

超临界流体制备 BSA 包衣微丸及释药特性

肖菊香 马晓文 莫 炜 宋后燕[△]

(复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系-分子医学教育部重点实验室 上海 200032)

【摘要】 目的 采用自行设计的 CO₂ 超临界流体(supercritical carbon dioxide, ScCO₂)包衣设备研究肠溶包衣参数,为开发蛋白质及多肽的口服制剂提供工艺基础。**方法** 以载牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)颗粒为微丸核心,以 EUDRAGIT L100-55 作为 pH 敏感的肠溶包衣材料,采用正交表研究压力、温度、增塑剂和包衣持续时间等不同的工艺参数组合,并考察肠溶包衣微丸的形态学和体外释放特性,以选择最优的二氧化碳超临界流体包衣工艺。**结果** 压力为 20 MPa、温度为 35 ℃、使用 40%增塑剂的条件下包衣 30 min,所得 BSA 微丸在模拟胃液中释放量小于 5%,在模拟肠液中迅速释放,符合肠溶包衣的要求。**结论** 得到了通过 ScCO₂ 制备肠溶微丸的最优参数组合,为二氧化碳超临界流体包衣的进一步研究提供了基础。

【关键词】 二氧化碳超临界; 蛋白质; 肠溶包衣

【中图分类号】 R 944.5 **【文献标识码】** A

Preparation of BSA pellets by supercritical carbon dioxide fluid and *in vitro* evaluation

XIAO Ju-xiang, MA Xiao-wen, MO Wei, SONG Hou-yan[△]

(Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education-Department of Biochemistry & Molecular Biology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai, 200032, China)

【Abstract】 Objective To prepare enteric-coated BSA pellets by supercritical carbon dioxide (ScCO₂) and to screen an optimum coating art by ScCO₂. **Methods** An L₉(3⁴) orthogonal table was designed to select an optimum coating art by ScCO₂, BSA pellets were characterized by morphology and *in vitro* release profile. **Results** *In vitro* evaluation of BSA pellets coated by parameters of 20 MPa, 35 ℃, 40% plasticizer for 30 min showed that the cumulative release percentage of BSA in 0.1 mol/L HCl was less than 5%. **Conclusions** An optimum coating art by ScCO₂ has been successfully screened and enteric-coated BSA pellets are successfully produced.

【Key words】 supercritical carbon dioxide fluid; protein; enteric-coated

19 世纪 80 年代, Hannay 等发现超临界流体(supercritical fluid, SCF)具有显著的溶解能力。到了 20 世纪后期超临界萃取技术(supercritical fluid extraction, SFE)蓬勃发展,在我国被广泛应用于中药有效成份的提取^[1,2]。除了在萃取领域的广泛应用外,超临界流体技术在其他方面的应用优势也日渐受到重视。其中超临界流体超微粉体的制备技术和基于超临界流体的包覆技术在医药食品以及生物材料的包埋上已经开始研究和应用^[3,4]。目前, ScCO₂ 技术在制备微球^[5]方面已得到广泛的应用。而在利用 ScCO₂ 技术进行造粒方面, Martin 等^[6]利用

ScCO₂ 制备得到含有蛋白质和高分子材料的微粒,王亭杰等^[7]利用 ScCO₂ 作为溶剂,在微粒约为 130 μm 的模拟药物载带颗粒的玻璃珠表面实现了石蜡的包覆造粒。

众所周知,利用生物技术开发的蛋白质及治疗性多肽类药物发展迅速,许多种类已经进入临床使用。但其传统的给药方式仍然是注射给药,这不仅给病人带来了治疗和经济上的困难,而且限制了药物对心血管等慢性疾病的治疗,因此多肽及蛋白质类药物口服制剂的研究被提上日程。但是传统的药物包覆技术要借助于有机溶剂来溶解包覆剂,有机

