

地塞米松磷酸钠脂质体经兔结肠粘膜的体外 Ussing chamber 渗透研究

李国锋 陈建海 袁静 袁丹 袁非 袁春霞 袁侯连兵 第一军医大学南方医院药学部 广东 广州 510515 宛

摘要 目的 观测并评价载药脂质体经结肠粘膜渗透的特点 方法 制备地塞米松磷酸钠 DSP 脂质体 采用体外 Ussing chamber 实验法 考察 DSP 经兔结肠粘膜的累积透过量及在粘膜内的分布量 结果 和 DSP 溶液比较 DSP 脂质体能延缓和减少 DSP 经结肠粘膜的透过量 DSP 脂质体的表观渗透系数 10^{-6} cm/s 为 31.95 依 0.65 DSP 溶液 88.61 依 18.61 宛 比较 具有显著差异 透过实验 120 min 和 300 min 时 DSP 脂质体在结肠粘膜中的分布量均明显高于 DSP 溶液 结论 和 DSP 溶液比较 DSP 脂质体在治疗局部结肠炎时 可能具有更小的毒性 更高的疗效 值得进一步开发研究 关键词 地塞米松磷酸钠 脂质体 体外 Ussing chamber 结肠

中图分类号 R944.1; R977.6 文献标识码 文章编号 000-2588 2004 宛 1-0011-04

Ussing chamber technique for studying the permeability of dexamethasone sodium phosphate liposome through rabbit colon mucosa In vitro

LI Guo-feng, CHEN Jian-hai, YANG Jing, GUO Dan, REN Fei, WANG Chun-xia, HOU Lian-bin

Department of Pharmaceutics, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the features of liposome-mediated drug permeability through the colon mucosa in vitro. Methods Dexamethasone sodium phosphate liposome (DSP) was prepared using orthogonal design. With in vitro Ussing chamber experiment, the accumulated amount of DSP permeated through rabbit colon mucosa into the receptor chamber and the distribution amount in the colon were determined at different time points during the experiment. Results Compared with the prepared DSP solution, DSP liposome decreased the permeated amount of DSP through rabbit colon mucosa. The apparent permeability coefficient (Papp, 10^{-6} cm/s) of the DSP was 31.95 依 0.65, significantly lower than that of DSP solution (88.61 依 18.61). On the other hand, the distribution amount of DSP liposome in the colon mucosa was significantly higher than that of the DSP solution both at 120 and 300 min. Conclusion DSP liposome dosage form may induce less toxicity with better therapeutic effect in the treatment of colitis, which is worthy of further exploitation.

Key words: dexamethasone sodium phosphate; liposome; in vitro Ussing chamber; colon

近年来载药脂质体用于局部病变的治疗引起了研究者越来越多的兴趣 一些脂质体直接用于皮肤 口腔 眼部及直肠等部位的粘膜 具有增加药物在局部粘膜组织中浓度 降低或延缓药物吸收入血速度的能力 地塞米松磷酸钠 DSP 为常用的抗炎药物 临床上常用其溶液剂经灌肠等方法来治疗各种结肠炎 为此 本研究试图通过制备 DSP 脂质体 并经体外 Ussing chamber 实验 初步分析 DSP 脂质体与 DSP 溶液剂经结肠粘膜渗透的差异 为临床合理用药提供理论依据 并为进一步开发毒性低 疗效高的结肠炎治疗药物制剂打下基础

1 材料与动物

收稿日期 003-08-12

基金项目 院 广东省自然科学基金 (020056) 院 广东省医学科研基金 宛 2002371 宛

Supported by Natural Science Foundation (020056) and Medical Research Foundation of Guangdong Province (A2002371)

作者简介 李国锋 (1964-) 宛 袁 000 年至 2001 年赴日本京都药科大学学习 袁 注册药师 电话 20-61641888-87236 宛 e-mail: lgfnf@fimmu.com

