

变;而后研究人员进一步通过反向遗传学发现 VP1 氨基酸 V 94 I 突变使 CVB5 更好适应胰岛 β 细胞株 MIN-6 细胞,认为该位点更重要^[11]。而本研究中 KMA193-09 VP1 的 94 和 95 位氨基酸分别为 I 及 N,这提示该分离株也能较好的在 MIN-6 细胞增殖。

另外, CVB5 病毒在 VP1 的 288 位氨基酸,除 CF219051-06 为赖氨酸(K)外, KMA193-09 与其他病毒分离株均为谷氨酸(E),该位置位于病毒体的表面,赖氨酸为碱性氨基酸,而谷氨酸为酸性氨基酸,这种突变的改变是否影响病毒吸附于细胞表面还有待于进一步的研究^[8]。

本研究阐明了 CVB5 病毒 KMA193-09 分离株结构蛋白 VP1 的基因序列,并对其变异性及与其他 CVB5 的关系进行了分析,为今后 CVB5 的基因库和分子流行病的调查研究提供一定的资料及试验依据。

参考文献

- 1 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京:科学出版社,2001: 579-602
- 2 赵国华,许汴利,朱谦,等. 一起柯萨奇 B5 病毒感染引起疾病暴发的流行病学调查[J]. 中国初级卫生保健,2006,20(8):25-26
- 3 葛琼,严菊英,龚黎明,等. 浙江省 2008 年病毒性脑膜脑炎病原柯萨奇 B 组 5 型病毒 VP1 区基因变异分析[J]. 中国疫苗和免疫,

2010,16(1):38-43

- 4 赵月萍,马明英,王建军,等. 一起爆发型柯萨奇病毒性脑炎的病原分离与鉴定[J]. 安徽预防医学杂志,2001,7(6):401-402
- 5 颜谨,柯昌文,郑焕英,等. 基于 VP4 基因扩增和序列测定快速检测鉴别人肠道病毒的研究[J]. 中国计划免疫,2006,12(6):469-471
- 6 世界卫生组织(WHO)扩大免疫规划和传染性疾病部. 脊髓灰质炎病毒检测手册[R]. 1992
- 7 Oberste MS, Maher K, Williams AJ, et al. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses[J]. Gen Virol, 2006, 87(1): 119-128
- 8 Papa A, Dumaidi K, Franzidou F, et al. Genetic variation of coxsackievirus B5 strains associated with aseptic meningitis in Greece. [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2006, 12(7): 688-691
- 9 Audrey Mirand, Christine Archimbaud, Ce'cile Henquell, et al. Prospective identification of HEV-B enteroviruses during the 2005 outbreak[J]. Journal of Medical Virology, 2006, 78: 1624-1634
- 10 Mark H, Sawyer MD. Enterovirus infections: diagnosis and treatment [J]. Current Opinion in Pediatrics, 2001, 13: 65-69
- 11 Al-Hello H, Davydova B, Smura T, et al. Phenotypic and genetic changes in coxsackievirus B5 following repeated passage in mouse pancreas in vivo[J]. Med Virol, 2005, 75(4): 566-574

(收稿:2011-02-24)

布洛芬肠溶微囊的研制

杜丽娜 张文明 金义光

摘要 目的 以肠溶性高分子材料羟丙基甲基纤维素酞酸酯(HPMCP)为囊材将非甾体抗炎药布洛芬制备成肠溶微囊,对该微囊进行体外释药评价。**方法** 采用 HPMCP 为囊材,硫酸钠溶液为凝聚剂,布洛芬粉末为囊心物,以单凝聚法制成微囊。布洛芬微囊含量测定以无水乙醇为溶媒,超声破碎微囊并提取,用一阶导数分光光度法在 274.2nm 处测定。**结果** 布洛芬微囊无布洛芬刺激性气味,在显微镜下,呈不规则晶体状粒子,粒径 3~25 μ m。微囊含量测定方法简单方便,灵敏度可靠。微囊的载药量为 38.50%。微囊在人工胃液中 2h 内几乎不溶解,而在人工肠液中 2h 释药量达 96.5%。**结论** 将非甾体抗炎药布洛芬制备成肠溶微囊,掩盖了药物的刺激性,可达到胃中不溶而肠中溶解的目的。

