

文章编号: 1004-7271(2006)03-0375-05

· 研究简报 ·

恩诺沙星微胶囊的制备及其缓释性能的研究

胡 鲲¹, 朱泽闻², 杨先乐¹, 鲍 莹¹, 宋 晴¹, 王 璐¹

(1. 上海水产大学农业部渔业动植物病原库, 上海 200090;

2. 全国水产技术推广总站, 北京 100026)

摘 要 分别以羧甲基纤维素和淀粉为壁材, 利用冷冻干燥法在不同的工艺条件下制备得到恩诺沙星微胶囊制剂。缓释试验表明, 以羧甲基纤维素和淀粉为壁材的恩诺沙星微胶囊均表现出明显的缓释作用, 且羧甲基纤维素的缓释性能优于淀粉, 冷冻温度的降低能促进微胶囊缓释性能。其中, 恩诺沙星原料药在 4.5 min 时的溶出率达到 99.4%。-40℃和-50℃条件下制备的以羧甲基纤维素为壁材的恩诺沙星微胶囊在 14 h 的溶出率分别为 99.2%和 99.7%; -40℃和-50℃条件下制备的以淀粉为壁材的恩诺沙星微胶囊在 12 h 的溶出率为 99.4%和 99.6%。

关键词 冷冻干燥; 恩诺沙星; 微胶囊; 缓释

中图分类号 S 948 文献标识码: A

Preparation of microencapsulation of enrofloxacin by freezing-dry and determination of controlled-release properties

HU Kun¹, ZHU Ze-wen², YANG Xian-le¹, BAO Ying¹, SONG Qing¹, WANG Lu¹

(1. Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090;

2. The National Fishery Technical Extension Center, Beijing 100026)

Abstract Enveloped by cellulose CM and starch, the enrofloxacin microencapsulations were prepared by freezing-dry respectively. The results of controlled-release tests implied that the enrofloxacin microencapsulation enveloped by both cellulose CM and starch have showed the distinct controlled-release properties. The controlled-release properties of cellulose CM are superior to those of starch. The lower freezing temperature can improve the controlled-release properties. While the releasing percentage of the enrofloxacin raw material reached 99.4% after 4.5 min, the ones of the enrofloxacin microencapsulation enveloped by cellulose CM at -40℃ and -50℃ reached 99.2% and 99.7% respectively. The ones of the enrofloxacin microencapsulation enveloped by starch at -40℃ and -50℃ reached 99.4% and 99.6% respectively.

Key words freezing-dry; enrofloxacin; microencapsulation; controlled-release

收稿日期 2005-12-25

基金项目: 上海市教委青年基金项目(03-129); 上海市教育委员会 E-研究院建设项目(E03009); 上海市重点学科建设项目(Y1101) 资助

作者简介: 胡 鲲(1976-)男, 湖北沙市人, 讲师, 在读博士生, 主要从事微生物、水产品质量安全等方面的研究。E-mail: khu@shfu.edu.cn

通讯作者: 杨先乐, E-mail: xlyang@shfu.edu.cn

药物剂型具有改变药物性质、控制释放速度、降低毒副作用、影响药物在动物体内的代谢转化规律和引导药物靶向等作用^[1-4]。相比农药、兽药丰富多样的剂型,目前我国渔药剂型的基础理论研究相对滞后,渔药剂型种类极其单一,剂型结构还停留在以传统的粉剂、水剂等第一代剂型为主的阶段^[4,5]。这些渔药剂型在生产中暴露出一系列的缺陷:释放不稳定、药效低、抗逆性差等。微胶囊(microencapsulation)是将分散均匀的固体颗粒、液滴或气体完全包封在囊壁壁材中的一项新型技术,形成直径约为5~500 μm 的微小胶囊^[6,7]。微胶囊具有良好的溶解分散、缓释、抗外界干扰等性能,成为备受关注的三大控释系统之一^[1,7],被广泛地应用到医药、化工、生物、食品和饲料等领域。目前微胶囊制剂在水产养殖领域主要应用于水产饲料^[8,9]和渔用疫苗^[9-11]上,关于渔药微胶囊的研究报道极少,也未见商品化的渔药微胶囊制剂。恩诺沙星(enrofloxacin,简称ENR)是一种吡酮酸衍生物(pyridonecarboxylic acid),通过抑止细菌DNA螺旋酶而达到抑菌的效果^[4],已在渔药和兽药中广泛使用^[12]。本文采取冷冻干燥^[13]的方法,以淀粉和羧甲基纤维素(CMC)为壁材,制备ENR微胶囊制剂,比较了不同工艺条件和不同包埋材料下ENR微胶囊的缓释性能。以期为渔药微胶囊剂型的研制和开发提供参考和借鉴。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂

