

- despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments [J]. Eur J Pharm, 1978, 47(4): 379-391.
- [14] MA X, KU B S, YAO H Y, et al. The conditions of forced swimming test in mice [J]. Acta Acad Med Xuzhou(徐州医学院学报), 2005, 25(3): 231-233.
- [15] LIAN J, WANG J, SUN H F, et al. Application of methyl in drug design [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2013, 48(8):

- 1195-1208.
- [16] WANG J, LIU J. Application of fluorine in drug design [J]. Chin J Org Chem(有机化学), 2011, 31(11): 1785-1798.
- [17] KIRK K L. Fluorination in medicinal chemistry: methods, strategies and recent developments [J]. Org Process Res Dev, 2008, 12(2): 305-321.

收稿日期: 2015-11-18

苄达赖氨酸温敏型眼用原位凝胶的体外释放性及角膜渗透性考察

李颖, 汤湛, 尹丽娜, 王胜浩, 王俏* (浙江省医学科学院药物研究所, 杭州 310013)

摘要: 目的 研究苄达赖氨酸温敏型眼用原位凝胶体外释放性及离体角膜渗透性。方法 考察泊洛沙姆 P407 及 P188 用量对处方凝胶温度的影响, 并对结果进行二项式拟合筛选出最优处方; 以市售滴眼液或溶液剂为对照, 采用无膜法、透析袋法、透析膜法考察了该处方的体外释放性; 采用 Franz 扩散池对该处方进行了离体角膜渗透研究。结果 该优选处方对角膜刺激性较小, 凝胶温度为 31.5 °C, pH 为 6.95, 渗透压为 397 mOsmol·kg⁻¹; 相比于对照组, 该处方缓释效果明显, 未出现突释效应; 离体角膜渗透研究结果表明, 该优选处方 6 h 角膜累积渗透率及渗透速率均低于市售处方。结论 温敏型原位凝胶缓释效果明显, 有望成为治疗白内障药物苄达赖氨酸的新剂型。

关键词: 原位凝胶; 眼; 苄达赖氨酸; 释放; 渗透

中图分类号: R944.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)05-0580-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.014

Study on *in Vitro* Release and Corneal Permeation of a Thermoresponsive Ophthalmic in Situ Gel Containing Bendazac Lysine

LI Ying, TANG Zhan, YIN Lina, WANG Shenghao, WANG Qiao* (*Institute of Medical Materials, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the *in vitro* release and corneal permeation of a thermoresponsive ophthalmic in situ gel containing bendazac lysine. **METHODS** The effect of the concentration of Poloxamer407 and 188 on the gelation temperature was evaluated, then the results were fitted with second-order quadratic models to optimize the formulation. Using aqueous solution or eye drops as control, the *in vitro* release of the formulation was evaluated by membrane-less method, dialysis bag method and dialysis membrane method. Then, the corneal permeation experiment of the optimum formulation was carried out with Franz diffusion cells. **RESULTS** The optimum formulation had low corneal irritation, gelling temperature of 31.5 °C, pH of 6.95, and osmotic pressure of 397 mOsmol·kg⁻¹. Compared to the control group, the optimum formulation had significant sustained release effect without burst release. The result of the corneal permeation showed that the corneal permeation rate of the in situ gel was lower than the eye drops. **CONCLUSION** With significant sustained release effect, the thermoresponsive ophthalmic in situ gel will become a promising alternative formulation for bendazac lysine which was used for treating cataract.

KEY WORDS: in situ gel; ocular; bendazac lysine; release; permeation

白内障是一种常见的致盲性眼疾。由于有毒物质、环境刺激或基因突变等因素导致眼球内晶状体浑浊, 使人视力下降并逐步加重, 最终导致失明。目前最有效的治疗方法是通过手术摘除晶

状体并植入人工晶状体, 但手术费用较高, 且术后易出现后囊膜浑浊等后遗症^[1], 故寻找有效的药物对白内障患者进行治疗以延缓白内障病情恶化显得尤为重要。

基金项目: 浙江省医学重点学科群项目(XKQ-010-001); 浙江省科技计划项目(2012F10005); 浙江省医科院青年基金(2013Y002); 浙江省医药卫生科技项目(2014KYB068)

作者简介: 李颖, 女, 硕士 Tel: (0571)88215623 E-mail: Li_Ying@hotmail.com

*通信作者: 王俏, 女, 研究员, 硕士 Tel:

(0571)88215623 E-mail: wangqiao-1@163.com

苄达赖氨酸对于早期老年性白内障具有防治作用^[2],通常以滴眼液形式进行局部给药。给药后,由于眼组织的各种保护性机制(如鼻泪管引流、泪液稀释、结膜吸收等),药物在角膜前滞留时间短,故需频繁给药以达有效治疗浓度。理想的眼用制剂要求给药方便,不会引起视力模糊或眼部刺激,并能在角膜前保留一定时间。温敏型原位凝胶在非生理条件下为溶液状,方便给药;当到达生理温度时相变为凝胶状,以延长药物在角膜前滞留时间。有文献表明^[3-5],温敏型原位凝胶多次给药对兔眼刺激性较小,未对角膜的结构完整性造成影响。

本研究选取了由聚氧乙烯(PEO)和聚氧丙烯(PPO)构成的 PEO_x-PPO_y-PEO_x 型嵌段共聚物——泊洛沙姆(P407, P188)构建苄达赖氨酸温敏型原位凝胶,通过正交试验并对结果进行二项式拟合得出最优处方,采用无膜法、透析袋法、透析袋法重点考察了其体外释药行为及释药机制,并采用离体角膜法考察了其角膜渗透性。

1 材料

1.1 仪器

日本岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪,岛津紫外检测器 SPD-20A,岛津高效液相色谱工作站 LCsolution 软件;Franz 扩散池(自制);HZ-9211KB 台式空气恒温振荡器(太仓市科教器材厂);HWCL-1 恒温水浴磁力搅拌浴(郑州长城工贸有限公司);透析袋(截留分子量:3 500,武汉鑫思锐科技有限公司);TGL-16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司);STY-1A 渗透压测定仪(天大天发科技有限公司);PHS-3C 精密级数字式酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司)。

1.2 试药

苄达赖氨酸对照品(武汉大华伟业医药化工有限公司,批号:20130203,纯度≥98%);乙腈(色谱纯, TEDIA);双蒸水;冰醋酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号:20120530);0.5%莎普爱思滴眼液(浙江莎普爱思药业股份有限公司,批号:140401D);泊洛沙姆 P407(德国 BASF,批号:WPEH540B);泊洛沙姆 P188(德国 BASF,批号:WPYH570B);人工泪液;其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

新西兰大白兔,♀♂,2.5~3.0 kg,浙江省医学科学院实验动物中心提供,许可证号:SCXK(浙

2013-0055)。

2 方法

2.1 色谱条件

Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相:乙腈-1%冰醋酸(58:42);流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:307 nm;柱温:35 ℃;进样量:20 μL。

2.2 扩散介质的制备

自制人工泪液(STF)^[6]:氯化钠 6.7 g·L⁻¹、碳酸氢钠 2.0 g·L⁻¹、二水合氯化钙 0.08 g·L⁻¹。离体角膜渗透试验扩散介质^[7]:以谷胱甘肽-碳酸氢钠林格溶液(GBR)为扩散介质,此介质由 2 部分组成,分别配制:一部分含氯化钠 12.4 g·L⁻¹、氯化钾 0.716 g·L⁻¹、磷酸二氢钠 0.206 g·L⁻¹、碳酸氢钠 4.908 g·L⁻¹;另一部分含二水氯化钙 0.230 g·L⁻¹、六水氯化镁 0.318 g·L⁻¹、葡萄糖 1.800 g·L⁻¹、谷胱甘肽(氧化型)0.184 g·L⁻¹。将上述 2 种溶液低温储存,用前等量混合即得。

2.3 体外释放考察

为了更好地模拟药物的角膜前释放行为,体外释放研究采用了无膜法、透析袋法、透析膜法来进行考察。

2.3.1 无膜法 精密移取 2 mL 凝胶,加入表面积为(1.76±0.01)cm²的具塞管,称重并记录后,将具塞管置于恒温摇床中,温度控制在 34 ℃,震荡频率 100 r·min⁻¹。待具塞管中处方完全结为凝胶状后,加入 2 mL STF(34 ℃)作为释放介质。每隔 20 min,完全倾倒入上层释放介质,称重并记录,再将具塞管置于恒温摇床中,待处方完全结为凝胶状后,补充等温 2 mL STF 作为释放介质。相邻时间点样品重量之差即为此期间凝胶溶蚀量。以凝胶溶蚀量除以溶蚀前凝胶质量即得各时间点的累积溶蚀量。将倾倒入出的上层释放介质经孔径 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,采用 HPLC 测药物含量。

2.3.2 透析袋法 精密移取 1.0 mL 凝胶于透析袋中,将透析袋袋口扎紧后置于 25 mL 西林瓶中。加入 25 mL STF(34 ℃)作为扩散介质,并将西林瓶置于恒温摇床中,温度控制在 34 ℃,震荡频率 100 r·min⁻¹。每隔一定时间,取样 1 mL,并及时补加等温等体积 STF。样品经离心后,取上清液采用 HPLC 测药物含量。