[△]Corresponding author E-mail: hysong@shmu.edu.cn

溶剂会使蛋白质及多肽类药物的活性丧失,因而蛋白质口服剂型的研制成为难题。ScCO₂ 技术可避免或减少有机溶剂的使用,同时 CO₂ 可以循环利用以降低成本。本文旨在将 ScCO₂ 的这种特有性质引入到蛋白质口服微丸制剂的研制过程中,开发不利用有机溶剂进行蛋白质及多肽类药物包覆的绿色工艺。

材料和方法

仪器 Glatt mini3 流化床(德国 Glatt 公司); HA 超临界二氧化碳流体包衣装置(南通华安超临界萃取有限公司); S-520 型扫描电镜(日本 HITACHI 公司); 紫外分光光度计(日本岛津 UV-260)。

试剂 牛血清白蛋白(BSA, 上海捷贝思基因技术有限公司); 空白丸芯(乳糖型, 710/850 μm, 上海运宏化工有限公司); 聚乙烯吡咯烷酮(PVP_{k30}, 国际特品公司); EUDRAGIT L100-55(德国罗姆公司); 柠檬酸三乙酯(TEC, 美国 Sigma 公司)。

载 BSA 丸芯的制备 以 30%PVP 水溶液为粘

合剂, 搅拌下将 BSA 溶解其中制成溶液, 将空白丸芯加入包衣机中, 采用底喷法载药。包衣机各参数设定如下: 喷嘴直径 1 mm, 进风温度 39 °C, 床内温度 35 °C, 雾化压力 1.2 bar, 流化压力 0.5 bar, 喷液速率 0.6 mL/min。喷药结束后继续进风 10 min 使小丸干燥。按下式计算微丸的上药率:

$$\text{上药率} = (\text{药物实际含量} / \text{药物理论含量}) \times 100\%$$

BSA 包衣微丸的工艺筛选 所采用的超临界二氧化碳流体包衣装置设备如图 1 所示, 包覆过程在静态反应釜内完成, 静态反应釜为密闭装置, 设有二氧化碳进气口和二氧化碳放气口, 上端配置了有调速电压控制的搅拌棒。

包衣反应的模式图如图 2 所示: 将载药丸芯与包衣材料同时加入静态反应釜, 向其中通入二氧化碳气体, 控制反应釜内的压力和温度使二氧化碳液化(二氧化碳的临界压力 = 7.28 MPa, 临界温度 = 31.6 °C), 然后开启搅拌棒使反应釜内容物发生充分的混匀。搅拌结束后, 打开放气口使反应釜内压力下降, 二氧化碳流体迅速变为气体释放出去。气体释放完全后取出包衣微丸即可。

