

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01227

眼用氟尿嘧啶的制备及体外评价

黄 潇,魏锐利*

第二军医大学长征医院眼科,上海 200003

[摘要] 目的:应用滴入分散法制备眼用氟尿嘧啶-壳聚糖纳米粒(5-Fu-CS-NP),并对其体外释放进行考察。方法:将壳聚糖、聚丙烯酸与氟尿嘧啶通过滴入分散法形成聚电解质络合物制备 5-Fu-CS-NP。考察纳米粒粒径、包封率、载药量以及体外释药特性。结果和结论:5-Fu-CS-NP 平均粒径为(144.6±3.1) nm,包封率为 84.5%,载药量为 3.91%。5-Fu-CS-NP 有良好的缓释作用,能在 3~7 d 内持续释放药物。在 pH 值 7.2~7.4 的生理范围内,释放速率变化不大。

[关键词] 氟尿嘧啶;壳聚糖;聚丙烯酸;纳米技术;后囊膜混浊

[中图分类号] R 988.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)10-1227-03

Preparation and *in vitro* evaluation of fluorouracil nanoparticles for ophthalmologic usage

HUANG Xiao, WEI Rui-li*

Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare fluorouracil-loaded chitosan nanoparticle (5-Fu-CS-NP) for ophthalmologic usage and evaluate its releasing characteristics *in vitro*. **Methods:** 5-Fu-CS-NP was prepared with 5-Fu, polyacrylic acid and chitosan using dispersion method. The mean size, entrapment efficiency (EE%), drug loading (DL%) and the *in vitro* releasing characteristics of 5-Fu-CS-NP were investigated. **Results and conclusion:** The mean size of 5-Fu-CS-NP was (144.6±3.1) nm, the EE% was 84.5% and the DL% was 3.91%. 5-Fu-CS-NP had a satisfactory sustained-releasing effect and the releasing could last for 3-7 days, and the release behavior was not greatly changed within a pH value of 7.2-7.4.

[KEY WORDS] fluorouracil; chitosan; polyacrylic acid; nanotechnology; posterior capsule opacification

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(10):1227-1229]

氟尿嘧啶 (fluorouracil, 5-Fu) 是胸苷酸合成酶的抑制剂,可有效抑制细胞的有丝分裂,是临床常用抗肿瘤药物。在眼科可用于预防人工晶体植入术后人工晶体前膜和后发性白内障^[1-2],还可以抗青光眼术后瘢痕形成^[3]。因 5-Fu 眼部直接应用对角膜、睫状体、视网膜毒副作用大,故目前尚无滴眼剂,也没有合适的眼用缓释制剂,限制了其临床应用。多项研究^[1,4-5]证明,如果能持续稳定缓慢给药,5-Fu 在极低的浓度下即可起到较好的抑制晶体上皮细胞增殖和移行的作用,从而预防后发性白内障。

纳米粒 (nanoparticle, NP) 作为新型药物载体,具有延缓药物释放的特点。壳聚糖 (chitosan, CS) 是一类带正电的直链多糖,具有良好的生物相容性、生物可降解性和多种生物活性。本研究制备了眼用氟尿

嘧啶壳聚糖纳米粒 (5-Fu-CS-NP), 以期降低 5-Fu 的毒副作用,并对其理化性质和体外释放进行考察。

1 材料和方法

1.1 仪器 FA2004 电子天平 (上海天平仪器厂); 多功能搅拌器 (安徽省天长市恒运电器厂); SHIMADZU UV-2201 紫外分光光度计 (日本岛津制作所); Nano-S Malvern 动态光散射纳米粒径测试仪 (英国马尔文有限公司); BECKMAN NVT90 低温超高速离心机 (美国贝克曼公司); 透射电子显微镜 JEM-2010 (日本电子株式会社 JEOL Ltd.); 透析袋 (上海医药公司试剂公司, 可滤过相对分子质量为 10 000); XMT-152C 型数显式电热恒温水浴锅 (上海跃进医疗器械厂)。

[收稿日期] 2008-02-27 **[接受日期]** 2008-05-08

[基金项目] 上海市科委纳米专项基金(0452nm015); 全军“十一五”医药卫生科研基金(06MA177)。Supported by Fund for Nano-research of Shanghai Science and Technology Committee(0452nm015) and the “10th Five-Year Plan” for Medical Science Research Foundation of PLA (06MA177)。