SAVANT Novalyph-NL150型冷冻干燥机,Agilent 1100高效液相色谱仪,MICROSON超声波破碎仪(22.5Khz),国产恒温水浴振荡器。ENR原料药(纯度99.5%),购自浙江新昌国邦兽药厂。乙腈、四丁基溴化铵、可溶性淀粉、CMC为国产化学纯试剂,甲醇为国产色谱纯试剂。

1.2 ENR微胶囊的制备

按照1:1(w/w)的比例,将ENR分别与淀粉、羧甲基纤维素混合,加入少许盐酸溶解,并配制成40%的水溶液,振荡15 min,分装于冷冻瓶中,分别在-20 $^{\circ}\text{C}$ 、-30 $^{\circ}\text{C}$ 、-40 $^{\circ}\text{C}$ 、-50 $^{\circ}\text{C}$ 下,抽真空,冷冻干燥,制备ENR微胶囊样品。

1.3 ENR浓度的测定

精确称取10.0 mg恩诺沙星,加少量盐酸溶解,用双蒸水相定容至100 mL棕色容量瓶中,制成恩诺沙星母液,保存于2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ (保存期不超过3个月)。稀释恩诺沙星母液为0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同浓度梯度的ENR标准溶液,上高效液相色谱仪(HPLC),以浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,以峰面积为纵坐标制作ENR标准曲线。色谱条件为:RP-ODS C18柱(15 cm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈:四丁基溴化铵溶液=5:95(V/V);波长278 nm;流速1.5 mL/min;柱温40 $^{\circ}\text{C}$,进样量为20 μL 。根据待测样品药物峰面积计算药物浓度。

1.4 ENR微胶囊产率和微胶囊效率的测定

1.4.1 实际微胶囊中总ENR质量的测定

取10.0 g ENR微胶囊样品,加入0.5 mL盐酸,用双蒸水定容到100 mL,45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,超声波破碎仪处理30 min,利用1.3的方法测定ENR浓度,依据样品体积计算ENR质量,得到微胶囊中总ENR质量。

1.4.2 微胶囊表面ENR质量的测定

取10.0 g ENR微胶囊样品,加入0.5 mL盐酸,用双蒸水定容到100 mL,利用1.3的方法测定ENR浓度,依据样品体积计算ENR质量,得到微胶囊中总ENR质量。

1.4.3 微胶囊产率和微胶囊效率的计算

微胶囊产率 = 实测微胶囊 ENR 总质量 / 理论加入的 ENR 总质量 \times 100% ;

微胶囊化效率 = (实测微胶囊 ENR 总质量 - 微胶囊表面 ENR 质量) / 实测微胶囊 ENR 总质量 \times 100%。

1.5 ENR 微胶囊制剂的缓释性能

分别取 ENR 微胶囊制剂、ENR 原料药,置于用双层纱布缝制透析袋(2.5 cm ± 2.5 cm)中。透析袋置于装有 198 mL 水和 2 mL 盐酸的烧杯中,40 °C,80 r/min 水浴振荡。在不同时间点取溶液 0.2 mL,利用 1.3.1 的方法测定 ENR 浓度,测定不同时间点析出的 ENR 的浓度。以药物全部溶出为 100%,计算药物溶出率。

2 结果

2.1 ENR 微胶囊的制备

分别以 CMC 和淀粉为壁材,按照 1:1(w/w)的比例制备 ENR 微胶囊。分别采取 -20 °C、-30 °C、-40 °C 和 -50 °C 的冷冻温度,制得 ENR 微胶囊制剂 A、B、C、D 和 E、F、G、H。ENR 微胶囊样品均呈乳白色粉末细腻、均匀,溶解性能良好。ENR 微胶囊样品的制备时间如图 1,ENR 微胶囊制剂 A 和 E 的制备时间分别为 17.5 h 和 17.0 h;ENR 微胶囊制剂 B 和 F 的制备时间分别为 12.5 h 和 11.5 h;ENR 微胶囊制剂 C 和 G 的制备时间分别为 8.2 h 和 7.5 h;ENR 微胶囊制剂 D 和 H 的制备时间分别为 8.2 h 和 8.0 h(图 1)。

