

巯基化壳聚糖-吡诺克辛钠-层状双氢氧化物 纳米复合物滴眼液的研究

张洁¹, 池慧波¹, 程艳菊², 操锋^{1*}

(¹中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009; ²正大天晴药业集团股份有限公司南京研发中心, 南京 210023)

摘要 将壳聚糖-谷胱甘肽(CG)与吡诺克辛钠(PRN)共插层于层状双氢氧化物(LDH)中, 制备有机-无机杂化层状双氢氧化物纳米复合物(CG-PRN-LDH)滴眼液, 并对其在家兔角膜前的滞留行为进行考察。采用共沉淀法制备了Mg-Al-PRN-LDH、Zn-Al-PRN-LDH和共插层的CG-PRN-LDH纳米复合物。通过X-RD、FTIR、TEM、激光粒度仪对纳米复合物进行表征。比较了3种纳米复合物和PRN在人工泪液中的释放行为, 考察了PRN-LDH、CG-PRN-LDH纳米复合物滴眼液和市售滴眼液在家兔角膜前的滞留行为。PRN-LDH、CG-PRN-LDH纳米复合物滴眼液的AUC₀₋₄分别为市售滴眼液的3.72和7.59倍, 平均滞留时间(MRT)分别为市售滴眼液的2.18和2.60倍, 结果表明有机-无机杂化纳米复合物CG-PRN-LDH能显著延长PRN在角膜前的滞留时间。

关键词 层状双氢氧化物; 吡诺克辛钠; 滴眼液; 巯基化壳聚糖; 纳米复合物; 共沉淀法; 体外释放; 角膜前滞留

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)02-0201-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150211

Ophthalmic solution of thiolated chitosan-pirenexine sodium-layered double hydroxides hybrid nanocomposites

ZHANG Jie¹, CHI Huibo¹, CHENG Yanju², CAO Feng^{1*}

¹Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

²Nan Jing Research and Development Center, Chia Tai Tianqing Pharmaceutical Group Co., Ltd., Nanjing 210023, China

Abstract Ophthalmic solution of organic-inorganic layered double hydroxides hybrid nanocomposites based on layered double hydroxides (LDH) intercalated with pirenexine sodium (PRN) and chitosan-glutathione (CG) was prepared, characterized and evaluated using rabbit precorneal retention. Mg-Al-PRN-LDH, Zn-Al-PRN-LDH and CG-PRN-LDH were synthesized by co-precipitation. The nanocomposites were characterized by laser particle sizer, powder X-ray diffraction (X-RD), fourier transform infrared spectra (FTIR) and transmission electron micrographs (TEM). The release of PRN from Mg-Al-PRN-LDH, Zn-Al-PRN-LDH, and CG-PRN-LDH nanocomposites and API in artificial tear was compared. Based on *in vivo* precorneal retention studies, PRN-LDH and CG-PRN-LDH nanocomposite dispersions showed significantly higher AUC (3.72-, 7.59-folds) and MRT (2.18-, 2.60-folds) than that of the commercial eye drops group. Organic-inorganic layered double hydroxides hybrid nanocomposites CG-PRN-LDH dispersions could remarkably improve precorneal retention of PRN.

Key words layered double hydroxides; pirenexine sodium; eye drops; thiolated chitosan; hybrid nanocomposites; co-precipitation method; *in vitro* release; precorneal retention

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81373362) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (No. PT2014YX0054)

层状复合氢氧化物(layered double hydroxides, LDHs)是一类典型的阳离子型层状化合物。LDHs 主体结构可以看作由三价金属离子同晶取代水镁石 $[\text{Mg}(\text{OH})_2]$ 层板中的 Mg^{2+} , 同时阴离子进入氢氧化物层间以平衡层板正电荷形成。LDHs 的结构通式可表示为 $[\text{M}_1^{2+}_x \text{M}_2^{3+}_{3-x}(\text{OH})_2]^{x+} \text{A}^{n-}_{x/n} \cdot m\text{H}_2\text{O}$, 其中 M^{2+} 为二价金属离子, 如 Zn, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Ca 等, 而 M^{3+} 为三价金属离子, 如 Co, Fe, Mn, Cr, Ga, In 等, A^{n-} 为可交换的阴离子^[1]。将阴离子型药物嵌入 LDHs 的层板间, 即可得到药物-LDHs 插层复合物。已有文献报道的插层药物包括非甾体抗炎药^[2]、抗生素^[3]、抗肿瘤药物^[4]、降压药^[5]等。药物-LDHs 纳米复合物的缓释性能主要是释放介质中的无机阴离子(如 NO_3^- 、 CO_3^{2-} 、 Cl^- 、 PO_4^{3-} 、 HPO_4^{2-} 、 H_2PO_4^- 等), 逐渐进入 LDHs 的层板间替换原有药物阴离子, 从而将药物缓慢释放到介质中^[6]。

巯基化壳聚糖是在壳聚糖分子中引入含巯基的化合物得到的。引入的含巯基化合物主要有 L-半胱氨酸盐酸盐、巯基乙酸、N-乙酰半胱氨酸、半胱氨酸、2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐(2-iminothiolane hydrochloride)、高半胱氨酸等。巯基化壳聚糖能通过半胱氨酸残基上的巯基与黏蛋白末端的巯基形成二硫键, 增加其在黏膜的黏附性^[7]。另有研究表明, 巯基化壳聚糖能打开黏膜上皮细胞间的紧密连接, 从而增加药物透过生物膜的能力^[8]。