[作者简介] 黄 潇, 硕士, 医师。E-mail: sophiahx@gmail.com

* 通讯作者 (Corresponding author)。Tel: 021-63610109-73451, E-mail: ruiliwei@gmail.com

1.2 试剂 氟尿嘧啶注射液 0.25 g/10 ml(上海旭东海普药业有限公司),5-Fu 标准品(Sigma 公司);壳聚糖(上海如吉科技发展有限公司)脱乙酰度大于92%,平均相对分子质量为40 000~80 000。聚丙烯酸(ALDRICH 公司)相对分子质量100 000,质量体积分数为35%,化学纯。冰醋酸(国药集团化学试剂有限公司),分析纯。醋酸钠(国药集团化学试剂有限公司),分析纯。

1.3 5-Fu-CS-NP的制备 根据文献^[6]报道,采用滴入分散法制备5-Fu-CS-NP混悬液。在室温、持续磁性搅拌下将适量5 mg/ml的5-Fu溶液滴加入1份含质量体积分数为1%壳聚糖的1%的醋酸溶液中混匀,再将上述混合液逐滴加入5份1%(质量体积分数)聚丙烯酸溶液中,控制滴速2 ml/min。反应30~120 min直至形成乳白色混悬液,中止反应,停止搅拌,过滤去除团聚物,将滤液移入透析袋置于250~500 ml pH值为4.5的醋酸-醋酸钠缓冲液中,透析24 h去除剩余单体即得5-Fu-CS-NP混悬液。

1.4 5-Fu-CS-NP的形态和粒径的测定 将所得5-Fu-CS-NP混悬液滴于铜架上,上覆硝化纤维,使之不被电子污染,室温下干燥,透射电子显微镜检测并照相,观察粒子形态;所得5-Fu-CS-NP混悬液用蒸馏水稀释后,用动态光散射纳米粒径仪检测粒径。

1.5 5-Fu含量测定 将配制的5-Fu母液及空白纳米粒混悬液在波长200~400 nm范围内扫描,结果5-Fu在波长265.5 nm处有最大特征吸收,而空白纳米粒混悬液在此处无吸收,不干扰5-Fu测定。精密量取25 mg/ml的5-Fu注射液1 ml,于250 ml容量瓶中加入蒸馏水定容,配制成100 μg/ml的5-Fu母液。分别用移液管量取母液0.4、0.6、0.8、1.2、1.6 ml,用蒸馏水稀释至10 ml,测定其在265.5 nm处的光密度(D)值,以 D 值对药物浓度(C)拟合,得回归方程。

1.6 测定5-Fu-CS-NP的包封率和载药量 取已过滤、尚未透析的5-Fu-CS-NP混悬液适量(V_1),在4℃下400 000× g 低温超高速离心40 min后,下层沉淀为5-Fu-CS-NP,上清液中含全部的游离药物5-Fu。取适量上清液稀释适当倍数后进行紫外分光光度计测定 D 值,代入回归方程计算5-Fu溶液浓度并乘以稀释倍数得上清液中5-Fu浓度 C_1 。包封率(EE%)的计算公式如下:EE%=[(5-Fu投药量-介质中游离药物量)/5-Fu投药量]×100%=[(5-Fu投药量- C_1V_1)/5-Fu投药量]×100%。载药量(drug loading)的计算公式如下:载药量(DL%)=(5-Fu投药量- C_1V_1)/纳米粒质量=(5-

Fu投药量- C_1V_1)/(混悬液质量-上清液质量)。

1.7 5-Fu纳米粒体外缓释特性 精确量取一定量上述已透析的纳米粒混悬液,置于透析袋内两端夹闭,分别以pH值7.2和7.4的PBS缓冲液为释放介质500 ml,保持恒温(37±1)℃,转速(100±1) r/min,分别在15、30 min及1、2、4、8、12、24、48、72、96、120、144、168 h取样5 ml,同时立即补充同温度等体积的释放介质。用紫外分光光度法检测所取样品中药物的浓度,由工作曲线回归方程计算药物累积释放百分比并绘制释放曲线。

2 结果

2.1 5-Fu-CS-NP的形态和粒径 应用透射电子显微镜观察所得5-Fu-CS-NP,见样品观察区域颗粒比较均匀,粒径小于150 nm,分散度好(图1)。用动态光散射纳米粒径仪检测纳米粒粒径为(144.6±3.1) nm。

