

结肠定位壳聚糖包衣氟尿嘧啶脂质体的制备、形态与体外释放

魏农农, 陆 彬*

(四川大学 华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 探讨药物结肠定位壳聚糖包衣脂质体的制备、形态及其在体外释药特性。方法 用罗丹明 B 异硫氰酸 (RBITC) 和 Bodipy-PC 分别标记壳聚糖和磷脂, 用前体脂质体方法制备氟尿嘧啶脂质体, 利用激光扫描共聚焦显微镜观察壳聚糖包衣脂质体的形态; 考察壳聚糖包衣脂质体在人工胃液、人工肠液和人工结肠液中的释放。结果 脂质体包衣前后粒径分别为 2.071 和 2.750 μm 。壳聚糖能较好地包覆脂质体; 3 种脂质材料不同的包封率分别为 99%、61%、72%。未包衣的脂质体在人工胃液中 4 h 已释放完全, 而包衣脂质体在人工胃液 4 h 释放 6.3%, 在人工肠液中 8 h 仅释放 6.8%, 但在人工结肠液中释药明显加快, $t_{1/2}$ 为 3.63 h。结论 结肠定位壳聚糖包衣脂质体制备可行, 在人工结肠液中, 体外释放符合 Higuchi 方程。

关键词: 氟尿嘧啶; 壳聚糖; 前体脂质体; 包衣脂质体; 激光扫描共聚焦显微镜; 形态; 体外释放

中图分类号: R943.42; R945.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)01-0053-04

Preparation, morphology and *in vitro* release of chitosan coated liposomes of fluorouracil for colon targeting

WEI Nong-nong, LU Bin

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Aim** To prepare chitosan-coated liposomes of fluorouracil for colon targeting and investigate their morphology and *in vitro* release. **Methods** Rhodamine B isothiocyanate and Bodipy-PC were used to label chitosan and the liposomes, respectively. Laser confocal scanning microscopy was used to explore the structure of chitosan-coated liposomes, and the release of chitosan-coated liposomes in simulated gastric solution, simulated enteric fluid and simulated colon fluid were investigated. **Results** The size of liposomes was measured by laser diffraction before and after polymer coating. The mean diameter of liposomes was in the range of 1.43 - 3.82 μm , whereas after coating 2.06 - 5.62 μm . For three types of liposomes, negatively charged, positively charged and neutrally charged, the entrapment rate was 99%, 61%, and 72%, respectively. The cumulative release of chitosan-coated liposomes in simulated gastric fluid was only 6.28% in 4 h, and in simulated enteric fluid only 6.8% in 8 h. But in the simulated colon fluid contained β -glucosidase the release was rapidly increased to a $t_{1/2}$ of 3.63 h. **Conclusion** The preparation technology of chitosan-coated liposomes for colon targeting was feasible. *In vitro* release in the simulated colon fluid was fitted to Higuchi equation.

Key words: fluorouracil; chitosan; proliposomes; coated liposome; laser scanning confocal microscopy; morphology; *in vitro* release

氟尿嘧啶 (fluorouracil, FU) 作为临床上常用的抗

肿瘤药物之一, 是目前胃、直结肠术后辅助化疗或晚期病人治疗中的首选药物。但该药口服吸收不完全, 影响治疗效果。而脂质体作为靶向给药系统其突出的优越性已得到大量文献^[1-3]的证实。但脂质体有物理稳定性问题如药物的渗漏, 口服后易被胃

收稿日期: 2002-01-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870868).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 28 - 85503689,

E-mail: lubin@wcums.edu.cn

肠道消化破坏,靶向效果存在较多争议,所以脂质体多用 iv。但用前体脂质体制备,即将磷脂吸附于可溶性载体上,加水水化重组形成脂质体,可有效防止药物的泄漏,提高脂质体的物理稳定性。壳聚糖是一种无毒的天然高分子多糖类化合物,具有良好的生物相容性和生物降解性。该化合物重要特性之一是能被结肠厌氧菌丛分泌专属性的酶降解,如 β -葡萄糖苷酶^[4]。本实验即利用壳聚糖与脂膜的相互作用而包裹脂质体,形成壳聚糖包衣脂质体(chitosan coated liposomes),防止脂质体在胃肠道破坏,以达到口服结肠定位释放的目的。同时用激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)观察壳聚糖包衣脂质体的形态,探讨该给药系统在人工胃液(pH 1.2),人工肠液(pH 6.8)和含有 β -葡萄糖苷酶人工结肠液(pH 7.8)中的释放。