2.2 ENR 标准曲线的制作

HPLC 法测定 ENR,基线走势平稳,ENR 的保留时间约为 9.4 min,药峰与杂质峰分离良好(图 2),其标准曲线方程为 $y = 0.0923x + 0.0238$,相关系数为 0.9788。

2.3 微胶囊产率和微胶囊化效率

ENR 微胶囊产率和微胶囊化效率如表 1。在本文实验条件下,利用冷冻干燥法制备 ENR 微胶囊的产率较高,恒定在 96% 以上,而微胶囊化效率则随着冷冻温度的降低而提高。以 CMC 为壁材的 ENR 微胶囊 A、B、C、D 的产率和微胶囊化效率分别为 96.5%、98.5%、98.4%、97.4% 和 78.2%、83.6%、88.4%、89.6%;以淀粉为壁材的 ENR 微胶囊 E、F、G、H 的产率和微胶囊化效率分别为 97.5%、99.5%、98.2%、98.5% 和 80.1%、85.1%、92.0%、92.5%。

表 1 ENR 微胶囊产率和微胶囊化效率(n=3)

Tab.1 The microencapsulation yield and microencapsulation efficiency(n=3)

样品名	微胶囊 A	微胶囊 E	微胶囊 B	微胶囊 F	微胶囊 C	微胶囊 G	微胶囊 D	微胶囊 H
制备温度(°C)	-20	-20	-30	-30	-40	-40	-50	-50
产率(%)	96.5	97.5	98.5	99.5	98.4	98.2	97.4	98.5
微胶囊化效率(%)	78.2	80.1	83.6	85.1	88.4	92.0	89.6	92.5

2.4 ENR 微胶囊制剂的缓释性能

ENR 原料药的溶出曲线如图 3,ENR 原料药 3.5 min、4.0 min 和 4.5 min 时的溶出率分别为 94.3%、99.0% 和 99.4%。相比原料药,以 CMC 和淀粉为壁材的 ENR 微胶囊制剂均表现出明显的缓释作用,

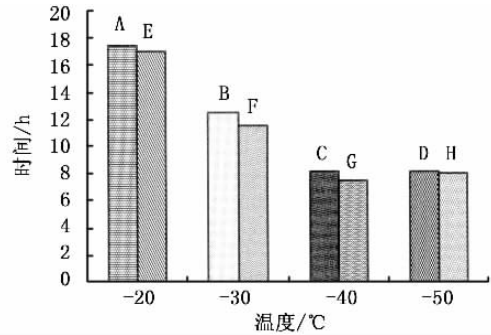


图 1 冷冻温度对 ENR 微胶囊制备时间的影响

Fig.1 Effects of the temperature on the time of preparing ENR microencapsulation



图 2 恩诺沙星色谱图

Fig.2 The chromatography of ENR

ENR 药物溶出曲线分别如图 4 和图 5:A 在 8.0h 的溶出率为 99.4%、B 在 12 h 的溶出率为 98.8%、C 在 14 h 的溶出率为 99.2%、D 在 14 h 的溶出率为 99.7%、E 在 6.0 h 的溶出率为 98.5%、F 在 10 h 的溶出率为 99.5%、G 在 12 h 的溶出率为 99.4%、H 在 12 h 的溶出率为 99.6%。

