

自制左氧氟沙星羧甲基壳聚糖缓释微球体内结肠靶向释放的实验

李 扬¹, 王 强^{1*}, 钱 方², 沈宏亮¹

(1. 第二军医大学长征医院普通外科, 上海 200003; 2. 长征医院药学部)

[摘要] **目的:**制备左氧氟沙星羧甲基壳聚糖(LVFX/CMC)微球并检测其在大鼠体内结肠靶向释药的性能。**方法:**色谱柱: KromasilRKR100-5C18(250 mm×4.6 mm), 流动相: 乙腈-0.1%三氟醋酸溶液(20:80), 柱温: 50℃, 激发波长: 295 nm, 发射波长: 495 nm, 流速: 1.0 ml/min。SD大鼠60只, 随机分为2组, 分别以LVFX/CMC微球(含40 mg左氧氟沙星)及等量左氧氟沙星溶剂灌胃, 以高效液相色谱法对LVFX/CMC微球和左氧氟沙星(LVFX)灌胃后大鼠胃、小肠、盲肠、结肠及血液中药物浓度进行定量检测。**结果:**灌胃后LVFX/CMC微球组5 h盲肠、结肠药量分别达(3.394±0.197)和(1.873±0.216) mg, 远高于LVFX组的(0.489±0.123)和(0.078±0.002) mg ($P<0.01$)。在9 h时LVFX/CMC微球组盲肠和结肠药量仍分别达到(1.580±0.234)和(0.713±0.073) mg, 明显高于LVFX组的(0.105±0.023)和(0.054±0.016) mg ($P<0.01$)。LVFX/CMC微球组血药浓度于5 h后达到最高, 而LVFX组1 h后即达最高血药浓度峰。微球组盲肠和结肠内容物的药量在7、9 h时段均明显大于胃和小肠内的药量。**结论:**左氧氟沙星羧甲基壳聚糖微球在体内实验中的释放符合结肠靶向释药的特点。

[关键词] 左氧氟沙星羧甲基壳聚糖; 微球体; 结肠

[中图分类号] R 944.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)05-0517-04

Preparation and controlled release of colon-targeted carboxymethylchitosan microspheres containing levofloxacin: an *in vivo* study

LI Yang¹, WANG Qiang^{1*}, QIAN Fang², SHEN Hong-liang¹ (1. Department of General Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University)

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare levofloxacin-carboxymethyl-chitosan (LVFX/CMC) microspheres and to study their colon-targeted release in rats. **Methods:** KromasilRKR100-5C18(250 mm×4.6 mm) was used as the analytical column and the temperature was maintained at 50℃. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid (20:80) pumped at a flow rate of 1.0 ml/min, with λ_{ex} 295 nm and λ_{em} 495 nm. Sixty healthy male SD rats were randomized into 2 groups: to receive gastric lavage with normal LVFX (40 mg, control group) and LVFX/CMC microspheres (40 mg, treatment group). HPLC was used to detect the concentrations of LVFX in the stomach, intestine, cecum, colon and blood in rats in both groups. **Results:** LVFX was detectable 3 h after LVFX/CMC microsphere lavage. Five hours after lavage, the levels of LVFX in cecum and colon were respectively (3.394±0.197) mg and (1.873±0.216) mg in treatment group, and (0.489±0.123) mg and (0.078±0.002) mg in control group ($P<0.01$). Nine hours after lavage, the levels of LVFX in cecum and colon were (1.580±0.234) mg and (0.713±0.073) mg in treatment group, and (0.105±0.023) mg and (0.054±0.016) mg in control group ($P<0.01$), respectively. Serum level of LVFX peaked at 5 h in treatment group and at 1 h in control group. The concentrations of LVFX were obviously higher in cecum and colon than those in stomach and intestine. **Conclusion:** The prepared LVFX/CMC microspheres have the property of colon-targeted release in rats.