材料和方法

试剂与仪器 卵磷脂(MW750, Acros Organic 公司, New Jersey, USA);胆固醇(广州化学试剂分公司进口分装);十八胺(stearylamine, SA)和磷酸二鲸蜡脂(dicety phosphate, DCP, Sigma 公司);乙醇胺(闪烁纯, Acros Organic 公司, New Jersey, USA);壳聚糖(chitosan, CS, 脱乙酰度 > 85%, Sigma 公司);MRC1024ES 激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM, BioRad 公司, 美国);罗丹明 B 异硫氰酸(rhodamine B isothiocyanate, RBITC, conjugation grade, Amresco Corporation, USA);透析袋(Visking 公司, 德国);氟尿嘧啶(flourouracil, FU, 南通制药总厂);四氢喹啉(Bioway 公司, 美国);Bodipy-PC FL C₅-HPC2-(4, 4-difluoro-5, 7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diazas-indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (Molecular Probes, USA); β -葡萄糖苷酶(β -glucosidas, Worthington Biochemical Corporation, USA);二甲基亚砜(DMSO, 成都化学试剂厂, 分析纯);UV-2201 可见紫外分光光度计(日本岛津);激光粒径分析仪(Mastersizer 2000, Malvern Instrument Ltd, UK);电磁搅拌器(上海司乐仪器厂)。

前体脂质体的制备 取卵磷脂 50 mg, 胆固醇 10 mg 共置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入四氢喹啉溶液(其中含 FU 12 mg);加入适量过 120 目筛的山梨醇, 置于旋转蒸发仪减压挥去溶剂(温度 35 °C, 真空度 0.09 MPa, 时间 3 ~ 4 h), 得白色粉末状的氟尿嘧啶前体脂质体。在脂质中加入适量的十八胺和磷酸二鲸蜡脂可分别制得带正电荷和负电荷的前体脂质

体。荧光标记前体脂质体是在将脂质完全溶解后, 用微量进样器精密吸取 Bodipy-PC 15 μ L 加入其中混匀, 以下步骤与前体脂质体的制备相同。制备好的前体脂质体在 4 °C 避光放置。

壳聚糖包衣脂质体的制备 精密称取氟尿嘧啶前体脂质体 0.5 g, 加磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2) 5 mL, 缓慢震荡, 静置, 即得脂质体混悬液。将其中 2.5 mL 置于 10 mL 玻璃离心管中, 在漩涡搅拌器上缓慢滴加质量浓度为 5 g·L⁻¹ 的壳聚糖溶液, 持续搅拌 10 min 后即得混悬状壳聚糖包衣脂质体。

壳聚糖包衣脂质体中脂质体包封率的测定 由于直接测定壳聚糖中脂质体的含量较困难, 所以本实验以磷脂含量间接代表脂质体的含量, 用紫外分光光度计定量测定壳聚糖包衣脂质体中磷脂的含量。用 Stewart 法^[5]测定磷脂的含量: 取脂质体 0.1 mL 于 5 mL 塑料离心管中, 加入不同体积的壳聚糖溶液, 快速搅拌 10 min, 静置 1 h 后, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后, 分离上清液, 在沉淀中加入氯仿 2 mL, 待完全溶解沉淀后, 将其全部转入 10 mL 的玻璃离心管中, 再加入硫氰酸铁胺 2 mL, 在漩涡搅拌器中搅拌 5 min 后静置 3 ~ 4 h, 2 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 分离, 用移液器吸取下层棕红色液体, 按 Stewart 法在波长 485 nm 处测定。此时的磷脂的含量与 0.1 mL 脂质体中的磷脂量之比即为壳聚糖包衣脂质体对脂质体的包封率。