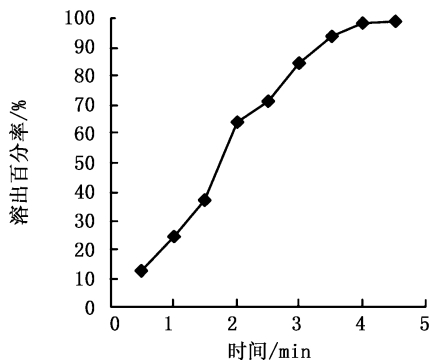


图 3 ENR 原料药溶出曲线

Fig.3 The release curves of ENR

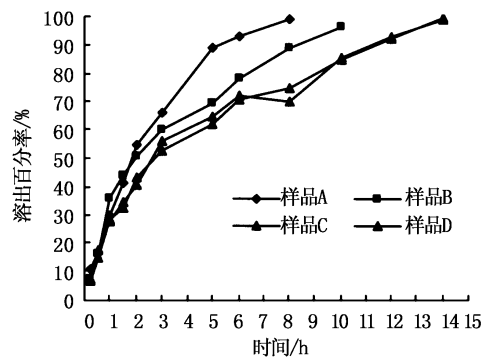


图 4 以 CMC 为壁材的 ENR 微胶囊制剂释放速度

Fig.4 The release curves of ENR microencapsulation enveloped by CMC

3 讨论

3.1 微胶囊制备工艺

微胶囊制备方法有许多^[14],其中冷冻干燥法作为一种物理方法,稳定、安全(不需高温、强电流等),可控性强(只需控制冷冻温度和真空度两个参数),被广泛地应用。本文采取冷冻干燥法制备的 ENR 微胶囊制剂粉末细腻、均匀,可溶性和分散性良好,符合水产实践生产中对新型渔药剂型的要求。CMC 和淀粉分别属于半合成型^[7]纤维素类衍生物和天然型^[7]的多糖,两者均无毒、来源广泛、成本低廉^[15-17]且对光热稳定,是良好的微胶囊壁材材料。

采用冷冻干燥法制备微胶囊的过程中,冷冻温度是需要控制的主要工艺参数。本文的试验结果表明:在 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冷冻温度下 ENR 微胶囊的制备时间极大短于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。冷冻温度越低,制备微胶囊的时间越短。在不同冷冻温度条件下以 CMC 和淀粉为壁材的微胶囊样品的产率均高于 96.0%,该结果说明利用冷冻干燥法制备 ENR 微胶囊过程中 ENR 损失极少,适于扩大化推广。而以 CMC 和淀粉为壁材的微胶囊样品的微胶囊化效率在 78.2%~92.5% 之间,且微胶囊化效率随着冷冻温度的降低而提高。该结果证明低温能提高药物的包埋效率,能减少游离在微胶囊颗粒表面的药物。

3.2 影响微胶囊缓释性能的因素

在相同的溶解条件下,影响微胶囊缓释性能的因素包括:制备工艺、微胶囊壁材性质、微胶囊粒径、微胶囊囊壁的厚度等^[1],而这几个方面的因素又相互关联、相互影响。沈宝亨认为微胶囊制备工艺参数对微胶囊颗粒粒径影响很大,比如温度^[3]。而微胶囊粒径又会对药物的释放速度、生物利用度和靶向性等特性产生影响^[1]。此外值得注意的是,一般认为制备的微胶囊颗粒越小、表面积越大,微胶囊的制备质量越好。但如果粒径过小易产生粘连现象,直接影响操作和制剂制备。本文试验结果表明,与原料药相比,微胶囊制剂具有明显的缓释作用,采用冷冻干燥法制备时冷冻温度越低,制备得到的微胶囊颗粒缓释效果越好。

本试验结果还表明:以 CMC 为壁材的微胶囊缓释性能好于以淀粉为壁材的微胶囊的缓释性能。这

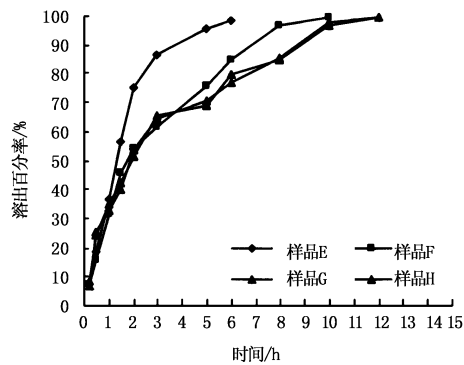


图 5 以淀粉为壁材的 ENR 微胶囊制剂释放速度

Fig.5 The release curves of ENR microencapsulation enveloped by starch

个试验结果说明,微胶囊颗粒的缓释性能与制备微胶囊的壁材有关。其原因可能与 CMC 和淀粉的分子空间结构有关:CMC 是一种半合成的高分子聚合物,空间结构均匀统一,而淀粉作为一种天然的高分子聚合物,是由直链和支链两种空间构形分子的混合物。潘卫三认为,不同的壁材具有不同的孔隙率和降解性能,药物镶入壁材的网状空隙,空隙越大越不均匀,药物的释放速度就越快^[1]。