关键词 单凝聚法 羟丙基甲基纤维素酞酸酯 肠溶微囊 布洛芬 一阶导数分光光度法

Preparation and Evaluation of Enteric Microcapsules of Ibuprofen. Du Lina, Zhang Wenming, Jin Yiguang. Department of Pharmaceutical Sciences, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China

Abstract Objective To prepare enteric microcapsules of anti-inflammatory drug - ibuprofen with hydroxypropyl methylcellulose phthalate (HPMCP). **Methods** Ibuprofen microencapsulation with HPMCP through coacervation by the addition of sodium sulphate solution was investigated on the basis of the temperature-dependent coacervating formation of the polymer. The first-order derivative spectro-

作者单位:100850 北京,中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所药物化学研究室(杜丽娜、金义光);475004 开封,河南大学药学院(张文明)

通讯作者:金义光,副研究员,硕士生导师,电子信箱:jinyiguang@gmail.com

photometry was used to determine the content of drug at 274.2nm, and it was proved to be a simple and accurate method. **Results** The enteric microcapsules were anomalistic particles under the microscope. Its diameter was 3 – 25 μ m. Drug load was 38.50%. The drug encapsulated in the microcapsules was not released in the artificial gastric juice, whereas in artificial enteric juice the release of microcapsules was 96.5% within 2h. **Conclusion** The unfavorable stimuli of drug was covered up when its enteric microcapsules were prepared, and the enteric microcapsules would not be soluble in the stomach but soluble when they arrived at the small intestine.

Key words Coacervation; Hydroxypropyl methylcellulose phthalate (HPMCP); Enteric microcapsules; Ibuprofen; First – order derivative spectrophotometry

以布洛芬为代表的丙酸类、以双氯灭痛为代表的乙酸类和以阿司匹林为代表的甲酸类等非甾体抗炎药具有解热镇痛、抗炎抗风湿、抗血小板聚集等作用,是临床常用药物,但它们也具有味苦、胃刺激性、体内半衰期短和贮存中易分解等缺陷^[1]。因此,常将非甾体抗炎药制备成肠溶制剂。另外,肠溶微囊同时具有肠溶性、易分散性和释药均一的特点,是非甾体抗炎药的较理想剂型。

羟丙基甲基纤维素酞酸酯(hydroxypropyl methylcellulose phthalate, HPMCP) 又称羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯,是一种新型的性能优良的药剂肠溶辅料,分别于 1981 年和 1983 年载入日本与美国的药典。它可单独或与其他辅料共用,制备缓释颗粒剂、片剂、胶囊剂、微囊剂和其他缓控释制剂。

HPMCP 为白色或类白色流动性良好的薄片状或颗粒状轻质粉末。市售 HPMCP 根据其酞酸取代度的不同分为 HP50、HP55、HP55S (日本信越公司)。“HP”之后所附的数字代表的是能够溶解聚合物的缓冲液 pH 的 10 倍数字, S 表明相对分子质量较高。它在不同种属动物的慢性和急性实验中没有发现致畸作用和毒性,通常被认为是无毒无刺激性的材料。HPMCP 理化性质稳定,固体粉末在 50℃ 放置 30 天后,产生的游离酞酸最大含量为 3.15%,而同样条件下醋酸纤维素酞酸酯释放出的游离酞酸高达 12.68%。在弱碱性环境中(1.5% NaHCO₃ 溶液)放置 70h, HPMCP 只检出 1.13% 的酞酸,而醋酸纤维素酞酸酯在相同条件下可达到 3.45%。HPMCP 在室温保存 3 ~ 4 年后理化性质仍保持稳定;在 40℃ 和 75% 相对湿度时,可保持 2 ~ 3 个月稳定;在 25℃ 和 70% 相对湿度时,暴露在紫外线下,可以保持 3 个月^[2,3]。