2.3.3 透析膜法 将新鲜处理的透析膜固定于自制平口 Franz 扩散池的供给池和接收池之间,在接

受池中加入新鲜配制的 STF 溶液 3 mL, 并将温度控制于 34 ℃, 磁子转速 100 r·min⁻¹, 然后在供给池中加入温敏原位凝胶 80 μL。加入温敏原位凝胶后开始计时, 每隔一定时间从接收池中取出 100 μL 样品, 同时补充等体积等温 STF 溶液, 样品经离心后, 取上清液采用 HPLC 测定药物浓度。

2.4 离体角膜渗透研究

将新西兰大白兔空气针处死后, 及时取眼球, 立即除去多余组织, 仔细分离出角膜。将新鲜离体角膜固定于自制弧形口 Franz 扩散池的供给池和接收池之间, 使上皮层面向供给池, 在接受池中加入新鲜配制的 GBR 溶液(34 ℃)3 mL, 并将温度控制于 34 ℃, 磁子转速 100 r·min⁻¹, 然后在供给池中加入温敏原位凝胶 80 μL。加入处方后开始计时, 每隔一定时间从接收池中取出 100 μL 样品, 同时补充等体积等温 GBR 溶液, 样品经离心后, 采用 HPLC 测定药物浓度。

试验结束后, 将暴露于扩散介质区域的角膜称重, 记为 m_b ; 70 ℃干燥 12 h 后再次称重, 记为 m_a 。角膜水化值按下式计算: $H = \frac{m_b - m_a}{m_b} \times 100\%$,

据文献报道^[8], 正常角膜水化值为 76%~80%; 若角膜水化值在 83%~92%内则说明角膜上皮细胞或内皮细胞受到损伤。

2.5 数据处理

无膜法中累积释放率 Q 可由下式求算:

$$Q_n = \frac{V \sum_{i=1}^{n-1} C_i}{m_{\text{drug}}}$$

体外释放研究中有膜法的累积释放率 Q 及离体角膜渗透研究中累积渗透率 Q 均可由下式求算:

$$Q_n = \frac{V_0 C_n + V \sum_{i=1}^{n-1} C_i}{m_{\text{drug}}}$$

其中, Q_n 为累积释放率或累积渗透率(%), V 为每次取样体积(mL), V_0 为接受池中溶液体积(mL), C_n 为 t 时间测定的药物浓度(mg·mL⁻¹), C_i 为 t 时间前测定的浓度(mg·mL⁻¹), m_{drug} 表示试验前苄达赖氨酸总量(mg)。

3 结果

3.1 分析方法学研究

3.1.1 标准曲线的制备

精密称取苄达赖氨酸对

照品 51.4 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解至刻度线, 制成 1 028 μg·mL⁻¹ 的对照品储备液。用 STF 将储备液稀释成浓度为 0.12, 0.25, 0.50, 1.00, 2.01, 4.02, 8.03, 16.06, 32.13, 64.25, 128.50, 257.00, 514.00 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液($n=5$)。以苄达赖氨酸的浓度(C)对峰面积(A)进行回归, 回归方程为 $A=14\,413.1C+237.789$ ($r^2=0.999\,2$, $n=5$), 线性范围为 0.12~514.00 μg·mL⁻¹, 线性关系良好, 定量限为 0.12 μg·mL⁻¹。

3.1.2 专属性考察 将空白 STF、对照品溶液(溶于 STF)、无膜法样品、透析袋法样品、透析膜法样品、空白 GBR 溶液、对照品溶液(溶于 GBR)、角膜渗透样品按“2.1”项下色谱条件检测, 结果见图 1。结果显示, 空白 STF 及空白 GBR 溶液不干扰苄达赖氨酸的含量测定。

