

网络出版时间:2012-12-21 17:28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20121221.1728.010.html>

硝唑尼特纳米乳的制备及其急性毒性测定

郭建军, 欧阳五庆, 郑星星, 周莹, 宋冠男, 李会芳, 沈巧艳

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**制备硝唑尼特纳米乳, 并对其理化性质及安全性进行评价。**【方法】**以纳米乳的载药量、稳定性和毒性为考察指标, 筛选合适的油相、表面活性剂、助表面活性剂和助溶剂, 再利用伪三元相图筛选最佳配方并制备硝唑尼特纳米乳。用透射电镜观察硝唑尼特纳米乳的形态, 用激光粒度分析仪测定其粒径分布范围、多分散系数(PDI)和 Zeta 电位, 通过留样观察和加速试验考察其稳定性, 采用急性毒性试验评估其安全性。**【结果】**硝唑尼特纳米乳配方中各组分的最优配比(质量分数)为: 二甲基亚砜 0.3%, 硝唑尼特 0.45%, 肉桂醛 6.0%, 1,2-丙二醇 5.0%, 聚氧乙烯醚蓖麻油 30.0%, 蒸馏水 58.25%。制备出的硝唑尼特水包油型纳米乳呈规则的圆球型, 粒径为 5~30 nm, 平均粒径 13.8 nm, 外观澄清透明; 稳定性试验结果显示, 其在 -4℃、室温和 60℃ 条件下储藏均未出现浑浊、分层或药物析出等现象, 稳定性表现良好; 急性毒性试验表明, 该纳米乳半数致死量(LD₅₀)为 5 391 mg/kg, 属实际无毒的药物, 有良好的安全性。**【结论】**成功研制了硝唑尼特纳米乳, 其稳定性好, 安全性高。

【关键词】 硝唑尼特; 纳米乳; 伪三元相图; 急性毒性试验

【中图分类号】 S859.5⁺3

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)01-0019-06

Preparation and toxicity test of Nitazoxanide nanoemulsion

GUO Jian-jun, OUYANG Wu-qing, ZHENG Xing-xing, ZHOU Ying,

SONG Guan-nan, LI Hui-fang, SHEN Qiao-yan

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

Abstract: **【Objective】** The purpose of this study was to establish nanoemulsion formula and evaluate its quality and acute toxicity. **【Method】** The appropriate oil phase, surfactant, cosurfactant and cosolvent were selected according to the drug loading, stability and toxicity of nanoemulsion and then the optimum formula was designed using pseudo-ternary phase diagram. The configuration was measured by TEM and the particle size, polydispersity and zeta potential were measured by LPSA. The stability was tested by high speed centrifugation and optic observation while acute toxicity was evaluated by LD₅₀. **【Result】** The optimum formula of Nitazoxanide nanoemulsion was composed of 0.3% (m/m) DMSO, 0.45% (m/m) Nitazoxanide, 6.0% (m/m) cinnamaldehyde, 5.0% (m/m) 1,2-propanediol, 30.0% (m/m) EL-40 and 58.25% (m/m) distilled water. The Nitazoxanide nanoemulsion droplet(O/W) was spherical under TEM and the particle size ranged from 5 to 30nm, with the average diameter of 13.8nm. Nitazoxanide nanoemulsion remained transparent and clear after high speed centrifuge test and being kept at -4℃, room temperature and 60℃, respectively. The acute toxicity test demonstrated that LD₅₀ was 5 391 mg/kg, which indicated that it was Non-toxic. **【Conclusion】** The Nitazoxanide nanoemulsion was successfully prepared with good stability

【收稿日期】 2012-04-20

【基金项目】 陕西省重大科技创新专项(K332020916)

【作者简介】 郭建军(1984—), 男, 河南焦作人, 在读硕士, 主要从事新兽药开发研究。E-mail: gjjun81@126.com

【通信作者】 欧阳五庆(1960—), 男, 陕西凤翔人, 教授, 博士生导师, 主要从事新兽药研发、纳米生物技术和细胞生物学研究。E-mail: oywq506@sina.com

and high security.