吡诺克辛钠(pirenexine sodium, PRN)滴眼液能改善晶状体浑浊, 其用于早期白内障的预防与治疗^[9]。PRN 是吡诺克辛酸的钠盐形式, 在水中微溶, 在乙醇、丙酮和乙醚中不溶, 遇酸即析出吡诺克辛酸沉淀。由于眼部泪液冲洗作用及角膜屏障的存在, 传统滴眼液中的药物难以到达晶状体, 生物利用度小于 5%^[10]。增加眼后段给药生物利用度的主要手段是增加角膜前滞留和改善角膜渗透性。本课题组前期研究^[11]表明: 将 LDH 作为结膜炎治疗药物双氯芬酸钠的载体, 能够延长眼部滞留时间, 未见关于有机/无机杂化 LDH 纳米复合物用于治疗眼部疾病的报道。本研究首次将壳聚糖-谷胱甘肽(CG)与 PRN 共插层与 LDH 层板间, 制备了有机/无机杂化纳米复合物 CG-PRN-LDH, 并通过体外释放和角膜前滞留实验考察了 CG-PRN-LDH 杂化纳米复合物增加角膜前滞留的可行性。

1 材料

1.1 试剂

吡诺克辛钠(PRN, 成都新恒创药业有限公司, 含量: 98%, 批号: 140503); 硝酸镁(西陇化工股份有限公司); 硝酸铝(上海市新宝精细化工厂); 硝酸锌(汕头市西陇化工厂); 吡诺克辛钠滴眼液(湖北远大天天明制药有限公司, 规格: 15 mL: 0.8 mg, 批号: 131038018); 壳聚糖(CTS, 南通兴成生物制品厂, 25 kD, 脱乙酰度大于 90%); 还原型谷胱甘肽(GSH, 国药集团化学试剂有限公司); 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC, 国药集团化学试剂有限公司); N-羟基丁二酰亚胺(NHS, 国药集团化学试剂有限公司); 5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB, 合肥博美生物科技有限责任公司)。

1.2 仪器

2010CHT 高效液相色谱系统(日本岛津公司); T6 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); ZetaSizer 3000HS 激光粒度分析仪(英国马尔文公司); H-7650 型透射电子显微镜(日本日立公司); Tensor 27 红外光谱仪(德国 Bruker 公司); D/max-2500/PC 型转靶 X 线衍射仪(日本理学公司); F6/10-8G 超细匀浆器(上海安谱科学仪器有限公司); 聚四氟乙烯内衬的不锈钢水热反应釜(西安常仪仪器设备有限公司); TGL-16C 智能溶出仪(天天发科技有限公司)。

1.3 动物

雄性新西兰大白兔, 体重 2~3 kg, 南京江宁区青龙山动物养殖场提供, 合格证号: 201401707。

2 方法

2.1 壳聚糖-谷胱甘肽(CG)的合成及表征

在本课题组前期工作的基础上, 经过适当改进制得 CG^[12]。称取壳聚糖 0.5 g, 用 1 mol/L HCl 3 mL 溶胀, 加入去离子水 35 mL 溶解, 用 5 mol/L NaOH 调节 pH 至 5, 得壳聚糖溶液。EDC 1.49 g、NHS 0.89 g、GSH 1.43 g 分别溶于去离子水 5 mL 中, 依次加入上述壳聚糖溶液中, 用 5 mol/L NaOH 迅速调节 pH 至 5, N_2 保护下, 室温反应 18 h。反应结束后, 将反应液抽滤, 滤液置透析袋中(截留相对分子质量为 8~14 kD), 室温避光透析。

5 mmol/L HCl 透析 12 h, 含 1% NaCl 的 5 mmol/L HCl 透析 24 h, 1 mmol/L HCl 透析 24 h, 冻干。通过红外光谱表征 CG 的结构。通过 Ellman's 试剂法对 CG 中的巯基含量进行测定。

2.2 Mg-Al-PRN-LDH、Zn-Al-PRN-LDH 和 CG-PRN-LDH 的制备

采用共沉淀法分别制备 Mg-Al-PRN-LDH、Zn-Al-PRN-LDH 和 CG-PRN-LDH。

称取 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol) 1.03 g, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (2 mmol) 0.75 g 溶于去离子水 3 mL 中, 为混盐溶液。称取 NaOH (13 mmol) 0.52 g 溶于去离子水 3 mL 中为碱液。称取 PRN (0.4 mmol) 140 mg 溶于去离子水 70 mL 中, 作为反应介质。0 °C 氮气保护, 剧烈搅拌下, 向反应介质中同步缓慢滴加混盐溶液和碱液, 控制体系 pH 9 ~ 10。滴加结束后继续搅拌 1 h。反应液于 10 000 r/min 高速离心 10 min, 倾去上清液。沉淀用热水洗涤, 重复离心、洗涤至上清液无色, 除去游离的离子和药物。沉淀加去离子水 60 mL 分散, 置聚四氟乙烯内衬的不锈钢水热反应釜中, 100 °C 熟化 5 h, 得 Mg-Al-PRN-LDH 溶液。冷冻干燥, 得 Mg-Al-PRN-LDH 粉末^[13]。

称取 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol) 1.19 g, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.75 g 溶于去离子水 3 mL 中, 为混盐溶液。称取 (12.5 mmol) 0.505 g NaOH 溶于去离子水 3 mL 中, 为碱液。控制体系 pH 为 7 ~ 8, 其余步骤同 Mg-Al-PRN-LDH 粉末的制备, 制得 Zn-Al-PRN-LDH 粉末。

将 CG 50 mg 及 PRN 140 mg 溶于去离子水 70 mL 中, 调节 pH 至 9, 作为反应介质, 其余步骤同 Mg-Al-PRN-LDH 粉末的制备, 制得 CG-PRN-LDH 粉末^[14]。