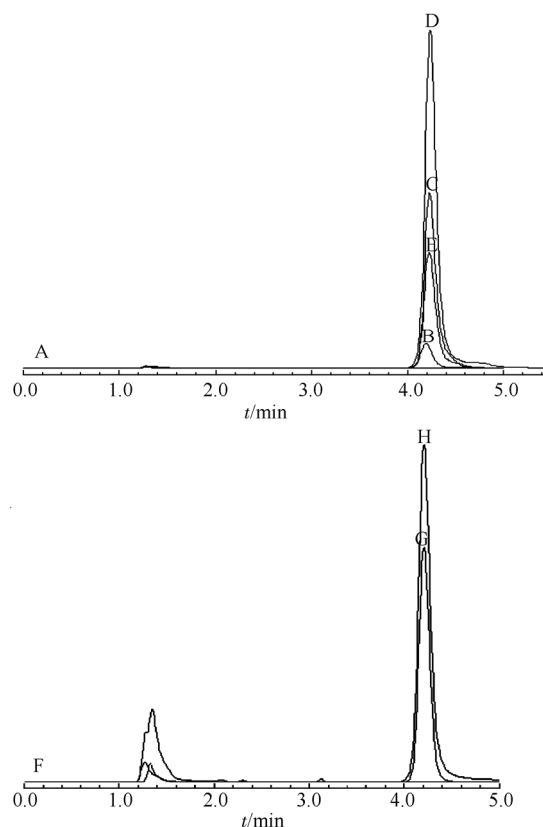


图 1 高效液相色谱图

A—空白 STF 溶液(不出峰); B—STF 对照品(32.13 μg·mL⁻¹); C—无膜法样品; D—透析袋法样品; E—透析膜样品; F—空白 GBR 溶液(不出峰); G—GBR 对照品(31.69 μg·mL⁻¹); H—角膜渗透样品。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A—blank STF solution(no peak); B—blank STF spiked with 32.13 μg·mL⁻¹ bendazac lysine; C—sample of membrane free model; D—sample of dialysis bag model; E—sample of membrane model; F—blank GBR solution(no peak); G—blank GBR spiked with 31.69 μg·mL⁻¹ bendazac lysine; H—sample of transcorneal permeation.

3.1.3 方法学考察 制备高、中、低(405.68, 8.03, 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)3个浓度的苄达赖氨酸对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定。同1天平行操作5次,考察方法的日内RSD;分别5d重复操作,考察方法的日间RSD。结果显示,日内RSD $\leq 0.57\%(n=5)$,日间RSD $\leq 4.32\%(n=5)$,高、中、低浓度日内平均准确度分别为93.8%,101.5%,101.5%,日间平均准确度分别为93.6%,103.6%,99.5%。结果表明精密度和准确度良好。

由于本研究采用不同方法进行体外释放研究,样品浓度范围较大,故标准曲线采用了13个浓度点以覆盖全部待测样品浓度范围,日内准确度在95.4%~103.7%内,日间准确度在95%~104.3%内,均符合样品测定要求。

3.2 温敏型原位凝胶制备及处方筛选

精密称取苄达赖氨酸适量,溶于双蒸水,配成5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液,加入一定量泊洛沙姆P407和泊洛沙姆P188,搅拌后置于4℃低温充分溶胀,制得苄达赖氨酸温敏眼用原位凝胶。

根据单因素考察结果及参考文献^[9-10]报道结果,选择泊洛沙姆P407及P188用量为考察因素,每个因素选择3个水平,采用试管倾斜法^[11]测定空白凝胶基质的胶凝温度,试验方案及结果见表1。

表1 试验设计表

Tab. 1 Experimental design

Formulation	泊洛沙姆 P407/%	泊洛沙姆 P188/%	胶凝温度/℃
1	21	0	24.5
2	21	2	32
3	21	4	38
4	23	0	23.5
5	23	2	27.5
6	23	4	35
7	25	0	22.5
8	25	2	23.5
9	25	4	28

根据以上试验结果,采用Matlab R2014b软件进行二项式方程拟合,拟合所得回归方程为 $z=6x+13.12y-0.1458x^2+0.2292y^2-0.5xy-36.97(R^2=0.9834)$,其中 z 为胶凝温度, x 为P407用量, y 为P188用量。绘制其三维立体图及等高线图,结果见图2。

由图2可见,处方的胶凝温度随泊洛沙姆P407用量增加而降低,随泊洛沙姆P188用量增加而升高。理想的温敏眼用原位凝胶制剂需在 $<25^\circ\text{C}$ 时为