由于 HPMCP 的优越性,已作为肠溶缓控释辅料用于薄膜包衣、微囊、丸剂、片剂、胶囊、共挥发物(co-evaporate)、多颗粒(multiparticulate systems)、纳米粒和微球等多种剂型^[4~18]。

微囊化(microencapsulation)是常用的制剂技

术。药物微囊化后可达到下述目的^[19]:①掩盖药物的不良气味及口味;②提高药物的稳定性;③防止药物在胃内失活或减少对胃的刺激性;④使液态药物固化以便于应用与贮存;⑤减少复方药物的配伍变化;⑥缓释或控释药物;⑦使药物浓集于靶区;⑧可将活细胞或生物活性物质包裹。根据微囊优点和 HPMCP 肠溶性可推断,将非甾体抗炎药制成肠溶微囊能提高药物稳定性并减少不良反应。

材料与方法

1. 材料和仪器:布洛芬(山东新华制药厂);HPMCP (HP55, 日本信越公司);其他试剂均采购自北京化学试剂公司;水为蒸馏水。

ML-902 定时恒温磁力搅拌器(上海浦东分析仪器厂);SHB-III 型循环式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);UV2501-PC 型紫外可见分光光度计(日本岛津);ZRS-8G 型智能药物溶出仪(天津大学无线电器材厂);XSB-3 型光学显微镜(上海浦东分析仪器厂);奥林巴斯倒置光学显微镜(日本);PHS-3C 型精密酸度计(上海精密科学仪器有限公司);FD-1-55 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)。

2. 布洛芬肠溶微囊的制备:(1)处方:布洛芬粉末(100 目)1.6g; HP55 0.5g; Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.4g; 20% Na₂SO₄ 溶液 10ml; 11.5% Na₂SO₄ 溶液 60ml; 5% 醋酸溶液;蒸馏水适量。11.5% Na₂SO₄ 稀释溶液的配制:其浓度由凝聚囊系统中的 Na₂SO₄ 浓度(如为 a%)加 1.5% [(a+1.5)%], 稀释液体积为凝聚囊系统体积的 3 倍,稀释液温度为 15℃。(2)微囊制备:将 Na₂HPO₄ · 12H₂O 溶于 9ml 蒸馏水中,加入 HP-55, 磁力搅拌使其完全溶解,补加蒸馏水至 10ml,备用。在磁力搅拌下将布洛芬粉末缓慢加入上述 HP55 溶液,使呈混悬液。在约 200r/min 速度搅拌下缓缓滴加 20% Na₂SO₄ 溶液(约耗时 7min),然后于 50℃ 水浴中继续以同样速度搅拌,产生絮状物(微囊),10min 后停止搅拌,静置片刻,微囊沉降,弃去大部分微囊上清液,将剩余微囊混悬液加入到 60ml 15℃ 的 11.5% Na₂SO₄ 溶液中,搅拌 10min,将微囊转移至 30ml 5% 醋酸溶液中固化 30min。固化后静置片刻,倾出部分上清液,用稀醋酸溶液将微囊洗 3 次,再用蒸馏水洗 3 次,过滤,用乙醚洗至无布洛芬气味,再用水洗至无乙醚气味。滤至滤液含有少量水分时,转移至 10ml 5% 甘露醇溶液中^[20],于冷冻干燥机