壳聚糖包衣脂质体在人工胃液、人工肠液和人工结肠液中的药物释放 将前体脂质体经水化后的 FU 脂质体 0.5 mL 和壳聚糖包衣 FU 脂质体分别放入透析袋中, 在 (37 ± 0.5) °C 分别在人工胃液、人工肠液和人工结肠液中进行体外释放, 分别在不同时间测定药物的累积释放量, 说明脂质体包衣前后的体外释药特性。

壳聚糖的荧光标记 由于壳聚糖为胺基多糖类化合物, 可利用其六元环上的 —NH₂ 与荧光染料 RBITC 中的 —NCS 基反应而将荧光标记物结合到壳聚糖上^[6]。方法: 取 2.5% 的壳聚糖溶液 100 mL, 用 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液调 pH 至 8.5。将荧光染料 RBITC 溶于 DMSO 中成 1 mg·mL⁻¹。将壳聚糖溶液置于 40 °C 水浴中, 在电磁搅拌下加入 RBITC 溶液 100 μ L, 持续反应 1 h 后, 加入乙醇胺 25 μ L 以终止反应。游离的 RBITC 用透析袋透析除去。以上均在避光下进行。反应示意图见图 1。

激光扫描共聚焦显微镜观察 在波长为 488 nm 的激发光条件下, 图 2A 是在 455DF30 发射滤光

片滤光下所见 Bodipy-PC 标记脂膜的绿色共聚焦图像,图 2B 是在 598DF40 发射滤光片滤光所得 RBITC 标记壳聚糖的红色共聚焦图像。图 2C 是上述 2 个图像经计算机处理后得到的壳聚糖包衣脂质体照片。

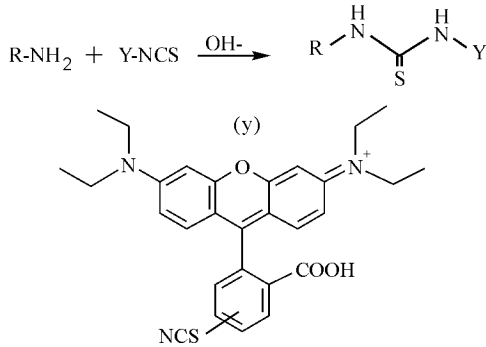
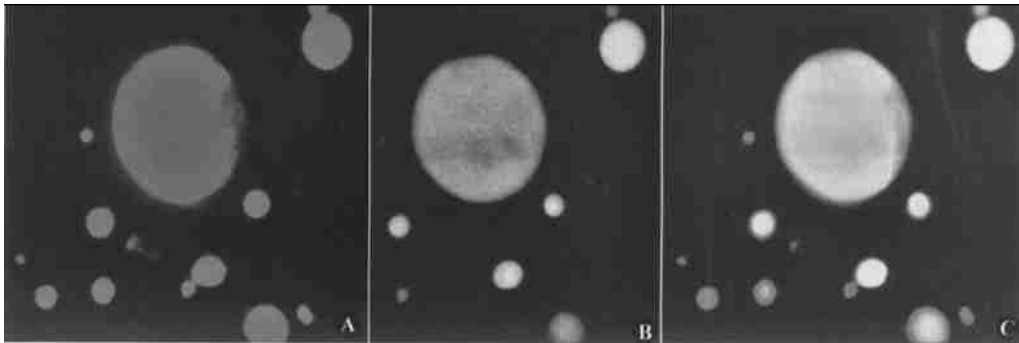


Figure 1 Reaction schemes for labeling procedures of chitosan with rhodamine B isothiocyanate (RBITC)



A: Chitosan coated liposomes labeled with RBITC; B: Chitosan-coated liposomes labeled with Bodipy-PC; C: Chitosan-coated liposomes with z-scanning

Figure 2 Scanning micrographs of chitosan-coated liposomes with laser scanning confocal microscopy

2 脂质体包衣前后的粒径变化

脂质体在包衣前后经激光粒度分析仪测定 ($n=3$), 在包衣前粒径分布在 $1.43 \sim 3.82 \mu\text{m}$ 。其中 $d(0.5)$ 是 $2.07 \mu\text{m}$ [$d(0.5)$ 系指粒径分布图中 50% 处的粒径]; 跨距 = 1.15; 一致性为 0.37, 残差为 1.38%。而在包衣后粒径分布在 $2.06 \sim 5.62 \mu\text{m}$; $d(0.5)$ 为 $2.75 \mu\text{m}$, 跨距 = 1.29; 一致性为 0.57, 残差为 1.02%。可见脂质体包衣后粒径略有增大。