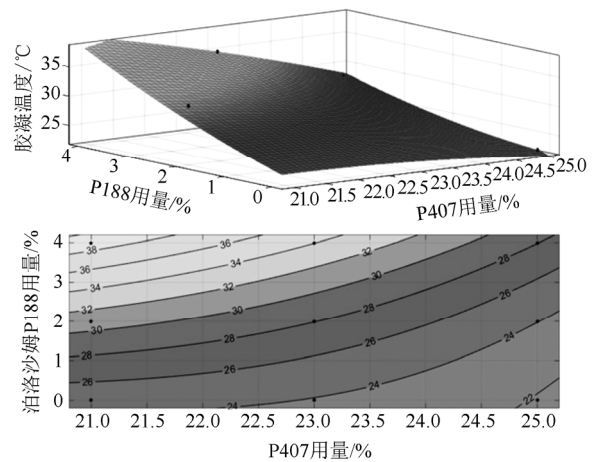


图2 三维立体图及等高线图

Fig. 2 Three-dimensional figure and contour map

低黏度的流动状态,并可在接近且 $\leq 34^\circ\text{C}$ (眼球表面温度)时可发生溶液-凝胶相变过程。考虑到辅料用量最少原则,同时考虑到眼球表面最适温度为 34°C 以及给药后泪液稀释作用,因此设定处方胶凝温度为 30°C ,根据回归方程,泊洛沙姆P407用量为21%,泊洛沙姆P188用量为1.745%,而该处方在 25°C 时流动性良好(黏度为47.71 $\text{mPa}\cdot\text{s}$),实测胶凝温度为 31.5°C (黏度为10 132 $\text{mPa}\cdot\text{s}$),实测值与回归方程预测值偏差仅为5%,说明该方程预测性良好。另外测得所选处方pH为6.95,渗透压为397 $\text{mOsmol}\cdot\text{kg}^{-1}$,渗透压摩尔浓度比为1.39。根据文献[12],眼球能适应的渗透压范围相当于浓度为0.6%~1.5%的NaCl等渗溶液,即205.2~512.8 $\text{mOsmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。此外,正常人眼可耐受的pH范围为5.0~9.0。按中国药典2015年版中规定,苄达赖氨酸滴眼液渗透压摩尔浓度比应为0.90~1.10,pH值范围应为6.8~7.8。该优选处方渗透压摩尔浓度略高于药典规定,pH在药典规定范围内。考虑到眼部泪液的稀释作用,故该优选处方pH值及渗透压均在人眼适应范围内。

3.3 体外释放研究

3.3.1 无膜法 采用无膜法进行处方的体外释药研究,结果见图3。药物累积释放率(Q)及凝胶累积溶蚀量均与时间(t)成良好的线性关系,药物释放遵循零级动力学方程 $Q=0.1965t-1.1467(r^2=0.9992)$ 。此外药物累积释放率与凝胶累积溶蚀量二者表现出良好的线性关系($r^2=0.9982$),故无膜法测定时药物主要是通过溶蚀方式缓慢释放,8h累积释放90%左右。

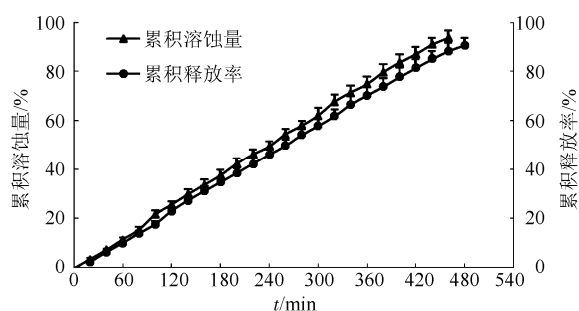


图 3 无膜法累积释放率-时间及累积溶蚀量-时间曲线 ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 *In vitro* release profiles of membrane free model ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

3.3.2 透析袋法 采用透析袋法进行处方的体外释药研究, 以药物溶液组作对照, 温敏组体外释放结果见图 4。该处方 9 h 可释放药物 66.6%, 缓释作用明显优于溶液组。溶液组在 90 min 达到最高值, 之后无法释放出来。

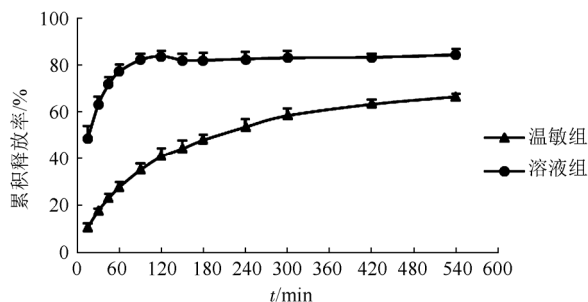


图 4 透析袋法累积释放率-时间曲线 ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 4 *In vitro* release profiles of dialysis bag model ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

根据文献[13], 将累积释放率在 5%~50% 内的数据采用数学模型拟合后, 结果见表 2。由拟合结果可以看出 Higuchi 方程和 Ritger-Peppas 方程均能较好拟合温敏组释药过程。当释放数据符合 Higuchi 方程, 说明释药机制属于 Fickian 扩散机制。但由于泊洛沙姆为亲水凝胶, Higuchi 只能较粗略地模拟其释放行为^[14]。而根据 Ritger-Peppas 方程拟合结果, 由于 $0.5 < n < 1$, 故药物的体外释放机制为扩散与溶蚀相结合。

表 2 体外释药拟合结果

Tab.2 Model fitting and parameters of *in vitro* drug release

方法	零级方程 r^2	一级方程 r^2	Higuchi 方程 r^2	Ritger-Peppas 方程 r^2	n
透析袋法	0.952 1	0.922 0	0.994 7	0.990 7	0.549 7
透析膜法	0.883 3	0.920 9	0.969 2	0.960 5	0.525 5