1.1 仪器

Waters 高效液相仪 宛 美国宛 Buch R-114 旋转薄膜蒸发仪 宛 瑞士宛 BK30 低温离心机 宛 igma 宛 美国宛 3000 HSA ZITASIZER 粒度测定仪 宛 英国宛 TEM-1200EX 透射电子显微镜 宛 日本宛 KW-80A 旋锅混合器 宛 上海医科大学仪器厂宛 KQ3200 超声波仪 宛 昆山市超声仪器有限公司宛 Mitti-Q 去离子水制备仪 宛 美国宛 7 ml Ussing chamber 装置 宛 日本 宛 本制作所赠送 宛

1.2 药物与试剂

DSP 对照品 宛 igma 公司宛 DSP 原料 宛 天津天药药业股份有限公司宛 卵磷脂 宛 英国进口分装宛 胆固醇 宛 英国进口分装宛 戊巴比妥钠 宛 上海化学试剂公司进口分装宛 甲醇为色谱纯 宛 其余试剂为国产分析纯 宛

1.3 实验动物

新西兰大白兔 宛 雌雄不拘 宛 体重 2.2~2.4 kg 宛 由第一军医大学实验动物中心提供 宛

2 方法与结果

2.1 DSP 脂质体的制备

2.1.1 处方的优选 用正交试验来筛选脂质体的配方 以药物包裹率作为主要评价指标 通过预实验 宛

析确定了影响脂质体包封率的 3 个主要因素为药物浓度、磷脂浓度及卵磷脂 / 胆固醇的比例。故拟定用 L9 渊表安排试验。实验重复 1 次。经 SPSS 统计软件分析。综合考虑载药量等因素。得到脂质体的最佳配方为 DSP 6 mg/ml、磷脂 24 mg/ml、磷脂 / 胆固醇 = 4。

2.1.2 脂质体的制备 用二次乳化法制备 DSP 脂质体。每份 10 ml。具体如下：取处方量的胆固醇和卵磷脂。用 10 ml 二氯甲烷溶解后。加入 4 ml 含处方量 DSP 的磷酸缓冲液 (pH=7)。超声作用 30 min。待充分乳化后。减压蒸发。水浴温度 40 益。转速 80 r/min。至圆底烧瓶内乳化液变成凝胶状粘稠液体时。再加入 6 ml 磷酸缓冲液 (pH=7)。继续减压蒸发至完全除去二氯甲烷。制得的混悬液再超声 10 min。即得 DSP 脂质体。

2.2 高效液相色谱法测定 DSP 浓度方法的建立

2.2.1 高效液相色谱条件 层析柱为 Nucleosil 100-5 C18 柱。柱长 150.0 mm。流动相为甲醇 0.34% KH₂PO₄。流速 1 ml/min。检测波长 240 nm。测得 DSP 的线性范围为 0.78~100 益/ml。相关系数 R₂=0.9999。

2.2.2 DSP 脂质体浓度的测定 精取 1 ml DSP 脂质体混悬液。用异丙醇、蒸馏水溶解并定容至 100 ml。用 HPLC 测定 DSP 浓度。色谱图如图 1 所示。空白脂质体对测定无干扰。本研究建立的 HPLC 法用于测定 chamber 实验中 DSP 浓度时。同样无干扰。采用随行外标法测定。日内及日间变异 RSD<5%。回收率 99.5%。样品含量为标示量的 95%~105%。

2.3 脂质体的质量评价

2.3.1 脂质体的包封率和载药量测定 精取脂质体 1 ml 于已称质量的 1.5 ml 离心管中。高速低温离心。5 000 r/min。30 min。分取上清液用异丙醇、蒸馏水溶解并定容至 50 ml。用 HPLC 测定 DSP 浓度并计算游离质量 W_p。含脂质体沉淀的离心管再次称质量。得到沉淀脂质体的质量 W_s。脂质体沉淀用异丙醇、蒸馏水溶解并定容至 50 ml。用 HPLC 测定 DSP 浓度并计算包裹的质量 W_p。分别按下列公式计算包裹率和载药量。

$$\text{包裹率} = \frac{W_p}{W_p + W_s} \times 100\%$$

$$\text{载药量} = \frac{W_p}{W_s} \times 100\%$$

本研究中测得优选处方 DSP 脂质体的平均包裹率为 54.82%。载药量为 8.67%。

2.3.2 脂质体的粒径观察 取 DSP 脂质体 200 益。加入 3 ml 去离子水。充分混合均匀后。用马尔文粒径测定仪测定粒径大小。结果。粒径分布在 100~170 nm 之间。平均粒径为 145 nm。粒径分布图如图 2 所示。