Key words: Nitazoxanide; nanoemulsion; pseudo-ternary phase diagram; acute toxicity test

硝唑尼特(Nitazoxanide)是 20 世纪 80 年代美国勒马克实验室(Romark Laboratories)首次研制成功的一种新型兽药,化学名为 2-乙酰氧基-N-(5-硝基-2-噻唑)苯甲酰胺[2-(acetolyloxy)-N-(5-nitro-2-thiazolyl) benzamide],简称为 NTZ。NTZ 的分子式为 $C_{12}H_9N_3O_5S$,相对分子质量为 307.3,熔点为 202 °C,常温下比较稳定,是一种淡黄色的结晶状粉末,不溶于水,微溶于乙醇,可溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砷(DMSO)等有机溶剂^[1]。

临床试验证明,NTZ 具有很强的抗寄生虫、抗菌和抗病毒活性^[2-3],对隐孢子虫、肠贾第鞭毛虫、贝氏等孢子虫、阿米巴原虫、蛔虫、钩虫、毛首鞭虫、肝片吸虫、艰难梭菌、幽门螺旋菌、轮状病毒、肝炎病毒等都有理想的治疗效果,具有广谱、低毒、高效、低残留的特点,其液体制剂于 2002 年被美国 FDA 批准作为第一个专门用于治疗儿童隐孢子虫感染的药物上市,剂型为混悬剂^[4]。2006-06,世界著名医学杂志《柳叶刀》发表的文章证实,NTZ 对轮状病毒导致的儿童腹泻也具有较好的疗效。近些年,科学家们发现 NTZ 能够治疗艾滋病患者的某些肠道寄生虫的感染,这无疑给艾滋病患者带来了福音。目前,对 NTZ 的实际作用机制尚不清楚,但通常认为其与抑制丙酮酸盐-铁氧化还原蛋白氧化还原酶(PFOR)的酶依赖性电子转移反应有关,此反应对厌氧能量代谢至为重要^[5]。当其作用于 PFOR 时,丙酮酸盐和焦磷酸硫酸素辅助因子的结合受到阻碍,电子转移受到干扰,病原体的能量代谢受到破坏,从而可以抑制病原体的繁殖^[6]。

目前,临床上使用的 NTZ 剂型为片剂和混悬剂,其他剂型几乎没有。片剂为传统和常用剂型,制剂时加入赋形剂压片制成,口服后药物溶出速度较慢,生物利用度低,且对于某些特殊病人或者动物有不易吞服的缺陷;混悬剂中的药物微粒粒径一般为 0.5~10 μm ,属于热力学不稳定的粗分散体系,生物利用度不高,且稳定性较差。

纳米乳(Nanoemulsion)是由表面活性剂(助表面活性剂)、油相及水相在适当比例下形成的一种外观澄清透明、低黏度、各相同性且热力学稳定的分散体系,乳滴粒径分布在 1~100 nm,是一种新型药物载体,具有增溶、缓释、靶向和高生物利用度等优点,

近年来倍受医药界的关注^[7]。本试验针对 NTZ 临床推广应用中存在的问题,结合先进的纳米技术,将 NTZ 制备成纳米乳剂(NTZ-NE),并考察了其性质,以期为 NTZ 新剂型的研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 Nicomp388/Zeta PALS 激光粒度测定仪(Zetasizer Nano ZS 型),英国 Malvern Instrument 公司生产;EB-280 型电子天平,日本 Shimadzu 公司生产;JME-1230 型透射电镜,日本 JEOL 公司生产;TGL-16B 型高速离心机,湖南星科科学仪器有限公司生产;SKP02.420 电热恒温培养箱,黄山市恒丰医疗器械有限公司生产。