[KEY WORDS] levofloxacin-carboxymethyl-chitosan; microspheres; colon

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(5): 517-520]

结肠靶向释药已成为近年来新剂型研究的热点^[1,2], 如在行结、直肠手术前肠道准备时应用结肠靶向抗生素可增强杀菌效能, 显著减少结肠腔内的细菌数量, 同时还能减少细菌耐药及菌群失调的可能。在军事人员投入渡海登陆作战时, 如能应用结肠靶向释放抗生素, 可预防性降低可能发生的结肠损伤及严重创伤、烧伤、休克等所致的伤员局部和全

身感染程度, 将达到更有效救治伤员的目的。本实验应用前期研究所研制的羧甲基壳聚糖左氧氟沙星

[基金项目] 全军医药科研基金指令性课题(01L056). Supported by Mandatory Medical Science Research Foundation of PLA(01L056).

[作者简介] 李 扬, 博士, 主治医师.

E-mail; E-mail: ig1901@yahoo.com

* Corresponding author. E-mail: wangq@guomai.sh.cn

(LVFX/CMC)微球^[3],选择大鼠作为动物实验对象,通过以微球口饲大鼠,在不同时段采取大鼠的胃、小肠、盲肠和结肠,对各标本进行高效液相色谱法定量检测,根据结果观察 LVFX/CMC 微球在盲肠和结肠中释放的情况,并进行相关分析。

1 材料和方法

1.1 药品、试剂和仪器 左氧氟沙星标准品(批号:021003,含量 100.1%,江苏昆山双鹤制药公司赠送)。普洛帕酮对照品(上海市药检所提供,纯度 99.0%,内标);甲醇及乙腈为色谱醇。高效液相色谱仪:岛津 LC-10AT 型高压泵,RF-551 型荧光检测器;色谱柱:KromasilRKR100-5C18(250 mm×4.6 mm)。

1.2 LVFX/CMC 微球的制备^[3] 将适量的液体石蜡与 Tween-80 以 250 r/min 转速混匀,按一定比例加入含羧甲基壳聚糖(40.0 g/L)的生理盐水溶液,在 30℃ 下同速搅匀 20 min,使之成为稳定的乳化体系,再加入左氧氟沙星(26.6 g/L)。冷却,加入一定量的戊二醛进行交联固化,反应完成后经抽滤、石油醚洗涤、丙酮脱水、干燥即得载药微球。取微球 0.1 g 研磨,超声提取后加入释放液生理盐水,定容于 250 ml 容量瓶中,过滤后以紫外分光光度计 293 nm 处测定光密度值。所得微球载药量为 21%,平均粒径为 64 μm,体外释药具有明显的缓释作用。

1.3 动物实验 正常 SD 雄性大鼠,体质量(216±12) g,共 60 只,随机分成 10 组,每组 6 只。前 5 组为 LVFX/CMC 微球组,以 LVFX/CMC 微球按含 40 mg 左氧氟沙星的微球量(190 mg)灌胃;后 5 组为单用 LVFX 组以左氧氟沙星 40 mg 水溶剂灌胃;本实验中所有大鼠均非空腹,为自由摄食、水状态。LVFX/CMC 微球组和 LVFX 组各 5 组分别于给药 1、3、5、7 和 9 h 后麻醉采取标本。心内取全血置于肝素化离心管中,混匀,3 000 r/min 离心 20 min,精密量取上层血浆 0.5 ml 置于 5 ml 离心管内待测。同时分别切取其胃、小肠、盲肠、结肠,收集各段内容物,精密称质量后,以生理盐水稀释至总体积为 10 ml,制成匀浆涡旋混匀后取 0.5 ml 混悬液置于离心管内,-60℃ 冰箱保存待测。以高效液相色谱法测定中左氧氟沙星浓度,计算出各段内容物中左氧氟沙星的总量。

1.4 高效液相色谱法测定左氧氟沙星含量

1.4.1 色谱条件 流动相:乙腈-0.1%三氟醋酸溶液(20:80),柱温:50℃,激发波长:295 nm,发射波

长:495 nm,流速:1.0 ml/min。

1.4.2 样品的预处理及测定 血样:50 μl 血样加入 100 μl 甲醇沉降蛋白后,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液 20 μl 进样。消化道内容物:消化道内容物按标本采取制成匀浆后,涡旋 1 min,3 000 r/min 离心 20 min;取 50 μl 加入 100 μl 甲醇沉降蛋白,同法离心。取上清液 20 μl 进样。