中压强为 5.2 ~ 5.5 Pa、温度为 -55℃ 状态下减压冷冻干燥 6h 即得。

3. 微囊的质量评价: 肉眼观察布洛芬肠溶微囊。取少许布洛芬肠溶微囊加适量蒸馏水中, 验证其分散性。取少量布洛芬肠溶微囊分散于蒸馏水中, 于显微镜下观察其形态。

4. 布洛芬肠溶微囊的含量测定: (1) 测定方法的选择: 取适量布洛芬微囊装入 10ml 容量瓶中, 加入乙醇, 水浴超声片刻, 微囊全部消失, 容量瓶底部有凝胶态物质, 经微孔滤膜 (0.45 μm) 过滤, 取续滤液在 250 ~ 280nm 扫描, 同时对 HP55 的乙醇处理溶液和布洛芬乙醇溶液进行扫描。(2) 标准曲线的制备: 精密称取布洛芬对照品 10.8mg 于 100ml 容量瓶中, 用无水乙醇溶液溶解, 配成 108 μg/ml 的布洛芬标准液。然后分别量取此溶液 1.0、4.0、6.0、8.0、10.0ml 置于 10ml 容量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度。以无水乙醇为空白对照, 于 250 ~ 280nm 扫描, 取一阶导数, 在 274.2nm 处测定 ΔA 值, 将数据进行回归处理, 得回归方程。(3) 回收率试验: 精密称取布洛芬对照品适量, 按处方比称取空白辅料, 按“测定方法的选择”项下方法将所得数据代入回归方程计算回收率。(4) 布洛芬肠溶微囊的含量测定: 精密称取布洛芬微囊 9.8mg 于 10ml 容量瓶中, 加入适量无水乙醇溶液, 水浴超声片刻, 使微囊消失, 乙醇稀释至刻度, 用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤器过滤, 取续滤液 1ml 于 10ml 容量瓶中, 用无水乙醇稀释至刻度。以无水乙醇为空白对照, 在 250 ~ 280nm 扫描, 取一阶导数并测定 274.2nm 处 ΔA 值, 代入回归方程, 求得布洛芬微囊中布洛芬含量。(5) 稳定性考察: 将对照品溶液 (108 μg/ml) 于室温放置 5 天后, 测定其吸收值。

5. 布洛芬肠溶微囊的体外溶出实验^[21]: (1) 布洛芬肠溶微囊在人工胃液中的溶出实验: 采用《中国药典》2000 版二部附录 X 溶出度测定第二法 (桨法)。量取 500ml 人工胃液 (pH1.2 的盐酸溶液) 于溶出杯中, 恒温 37 ± 0.1℃。精密称取布洛芬肠溶微囊 0.5g 置于杯中, 以 50r/min 的转速运转, 定时吸取溶出液 5ml, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 并补充同温等体积的人工胃液 5ml 于烧杯中。取续滤液 1ml 于 10ml 容量瓶中并补加无水乙醇至刻度, 用 0.45 μm 滤膜过滤。以无水乙醇为空白对照, 取续滤液在 250 ~ 280nm 扫描并取一阶导数。(2) 布洛芬肠溶微囊在人工肠液中的溶出实验: 参照在人工胃液中的溶出实验, 量取 500ml 人工肠液 (磷酸盐缓冲液, pH6.8) 于溶出杯中, 恒温 37 ± 0.1℃。精密称取布洛芬微囊 0.5g 置于杯中, 以 50r/min 的转速运转, 定时吸取溶出液 5ml, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 并补充同温等体积的人工肠液 5ml 于烧杯中。取续滤液 1ml 于 10ml 容量瓶中, 滴加浓盐酸溶液 3 ~ 4 滴使其至酸性, 则 HP55 与布洛芬以白色絮状沉淀析出, 加无水乙醇溶解布洛芬, 并稀释至刻度。用 0.45 μm 滤膜过滤, 以无水乙醇为空白对照, 取续滤液在 250 ~ 280nm 扫描并取一阶导数, 将 274.2nm 处 ΔA 值代入回归方程计算累积释放百分率。

结 果

布洛芬肠溶微囊为无臭、白色易流动粉末状颗粒。粒子易分散在水中, 证明分散性良好。显微镜下观察布洛芬肠溶微囊为不规则颗粒状, 直径在 3 ~ 25 μm。囊心物颗粒镶嵌于囊材之中, 药物周围包有一透明薄膜。

由 HP55 的乙醇处理溶液和布洛芬乙醇溶液的扫描图可看出 (图 1A), 布洛芬微囊溶解物和布洛芬乙醇溶液的吸收曲线趋势基本一样, 而 HP55 乙醇液的吸收曲线基本成一直线, 但对布洛芬的紫外测定有微量干扰。为消除 HP55 的影响, 对各溶液的吸收曲线进行一阶导数处理 (图 1B), 发现布洛芬在 274.2nm 处存在最大谷值, 而 HP55 溶液的导数值为零。因此可以选用无水乙醇为溶媒, 在 274.2nm 处用一阶导数分光光度法测定微囊中布洛芬的含量。