1.1.2 主要试剂 NTZ 原料药,安徽金奥化工有限公司生产;肉桂醛,武汉远成共创科技有限公司生产;吐温-80、RH-40、EL-40,天津市恒星化学试剂制造公司生产;无水乙醇,西安三浦化学试剂有限公司生产;1,2-丙二醇,天津市天力化学试剂有限公司生产;1,3-丁二醇,中国医药集团上海化学试剂公司生产;聚乙二醇 200、聚乙二醇 400、聚乙二醇 600,天津市科密欧化学试剂有限公司生产;异丙醇,四川西陇化工有限公司生产;二甲基亚砷,国药集团化学试剂有限公司生产;苏丹红 III,上海试剂三厂生产;亚甲蓝,天津市福晨化学试剂厂生产。

1.1.3 试验动物 7 日龄依莎粉蛋雏鸡,由陕西省武功县某种鸡场提供。

1.2 NTZ-NE 配方的筛选

1.2.1 表面活性剂 由于纳米乳液为口服剂型,需用安全性高、乳化能力强、稳定性好的表面活性剂。另外,由于离子型表面活性剂溶血作用较强,故在制备纳米乳时首选非离子型表面活性剂。目前,国内可供药用的非离子表面活性剂种类较少,常用的有吐温-80、聚氧乙烯醚蓖麻油(EL-40)和聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH-40)等。本试验以吐温-80、EL-40 和 RH-40 为表面活性剂制备 NTZ-NE,以纳米乳载药量、稳定性和毒性为考察指标,筛选制备 NTZ-NE 的表面活性剂。

1.2.2 油相 以三乙酸甘油酯、油酸、菜籽油、香芹酚和肉桂醛为油相,制备 NTZ-NE,考察其对 NTZ 的溶解性,筛选最佳油相。

1.2.3 助表面活性剂 良好的助表面活性剂可以帮助乳化,也可以提高纳米乳的 Zeta 电位值,从而使药物更稳定。将待选的助表面活性剂和已选的表面活性剂混合均匀后加入到已选定的最佳油相中,充分搅拌,边搅拌边逐滴加入蒸馏水,直至乳液能像水一样滴下为止,静置后观察体系能否澄清透明,并对其进行低温、室温、高温和加速稳定性考察。待选的助表面活性剂有无水乙醇、1,2-丙二醇、1,3-丁二醇、异丙醇、聚乙二醇 200、聚乙二醇 400 和聚乙二醇 600。

1.2.4 助溶剂 为了提高 NTZ-NE 的载药量,可选用适当量的助溶剂加入到 1.2.2 筛选的油相中,以增加油相的溶解度。依据 NTZ 的性质,选用二甲基亚砜(DMSO)和 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)作为助溶剂。但由于 DMF 有一定毒性,且在助溶效果上和 DMSO 无显著差异,故选用 DMSO 为助溶剂。以表面活性剂/助表面活性剂/油相/蒸馏水体系为药用载体,考察体系中不同质量分数(0.1%,0.15%,0.2%,0.25%,0.3%,0.35%,0.4%,0.45%和 0.5%)DMSO 对 NTZ-NE 形成及载药量的影响。

1.2.5 表面活性剂与助表面活性剂的质量比(K_m)

根据选定的表面活性剂/助表面活性剂和油相,通过伪三元相图确定 K_m 值。将表面活性剂和助表面活性剂按 7:1,6:1 和 5:1 的质量比混匀,然后分别与确定的油相按 9.7:0.3,9.5:0.5,9:1,8.75:1.25,8.5:1.5,8:2,7:3,6:4,5:5,4:6,3:7,2:8,1:9 的质量比混匀,逐滴加入蒸馏水,并不断搅拌。搅拌过程中该体系会由稀变黏稠,再由黏稠变稀,直至液体澄清透明如水样流动时为止。记录当体系突然由黏稠状态变稀时的临界加水量,并计算该临界体系中各成分的质量分数。分别以表面活性剂/助表面活性剂、油相、水作为相图的 3 个顶点,用 Origin 8.0 软件绘制伪三元相图,根据乳区的大小确定 K_m 值。