3.3.3 透析膜法 采用透析膜法进行处方的体外释放研究, 以市售滴眼液作对照, 温敏组体外释放结果见图 5。采用透析膜法进行体外释药考察时, 该处方 8 h 可缓慢释放药物 45.2%。而市售滴眼液存在突释现象, 60 min 之内释放药物达 63.4%, 之后就无法释放出来, 所以曲线只画出 120 min 之前的情况。

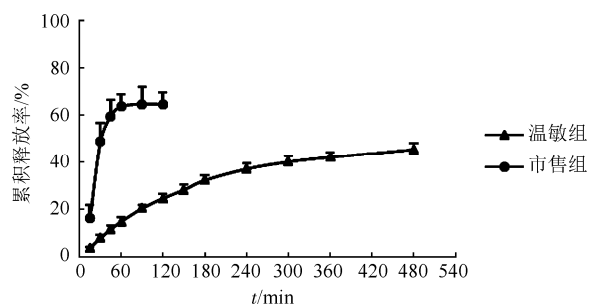


图 5 透析膜法累积释放率-时间曲线 ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 5 *In vitro* release profiles of membrane model ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

将温敏组累积释放率在 5%~50% 内的数据采用数学模型拟合, 结果见表 2。根据拟合结果, 该释放数据可较好遵循 Ritger-Peppas 方程, 且 $0.5 < n < 1$, 说明采用透析膜法时, 该处方体外释药机制为扩散与溶蚀共同作用。

3.4 离体角膜渗透研究

采用离体角膜法进行处方的角膜渗透性研究, 结果见图 6。药物的累积渗透率 (Q) 与时间 (t) 呈良好的线性关系, 遵循零级动力学方程: $Q=0.009\ 72t-0.482\ 72$ ($r^2=0.998\ 5$)。温敏原位凝胶 6 h 累积渗透率为 3.1%, 而市售滴眼液 6 h 累积渗透率为 16.33%。角膜水化值是体外试验中评价物质对角膜组织刺激性的重要指标, 本试验结束后测得平均角膜水化值为 80.95%, 说明该处方对角膜刺激性较小。

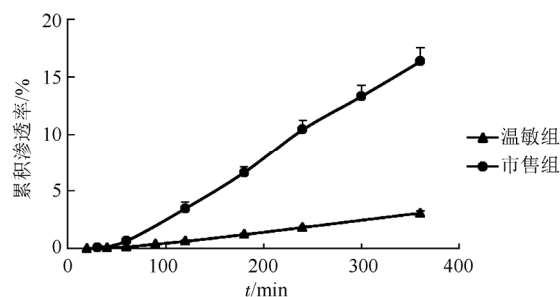


图 6 离体角膜渗透研究累积渗透率-时间曲线 ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 6 *In vitro* transcorneal permeation profile ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

4 讨论

本研究分别采用无膜法、透析袋法、透析膜法以及离体角膜法对温敏型原位凝胶的体外释药行为进行考察, 研究发现该处方均未出现药物突释效应, 说明药物存在于原位凝胶骨架结构中, 制剂的缓释效果明显。

温敏型原位凝胶是一种生物溶蚀型的亲水性骨架材料, 应用于动物或人体后, 由于泪液存在, 药物释放既包括药物从骨架结构中扩散出来的过程, 又有骨架结构溶蚀而释放药物的过程。故本研究采取无膜法、2 种有膜法以及离体角膜法, 同时对温敏型原位凝胶进行体外释放的考察, 能更好地模拟制剂在动物或人类角膜前的释药行为。一般滴眼液每次滴 1~2 滴, 大约 40~100 μL 。试验过程中, 为保证溶液在供给池内完全覆盖透析膜及角膜表面, 故加入处方量定为 80 μL 以便于比较。此外, 2 种有膜法与离体角膜法采用了不同的渗透池来做体外释放研究, 见图 7。2 种有膜法是采用人工半透膜, 由于其为无弹性且平整的膜片, 故采用平口渗透池(图 7A); 而离体角膜法是采用兔角膜, 其为圆弧形, 平口池不便于夹持, 所以改良成了弧口渗透池(图 7B)。