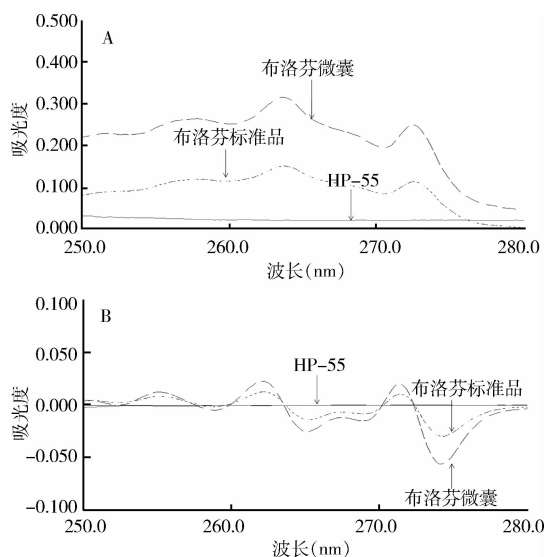


图 1 布洛芬肠溶微囊紫外图谱

A. 紫外吸收光谱图; B. 一阶导数紫外图谱

布洛芬线性方程为: $\Delta A = -2.809 \times 10^{-4} C + 5.373 \times 10^{-4}$ ($r = 0.9999$), 线性范围为: 10.8 ~ 108 μg/ml。回收率平均值为 100.4%, RSD 为 0.52%, 符合要求。布洛芬微囊中布洛芬含量为 38.50%。被测溶液在配制 5 天内吸收值无变化, 证明该方法较稳定。

在胃液中布洛芬微囊几乎不溶, 没有药物溶出。而在人工肠液中 10min 即释放 26.97%, 120min 释放已达 96.5% (图 2)。

讨 论

单凝聚法是制备微囊较为常用的方法, 它是在含

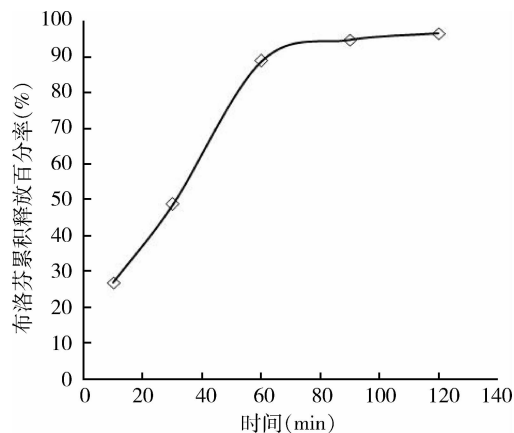


图 2 布洛芬肠溶微囊在人工肠液
(磷酸盐缓冲液, pH6.8) 中释放曲线

有囊心物(药物)的高分子包囊材料溶液中,加入强亲水性溶液(如乙醇、丙酮溶液)或中性电解质(如硫酸钠、硫酸铵溶液)作为凝聚剂,使囊材析出并凝聚在药物颗粒表面形成微囊的一种相分离方法。

单凝聚法一般所用囊材为明胶,而本实验用的是优良的肠溶性材料 HPMCP。本制备过程是基于 HPMCP 的分子结构,以增加温度和加入电解质的协同作用使 HPMCP 凝聚包裹药物布洛芬,形成布洛芬肠溶微囊。所制得的非甾体抗炎药布洛芬微囊在胃液中不溶在小肠液中溶解,还有缓释作用,既减少了对胃的刺激性,又减少了服药次数。

布洛芬易溶于乙醇,而 HP55 在乙醇中只能溶胀^[4,22]。因此,布洛芬 HPMCP 微囊的含量测定方法采用在乙醇溶液中经超声使微囊破碎、HP-55 溶胀,从而使布洛芬溶于乙醇。