1.2.6 NTZ-NE 配方的确定 根据 1.2.1、1.2.2、1.2.3、1.2.4 和 1.2.5 的试验结果,筛选出最佳的 NTZ-NE 配方,用此配方制备 NTZ-NE。

1.3 NTZ-NE 结构类型鉴别

采用离心法^[8]鉴别 NTZ-NE 的结构类型,即将制备好的纳米乳液以 4 000 r/min 离心 30 min,观察是否有浑浊、分层、药物析出等情况,若仍澄清透明,可判断该乳液为纳米乳。采用染色法^[9]对该纳米乳的类型进行鉴别,将亚甲蓝和苏丹红Ⅲ分别滴

加到制备的样本中,如果蓝色扩散速度明显大于红色,则可判定该纳米乳为水包油(O/W)型,反之则为油包水(W/O)型,二者速度一样则为双连续型。

1.4 NTZ-NE 的形态观察

将 NTZ-NE 用蒸馏水稀释 5 倍,滴加在覆盖有碳膜的铜网上,室温下自然干燥后,用质量分数 2.0%的磷钨酸负染,通过透射电镜检测纳米乳的形态^[10]。

1.5 NTZ-NE 的粒径分析

将 NTZ-NE 用蒸馏水稀释 8 倍后,用激光粒度分析仪测定其平均粒径(Z-Average)、多分散系数(PDI)和粒径分布(Size distribution by intensity)。

1.6 NTZ-NE 的稳定性考察

1.6.1 留样观察试验 将 NTZ-NE 分别于-4℃、室温和 60℃下保存,于 1,3,6 个月 after 取样观察其外观是否有浑浊、分层及药物析出等现象,并将 NTZ-NE 于 4 000 r/min 离心 30 min,观察其外观是否有浑浊、分层及药物析出等现象。

1.6.2 Zeta 电位测定 取 NTZ-NE 稀释 8 倍后,于 25℃下用 pH 计测定其 pH 值,用马尔文 Zeta 电位分析仪测定其 Zeta 电位,根据电位大小考察其稳定性。

1.7 NTZ-NE 急性毒性试验

1.7.1 预试验 采用预试验找出 0~100%死亡率的毒性估计范围,以便确定正式试验分组的组数和剂量。选取 24 只体质量相近的 7 日龄依莎粉蛋雏鸡作为试验动物,将其随机分为 6 组,每组 4 只,其中 1~5 组为试验组,第 6 组为对照组,各组鸡分别称体质量。试验采用二步法:①用 10 倍稀释的药液系列,找出药物毒性浓度的大致范围。将制备的 NTZ-NE 用生理盐水等比稀释为质量浓度分别为 0.03,0.33,3.33,33.33 和 333.33 mg/mL 的药液,分别灌胃 1~5 组试验鸡 30 mL/kg,第 6 组灌胃相同剂量的生理盐水。给药前各组鸡禁食禁水 24 h,一次给药后连续观察 7 d,期间观察并记录各组鸡的死亡情况。预试验结果表明,NTZ-NE 的 0~100%死亡率毒性质量浓度的大致范围为 33.33~333.33 mg/mL,由于用药剂量为 30 mL/kg。因此,NTZ-NE 的大致毒性范围为 1 000~10 000 mg/kg;②参照试验得到的 10 倍等比稀释药液系列的大致毒性剂量范围,采用相同的试验方法缩小稀释倍数找出 0~100%死亡率毒性剂量的具体范围,试验结果为 3 000~10 000 mg/kg。

1.7.2 正式试验 正式试验采用改良寇氏法。参

照预试验结果,配制组距(剂量间比值) $r=0.8$,组数 $G=6$ 的等比稀释药液系列,药物质量浓度分别为100.00,125.00,156.27,195.33,244.13和305.17 mg/mL。选取体质量相近的7日龄依莎粉蛋雏鸡70只,随机分为7组,每组10只,其中1~6组为试验组,依次灌胃给予上述6种不同质量浓度的NTZ-NE 30 mL/kg,给药剂量依次为3 000,3 750,4 688,5 860,7 324和9 155 mg/kg;第7组为对照组,灌胃相同剂量的生理盐水。试验方法同预试验,一次给药后连续观察7 d,期间每日观察并详细记录各组鸡的中毒情况,最后计算NTZ-NE的半数致死量(LD₅₀)和95%置信范围。