3 壳聚糖包衣脂质体中壳聚糖对脂质体包封率的测定

不同表面电荷的脂质体加入不同体积的壳聚糖溶液包裹后, 壳聚糖对脂质体 (以磷脂量计算) 的包封率见表 1。

从表 1 可看出, 随着壳聚糖与脂质体体积比的增加, 壳聚糖中的磷脂含量不断提高, 在 4:1 时壳聚糖基本将脂质体包裹。其中表面带正电荷的脂质体包

结果

1 壳聚糖包衣脂质体的激光扫描共聚焦显微镜观察

图 2A 是在波长 585 nm 发射光下红色的 RBITC 标记的壳聚糖包裹表面带负电荷的脂质体的扫描照片。图 2B 在波长 455 nm 发射光条件下绿色的 Bodipy-PC 标记的脂质体的扫描照片。图 2C 是壳聚糖包覆脂质体后形成的“断层扫描照片” (z-scan), 即激光束在计算机的控制下对该视野下的包衣脂质体进行断层扫描 (厚度为 $2 \mu\text{m}$) 的第 10 层 (基本上是包衣脂质体中部) 照片; 从照片看出, 外层为壳聚糖的红色光圈 (A), 脂质体为绿色 (B), 但由于壳聚糖的红色标记物 RBITC 具有一定的脂溶性, 部分溶于绿色荧光标记的脂膜中呈现出橙红色 (C), 另外可见粒径较大的脂质体被壳聚糖包裹不完全, 而粒径较小的脂质体则包裹较完全。

封率最低为 61%, 不带电荷的脂质体为 73%, 带负电荷脂质体的包封率最高达 99%。

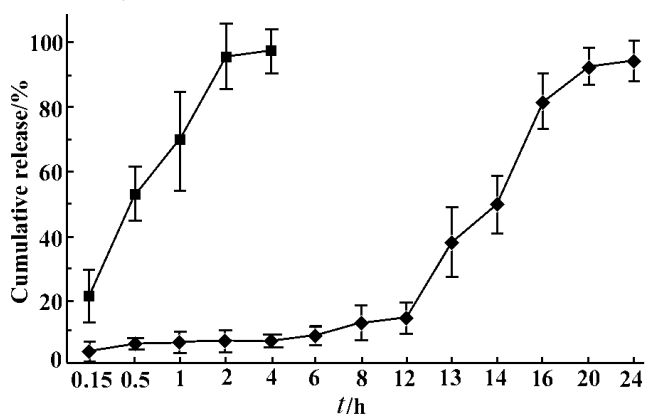
Table 1 Encapsulation ratio of liposomes with different electric charges in chitosan (CS) ($n=5, \bar{x} \pm s$)

CS/lipid	Encapsulation ratio of liposomes / %		
	DCP (-)	SA (+)	Neutral
0.5:1	21 ± 6	17 ± 8	16 ± 4
1:1	73 ± 17	40 ± 16	58 ± 13
2:1	84 ± 10	54 ± 18	62 ± 11
3:1	90 ± 12	55 ± 14	64 ± 7
4:1	99 ± 11	61 ± 11	73 ± 13
6:1	99 ± 12	61 ± 11	72 ± 16
8:1	100 ± 10	62 ± 14	73 ± 14

DCP: Dicety phosphate; SA: Stearylamine

4 脂质体包衣前后在人工胃液、人工肠液和人工结肠液中的药物释放

从图 3 可知,未包衣的脂质体在人工胃液中迅速释放出药物,2 h 后脂膜被酸完全破坏。但包衣脂质体的稳定性大为提高,4 h 仅释药 6.82%。在人工肠液(pH 6.8)中,包衣脂质体的药物释放符合零级释药方程($r = 0.9765$),释药 $t_{1/2}$ 为 59.6 h;而在人工结肠液(pH 7.8)中,壳聚糖在 β -葡萄糖苷酶的作用下发生降解,释药速率大为加快,此时的释药规律符合 Higuchi 方程 $Q = -0.432 + 0.125 t_{1/2}$ ($r = 0.9653$), $t_{1/2}$ 为 3.63 h。