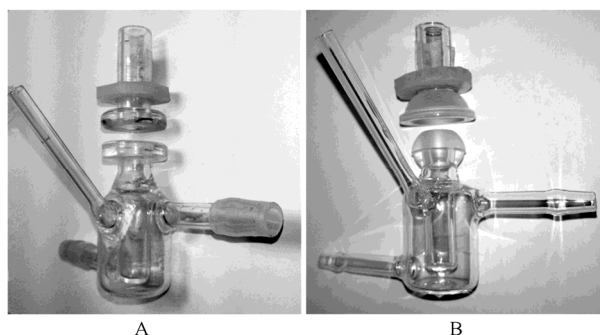


图 7 渗透池
Fig. 7 Franz diffusion cells

采用无膜法时, 凝胶与释放介质直接接触, 能够模拟凝胶骨架在角膜前缓慢溶蚀的过程。由图 3 可见, 药物的累积释放率随凝胶累积溶蚀量的增加而增加, 且二者呈良好的线性关系。这是因为采用无膜法对该处方进行体外释放考察时, 凝胶溶蚀速度较快, 故溶蚀为主要的释药机制。但无膜法无法体现实际生物给药时特殊的角膜结构及凝胶在角膜表面的覆盖, 故进一步采用透析膜及透析袋法进行体外释放研究。

透析膜和透析袋法均采用了人工半透膜来模

拟温敏原位凝胶实际生物给药时的角膜结构, 其体外释放结果均与 Ritger-Peppas 方程拟合较好。由于 Ritger-Peppas 释药模型一般用于判断制剂中药物的释放机制: $Q=Kt^n$, 式中, Q —累积释放率, K —释放速率常数, n —扩散指数, t —时间。当 $n=1$, 表示该制剂符合零级释放动力学; $n=0.5$, 表示该制剂符合 Higuchi 方程; $n<0.5$, 表示该制剂的体外释放机制为 Fickian 扩散; $0.5<n<1$, 表示该制剂的体外释放机制为扩散与溶蚀结合^[13]。将 2 种有膜法释药数据采用该模型拟合, 结果表明扩散指数 $0.5<n<1$, 且均接近于 0.5。这说明采用 2 种有膜法时, 原位凝胶的体外释放机制为扩散与溶蚀相结合, 以 Fickian 扩散为主, 但存在一定程度的溶蚀, 已有文献报道类似结果^[15-16]。这可能是由于半透膜两侧存在渗透压差, 水分子从接受池透过透析膜进入供给池, 引起与膜紧贴的凝胶基质的部分溶蚀。这一点恰好与实际生物给药时, 角膜表面泪液更新过程相符。

从无膜法与 2 种有膜法结果中可以看出, 无膜法时药物基本可以完全释出, 而 2 种有膜法有部分药物残留于凝胶中无法释出。这是因为无膜法时, 凝胶与溶液直接接触, 凝胶层可不断溶蚀, 故药物可完全释出。采用有膜法时, 该处方由溶液状相变为凝胶状后, 与半透膜表面贴合。由于凝胶层较厚, 且与半透膜直接接触的凝胶层溶蚀量较少, 故药物难以从凝胶中心扩散出来, 从而造成在凝胶中的药物残留。

由于人工膜与角膜结构存在较大差异, 故对该优选处方与市售滴眼液进行进一步的离体角膜渗透研究。其结果表明, 温敏型原位凝胶累积渗透率及渗透速率均远低于市售处方。造成这一结果可能是因为: ①温敏原位凝胶为亲水型骨架材料, 药物均匀分散于骨架材料中, 药物必须先通过骨架材料扩散至骨架外表面, 然后再扩散进入释放介质, 故其药物释放过程比普通溶液剂缓慢。②采取的离体角膜渗透法是将制剂固定于角膜上进行研究, 滴眼液不会流失, 故无法体现原位凝胶能延长角膜前滞留时间而提高生物利用度的特点。此外, 由于苄达赖氨酸为水溶性药物, 2 种制剂的角膜渗透率都较低。但据文献报道^[17], 温敏原位凝胶在凝胶状时存在剪切稀释特性, 随着眼睛眨动和滚动会在眼球表面进行重新分布, 故给药后渗透速率和渗透总量将高于离体角膜渗透研