2 结果与分析

2.1 NTZ-NE 配方的筛选

2.1.1 表面活性剂的确定 本试验发现,与吐温-80形成的纳米乳相比,EL-40形成的纳米乳载药量较高;与RH-40形成的纳米乳相比,EL-40形成的纳米乳稳定性较强,且毒性较低。故选择EL-40为表面活性剂。

2.1.2 油相的确定 常温条件下,常用油相三乙酸

甘油酯、油酸、菜籽油、香芹酚和肉桂醛对NTZ的最大载药量(质量分数)分别为0.2%,0.5%,0.8%,0.3%和5.0%,故选取肉桂醛为油相以确保高载药量。

2.1.3 助表面活性剂的确定 试验结果表明,以无水乙醇、1,3-丁二醇、异丙醇、聚乙二醇200、聚乙二醇400作为助表面活性剂时,虽在常温下也能形成纳米乳,但在低温-4℃和高温60℃的条件下容易浑浊破乳或析出药物,体系不稳定;以聚乙二醇600作助表面活性剂时不能形成纳米乳;而以1,2-丙二醇作助表面活性剂时,形成的NTZ-NE体系经稳定性检验后无药物析出或浑浊等破乳现象,故选择1,2-丙二醇为最佳助表面活性剂。

2.1.4 助溶剂质量分数的确定 经测定,当DMSO质量分数大于0.35%时,形成的纳米乳不稳定,有药物析出现象,为确保高载药量和稳定性,将DMSO的质量分数确定为0.3%。

2.1.5 表面活性剂与助表面活性剂质量比(K_m)的确定 根据伪三元相图(图1)可知, K_m 值为6:1时的相图区域面积明显大于 K_m 为5:1和7:1时的相图区域面积,因此将6:1确定为最佳 K_m 值。

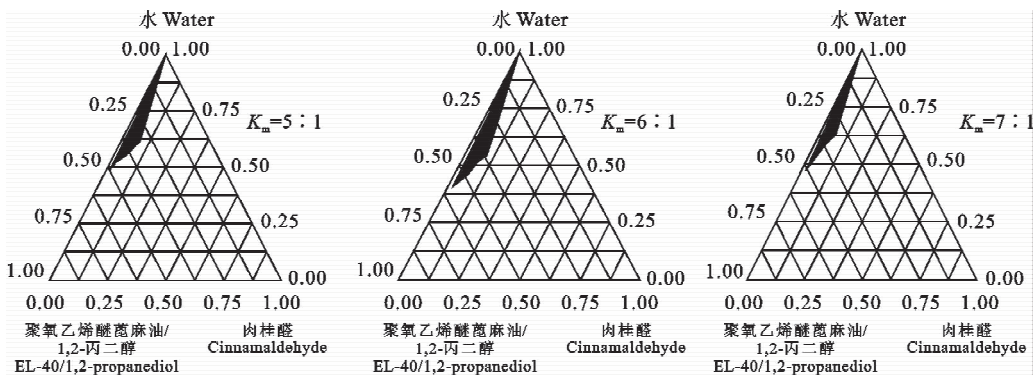


图1 K_m 值对 NTZ-NE 形成的影响

图中阴影部分为可形成的纳米乳区域

Fig. 1 Effects of K_m on formation of NTZ-NE region

The shaded area is nanoemulsion region

2.1.6 NTZ-NE 配方的确定 根据以上结果,确定最佳NTZ-NE配方中各组分的质量分数为:DM-SO 0.3%,NTZ 0.45%,肉桂醛 6.0%,1,2-丙二醇 5.0%,EL-40 30.0%,蒸馏水 58.25%。用该配方制备的NTZ-NE外观澄清透明,流动性和稳定性好。