1.4.3 制作左氧氟沙星标准曲线及方法学考察 精密称取 9.8 mg 标准品,用少量甲醇溶液移入容量瓶中,加入适量甲醇使成浓度为 392 μg/ml。精密吸取,稀释成浓度为 12.8 μg/ml 和 1.28 μg/ml 的血样,用空白血样倍比稀释上述血样,使浓度为 640、320、160、80、40、20、10、5 ng/ml 的标准血样;各标准血样按 1.4.1 色谱条件进样行液相色谱分析,以浓度对峰面积进行回归,得回归方程。于空白血浆中加入高、中、低(1.0、0.5 和 0.1 μg/ml)3 个浓度的左氧氟沙星标准溶液各 5 管,同日进行萃取测定,以考察方法的日内精密性;同法在连续 5 d 内进行萃取测定,考察日间精密性。同时计算所得峰面积与相对浓度对照品溶液峰面积的比值,即得其回收率。

1.5 统计学处理 计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。使用 SPSS 8.0 进行统计学分析。两组均数比较采用 *t* 检验,两组率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 左氧氟沙星标准曲线 以浓度(*y*)对峰面积(*x*)进行回归,得回归方程: $y=0.726 2+0.001 065 x(r=0.999 8)$,显示 HPLC 测定样品中的左氧氟沙星具有良好的线性。

2.2 方法回收率及精密性结果 如表 1。结果表明方法回收率和精密性良好。HPLC 色谱图中左氧氟沙星和内标的分离情况良好,无杂质峰干扰。见图 1。

表 1 样品中左氧氟沙星的方法回收率及精密性

Tab 1 The recovery and inter/intra-day precision of LVFX

(*n*=6, $\bar{x} \pm s$, %)

Concentration ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Recovery	Inter day RSD	Intra day RSD
0.1	106.9±3.6	4.37	6.69
0.5	102.1±4.1	2.45	3.32
1.0	98.2±2.7	1.56	2.78

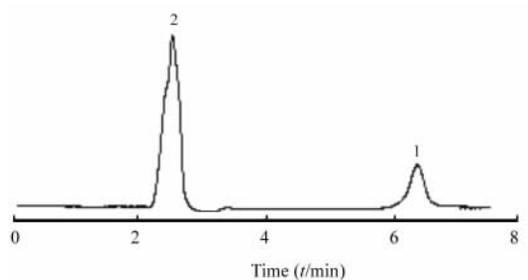


图1 HPLC测定LVFX标准品色谱图

Fig 1 The chromatogram of LVFX

1: Internal standard; 2: LVFX

2.3 样品测定结果 如表2。LVFX组中1、3 h盲肠或结肠内容物中均未检测到LVFX, LVFX/CMC微球组3 h时可检测出LVFX; LVFX及LVFX/CMC微球组两组均在5 h时检测到药物峰值, 随后浓度均逐渐下降($P < 0.01$)。微球组5 h盲肠药量达

(3.394 ± 0.197) mg, 结肠药量为(1.873 ± 0.216) mg, 远高于LVFX组的(0.489 ± 0.123) mg和(0.078 ± 0.002) mg。在9 h时微球组盲肠和结肠药量仍分别达到(1.580 ± 0.234) mg和(0.713 ± 0.073) mg, 明显高于LVFX组的(0.105 ± 0.023) mg和(0.054 ± 0.016) mg, 差异有显著意义($P < 0.01$)。LVFX组在盲肠和结肠的药量大部分时间里均明显低于在胃和小肠内容物的量, 其在后者的药量占消化道总量的90%以上; 而微球组在盲肠和结肠内容物的药量在7、9 h时段均明显高于胃和小肠内的药量; 各组间差异统计学均有显著意义($P < 0.01$)。但由于壳聚糖为小分子, 以其为载体制备的前体药给大鼠灌胃后, 不仅在小肠远端有一定量的药物释放, 而且在盲肠、结肠中药物释放出的速度较快。微球灌胃后, 血药浓度于5 h后达到最高, 而对照组1 h后即达最高血药浓度峰, 微球组血药浓度波形明显滞后(图2)。