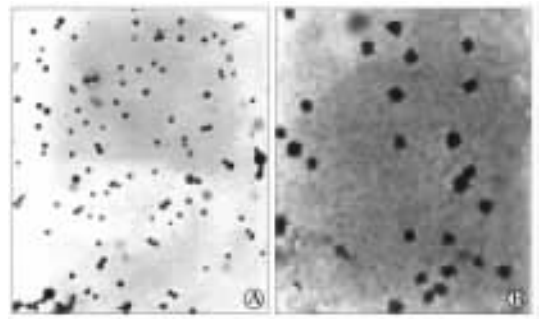


图1 5-Fu-CS-NP的透射电镜照片

Fig 1 TEM image of 5-Fu-CS-NP

Original magnification: A(×10 000), B(×20 000)

2.2 5-Fu标准曲线 标准曲线回归方程为 $D=0.0399C+0.0314$, $r=0.999$ 。其中 D 为光密度值, C 为5-Fu溶液的质量浓度,单位为μg/ml。线性范围为4~16 μg/ml,日内精密性RSD为1.25%,日间精密性为1.96%。回收率为(98.7±0.42)%。采用5-Fu标准品标定5-Fu注射液,5-Fu注射液中5-Fu含量为(99.2±0.6)%。

2.3 5-Fu-CS-NP的包封率和载药量 在一定量的壳聚糖溶液中投入不同量的氟尿嘧啶溶液,制得5-Fu-CS-NP的包封率在一定范围内随5-Fu投药量减少而增加,而载药量则随5-Fu投药量减少而减少(表1)。

2.4 透析袋及投药量对体外释药的影响 由图2可见,当装有游离5-Fu的透析袋浸入释放介质恒温振荡仅4 h,5-Fu的累积释放率已达90%,说明透析袋对游离5-Fu的体外释放滞后作用相对较小,对5-Fu-CS-NP释药的影响可忽略。实验发现,随投药量的增大,载药量随之增大,第1小时释放量随之增

大, 释放维持时间相应缩短。

2.5 释放介质 pH 值对体外释药的影响 在 pH 值 7.2~7.4 的生理范围内, 释放速度变化不大(图 3)。

表 1 5-Fu 投药量对包封率和载药量的影响

Tab 1 Effect of different 5-Fu dosages on drug loading and entrapment efficiency

Sample No.	CS/5-Fu φ	Entrapment efficiency (%)	Drug loading (%)
060321-1	1 : 2	39.7	13.92
060321-2	1 : 1	51.4	9.24
060321-3	2 : 1	80.5	7.30
060321-4	4 : 1	84.5	3.91

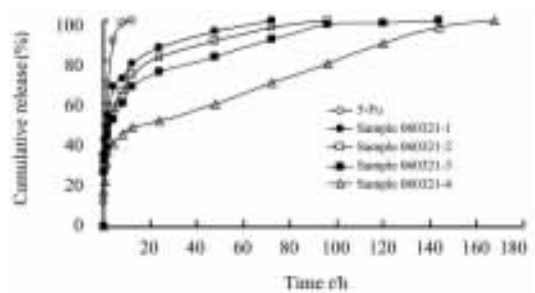


图 2 透析袋及投药量对体外释药的影响

Fig 2 Influence of dialyzer and drug doses on *in vitro* release of 5-Fu-CS-NP

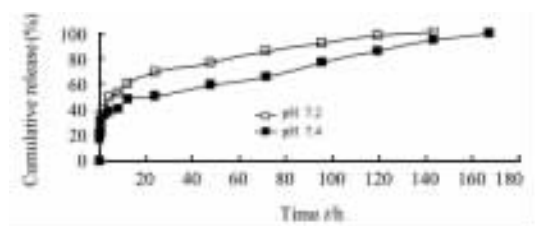


图 3 释放介质 pH 值对体外释放的影响

Fig 3 Influence of pH value on drug release of 5-Fu-CS-NP

3 讨 论

5-Fu 是常用的抗代谢药物, 临床上用于治疗食管癌、胃癌和大肠癌等消化道癌症。在眼科, 有实验研究证实 5-Fu 可用于预防非穿透性抗青光眼术后滤泡纤维化^[7], 预防白内障术后后囊膜混浊和虹膜粘连^[8], 治疗增殖性玻璃体视网膜疾病^[9]。限制其临床应用的主要是其毒副作用。5-Fu 缓释制剂可以有效减低其毒副作用^[10-11], 是目前研究的热点, 常见的有 5-Fu 微囊和聚乳酸 5-Fu 微球。本研究采用壳聚糖-聚丙烯酸纳米粒为载体制备 5-Fu 缓释制剂, 为 5-Fu 缓释制剂提供了新思路。