2.3.3 脂质体的电镜观察 将 DSP 脂质体混悬液置

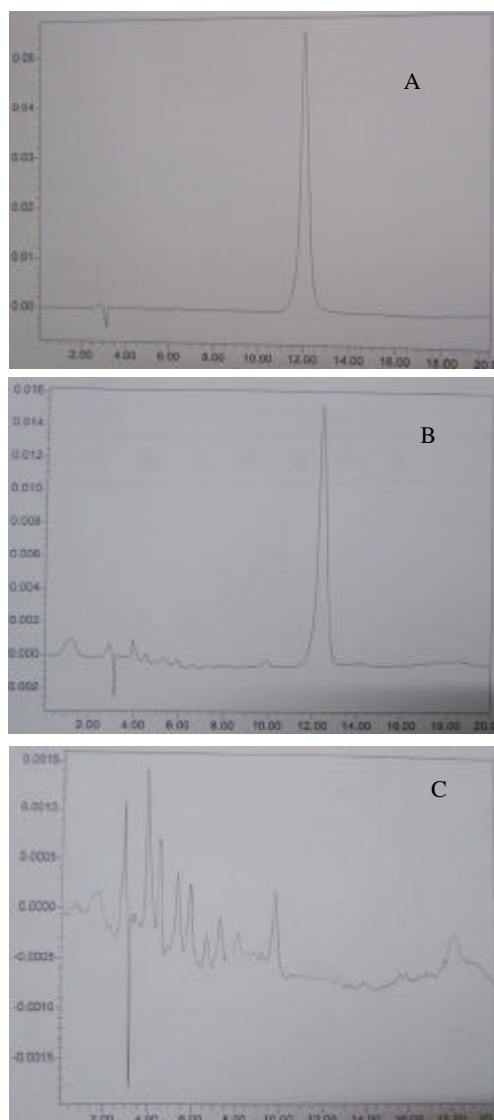


图 1 地塞米松磷酸钠的高效液相色谱图

Fig.1 High-performance liquid chromatography of 5-aminosalicylic acid

A: Dexamethasone sodium phosphate (DSP); B: DSP liposome; C: Blank liposome

于带 Formrar 膜的铜网上。以滤纸吸收边缘液体。干燥后用 2% 的磷钨酸负染色。置于电镜下观察。拍照。结果如图 3 所示。

2.3.4 脂质体的稳定性 DSP 脂质体于冰箱中放置 3~7 d。脂质体的粒径大小、包裹率等无明显的改变。对本研究实验的完成没有明显影响。

2.4 体外 Ussing chamber 实验

2.4.1 透过实验用介质的配制 按文献咱方法配制。各成分及浓度分别为 1.2 mmol/L NaH₂PO₄、25 mmol/L NaCl、5 mmol/L KCl、4 mmol/L CaCl₂、0 mmol/L NaHCO₃、9 mmol/L 谷氨酸钠、4 mmol/L 富马酸二钠、9 mmol/L 丙酮酸钠和 2 mg/ml 的葡萄糖。于配好的介质中不断通入 95% O₂+5% CO₂ 的混合气体。调整 pH 至 7.4。备用。