表2 LVFX及LVFX/CMC微球灌胃后胃肠道各段内容物LVFX的总量

Tab 2 Concentration of LVFX in gastrointestinal tract after gastricavage of LVFX/CMC and LVFX

 $(n=6, \bar{x} \pm s, \text{m/mg})$

Time (t/h)	Stomach		Intestine		Cecum		Colon	
	LVFX	LVFX/CMC	LVFX	LVFX/CMC	LVFX	LVFX/CMC	LVFX	LVFX/CMC
1	8.059 ± 0.895	7.835 ± 0.470	5.182 ± 0.496	7.407 ± 0.619	ND	ND	ND	ND
3	10.249 ± 1.300	5.098 ± 0.551▲	0.235 ± 0.096	6.972 ± 0.734▲▲	ND	1.432 ± 0.138▲▲	ND	0.289 ± 0.004▲▲
5	0.672 ± 0.122	0.936 ± 0.085▲	0.165 ± 0.022	2.128 ± 0.229▲▲	0.489 ± 0.123	3.394 ± 0.197△△▲▲	0.078 ± 0.002**	1.873 ± 0.216▲▲
7	0.905 ± 0.166	0.100 ± 0.010▲▲	0.177 ± 0.011	0.080 ± 0.016▲▲	0.069 ± 0.003	2.865 ± 0.227△△▲▲	0.014 ± 0.002**	1.501 ± 0.182△△▲▲
9	0.756 ± 0.089	0.438 ± 0.088▲	0.145 ± 0.014	0.178 ± 0.027▲	0.105 ± 0.023	1.580 ± 0.234△△▲▲	0.054 ± 0.016**	0.713 ± 0.073▲▲

** $P < 0.01$ vs the LVFX concentration of stomach and intestine in LVFX group at the same point; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs the LVFX concentration of stomach and intestine in LVFX/CMC group at the same point; $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$ vs LVFX group in the same position at the same point; ND: Not detected

3 讨论

近年来结肠靶向给药体系的研究得到了迅速发展, 并引起国内外医药界的极大关注。结肠靶向给药时药物在结肠直接释放, 可以提高局部药物浓度, 从而改善对结肠局部病变的治疗; 同时可以减少各种药物如化疗药物等对胃肠道的刺激及由于胃肠道吸收所引起的全身性毒副作用。在众多的结肠靶向药物传递系统中, 壳聚糖的衍生物^[4]如半合成琥珀酸-壳聚糖和邻苯二甲酸-壳聚糖等具有碱依赖性, 在酸性介质中膨胀成凝胶, 延缓其释药速度, 故可耐

受上消化道胃酸及各种消化酶的作用; 而到达结肠后, 壳聚糖被结肠中菌群产生的酶所分解而释放所载有的药物^[5], 同时其生物黏附性能可使其黏附于结肠黏膜, 从而延长药物作用时间, 更有效的产生治疗作用; 故将其应用于结肠靶向释药的研究日渐增多^[6]。Tozaki等^[7]应用壳聚糖制成胶囊, 分别包裹治疗溃疡性结肠炎的药物R68070, 并选择人工诱发的大鼠溃疡性结肠炎进行释药实验, 结果发现所载药物可如预期设计到达结肠定位释放。同时以壳聚糖为辅料, 结合5-氨基水杨酸, 治疗人工诱导的大鼠溃疡性结肠炎, 结果显示大鼠灌胃靶向系统后结肠