■ — ■ Liposomes; ◆ — ◆ Coated liposomes. 0 - 4 h in pH 1.2; 4 - 12 h in pH 6.8; 12 - 24 h in pH 7.8 PBS contained β -glucosidase

Figure 3 Release of chitosan-coated liposomes *in vitro* ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

讨论

激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope)是将光学显微镜技术、激光扫描技术和计算机图像处理技术结合起来的高技术设备,有极高的分辨率,在生物医学和材料学领域有广泛的应用。它结合了扫描与透射的特点,可对视物同时进行扫描和透视。目前已有利用该设备进行对微球结构研究的报道^[8,9]。本实验利用双重标记法分别对壳聚糖和磷脂进行标记,清晰反映出壳聚糖包裹脂质体的形态,为进一步研究该给药系统提供依据。

以壳聚糖为材料对脂质体进行包衣已有报道^[10],本实验考察了壳聚糖包衣脂质体作为口服结肠定位释放,结果表明,该给药系统在人工胃液和人工肠液中累积药物释放量仅为 13.1%,但在人工结肠液中,壳聚糖在 β -葡萄糖苷酶的降解作用下,释药明显加快,释药 $t_{1/2}$ 为 3.63 h。经动物体内试验,壳聚糖包衣氟尿嘧啶脂质体灌胃后在结肠部位符合一级吸收-室动力学模型,AUC 由 $45.1 \text{ h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 提高到 $546 \text{ h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, t_{max} 由 1.14 h 延长到 8.6 h, C_{max} 由

$2.13 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 提高到 $33.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,基本达到了口服后在结肠释药、吸收的特征。详细的体内过程将另文发表。

壳聚糖包衣脂质体稳定的机理是阳离子型的壳聚糖与脂质体的电荷作用^[10]。另一可能是未完全脱乙酰化的酰基插入到脂质体的脂膜中,使壳聚糖分子镶嵌到脂质体的表面而形成壳聚糖-脂质体复合物^[11,12](chitosan liposomes complex)。

References:

- [1] Harrington KJ, Rowlinson-Busza G, Syrigos KN. Biodistribution and pharmacokinetics of ¹¹¹In-DTPA-labelled pegylated liposomes in a human tumour xenograft model: implications for novel targeting strategies [J]. *Br J Cancer*, 2000, **83**(2):232 - 238.
- [2] Sihorkar V, Vyas SP. Potential of polysaccharide anchored liposomes in drug delivery, targeting and immunization [J]. *J Pharm Sci*, 2001, **4**(2):138 - 158.
- [3] Budai M, Szogyi M. Liposomes as drug carrier systems. Preparation, classification and therapeutic advantages of liposomes [J]. *Acta Pharm Hung*, 2001, **71**(1):114 - 118.
- [4] Edwards C. Physiology of the colorectal barrier [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, **28**:173 - 190.
- [5] Roger CC. *New Liposomes: a Practice Approach* [M]. Oxford: Oxford University Press, 1994:108 - 109.
- [6] Schreiber AB, Haimovich J. Quantitative fluorometric assay for detection and characterization of Fc receptor [J]. *Methods Enzymol*, 1983, **93**:147 - 155.
- [7] Gric FJ, Basnet S. Mucoadhesive chitosan-coated liposomes: characteristics and stability [J]. *J Microencapsul*, 2001, **18**(1):3 - 12.
- [8] Lamprecht A, Schäfer U, Lehr CM. Structural analysis of microparticles by confocal laser scanning microscopy [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2000, **1**(3):article 17.
- [9] Lamprecht A, Schäfer U, Lehr CM. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, **49**(1):1 - 9.
- [10] Henriken I, Smistad G, Karsen J. Interaction between liposomes and chitosan [J]. *Int J Pharm*, 1994, **101**:227 - 236.
- [11] Henriken I, Vagen SR, Sande SA. Interaction between liposomes and chitosan II: effect of selected parameters on aggregation and leakage [J]. *Int J Pharm*, 1997, **146**:193 - 204.
- [12] Janes KA, Calvo P. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **47**:83 - 97.