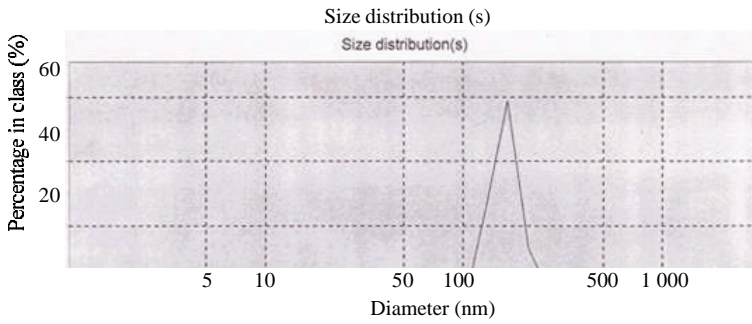


图 2 地塞米松磷酸钠脂质体的粒径分布

Fig.2 Size distribution of dexamethasone sodium phosphate liposome

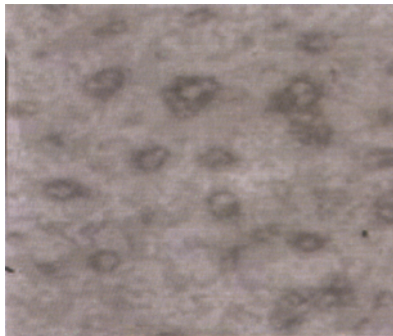


图 3 地塞米松磷酸钠脂质体的电镜观察

Fig.3 Sodium phosphate liposome under electron microscope

2.4.2 结肠粘膜渗透实验 新西兰大白兔用戊巴比妥钠 10 mg/kg b.w. 麻醉后腹部去毛行腹部正中中线剖腹取出结肠部位 从盲肠下 0.2 cm 开始共 10 cm 用 2.4.1 所述的介质冲洗干净结肠内容物截取长约 1.5 cm 的结肠 6 段分别沿相同的肠系膜边缘剪开分离除去浆膜侧的肌层将分离好的结肠粘膜固定于 Ussing chamber 装置中刻于装置的粘膜侧和浆膜侧分别加入 6 ml 介质溶液整个装置置于 37.5 益恒温环境中并不断于两侧的介质中通入 95% O₂+5% CO₂ 的混合气体至实验结束有效渗透面积为 0.785 cm² 30 min 后分别于粘膜侧和浆膜侧加入已预热至 37.5 益的 DSP 脂质体 1 ml 含 DSP 6 mg 和介质液 1 ml 作为对照粘膜侧加入 1 ml DSP 溶液含 DSP 6 mg 分别于给药后 20 30 60 80 和 300 min 从浆膜侧取样 0.5 ml 并立即补充已预热至 37.5 益的新鲜介质 0.5 ml 为了观察粘膜侧中药物的残留量实验中于 120 min 和 300 min 分别从粘膜侧取样 100 滋逐份取样后的样品于冰箱中保存直到进行 HPLC 分析

2.4.3 累积渗透量及表观渗透系数的测定 用 HPLC 法测得给定时间浆膜侧药物浓度为 C_m 用下列公式计算累积透过量 Q_m

$$Q_m = \sum_{i=0}^n [0.5 C_m \cdot t] + 7C_m$$

其中 0.5 和 7 表示取样体积和浆膜侧的体积分别为 0.5 ml 和 7 ml 根据给药剂量 D 计算累积透过百分率 Q_m / D 伊 100% 并绘制经时累积透过百分率曲线图 4 可见 DSP 脂质体能延缓和减少 DSP 经结肠粘膜的渗透另一方面表观渗透系数 P_{app} 是表示药物经粘膜透过能力的重要指标其计算公式为 P_{app} = Q_m / dt 宽

宽 AC₀ 其中 dQ/dt 表示稳态时时间 - 透过累积量线性回归所得的斜率 为有效透过面积表 C₀ 为粘膜侧初始药物浓度 本研究测得 DSP 脂质体和 DSP 溶液的 P_{app} 分别为 1.95 依 7.65 和 88.61 依 8.61 两组间 P=0.00134 相差非常显著表明 DSP 溶液较 DSP 脂质体更易透过结肠粘膜

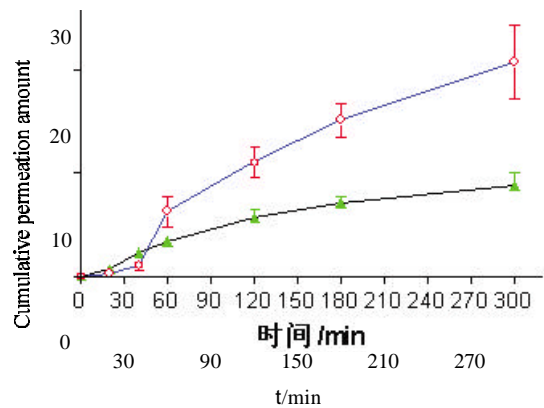


图 4 地塞米松磷酸钠体外 Ussing chamber 实验透过图 (n=4)