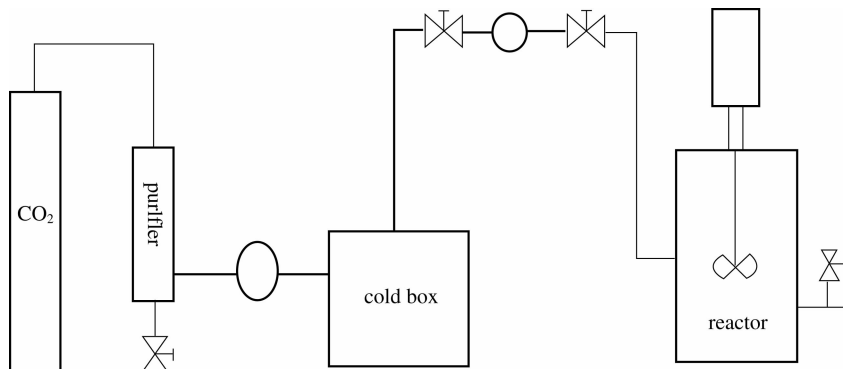


图 1 超临界二氧化碳流体包衣装置示意图

Fig 1 Schematic diagram of supercritical carbon Dioxide coating machine

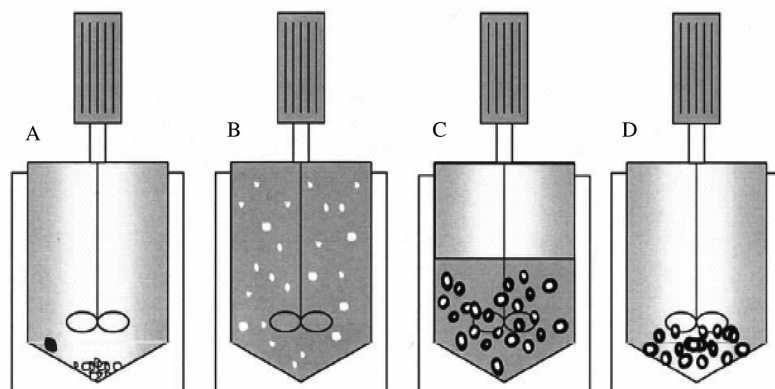


图 2 静态反应釜包衣流程示意图

Fig 2 Schematic diagram of supercritical carbon dioxide coating process

BSA 包衣微丸的检测

形态学检测 使用扫描电镜检测了 BSA 包衣

微丸的外观特点, 以检测在二氧化碳超临界流体中包衣材料的包覆情况。

体外释放实验 按《中国药典》2000年版二部附录XD第2法测定。采用0.1 mol/L HCl溶液和pH 6.8 PBS溶液模拟胃和肠道环境,称取小丸适量,先将小丸加入0.1 mol/L HCl 750 mL中释放2 h,保持温度为37℃,转速为100 r/min,定时取样,同时补充等量等温介质。然后往HCl溶液里加入0.2 mol/L Na₃PO₄ 250 mL溶液,调整其pH值为6.8,保持其他条件,定时定点取样。将得到样本迅速用0.8 μm滤膜过滤,取续滤液测定吸收度并根据标准曲线计算累计释放度。

BSA标准曲线制备方法如下:分别用0.1 mol/L HCl及pH 6.8 PBS配制一定浓度的BSA溶液,于200-400 nm的波长范围内进行紫外扫描,确定其敏感吸收峰。同时用相应同种介质对方量的辅料进行稀释,观察其在敏感波长处是否干扰。随后,分别用这两种介质将BSA做梯度稀释后读取敏感波长处的吸收度,通过线性回归作出标准曲线。

BSA包衣微丸的制备 以筛选所得的工艺参数制备BSA包衣微丸,并通过检测其体外释放特性评价该工艺参数的可行性。

结 果

载药微丸上药率的计算 通过流化床底喷法制备的载药微丸均匀圆整,称取载药微丸研磨溶解后,用0.8 μm滤膜过滤,取续滤液测定吸收度。最后得到小丸上药率为97.6%。

BSA肠溶微丸的制备 蛋白质或治疗性多肽类药物在酸性环境中容易变性失活,因而在制备口服制剂时通常将其设计成肠溶的形式。EUDRAGIT L100-55是一种在pH 5以上特定溶解的肠溶材料,可以使蛋白质避免暴露在胃酸环境中从而保护药物的活性。由于超临界CO₂流体的溶解能力与流体的温度、压力等有着密切的关系,所以在包衣过程中要考察不同参数设置对包衣效果带来的影响,使其真正达到肠溶的目的,即《中国药典》2000年版中规定微丸的酸中累积释放度<5%。

本文选用BSA微丸在模拟胃酸中2 h的累积释放度为参考指标,采用L₉(3⁴)正交表考察在包衣过程中设置的不同参数对包衣效果的影响(表1),以寻找最合适的工艺路线。

从表中可以看出,药物在酸中累积释放度最小的参数组合为A₃B₃C₃D₃。从各包衣参数的组合结果看,反应罐内压力和增塑剂的使用对肠溶包衣微丸的制备影响较大,增加增塑剂的使用量可以明显提高包衣效率,显著降低微丸的酸中释放度,提示其

对包衣材料的成膜机制有重要作用,原因在于增塑剂可以降低EUDRAGIT材料的玻璃化温度,促进其在较低温度下成膜。

表1 包衣方法参数筛选

Batch	A	B	C	D	Accumulative release in acid period(%)
1	10	32	0	15	77.4
2	10	35	30	30	29.2
3	10	40	40	60	24.4
4	15	32	30	60	12.6
5	15	35	40	15	12.6
6	15	40	0	30	31.9
7	20	32	40	30	4.2
8	20	35	0	60	24.8
9	20	40	30	15	2.3
K1	43.7	31.4	44.7	30.8	
K2	19	22.2	14.7	21.8	
K3	10.4	19.5	13.7	20.6	
Range	33.3	11.9	31	10.2	

A: Coating press(MPa); B: Coating temperature (°C); C: Plasticizer TEC (%); D: Coating time(min); K: Mean(%).