以不含药物的去离子水 70 mL 作为介质, 其余步骤分别同 Mg-Al-PRN-LDH、Zn-Al-PRN-LDH 粉末的制备, 制得空白 LDH 粉末, 记作 Mg-Al- NO_3 -LDH、Zn-Al- NO_3 -LDH 粉末。

2.3 载药量的测定

精密称取载药 LDHs 粉末 5 mg 于 10 mL 量瓶中, 加入 5 mol/L HCl 1 mL 破坏, 加入 DMSO 定容至刻度。上述溶液用 DMSO 稀释至适宜浓度, 紫外分光光度法 433 nm 测定 PRN 含量^[15]。

2.4 LDH 样品的表征

使用粒径/电位仪, 将载药 LDHs 粉末分散于去

离子水中, 并稀释至 1 mg/mL, 测定样品粒径。使用 X 射线衍射仪 (Cu 靶, KA 射线, $\lambda = 0.1542 \text{ nm}$, 2θ 范围 $1.5^\circ \sim 70^\circ$) 测定样品的晶体结构。傅里叶变换红外光谱仪 (FT-IR) 分析样品结构。采用透射电镜 (TEM) 分析样品的粒径和形态。

2.5 PRN-LDH 在人工泪液中的释放

精密称取 PRN 原料药 10 mg, PRN 原料药 10 mg 与 5 mg CG 的物理混合物。根据载药量, 称取含有 10 mg PRN 的 Mg-Al-PRN-LDH 粉末, Zn-Al-PRN-LDH 粉末, CG-PRN-LDH 粉末。根据《中华人民共和国药典: 二部》(2010 版) 释放度测定法第二法桨法, 以标准浓度人工泪液作为溶出介质, 进行释放度测定。每升人工泪液含 NaHCO_3 2.18 g、NaCl 6.78 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.084 g、KCl 1.38 g^[13]。人工泪液的 pH 为 7.4。温度 $(35 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 桨转速 100 r/min。于 5, 10, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 min 取样 5 mL 并补加等体积溶出介质, 0.45 μm 微孔滤膜过滤。紫外分光光度法 ($\lambda = 433 \text{ nm}$) 测定 PRN 含量, 计算释放度。

2.6 眼部刺激性实验

新西兰大白兔 6 只, 随机分为 PRN-LDH (以下用 PRN-LDH 代表 Mg-Al-PRN-LDH) 和 CG-PRN-LDH 纳米复合物滴眼液组。每组 3 只, 左眼给予生理盐水 50 μL 作为对照, 右眼给予药液 50 μL 。单次给药眼刺激性试验, 给药 1 次, 给药后 1, 2, 4, 24, 48, 72 h 记录眼部各组织的变化; 多次给药眼刺激性试验, 每日 3 次, 连续 5 日, 每日给药前以及最后一次给药后的 1, 2, 4, 24, 48, 72 h 检查眼部各组织的变化。根据 Draize 眼部刺激性评价标准, 分别评价角膜、虹膜和结膜的刺激性反应分数, 累积计算平均分数为每只兔的眼部刺激性分值。

2.7 家兔角膜前滞留行为的考察

2.7.1 滴眼液的制备 分别配制 PRN 含量为 0.05 mg/mL, CG 含量为 0.025 mg/mL 的 CG-PRN 溶液 20 mL, PRN 含量为 0.05 mg/mL 的 PRN-LDH 和 CG-PRN-LDH 纳米复合物混悬液 20 mL, 分别加入 0.25% 三氯叔丁醇 (抑菌剂) 和 6% 葡萄糖 (渗透压调节剂), 得 CG-PRN 滴眼液、PRN-LDH 和 CG-PRN-LDH 纳米复合物滴眼液。滴眼液的 pH 分别为 7.1 ~ 7.4, 9.0 ~ 9.3 和 8.6 ~ 8.9, 黏度分别为 1.62、1.74 和 1.61 mPa·S。市售滴眼液的 pH 为 7.2, 黏度为 1.60 mPa·S。

2.7.2 试验方案及泪液样品检测方法 新西兰大白兔24只,随机分成4组,每组6只,4组分别给予上市制剂(含0.005% PRN)、CG-PRN滴眼液、PRN-LDH和CG-PRN-LDH纳米复合物滴眼液。将家兔固定,使其头部和眼部可自由活动。用微量进样器在家兔的左眼结膜囊中给予滴眼液50 μL ,右眼给予生理盐水作为对照。松开眼睑,使眼睑自由闭合30 s。滴眼后,分别于10,30,60,90,120,180,240,300,360 min用毛细管取家兔泪液10 μL 于塑料离心管中,加入甲醇90 μL ,涡旋2 min,10 000 r/min离心10 min,取上清液进样进行分析。

采用HPLC法测定泪液中的PRN浓度。色谱条件:色谱柱为Intertsil OSD-SP(4.6 mm \times 150 mm,5 μm),流动相为0.1 mol/L磷酸二氢钠(用氢氧化钠调pH至6.0)-甲醇-乙腈(70:20:10),柱温为35 $^{\circ}\text{C}$,检测波长为230 nm,进样量为20 μL [16]。