2.2 NTZ-NE 结构类型的鉴别

按筛选出的配方制备的纳米乳经离心后,无浑浊、分层、药物析出等情况发生,可判定该体系为纳米乳体系。将样本用亚甲蓝和苏丹红Ⅲ2种染料

染色后,结果显示,亚甲蓝在样本中的扩散速度明显大于苏丹红Ⅲ,可判定该纳米乳类型为水包油型(O/W型)。

2.3 NTZ-NE 的形态观察

由图2可知,NTZ-NE在透射电镜下呈规则的圆球形,分布均匀,无粘连。

2.4 NTZ-NE 的粒径分析

马尔文激光粒度分析仪测定结果(图3)表明,NTZ-NE的粒径分布为5~30 nm,平均粒径为13.8 nm,多分散系数(PDI)为0.155。

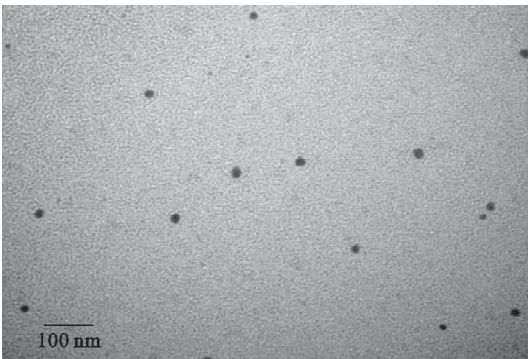


图 2 NTZ-NE 透射电镜观察(×100 000)
Fig. 2 Transmission electron micrograph results of NTZ-NE(×100 000)

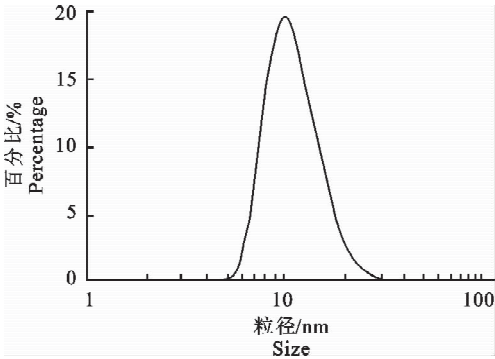


图 3 NTZ-NE 的粒径分布
Fig. 3 Size distribution of NTZ-NE

2.5 NTZ-NE 的稳定性

2.5.1 留样观察试验 试验结果表明,NTZ-NE 在-4℃、室温和 60℃下分别保存 1,3,6 个月后,仍澄清透明,未出现浑浊、分层或药物析出等现象,表明 NTZ-NE 温度稳定性良好;高速离心后,NTZ-NE 仍保持澄清透明,表明 NTZ-NE 的加速稳定性良好。

2.5.2 Zeta 电位考察 Zeta 电位分析结果表明,25℃时,制备的 NTZ-NE 在稀释 8 倍后 pH 值为 6.5±0.2,在此 pH 下 NTZ-NE 的平均 Zeta 电位为-14.7 mV,其分布如图 4 所示。在此电位下,NTZ-NE 具有良好的稳定性。

2.6 NTZ-NE 的急性毒性评定

NTZ-NE 急性毒性评定的正式试验结果如表 1

所示。由表 1 数据计算得 NTZ-NE 的 LD₅₀ 为 5 391 mg/kg,95%置信范围为 5 387~5 395 mg/kg,表明 NTZ-NE 属于实际无毒(≥5 000 mg/kg)药物。