Fig.4 In vitro Ussing chamber permeation profiles (n=4) of DSP

菌 DSP solution; 银 DSP liposome

2.4.4 DSP 在粘膜中的分布量 根据给药剂量 和在给定时间测定的粘膜侧的残留 DSP 量 和浆膜侧的累积透过量 Q_a 来计算 DSP 在粘膜中的分布量 结果 20 min 时脂质体和溶液在结肠粘膜中的分布百分率 分别为 2.01 依 0.71 和 0.71 依 0.47 两组比较 P=0.0226 相差显著表明相同剂量下 20 min 时脂质体有更多的 DSP 滞留在粘膜中 300 min 时两组在结肠粘膜中的分布百分率 分别为 3.34 依 1.19 和 1.71 依 0.38 相差 =0.0408 同样具有显著差异

3 讨论

体外 Ussing chamber 实验在评价药物经消化道粘膜渗透的研究中已有一定的应用 但尚未见我

学者的开发应用该技术具有模拟胃肠道的生理环境、操作简单、容易掌握等特点。尽管同实际的动物实验结果可能会有一定的差距，但在初期快速地筛选药物制剂的配方、了解药物在消化道各区段吸收的规律性等方面具有明显优势。由于迄今为止大多数药物均经口服给药，Ussing chamber 实验会有越来越广泛的应用。

脂质体的制备方法很多，由于 DSP 是水溶性的药物，本研究初步探讨用二次乳化法来制备其脂质体。结果表明采用这种方法可使脂质体中 DSP 的包裹率达到 50% 以上。在进行 DSP 脂质体含量测定时发现通过选择合适比例的异丙醇和水作为混合溶剂较好地解决了脂质体中药物的溶出和脂质体的溶解问题。

尽管不少学者对脂质体经皮肤、口腔、直肠等吸收的规律作了较多的研究，但探索载药脂质体经结肠粘膜吸收规律的研究尚未见国内外文献报道。一般来说，载药脂质体口服后在上消化道时大多数药物已从脂质体中释放或吸收入血，这可能是导致研究者忽视载药脂质体经结肠吸收研究的主要原因之一。不过，结肠定位给药技术给载药脂质体在结肠部位的释放和发挥其特色治疗作用带来了希望。例如，作者已探索了受结肠菌群酶作用的材料——壳聚糖的一些特点，研究表明用外涂邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素的壳聚糖作为保护层可使装载的药物在结肠释放。因此，将载药脂质体冷冻干燥后装入这种胶囊有望达到预期的目标。

用 DSP 来治疗结肠炎时，一般常规口服时药物大多数从胃及小肠部位就已被吸收入血，故再分布到结肠部位的药量很少，加大口服剂量可能是解决办法之一。但由于入血的浓度增加，由此会引起全身严重的毒副作用，患者难以长期服用。通过地塞米松前体药物等的制备，有望将地塞米松导向结肠定位释药。为此，国内不少学者也进行了研究^[2-14]。但是，紧接着的另一个问题在以往的研究中很少涉及，即一旦药物在结肠部位定位释药后，其下一步的去向及变化如何。本研究利用体外 Ussing chamber 实验法对此进行了探索。结果提示，DSP 脂质体在结肠局部直接给药时，与一般的溶液剂相比较，有望达到提高 DSP 治疗效果、减少全身毒副作用的目的，从而利于患者长期用药。

参考文献

- 咱 后桂荣, 曾 抗, 周再高, 等. 两种鬼臼毒素脂质体的制备及其比较分析. 咱 第一军医大学学报, 2003, 23(3): 216-8.
- Hou GR, Zeng K, Zhou ZG, et al. Preparation and comparative analysis of two podophyllotoxin liposomes. 咱 第一军医大学学报, 2003, 23(3): 216-8.
- 咱 颜玉胜, 曾 抗, 李国锋, 等. 脂质体影响荧光素钠透皮和皮肤贮留

量的实验研究. 咱 第一军医大学学报, 2003, 23(2): 110-3.