3 结果与讨论

3.1 CG的表征

图1为CTS(A)和CG(B)的红外光谱对比。在CG中,GSH以酰胺键与壳聚糖上的氨基相连。酰胺基团的特征吸收峰分为三带,酰胺I带($\nu_{\text{C=O}}$)为1 680~1 630 cm^{-1} ;酰胺II带($\delta_{\text{N-H}}$)为1 570~1 510 cm^{-1} ;酰胺III带($\nu_{\text{C-N}}$)为1 335~1 200 cm^{-1} 。CG的酰胺I带和II带的特征吸收峰较CTS中的有所增强,表明合成了目标产物。以Ellman's试剂法测得CG中的巯基含量为(280.4 \pm 16) $\mu\text{mol/g}$ ($n=3$)。

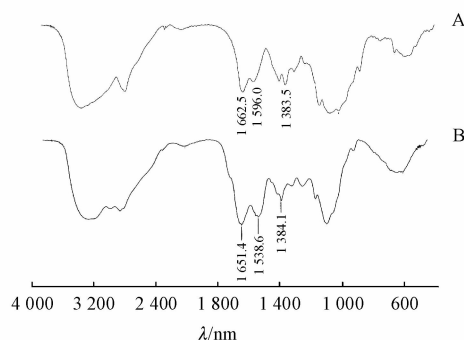


Figure 1 IR patterns of chitosan CTS (A) and chitosan-glutathione CG (B)

3.2 LDH和PRN-LDH样品的表征

3.2.1 X线粉末衍射

从图2中可以看出,所有样品(A~E)都出现了LDH的特征衍射峰(003)、(006)、(009)和(110),说明成功形成了LDH。衍射峰(003)对应LDH的层间距 $d(003)$,包括单层LDH金属层板的厚度及层板之间空间的高度。与 NO_3^- 插层的LDH相比,样品B,D的(003)衍射峰都由10.0 $^{\circ}$ 前移到7.0 $^{\circ}$,层间距由0.88 nm增加至1.27 nm,已知LDH层板的厚度为0.48 nm,则Mg-Al-PRN-LDH和Zn-Al-PRN-LDH的层间高度都为0.79 nm。这说明在不同金属离子组成的PRN-LDH中,PRN以相同的插层结构排列。CG-PRN-LDH(E)的(003)衍射峰前移至5.9 $^{\circ}$,层间距增大至1.49 nm,与PRN-Mg-Al-LDH相比,层间距增大了0.22 nm,推测CG可能在LDH中形成了部分嵌插结构,使层间距扩大。

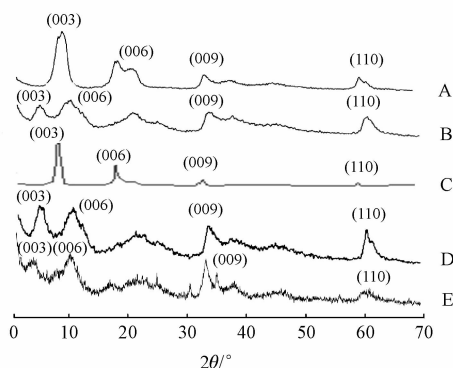


Figure 2 X-RD patterns of Zn-Al- NO_3 -LDH (A), Zn-Al-PRN-LDH (B), Mg-Al- NO_3 -LDH (C), Mg-Al-PRN-LDH (D) and CG-PRN-LDH (E). LDH: Layered double hydroxide; PRN: Pirenoxine sodium

3.2.2 红外光谱 图3中,所有LDHs样品(A~E)的吸收曲线比较相似。900~400 cm^{-1} 的吸收峰归属于M-O-M的晶格振动和弯曲振动。3 456 cm^{-1} 处较宽的吸收峰是由LDH表面和层间的 H_2O 或M-OH中羟基的伸缩振动引起,说明所有样品都形成了LDHs结构[17]。PRN-LDHs(B,D,E)中,3 456 cm^{-1} 位置的峰比相应的 NO_3^- -LDH(A,C)展宽,可能是PRN阴离子与层板间的水形成了新的氢键。1 384 cm^{-1} 的吸收峰来自 NO_3^- 的伸缩振动,PRN-LDHs中该峰比相应的 NO_3^- -LDH减弱,说明所有LDH样品层板间都存在 NO_3^- ,载药LDH中部分 NO_3^- 被PRN阴离子取代。PRN原料药的特征吸收峰在PRN-LDHs中消失,在1 585 cm^{-1} 和1 507 cm^{-1} 处出现了 $-\text{COO}^-$ 的对称及反对称伸缩振动峰,说明PRN的阴离子进入LDH层间。CG

(G) 中, $1\,651\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,538\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰分别归属于酰胺 I 带 ($\nu_{\text{C=O}}$) 和酰胺 II 带 ($\delta_{\text{N-H}}$), 在 CG-PRN-LDH(E) 中, 也出现了相应的酰胺特征吸收峰, 并向低波数方向发生位移, 说明 CG 与 LDH 层板有氢键结合, 证明 CG-PRN-LDH 形成有机/无机杂化层状双氢氧化物结构。

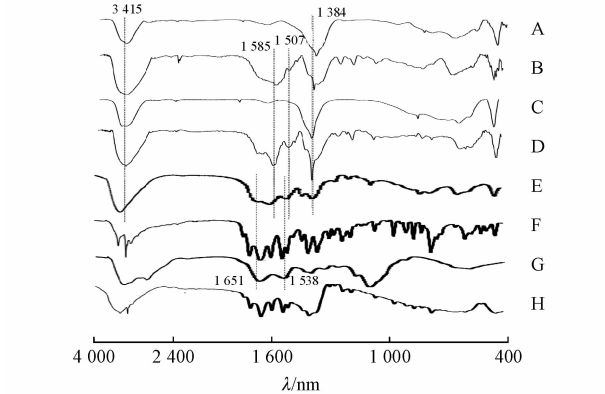


Figure 3 IR patterns of Mg-Al-NO₃-LDH (A), Mg-Al-PRN-LDH (B), Zn-Al-NO₃-LDH (C), Zn-Al-PRN-LDH (D), CG-PRN-LDH (E), PRN (F), CG (G) and physical mixture of PRN and NO₃-LDH (H)