3.3 微胶囊的缓释过程

微胶囊中的包埋的囊心(药物)通过溶解、渗透或扩散等过程,透过囊壁释放出来,其释放速度通过囊壁壁材的化学成分、厚度、硬度、孔径大小等加以控制^[1,6,7]。微胶囊囊心的释放分为三个阶段:药物从微胶囊囊壁中扩散释放、聚合物水解使囊壁分子量变小和低分子碎片溶解^[1]。本试验结果显示,药物在溶解过程的前期(3 h 左右)均呈现出较快的溶解趋势,也就意味着 ENR 从囊壁中扩散释放的速度相对后二个过程较快。该结果提示我们:提高微胶囊制剂缓释性能,应该把重点放在采取有效措施(如筛选空间结构均匀、络合度高的壁材等)控制药物从微胶囊囊壁的扩散过程。某些疏水性附加剂能通过填充微胶囊囊壁,达到增塑作用,从而减缓药物从微胶囊囊壁中扩散,提高缓释性能^[1]。

3.4 微胶囊渔药缓释性能的应用价值

传统的粉剂、水剂等渔药制剂存在着药效低、对水产动物刺激大^[4]以及动物体内血药浓度波动大^[1]等问题。微胶囊作为新型的二元剂型具有缓释、保护囊心(药物)等作用,特别适合水产养殖实践环境中使用。祝万菊等^[18]发现恩诺沙星缓释剂能显著提高药物在猪体内的生物利用度。通过药物缓释达到提高药物的生物利用度成为人们的共识。但目前微胶囊制剂应用于渔药中尚鲜有大规模应用的报道。缓释制剂是发展控释制剂的技术基础^[19]。开发微胶囊渔药制剂对提高渔药的生物利用度、减少渔药在水产动物体内的残留、降低渔药对养殖环境的污染具有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] 潘卫三. 新药制剂技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [2] 魏树礼. 生物药剂学与药物动力学[M]. 北京: 中国医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997.
- [3] 沈宝亨, 李良铸, 李明晔, 等. 应用药物制剂技术[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000.
- [4] 杨先乐. 新编渔药手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [5] 邓永强, 汪开毓. 水产药物制剂生产存在的问题与对策[J]. 科学养鱼, 2004, 7: 42.
- [6] 李志强, 任彦荣. 微胶囊技术及其应用研究进展[J]. 化学推进剂与高分子材料, 2004, 26(6): 19-31.
- [7] 田云, 卢向阳, 何小解, 等. 微胶囊制备技术及其应用研究[J]. 科学技术与工程, 2005, 5(1): 44-47.
- [8] 邓岳松. 鳊鱼仔鱼微型胶囊饲料的初步研究[J]. 水产科技, 2001, 22(5): 8-10.
- [9] 窦海鸽, 刘彦, 明召华. 微胶囊技术在水产养殖上的应用[J]. 饲料与营养, 2004, 3: 18-20.
- [10] 余俊红, 纪伟尚. 鲈鱼口服生物胶囊疫苗的研究[J]. 高技术通讯, 2001, 11(3): 15-18.
- [11] 陈舒泛, 华元渝. 生物微囊渔药的研制[J]. 淡水渔业, 2003, 33(6): 14-16.
- [12] 郑宗林, 唐俊, 喻文娟, 等. RP-HPLC 法测定中华绒螯蟹主要组织中的恩诺沙星及其代谢产物[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(2): 156-162.
- [13] 胡鲲, 杨先乐, 龚幼兰, 等. 恩诺沙星微胶囊的制备及其抗紫外、热稳定性的研究[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 25-29.
- [14] 刘晓庚, 谢亚桐. 微胶囊制备方法的比较[J]. 粮食与食品工业, 15(1): 28-31.
- [15] 邓岳松. 鱼用含鞣酐的明胶-羧甲基纤维素钠微囊制剂[J]. 吉首大学学报, 2001, 22(4): 23-28.
- [16] 夏士册. 用木屑制备羧甲基纤维素[J]. 淮阴师范学院学报(自然科学版), 2004, 3(3): 236-239.
- [17] 赵龙涛, 李入林. 用棉花杆制备羧甲基纤维素[J]. 河南化工, 2002, (4): 18-20.
- [18] 祝万菊, 邓旭明, 张艳萍, 等. 恩诺沙星缓释溶液在猪体内的药物动力学及生物利用度[J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25(3): 335-338.
- [19] 魏凤环, 田景振, 王怀忠, 等. 缓释控释技术[J]. 山东中医杂志, 2000, 19(9): 554-557.