- Xie YS, Zeng K, Li GF, et al. Effect of liposome on permeability and drug retention of sodium fluorescein in rat skin: an experimental study. 咱 第一军医大学学报, 2003, 23(2): 110-3.
- 咱 江彬彬, 曾 抗, 张三泉, 等. 鬼臼毒素二棕榈酸磷脂酰胆碱脂质体局部外用的实验研究. 咱 第一军医大学学报, 2002, 22(10): 875-7.
- Jiang BB, Zeng K, Zhang SQ, et al. Experimental study of podophyllotoxin dipalmitoylphosphatidylcholine liposome for topical skin application. 咱 第一军医大学学报, 2002, 22(10): 875-7.
- 咱 张三泉, 曾 抗, 江彬彬, 等. 大鼠外用脂质体鬼臼毒素后血液中鬼臼毒素浓度观察. 咱 第一军医大学学报, 2002, 22(9): 782-3.
- Zhang SQ, Zeng K, Jiang BB, et al. Changes in serum concentration of podophyllotoxin after its topical application with liposome on rat skin. 咱 第一军医大学学报, 2002, 22(9): 782-3.
- 咱 胡 俊, 章 廉, 冯筱榕, 等. 一种新型脂质体的制作方法. 咱 第一军医大学学报, 2001, 21(2): 138-9.
- Hu J, Zhang L, Feng XR, et al. A method for producing a new type of liposome. 咱 第一军医大学学报, 2001, 21(2): 138-9.
- 咱 Rogy MA, Beinhauer BG, Reinisch W, et al. Transfer of interleukin-4 and interleukin-10 in patients with severe inflammatory bowel disease of the rectum. 咱 Hum Gene Ther, 2000, 11 (2): 1731-41.
- 咱 Suintres ZE, shek PN. Prophylaxis against lipopoly saccharide-induced lung injuries by liposome-entrapped dexamethasone in rats. 咱 Biochem Pharmacol, 2000, 59(90): 1155-61.
- 咱 曾 抗, 李国锋, 许重远, 等. 脂质体鬼臼毒素治疗尖锐湿疣的双盲随机对照试验. 咱 第一军医大学学报, 1998, 18(3): 246.
- 咱 Yata T, Endo Y, Sne M, et al. Amino Acids protect epithelial cells from local toxicity by absorption enhancer, sodium Laurate. 咱 J Pharm Sci, 2001, 90(10): 1456-65.
- 咱 Yamamoto A, Tatsumi H, Maruyama M, et al. Modulation of intestinal permeability by nitric oxide donors: implications in intestinal delivery of poorly absorbable drugs. 咱 J Pharmacol Exp Therap, 2001, 296(1): 84-90.
- 咱 李国锋, 陈建海, 郭 丹, 等. 重组人粒细胞集落刺激因子壳聚糖胶囊的制备和体外释药特性. 咱 中国医院药学杂志, 2003, 23(1): 1-4.
- 咱 庞怡诺, 张志荣, 庞其捷, 等. 酶依赖结肠靶向地塞米松壳聚糖酯及其片剂的研究. 咱 药学学报, 2001, 36(8): 625-30.
- 咱 周四元, 梅其柄, 周 瑾, 等. 糖皮质激素前体药物在大鼠胃肠道中定位转释的药代动力学. 咱 药学学报, 2001, 36(5): 325-8.
- 咱 李国锋, 陈建海, 刘立捷, 等. 结肠菌群触发型 5-氨基水杨酸壳聚糖胶囊大鼠体内的吸收与分布研究. 咱 第一军医大学学报, 2003, 23(5): 431-4.
- Li GF, Chen JH, Liu LJ, et al. Absorption and distribution of 5-aminosalicylic acid from its chitosan capsule degraded by colon bacteria-released enzymes in rats. 咱 第一军医大学学报, 2003, 23(5): 431-4.