3.2.3 透射电镜(TEM)分析 粒径/电位仪测得 Mg-Al-NO₃-LDH (A)、Mg-Al-PRN-LDH (B)、CG-PRN-LDH(C) 和 Zn-Al-PRN-LDH(D) 的粒径分别为 82,96,132,202 nm, 与 TEM 结果基本符合(图 4)。Zn-Al-PRN-LDH 的形态为六边形片状晶体, 粒径大, 晶型完整。Mg-Al-NO₃-LDH、Mg-Al-PRN-LDH 和 CG-PRN-LDH 为六边形、圆形及不规则类圆形片状结构, 粒径较小。

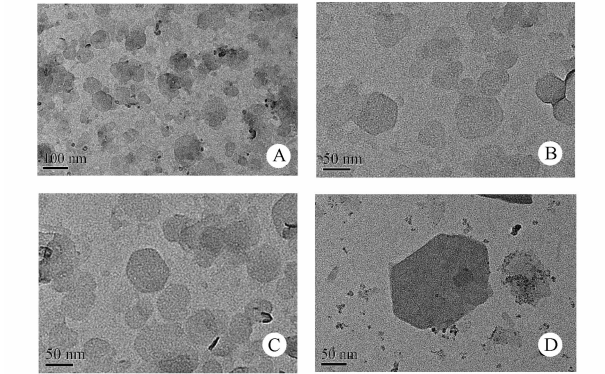


Figure 4 TEM micrographs of Mg-Al-NO₃-LDH (A), Mg-Al-PRN-LDH (B), CG-PRN-LDH (C) and Zn-Al-PRN-LDH (D)

3.3 超分子插层结构模拟

通过 Chem3D 软件对 PRN 阴离子进行结构模

拟, PRN 阴离子为平面结构, 计算得到 PRN 阴离子长轴直径为 1.01 nm, 短轴直径为 0.69 nm。由 XRD 结果可知 PRN-LDH 的层间距为 1.27 nm, 已知 LDH 层板高度为 0.48 nm, 所以 PRN-LDH 的层板空间为 0.79 nm, 小于 PRN 阴离子单层垂直排列的高度, 故推测 PRN 阴离子通过-COO⁻ 基团与层板上的正电荷以静电结合, 通过-OH 基团与层板的羟基以氢键结合。PRN 阴离子在 LDHs 层板间以一定角度沿长轴倾斜排列成单层。由于 PRN 是一价阴离子, 需要在层间以交错排列的方式来平衡上下层板的电荷, 且这种排列方式必须使体系保持较低的能量。由于 PRN 阴离子一端连有共轭的多元环状结构, 疏水性较强, 很难与层板发生相互作用, 所以 PRN 阴离子交错排列于层板间, 相邻 PRN 阴离子间的 π 电子部分重叠, 使得能量降低, 结构稳定^[18]。

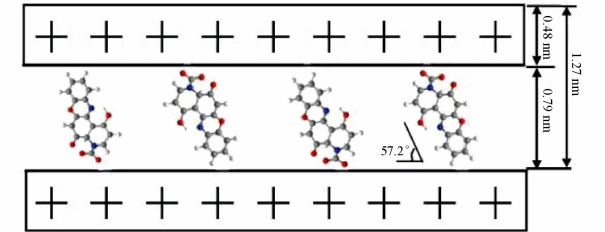


Figure 5 Schematic illustration of the orientation of PRN intercalates

3.4 PRN-LDHs 纳米复合物的性质

PRN-LDHs 纳米复合物的粒径、电位、pH 和载药量的性质见表 1。通常 Zeta 电位在 30 mV 以上的纳米粒能通过自身的静电排斥作用保持稳定。PRN-LDHs 的电位在 28 ~ 34 mV 间。Zn-Al-PRN-LDH, Mg-Al-PRN-LDH, CG-PRN-LDH 电位依次增大, 稳定性依次增加。一般来说, 粒径小有利于纳米粒通过角膜上皮细胞的紧密连接, 小于 200 nm 的纳米粒能够分布到视网膜, 但粒径过小也不利于纳米粒到达眼后段, 小于 20 nm 的纳米粒由于眼周循环的清除作用仅有少量能透过巩膜^[19]。由于 PRN 阴离子体积比 NO₃⁻ 大, PRN-LDHs 的粒径比 NO₃-LDHs 增大, 位于 96 ~ 202 nm。Mg-Al-PRN-LDH、Zn-Al-PRN-LDH 的粒径分布为 96 和 202 nm。造成粒径差异的原因: 一方面是 Mg²⁺ 的直径比 Zn²⁺ 小, 另一方面是由于 Zn-Al-PRN-LDH 载药量更大。共沉淀法制备 PRN-LDHs 是 PRN 阴离子与 NO₃⁻ 竞争插层的过程。金属层板与阴离子亲和力越大,

则阴离子越容易进入层间,越难被交换到介质中。所以推测 Zn-Al-LDH 层板对 PRN 阴离子有更强的亲和力。而 CG-PRN-LDH 的载药量与 Mg-Al-PRN-LDH 相比有显著提高,可能是因为 CG 能与 PRN 或 LDH 层板以氢键结合,使层间距进一步增大。滴眼液要求的 pH 范围为 6.0~9.0,超出该范围可能对结膜刺激性较大。Zn-Al-LDH 和 Mg-Al-LDH