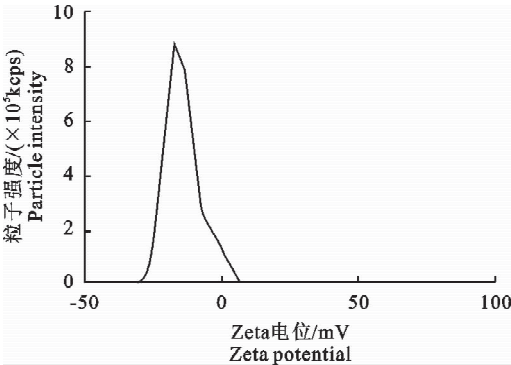


图 4 NTZ-NE 的 Zeta 电位分布(pH=6.5)
Fig. 4 Zeta potential distribution of NTZ-NE (pH=6.5)

表 1 NTZ-NE 急性毒性评定的正式试验结果

Table 1 Acute toxicity of NTZ-NE

分组 Groups	剂量/(mg·kg ⁻¹) Dose	供试雏鸡数 Number of chick	死亡雏鸡数 Number of mortality	死亡率/% Mortality ration
1	3 000	10	0	0
2	3 750	10	1	10
3	4 688	10	3	30
4	5 860	10	6	60
5	7 324	10	8	80
6	9 155	10	10	100
7	0	10	0	0

3 讨 论

纳米乳是由表面活性剂(助表面活性剂)、油相和水相组成的乳滴粒径在 1~100 nm 的透明液体载药系统,是进入 21 世纪以来研究较多的一种药物新剂型,特别是在兽用制剂方面,其与常规剂型相比具有诸多优点:①增溶作用;②提高了易水解药物的稳定性;③可用水无限稀释,溶解均匀,不堵塞饮水

器,用药趋于整齐,利于畜禽大群给药,省时省力;④药物分散性好,吸收迅速,药物生物利用度提高;⑤透皮率高,可经皮给药,减少动物应激;⑥低黏度,注射给药疼痛小等。纳米乳的形成主要依赖于组分的选择与各个组分的合理配比,载药时应选择药物溶解度高且对机体无毒、无刺激、稳定性强的油相,必要时可以对油相进行复配。选择好油相后,根据油相乳化所需的亲油亲水平衡值(HLB 值)选择合

适的表面活性剂,使油相乳化所需的 HLB 值和表面活性剂的 HLB 值相同或相近,即可制得理想的纳米乳剂。

NTZ 是目前研究较多、疗效可靠的新型抗寄生虫、抗菌和抗病毒药。有资料表明,NTZ 对 G^+ 和 G^- 菌有强大的抑制繁殖和杀灭作用^[11]。研究者对临床上分离的常见菌株进行试验,发现其对 50% 菌株的 MIC_{50} 低于 1 mg/mL, MIC_{90} 为 4 mg/mL^[12-14]。因其良好的疗效,我国目前已将 NTZ 列入国家“十二五”规划重点发展药物。

NTZ 原药难溶于水,市场上剂型很有限,目前已知的只有片剂和混悬剂,其药用价值和潜在价值未得到充分的发挥和挖掘。本试验将 NTZ 和先进的纳米技术相结合,不仅使 NTZ 在水中的溶解度明显提高,且纳米级的 NTZ 乳滴口服后通过肠壁淋巴管道吸收,避开了肝脏的首过效应,药物生物利用度和药效均明显提高。对养殖业而言,NTZ-NE 可用水无限稀释的特点便于群体饮水给药,应用前景广阔。

尽管 NTZ-NE 和传统剂型相比有诸多优点,但 NE 剂型本身表面活性剂的含量较高,对机体有一定的溶血作用,如果长期大剂量使用仍不可避免地对机体有一定损害。目前医药上允许使用的表面活性剂种类很少,因此开发低毒或无毒的表面活性剂对于 NE 的推广有重大意义^[15]。另外,NE 如果长时间存放,乳滴会有自发聚集的倾向,多个乳滴聚合后形成较大粒径的乳滴,外观表现浑浊,甚至会有分层、沉淀和药物析出等破乳现象出现,生物利用度和药效也会相应降低,其解决途径有待进一步研究。由于 NE 剂型研究起步较晚,技术尚未成熟和完善,但相信随着制药和化工技术的发展,NE 剂型必将很快得到临床应用,并为畜牧业的发展作出贡献。