布洛芬易溶于乙醚而 HPMCP 不溶,可用乙醚洗去没有被包裹的布洛芬。在冷冻干燥时加入 5% 甘露醇可以改善微囊的外观及分散性。

采用一阶导数分光光度法测定布洛芬肠溶微囊中药物含量,操作快速简便、结果准确、重现性好。

参考文献

- 1 陈新谦,金有豫,汤光.新编药理学[M].北京:人民卫生出版社,2004:192
- 2 罗明生,高玉惠.药剂辅料大全[M].成都:四川科学技术出版社,2006:1232
- 3 郭圣荣.药用高分子材料[M].北京:人民卫生出版社,2009:57
- 4 杜德才.肠溶包衣材料在药物制剂中的应用[J].中国药业,2001,10(5):62-63

- 5 徐武军,高强,徐耀,等.基于 HPMCP 包覆介孔 SBA-15 的 pH 敏感药物缓释系统[J].化学学报,2008,66(14):1658-1662
- 6 Mandal A S, Biswas N, Karim K M, et al. Drug delivery system based on chronobiology - a review[J]. J Control Release, 2010, 147: 314-325
- 7 Wei G B, Knoch A, Laicher A, et al. Simple coacervation of hydroxypropyl methylcellulose phthalate II. Microencapsulation of ibuprofen[J]. Int J Pharm, 1995, 124: 97-105
- 8 Torres D, Garcia - Encina G, Seijo B, et al. Formulation and in vitro evaluation of HPMCP - microencapsulated drug - resin complexes for sustained release of diclofenac[J]. Int J Pharm, 1995, 121: 239-243
- 9 邵自强,徐雅青,王文俊,等.羟丙基甲基纤维素酞酸酯的制备与性能测定[J].华西药理学杂志,2008,23(2):183-184
- 10 Tang X, Tian X, Ci L. Preparation and evaluation of pH - dependent gradient - release pellets for TCM[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2004, 30(10):1079-1087
- 11 Klayraung S, Viernstein H, Okonogi S. Development of tablets containing probiotics: effects of formulation and processing parameters on bacterial viability[J]. Int J Pharm, 2009, 370: 54-60
- 12 谢涛,刘汉清,蒋鸣.肠溶胶囊剂的囊壳材料及其制备研究概况[J].现代中药研究与实践,2010,24(3):77-80
- 13 Ferrari P C, Oliveira G F, Chibebe F C S, et al. In vitro characterization of coevaporates containing chitosan for colonic drug delivery[J]. Carbo Polym, 2009, 78: 557-563
- 14 Oliveira G F, Ferrari P C, Carvalho L Q, et al. Chitosan - pectin multiparticulate systems associated with enteric polymers for colonic drug delivery[J]. Carbo Polym, 2010, 82: 1004-1009
- 15 Wang X Q, Dai J D, Chen Z, et al. Bioavailability and pharmacokinetics of cyclosporine A - loaded pH - sensitive nanoparticles for oral administration[J]. J Control Release, 2004, 97(3):421-429
- 16 Makhlof A, Tozuka Y, Takeuchi H. Design and evaluation of novel pH - sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery[J]. Eur J Pharm Sci, 2010: In press
- 17 Qi R, Ping Q N. Gastrointestinal absorption enhancement of insulin by administration of enteric microspheres and SNAC to rats[J]. J Microencapsul, 2004, 21(1):37-45
- 18 Rafati H, Talebpour Z, Adlnasab L, et al. Quality by design: optimization of a liquid filled pH - responsive macroparticles using Draper - Lin composite design[J]. J Pharm Sci, 2009, 98(7):2401-2411
- 19 陆彬.药物新剂型与新技术[M].北京:人民卫生出版社,2003:165
- 20 娄月芬,陆锦芳.莪术油微囊栓塞剂的制备[J].中国医药工业杂志,2003,34(8):391-392
- 21 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2010:附录 85
- 22 卞筱泓,黄文龙.纤维素类肠溶包衣材料的应用[J].药学进展,2001,25(3):155-159

(收稿:2011-01-14)

(修回:2011-06-20)