分别在 pH 7、pH 9 以上形成,所以 Mg-Al-PRN-LDH 的 pH 稍大于 9。但由于滴眼液剂量小且 PRN 是缓慢释放的,能部分抵消 pH 稍高引起的刺激性。PRN-LDHs 滴眼液的刺激性通过眼刺激性实验进一步说明。CG-PRN-LDH 杂化纳米粒性质 Mg-Al-PRN-LDH 相似,适宜用作眼部给药的载体研究。

Table 1 Characterization of different kinds of PRN-LDHs nanocomposites ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	Particulate size/nm	Zeta/mV	pH	Drug loading/%
Zn-Al-PRN-LDH	202 ± 17	28.3 ± 0.8	7.17 ± 0.29	14.32 ± 0.52
Mg-Al-PRN-LDH	96 ± 11	31.2 ± 1.2	9.32 ± 0.36	3.75 ± 0.10
CG-PRN-LDH	124 ± 13	33.5 ± 1.9	8.76 ± 0.24	6.12 ± 0.27

3.5 不同类型的 PRN-LDHs 在人工泪液中的释放

PRN 原料药、CG-PRN 和 PRN-LDHs 在人工泪液中的释放曲线见图 6。PRN 原料药及 CG-PRN 10 min 释放即达到 100%, Mg-Al-PRN-LDH 和 Zn-Al-PRN-LDH 与原料药相比,都具有一定的缓释作用。Zn-Al-PRN-LDH 和 Mg-Al-PRN-LDH 在 6 h 内累积释放分别为 20% 和 80%,故选择 Mg-Al-PRN-LDH 进行滴眼液的研究。Mg-Al-PRN-LDH 的释放曲线可以分为 3 个阶段:① 45 min 以前药物快速释放,主要是由表面吸附的药物引起;② 45~240 min 药物缓慢释放至平台,是由介质中的阴离子与层板间的药物缓慢交换直至平衡引起;③ 300 min 后又有少量药物释放,是由于部分 LDH 层板塌陷,使得药物从中释放。不同金属离子组成的 LDH 释放行为的差异可能有以下两种原因:其一是由于 Mg(OH)₂ 与 Zn(OH)₂ 的溶度积分别为 5.61×10^{-12} 、 3×10^{-17} ,在人工泪液 (pH 7.4) 中, Mg(OH)₂ 可能有少量溶解,而 Zn(OH)₂ 比较稳定。Mg-Al-PRN-LDH 的释放包括离子交换和层板溶蚀两个过程,相互促进,使得其释放较快。其二,药物在 LDH 中释放的过程是水分子先与层板通过氢键结合,削弱药物与层板间的氢键作用,水分子在层板附近聚集并形成结构层,药物分子被挤向层板中间,形成水合阴离子,与层板的作用力减弱,在浓度差的作用下释放到介质中。药物释放的速度和程度与药物与层板间氢键的强度,层板的水合膨胀性能有关^[20]。从红外光谱及载药量的结果可以看出, Mg-Al-PRN-LDH 水合量高而载药量低, Zn-Al-PRN-LDH 水合量低而载药量高。推测可能 Mg-

Al-LDH 的层板与 PRN 的氢键结合较弱,层板的水合能力较强,从而更容易将层板间的药物释放出来,而 Zn-Al-LDH 与之相反。CG-PRN-LDH 在人工泪液中的释放与 Mg-Al-LDH 相似,但比 Mg-Al-LDH 释放稍慢,达到离子交换平衡的释放量稍少。该结果也反映了 PRN 与 CG 间可能有氢键作用,而使 CG-PRN-LDH 中药物释放稍慢。

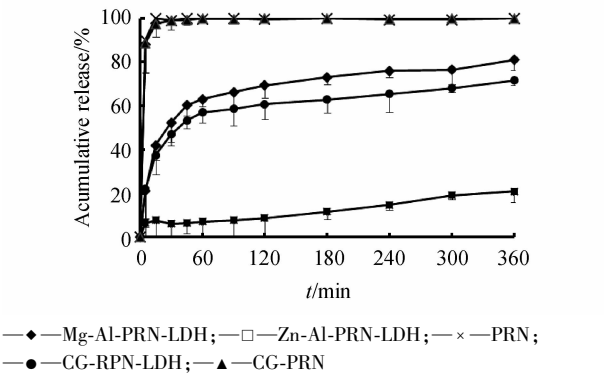


Figure 6 Accumulative release-time profiles of PRN, CG-PRN, Mg-Al-PRN-LDH, Zn-Al-PRN-LDH and CG-PRN-LDH ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 PRN-LDHs 纳米复合物滴眼液的眼刺激性

PRN-LDH 和 CG-PRN-LDH 纳米复合物制剂滴眼后与生理盐水无异,家兔的角膜、虹膜和结膜组织均无变化,PRN-LDH 制剂组单次给药和多次给药的眼刺激性平均积分分别为 0.77 和 1.89, CG-PRN-LDH 制剂组单次给药和多次给药的眼刺激性平均积分分别为 0.65 和 1.54。根据 Draize 眼刺激性评价标准,可以认为 PRN-LDH 和 CG-PRN-LDH 纳米复合物滴眼液对眼部无刺激。