设定 CS 和聚丙烯酸质量体积分数均为 1%, 当 CS:5-Fu 的质量比从逐渐 1 : 2 升至 1 : 1、2 : 1 和

4 : 1 时, 5-Fu 的包封率明显提高, 载药量有一定程度的下降。上述 4 个样品反应系统 pH 值均在 4.0~4.5 之间。在这种情况下, 相对于同等量的药物来讲, 载体增加, 被包裹入载体的药物比率也增加, 故药物包封率明显增加。而载药量反而下降的主要原因是虽然包封率增高, 但等量载体相对投药总量减少, 所以同等质量纳米粒中包含的药物量有所下降。

1% 聚丙烯酸 pH 值约为 4.0, 1% CS 的 pH 值为 3.5, 而 5 mg/ml 的 5-Fu 注射液 pH 值为 8.0。CS 溶于稀盐酸和稀醋酸, 在 pH 值大于 7 的溶液中则很快形成团聚物。所以, 将 5-Fu 加入 1% CS 溶液中时, 宜缓慢滴加并持续搅拌, 控制 pH 值在 6.5 以下, 防止 CS 团聚降低纳米粒得率。

[参考文献]

- [1] Abdelwahab M T, Kugelberg M, Kugelberg U, Zetterström C. After-cataract evaluation after using balanced salt solution, distilled deionized water, and 5-fluorouracil with a sealed-capsule irrigation device in the eyes of 4-week-old rabbits[J]. J Cataract Refract Surg, 2006, 32:1955-1960.
- [2] 李筱荣, 刘新玲, 常 津, 刘小燕. 靶向 5-氟尿嘧啶纳米微球对体外培养的人晶状体上皮细胞作用的研究[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42:526-530.
- [3] 才 瑜, Lim Z, Lim B A, Oen F, 晏晓明, 李美玉, 等. 超声乳化联合小梁切除术及术中应用 5-氟尿嘧啶治疗青光眼合并白内障的长期疗效观察[J]. 中华眼科杂志, 2005, 41:128-131.
- [4] McDonnell P J, Krause W, Glaser B M. *In vitro* inhibition of lens epithelial cell proliferation and migration[J]. Ophthalmol Surg, 1988, 19:25-30.
- [5] Yamamoto T, Soong H K, Lighter P R. Effects of 5-Fu on cultured rabbit lens epithelial cells[J]. Jpn J Ophthalmol, 1990, 34:325-330.
- [6] Hu Y, Jiang X Q, Ding Y, Ge H X, Yuan Y Y, Yang C Z. Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles[J]. Biomaterials, 2002, 23:3193-3201.
- [7] Choudhary A, Wishart P K. Non-penetrating glaucoma surgery augmented with mitomycin C or 5-fluorouracil in eyes at high risk of failure of filtration surgery: long-term results[J]. Clin Experiment Ophthalmol, 2007, 35:340-347.
- [8] Abdelwahab M T, Kugelberg M, Zetterström C. Irrigation with thapsigargin and various concentrations of 5-fluorouracil in a sealed-capsule irrigation device in young rabbit eyes to prevent after-cataract[J]. Eye, 2008[Epub ahead of print].
- [9] 毕宏生, 崔 彦, 张建华, 王兴荣, 谢孝锋. 5-氟尿嘧啶聚乳酸微球防治实验性增生性玻璃体视网膜病变的效果观察[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42:37-41.
- [10] 崔 彦, 毕宏生, 王兴荣, 张建华, 谢孝锋. 5-氟尿嘧啶聚乳酸微球防治增生性玻璃体视网膜病变的安全性研究[J]. 中国实用眼科杂志, 2006, 24:208-212.
- [11] Abdelwahab M T, Kugelberg M, Seregard S, Zetterström C. Safety of irrigation with 5-fluorouracil in a sealed-capsule irrigation device in the rabbit eye[J]. J Cataract Refract Surg, 2007, 33:1619-1623.