6): 435-438.
- [11] 过乃蓉, 罗庆尧, 陈震华, 等. 三波长分光光度法的原理和应用[J]. *分析化学*, 1983, 11(6): 408-413.
GUO N R, LUO Q Y, CHEN Z H, et al. The principle and application of three wavelength spectrophotometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 1983, 11(6): 408-413. (in Chinese)
- [12] 刘文英. 药物分析[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 98-99.
LIU W Y. *Pharmaceutical analysis*[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007: 98-99. (in Chinese)
- [13] HASAN B, OSMAN S, GULCAN O, et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey[J]. *Food Control*, 2004, 15: 169-172.
- [14] BUSATTA C, VIDAL R S, POPIOLSKI A S. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage[J]. *Food Microbiol*, 2008, 25(1): 207-211.
- [15] CRAUSTE M S, DECROIX M, FARINOTTI R, et al. Cefpodoxime-proxetil hydrolysis and food effects in the intestinal lumen before absorption; *in vitro* comparison of rabbit and human material[J]. *Int J Pharm*, 1997, 157(2): 153-161.
- [16] 徐厚恩, 张 铤. 卫生毒理学基础[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1989: 51-52.
XU H E, ZHANG X. *Health toxicology foundation*[M]. Beijing: Publishing House of Ancient Chinese Medical Books, 1989: 51-52. (in Chinese)
- [17] GB 15193. 3-2003. 急性毒性试验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
GB 15193. 3-2003. *Acute toxicity test*[S]. Beijing: China Standards Press, 2003. (in Chinese)
- [18] 周立国. 药物毒理学[M]. 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2009: 133.
ZHOU L G. *Drug toxicology*[M]. 2nd edition. Beijing: Chinese Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2009: 133. (in Chinese)

(编辑 白永平)