BSA肠溶微丸形态学检测 BSA肠溶微丸的扫描电镜照片如图3所示。1号微丸在未使用增塑剂的条件下,表面有大量颗粒状包衣材料的覆盖。7号微丸在包衣过程中使用增塑剂后,电镜照片显示包衣材料在其表面形成了致密的肠溶衣薄膜。

结合上述微丸在酸中的累积释放度情况,可见微丸表面的包衣形态决定了其肠溶的效果。致密的包衣薄膜才能够使微丸达到肠溶的目的,从而使蛋白质或多肽类药物的活性不受胃液酸性环境的破坏。

BSA肠溶微丸体外释放实验 本文测定了不同工艺制备的微丸在0.1 mol/L HCl溶液和pH 6.8 PBS溶液模拟的胃和肠道环境中的释放度,如图4所示。可见,BSA在酸中的释放度各不相同,但是进入碱液模拟的人工肠液后迅速释放。其中,7号和9号微丸的酸中累积释放度均<5%,达到了肠溶的目的。

BSA包衣微丸的制备 通过正交实验得到的工艺参数为:反应罐内压力20 MPa,温度40℃,以40%TEC为增速剂,包衣持续时间60 min。但是由于40℃的温度可能会损伤蛋白质的生物活性,而30 min的反应时间已足够原料搅拌均匀,所以我们在进一步研究中采用A₃B₃C₃D₃组合,即包衣反应罐内压力为20 MPa,温度为35℃,以40%TEC为增速剂,包衣持续时间为30 min的参数组合。上述工艺条件下制备所得的BSA包衣微丸,检测其中3批的体外释放特性,其累积释放度如图5所示,酸中释放度均在5%以内,符合肠溶的要求。