3.7 PRN-LDH 在家兔泪液的药代动力学

滴眼给药后,PRN 浓度随时间延长呈衰减趋

势。以 HPLC 法检测泪液中的 PRN 浓度, 上市制剂和 CG-PRN 组仅能检测到 2 h 内的泪液 PRN 浓度, 而 PRN-LDH, CG-PRN-LDH 可以检测到 6 h 内的泪液 PRN 浓度, 其结果见图 5。采用 Pksolver 软件进行根据 AIC 最小原则进行模型拟合, 4 种制剂都符合单室模型, 拟合结果见表 2。相比于对照组, PRN-LDH 制剂、CG-PRN-LDH 制剂的 AUC_{0-t} 、 c_{max} 和 MRT 都显著提高 ($P < 0.05$)。PRN-LDH、CG-PRN-LDH 的 AUC_{0-t} 和 c_{max} 分别为对照组的 3.72 和 7.59 倍, MRT 分别为对照组的 2.18 和 2.60 倍, c_{max} 分别为对照组的 1.73 和 3.04 倍, 说明 LDH 作为 PRN 的载体, 能增加药物在泪液中的浓度和滞留时间, CG-PRN-LDH 与 PRN-LDH 相比, 能显著增加 PRN 在泪液中的浓度。LDH 增加药物的角膜前滞留, 一方面是由于 LDH 粒径小, 比表面积大, 表面正电荷密度大^[21], 能与带负电的角膜上皮通过静电结合, 从而减少泪液的冲洗作用, 另一方面, LDH 层板间的药物是通过与泪液中的离子进行交换而缓慢释放出来的, 这样可以减少高浓度药物对眼部的刺激, 也能减少眨眼和泪液冲洗造成的药物流失。CG-PRN-LDH 杂化纳米

粒与 PRN-LDH 相比, 药物在泪液中的浓度显著提高、滞留时间也进一步延长, 这可能是由于引入 CG 后, CG 中的巯基可以与黏液中黏蛋白的巯基形成二硫键, 从而增强载药纳米粒与角膜上皮的黏附性。增加药物在角膜前的浓度和滞留时间是提高眼后段给药生物利用度的有效手段, 故将有机物 CG 和无机物 LDH 杂化后形成有机-无机杂化纳米复合物作为眼后段药物的载体可能具有良好的应用价值。

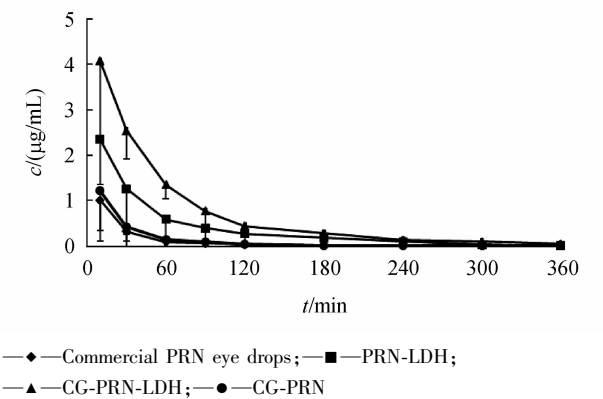


Figure 7 Tear fluid concentration-time profiles of commercial PRN eye drops, CG-PRN, PRN-LDH and CG-PRN-LDH ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of commercial PRN eye drops, CG-PRN, PRN-LDH and CG-PRN-LDH in tears ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Parameter	$AUC_{0-t}/(\mu\text{g/mL}\cdot\text{min})$	$c_{max}/(\mu\text{g/mL})$	MRT/min
Commercial PRN eye drops	30.33 ± 6.23	1.53 ± 0.21	18.33 ± 1.14
CG-PRN	$32.97 \pm 5.87^*$	$1.73 \pm 0.19^*$	$20.97 \pm 1.08^*$
PRN-LDH	$112.72 \pm 23.15^{**}$	$2.65 \pm 0.77^{**}$	$40.01 \pm 3.86^{**}$
CG-PRN-LDH	$230.16 \pm 30.78^{***}$	$4.65 \pm 1.02^{***}$	$47.55 \pm 4.23^{***}$

* $P > 0.05$ vs commercial PRN eye drops group; ** $P < 0.05$ vs commercial PRN eye drops group;

*** $P < 0.05$ vs PRN-LDH group; **** $P > 0.05$ vs PRN-LDH group

4 结 论

本研究采用共沉淀法制备了 Mg-Al-PRN-LDH、Zn-Al-PRN-LDH 纳米复合物, CG-PRN-LDH 杂化纳米复合物。通过 X-RD、IR 证明 PRN 已插入 LDHs 层间, CG 以部分嵌插的方式与 PRN-LDH 形成有机-无机杂化纳米复合物结构。与 NO_3 -LDH 相比, PRN-LDHs 层间距由 0.88 nm 增加到 1.27 nm, 推测 PRN 在 LDHs 中为平行的单层交错排列, PRN 阴离子与层板夹角为 57.2° , 相邻 PRN 阴离子的羧基分别朝向上下层板。与 PRN 原料药相比, PRN-LDHs 纳米复合物在人工泪液中表现出缓释性质。Zn-Al-PRN-LDH 和 Mg-Al-PRN-LDH 纳米复合物在人工泪液中 6 h 累积释放分别为 20% 和

80%, 故选择 Mg-Al-LDH 作为 PRN 的载体材料。CG-PRN-LDH 杂化纳米复合物的释放行为与 Mg-Al-PRN-LDH 纳米复合物相似。比较了 PRN-LDH、CG-PRN-LDH 纳米复合物滴眼液与市售 PRN 滴眼液在家兔泪液中的药代动力学行为, PRN-LDH、CG-PRN-LDH 纳米复合物滴眼液的 AUC_{0-t} 分别为市售 PRN 滴眼液的 3.72 和 7.59 倍, MRT 分别为市售滴眼液的 2.18 和 2.60 倍, 说明 PRN-LDH 和 CG-PRN-LDH 纳米复合物显著增加了 PRN 在泪液中的浓度和滞留时间。