究结果。

本研究为温敏型眼用原位凝胶的体外释放考察方法提供了参考,但还需进一步的体内试验,将该制剂与市售滴眼液进行比较,以体现该制剂的优势所在。

REFERENCES

- [1] SHEN H, GOU S, SHEN J, et al. Synthesis and biological evaluations of novel bendazac lysine analogues as potent anticataract agents [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(7): 2115-2118.
- [2] SUN X, SHI Y F. Determination of *L*-lysine in Bendazac Lysine eye drops by HPLC [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2014, 45(11): 1061-1062.
- [3] AMMAR H O, SALAMA H A, GHORAB M, et al. Development of dorzolamide hydrochloride in situ gel nanoemulsion for ocular delivery [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2010, 36(11): 1330-1339.
- [4] ASASUTJARIT R, THANASANCHOKPIBULL S, FUONGFUCHAT A, et al. Optimization and evaluation of thermoresponsive diclofenac sodium ophthalmic in situ gels [J]. Int J Pharm, 2011, 411(1/2): 128-135.
- [5] WANG Z G, WANG Y J, LI H, et al. Study on preparation of Dange Mingmu in-situ forming eye gel [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(1): 46-57.
- [6] GEETHALAKSHMI A, KARKI R, JHA S K, et al. Sustained ocular delivery of brimonidine tartrate using ion activated in situ gelling system [J]. Curr Drug Deliv, 2012, 9(2): 197-204.
- [7] LI X R, LEI Y L, SHEN C Y, et al. Preparation and evaluation of ophthalmic pH sensitive in-situ gel of acyclovir [J]. Chin New Drug J(中国新药杂志), 2009, 18(24): 2360-2364.
- [8] MONTI D, SACCOMANI L, CHETONI P, et al. Effect of iontophoresis on transcorneal permeation 'in vitro' of two beta-blocking agents, and on corneal hydration [J]. Int J Pharm, 2003, 250(2): 423-429.
- [9] QIAN Y, WANG F, LI R, et al. Preparation and evaluation of in situ gelling ophthalmic drug delivery system for methazolamide [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2010, 36(11): 1340-1347.
- [10] GRATIERI T, GELFUSO G M, ROCHA E M, et al. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2010, 75(2): 186-193.
- [11] DEWAN M, BHOWMICK B, SARKAR G, et al. Effect of methyl cellulose on gelation behavior and drug release from poloxamer based ophthalmic formulations [J]. Int J Biol Macromol, 2015(72): 706-710.
- [12] XIAO Y Y, BAO X, SHEN J, et al. Preparation and *in vitro* characterizations of cyclosporine a ocular nanostructured lipid carriers [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2012, 47(5): 362-366.
- [13] QIAN S, WONG Y C, ZUO Z. Development, characterization and application of in situ gel systems for intranasal delivery of tacrine [J]. Int J Pharm, 2014, 468(1/2): 272-282.
- [14] LU B. New Techniques and New Dosage Forms of Drug [M]. 2nd Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 386-387.
- [15] YUAN Y, CUI Y, ZHANG L, et al. Thermosensitive and mucoadhesive in situ gel based on poloxamer as new carrier for rectal administration of nimesulide [J]. Int J Pharm, 2012, 430(1/2): 114-119.
- [16] BHOWMIK M, KUMARI P, SARKAR G, et al. Effect of xanthan gum and guar gum on in situ gelling ophthalmic drug delivery system based on poloxamer-407 [J]. Int J Biol Macromol, 2013(62): 117-123.
- [17] TIAN F, WANG Y Z, YANG K, et al. Rheological characteristics of nifedipine vaginal thermosensitive in situ gels [J]. Chin New Drug J(中国新药杂志), 2013, 22(3): 345-350.

收稿日期: 2015-09-23

口服聚乙二醇修饰固体脂质纳米粒的组织分布及抗肿瘤药效学研究

陈春燕¹, 徐萍¹, 袁弘² (1.宁波市第一医院, 浙江 宁波 315010; 2.浙江大学, 杭州 310012)

摘要: 目的 研究口服固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticle, SLN)和经聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰后的SLN(pSLN)在小鼠体内的组织分布及药效。方法 采用水性溶剂扩散法制备 SLN, 用聚乙二醇单硬脂酸酯(PEG₂₀₀₀-SA)修饰以提供亲水基团; 测定其粒径、Zeta 电位、表面元素、接触角和稳定性; 以 DiR 为荧光标记物, 测定 SLN 及 pSLN 制剂经口服给药后的体内组织分布; 以阿霉素为模型药物, 考察口服脂质纳米给药系统的体内抗肿瘤活性及安全性。结果 SLN 经 PEG 修饰后, 得到的 pSLN 制剂粒径降低, Zeta 电位约为-20 mV, 表面亲水性及体内稳定性增加; 经口服给药后, pSLN 在肿瘤组织有聚集, 且经 PEG 修饰后的纳米粒在组织中的滞留时间可显著延长; 在荷瘤裸鼠模型动物上的药效学结果显示, PEG 修饰口服脂质纳米给药系统在改善药效的同时, 降低药物的不良反应, 提高给药系统的安全性。结论 PEG 修饰改善了口服纳米给药系统的生物分布及药效, 提高了给药系统的安全性。

关键词: 固体脂质纳米粒; 聚乙二醇; 口服给药; 组织分布; 药效学

中图分类号: R969.1; R965.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)05-0586-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.015

基金项目: 宁波市自然基金项目(2014A610216)

作者简介: 陈春燕, 女, 硕士, 药师

Tel: (0574)87085157

E-mail: chunyanchen@zju.edu.cn