[参考文献]

[1] 吕 斌,赵地顺,孙智敏. 硝唑尼特的合成及应用 [J]. 河北化工,2010,33(5):5-7.
Lü B,Zhao D S,Sun Z M. Synthesis and application of Nitazoxanide [J]. Hebei Chemical Engineering,2010,33(5):5-7. (in Chinese)
[2] 史 赫,张瑞岩,张林波,等. 硝唑尼特对利什曼原虫的体外药效试验 [J]. 动物医学进展,2010,31(3):115-117.
Shi H,Zhang R Y,Zhang L B,et al. Nitazoxanide efficacy trials on Leishmania *in vitro* [J]. Progress in Veterinary Medicine,2010,31(3):115-117. (in Chinese)
[3] Musher D M,Logan N,Mehendiratta V,et al. Clostridium dif-

ficilecolitis that fails conventional metronidazole therapy: Response to nitazoxanide [J]. Antimicrob Chemother,2007,59(4):705-710.
[4] 刘耀文. 2002 年美国 FDA 批准的新药及生物制品 [J]. 国外医药,2003,30(3):192-193.
Liu Y W. New drugs and biological products approved by FDA in 2002 [J]. Foreign Medicine,2003,30(3):192-193. (in Chinese)
[5] 陈阜新. 硝唑尼特:一种新的抗原虫药 [J]. 中国药师,2004,7(5):394-395.
Chen F X. Nitazoxanide: A new kind of antiprotozoal drug [J]. Chinese Pharmacist,2004,7(5):394-395. (in Chinese)
[6] Guttner Y,Windsor H M,Viiala C H,et al. Nitazoxanide in treatment of helicobacter pylori: A clinical and *in vitro* study [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2003,47(12):3780-3783.
[7] 陆 彬. 药物新剂型与新技术 [M]. 北京:人民卫生出版社,1998:59-89.
Lu B. New form and technology of medication [M]. Beijing: The Publish of People Healthy Industry,1998:59-89. (in Chinese)
[8] Schechter R S,Bourrel M. Micro-emulsions and related systems [M]. New York:Marcel Dekker,1998.
[9] 张阳德. 纳米药理学 [M]. 北京:化学工业出版社,2005:163-188.
Zhang Y D. Nano pharmaceuticals [M]. Beijing:Chemical Industry Press,2005:163-188. (in Chinese)
[10] 叶海英,张忠义,高 申,等. 法莫替丁微乳的研制及其质量评价 [J]. 第一军医大学学报,2003,23(1):68-70.
Ye H Y,Zhang Z Y,Gao S,et al. Preparation of famotidine microemulsion and its quality evaluation [J]. First Mil Med Univ,2003,23(1):68-70. (in Chinese)
[11] Rossignol J F. Benzamide derivative,compositions containing said derivative and use thereof:PCT,WO9528393 [P]. 1995-10-26.
[12] Yamamoto Y,Hakki A,Friedman H,et al. Nitazoxanide,a nitrothiazolide antiparasitic drug,is an anti-Helicobacter pylori agent with anti-vacuolating toxin activity [J]. Chemotherapy,1999,45(4):303-312.
[13] Megraud F,Occhialini A,Rossignol J F. Nitazoxanide, a potential drug for eradication of helicobacter pylori with no cross-resistance to metronidazole [J]. Antimicrob Agents Chemother,1998,42(11):2836-2840.
[14] Rossignol J F. Method for treatment of helicobacter pylori infections:USA,US5859038 [P]. 1999-01-12.
[15] 胡宏伟,李剑勇,吴培星,等. 纳米乳在药剂学中的研究进展及其应用 [J]. 湖北农业科学,2009,48(3):747-750.
Hu H W,Li J Y,Wu P X,et al. Research progress on application of nanoemulsions in pharmaceuticals [J]. Hubei Agricultural Sciences,2009,48(3):747-750. (in Chinese)