角膜上皮和结膜糖蛋白带有负电荷, CG-PRN-LDH 层板表面带有正电荷, 能通过静电作用吸附在角膜表面, 延长在角膜前的滞留时间。嵌插于 LDH 层板间的 CG 可能通过与角膜上黏蛋白结合,

进一步增加 CG-PRN-LDH 在角膜前的滞留。CG-PRN-LDH 层板间的 PRN 可能通过与泪液中的阴离子交换而逐渐释放到泪液中, PRN 以分子形式透过角膜, 到达晶状体发挥治疗作用。CG-PRN-LDH 也可能以纳米复合物的形式透过角膜, 层板间的 PRN 再与房水中的阴离子交换而释放出来, 从而发挥治疗作用。由此推测巯基化壳聚糖 CG 与无机材料 LDH 形成的杂化纳米复合物, 可以作为眼部药物递送的载体, 增加角膜前滞留时间, 进而提高药物的生物利用度。

参考文献

- [1] Allmann R. The crystal structure of pyroaurite[J]. *Acta Crystallogr B*, 1986(24): 972–977.
- [2] Rives V, Arco MD, Martn C. Layered double hydroxides as drug carriers and for controlled non-steroid; a review[J]. *J Control Release*, 2013, 168(1/2): 28–39.
- [3] Chakrabortia M, Jacksona JK, Plackettb D, et al. Drug intercalation in layered double hydroxide clay; application in the development of a nanocomposite film for guided tissue regeneration[J]. *Int J Pharm*, 2011, 416(2): 305–313.
- [4] Zhang XQ, Zeng MG, Li SP, et al. Methotrexate intercalated layered double hydroxides with different particle sizes; structural study and controlled release properties[J]. *Colloid Surf B; Biointerfaces*, 2014, 117(1): 98–106.
- [5] Berber MR, Hafez IH, Minagawa K, et al. Nanocomposite formulation system of lipid-regulating drugs based on layered double hydroxide; synthesis, characterization and drug release properties[J]. *Pharm Res*, 2010, 27(11): 2394–2401.
- [6] Rives V, Arco MD, Martin C. Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release[J]. *App Clay Sci*, 2014(89): 239–269.
- [7] Kafedjiiski K, Foger F, Werle M, et al. Synthesis and *in vitro* evaluation of a novel chitosan-glutathione conjugate[J]. *Pharm Res*, 2005, 22(9): 1480–1488.
- [8] Ylenia Z, Francesca F, Angela F, et al. Mucoadhesive nanoparticles made of thiolated quaternary chitosan crosslinked with hyaluronan[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(1): 33–39.
- [9] Miriam C, Salvatore S, Marcella C. Pirenixine prevents oxidative effects of argon fluoride excimer laser irradiation in rabbit corneas; biochemical, histological and cytofluorimetric evaluations[J]. *J Photoch Photobiol B*, 2005, 78(1): 35–42.
- [10] Chennamaneni SR, Mamalis C, Archer B, et al. Development of a novel bioerodible dexamethasone implant for uveitis and postoperative cataract inflammation[J]. *J Control Release*, 2013, 167(1): 53–59.
- [11] Cao F, Wang YJ, Ping QN, et al. Zn-Al-NO₃-layered double hydroxides with intercalated diclofenac for ocular delivery[J]. *Int J Pharm*, 2011, 404(1/2): 250–256.
- [12] Jin XF, Xu Y, Shen J, et al. Chitosan-glutathione conjugate-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: promising carriers for oral thymopentin delivery[J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 86(1): 51–57.
- [13] Wang YJ, Cao F, Ping QN. Preparation and characterization of diclofenac sodium layered double hydroxide nanohybrids[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2009, 40(4): 321–326.
- [14] Yong L, Wang A, Ping X, et al. Structural and spectroscopic study of tripeptide/layered double hydroxide hybrids[J]. *J Colloid Interf Sci*, 2013(394): 564–572.
- [15] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Drug Standard of Ministry of Public Health of the People's Republic of China; Part 2* (中华人民共和国卫生部药品标准: 二部) [S]. Beijing: Chemical Industry Press, 1995: 46–48.
- [16] Kong CX, Zhang Q, Liu YN, et al. Determination of Pirenixine sodium and its related substances by HPLC[J]. *China Pharm* (中国药师), 2013, 16(1): 66–69.
- [17] Zhu HG, Tang PG, Feng YJ. Intercalation of IR absorber into layered double hydroxides; preparation, thermal stability and selective IR absorption[J]. *Mater Res Bull*, 2012, 47(3): 532–536.
- [18] Kuk WK, Huh YD. Preferential intercalation of isomers of anthraquinone sulfonate ions into layered double hydroxides[J]. *J Mater Chem*, 1997, 7(9): 1933–1936.
- [19] Amrite AC, Eelhauser HF, Singh SR, et al. Effect of circulation on the disposition and ocular tissue distribution of nanoparticles after periocular administration[J]. *Mol Vis*, 2008, 14(29): 150–160.
- [20] Li Y, Ni ZM, Xu Q, et al. Molecular dynamics simulation of histidine intercalated Zn/Al hydrotalcite and release course[J]. *J Chin Ceram Soc* (硅酸盐学报), 2011, 1(39): 63–68.
- [21] Qin ZG, Cao F, Ping QN, et al. Layered double hydroxides and their applications in drug delivery systems[J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2013, 37(12): 615–622.