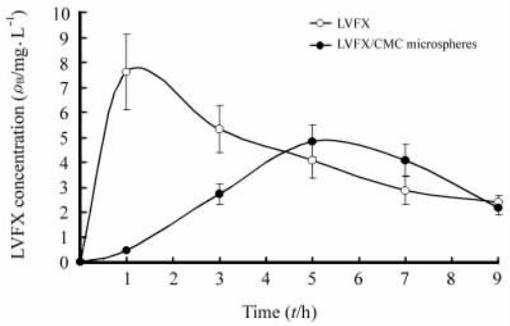


图2 LVFX/CMC微球、LVFX灌胃后LVFX血药浓度-时间曲线

Fig 2 Blood concentration-time profile of LVFX after gastric lavage of LVFX/CMC microspheres and LVFX

$n=6, \bar{x} \pm s$

黏膜中5-氨基水杨酸的浓度明显高于其混悬液单独灌胃时的浓度。

本实验进行动物体外药物释放研究,发现经壳聚糖制成微球制剂后载入左氧氟沙星对大鼠灌胃,对不同时段大鼠消化道各段内容物药物含量进行分析。研究发现对照组3h内盲肠或结肠内容物中均未检测到药物,在大部分时间里盲肠和结肠的药量均明显少于在胃和小肠内容物的量,其在胃和小肠内容物的药量占消化道总量的90%以上;表明口服抗生素在上消化道吸收降解,并不能有效到达结肠部位,对于结肠局部病变的治疗作用较小。而口服载药微球组在胃和小肠中释药较少,药物到达后在盲肠和结肠内容物的药量在随后的时段均明显大于胃和小肠内的药量,远高于单用左氧氟沙星组结肠内容物的药物含量。目前认为此类结肠定位释放机制是壳聚糖辅料保护了其与所载药物之间相连接的酯键,使其免受胃肠道上部羧酸酯酶的作用。到达结肠后,壳聚糖对结肠菌群代谢产物如降解多糖的酶类较为敏感,从而被降解后释放药物。该微球在结肠释药时间较长,数小时后仍能在结肠内容物中维持较高的药物浓度,可能与其固有的缓释机制有

关。

目前常用的肠道准备一般为术前连续3d口服抗生素,而药物多在胃和小肠大量吸收入血,血循环中的有效药物仅能杀灭肠黏膜血供可达范围内的细菌,而对于结肠内容物及结肠黏液中的细菌抗菌作用甚微。如以结肠靶向系统将抗生素选择性在结肠中释放,长时间维持局部较高的药物浓度,可有效提高结肠灭菌和肠道准备的效果。而对于野战结肠外伤及其他各种重症感染的伤员而言,战前如能预防性使用结肠靶向抗生素,必将能更好的达到有效救治的目的。本实验仅为结肠靶向药物的研制做初步探讨,要制成战前一次性口服药剂达到更好肠道灭菌作用的结肠靶向缓释剂或应用于结肠恶性肿瘤局部化学药物靶向系统尚有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Chourasia MK, Jain SK. Polysaccharides for colon targeted drug delivery[J]. Drug Deliv, 2004, 11: 129-148.
- [2] Lorenzo-Lamosa ML, Remunan-Lopez LC, Vila-Jato JL, et al. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery [J]. J Control Rel, 1998, 52: 109-118.
- [3] 沈宏亮,王强,钱方,等.左氧氟沙星羧甲基壳聚糖缓释微球的制备及其体外释放研究[J].第二军医大学学报, 2004, 25: 482-484.
- [4] Shimono N, Takatori T, Ueda M, et al. Multiparticulate chitosan-dispersed system for drug delivery [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2003, 51: 620-624.
- [5] 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[J].第一军医大学学报, 2003, 23: 431-434.
- [6] Zhang H, Alsarra IA, Neau SH. An *in vitro* evaluation of a chitosan-containing multiparticulate system for macromolecule delivery to the colon[J]. Int J Pharm, 2002, 239: 197-205.
- [7] Tozaki H, Odoriba T, Okada N, et al. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery; enhanced localization of 5-aminosalicylic acid in the large intestine accelerates healing of TNBS-induced colitis in rats[J]. J Control Rel, 2002, 82: 51-61.

[收稿日期] 2005-09-14

[修回日期] 2005-11-29

[本文编辑] 尹茶