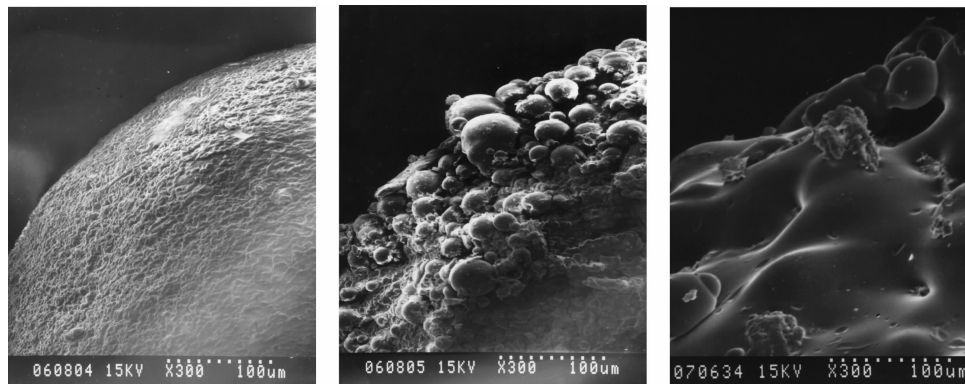


图3 BSA微丸扫描电镜照片

Fig 3 SEM photomicrograph of BSA coating pellets

A; Uncoated; B; Pellets batch 1; C; Pellets batch 7

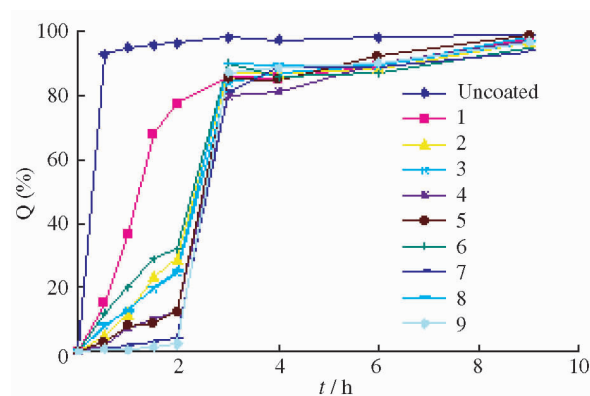


图4 BSA微丸体外释放曲线

Fig 4 Release kinetics of BSA pellets

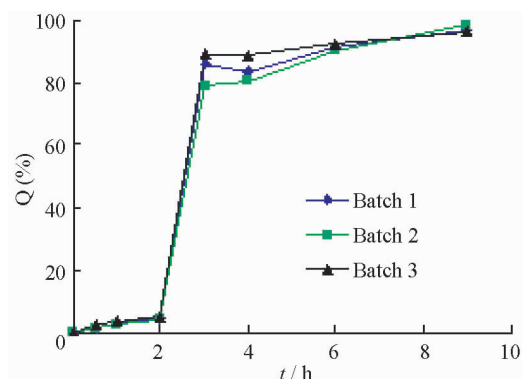


图5 BSA微丸体外释放曲线

Fig 5 Release kinetics of BSA pellets

讨 论

本文初步确定了利用超临界 CO_2 流体在静态反应釜内制备蛋白质肠溶包衣微丸的工艺路线。这种基于超临界流体的包覆技术避免在包覆过程中使用有机物质作为溶剂,从而保护蛋白质及多肽类药物的活性不受损害,有望实现蛋白质及多肽类药物的口服给药^[8,9]。同时与传统的流化床包衣相

比,超临界 CO_2 流体包衣的操作简单,而且反应时间大大缩短,存在巨大的发展空间。

由于本实验采用 BSA 作为模拟药物,所以对包衣过程中蛋白质活性的检定尚需进一步的实验验证,对口服微丸制剂的其他检测也需要进一步完善。但是超临界流体技术介导的包覆技术显示出了巨大的优势,将会给医药及食品领域的包覆工艺带来全新的改革。

致谢 复旦大学药学院药剂学教研室蒋新国老师及陶炜兴师兄为本实验提供了帮助和指导。

参 考 文 献

- [1] 周高宁,邹丽丽,李柏林. 超临界二氧化碳流体及其主要应用[J]. 安徽化工,2006,140(2):16-19.
- [2] 张海英,张国英,段更利,等. 加哇挥发油成分的超临界 CO_2 流体萃取及 GC-MS 定性分析[J]. 复旦学报:医学版,2007,34(4):584-587.
- [3] 吴彩娥,许克勇,李元瑞. 超临界流体制备超细粉体及纳米胶囊技术研究进展[J]. 农业工程学报,2004,20(7):264-269.
- [4] 邓政兴,张润,李立华,等. 生物材料制备新方法——超临界流体技术[J]. 化学世界,2004,2:99-103.
- [5] 张岩,陈岚,李保国,等. 超临界 CO_2 抗溶剂法制备乙基纤维素微球试验[J]. 化学工程,2005,33(3):63-67.
- [6] Martin JW, Jianyuan Hao, Owen RD, et al. The production of protein-loaded microparticles by supercritical fluid enhanced mixing and spraying[J]. *Control Release*, 2005, 101: 85-92.
- [7] 王亭杰,堤敦司,金涌. 用石蜡- CO_2 超临界流体快速膨胀在流化床中进行细颗粒包覆[J]. 化工学报,2001,52(1):50-55.
- [8] Chies C, Ribeiro DSI, Richard J, et al. A supercritical fluid-based coating technology 1: Process considerations[J]. *J Microencapsulation*, 2003, 20(1):87-96.
- [9] Ribeiro DSI, Chies C, Richard J, et al. A supercritical fluid-based coating technology 2: Solubility considerations[J]. *J Microencapsulation*, 2003, 20(1):97-109.

(收稿日期:2007-11-30;编辑:王蔚)