

吡諾克辛鈉-層狀雙氫氧化物納米片及插層納米粒 複合物滴眼液的研究

池慧波¹,許婷婷¹,陳紅艳²,操 鋒^{1*}

(¹中國藥科大學藥劑學教研室,南京 210009;²河北省中醫院,石家莊 050017)

摘要 为考察新型药物载体层状双氢氧化物(LDH)纳米片在眼部给药系统的应用,采用LDH纳米片为载体,羧甲基纤维素钠(CMC)为稳定剂,吡诺克辛钠(PRN)为模型药物,制备CMC-PRN-LDH纳米片复合物;采用共沉淀法制备PRN-LDHs插层纳米粒复合物。通过X射线衍射、原子力显微镜、透射电镜、激光粒度仪等对LDH纳米片、CMC-LDH纳米片复合物及两种载药-LDH纳米复合物理化性质进行研究。通过体外稳定性、体外释放、家兔泪液滞留实验比较了两种载药-LDH纳米复合物的差异。结果显示,CMC-PRN-LDH纳米片复合物相对稳定,而PRN-LDHs插层纳米粒稳定性较差,二者12 h体外累积释放百分率分别为70.44%和44.21%。CMC-PRN-LDH纳米片复合物滴眼液的AUC_{0-6 h}和MRT分别为市售滴眼液的4.18和1.79倍,而PRN-LDHs插层纳米粒复合物滴眼液眼部滞留结果差异较大。CMC-PRN-LDH纳米片复合物滴眼液对眼部无刺激性。上述结果表明,LDH纳米片可作为眼部给药载体,能显著提高药物在角膜前的滞留时间。

关键词 层状双氢氧化物;纳米片;纳米粒;剥离;吡诺克辛钠;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(2016)04-0448-09

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160410

引用本文 池慧波,許婷婷,陳紅艳,等. 吡諾克辛鈉-層狀雙氫氧化物納米片及插層納米粒複合物滴眼液的研究[J]. 中國藥科大學學報, 2016, 47(4):448–456.

Cite this article as: CHI Huibo, XU Tingting, CHEN Hongyan, et al. Ophthalmic solution of pirenoxine sodium-layered double hydroxide nanosheets and intercalated nanoparticles[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(4):448–456.

Ophthalmic solution of pirenoxine sodium-layered double hydroxide nanosheets and intercalated nanoparticles

CHI Huibo¹, XU Tingting¹, CHEN Hongyan², CAO Feng^{1*}

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

²Hebei Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050017, China

Abstract The aim of this study was to evaluate the potential application of layered double hydroxide(LDH)nanosheets for ocular drug delivery. Using LDH nanosheets as carriers, carboxymethyl cellulose(CMC)as a stabilizer and pirenoxine sodium(PRN)as the model drug, CMC-PRN-LDH nanosheets were prepared. PRN-LDHs nanoparticles were synthesized via co-precipitation method. X-ray diffraction, atomic force microscopy, transmission electron microscopy and laser particle sizer were employed to characterize the physicochemical properties of LDH nanosheets, CMC-LDH nanosheets and PRN-LDH nanocomposites. Stability, accumulative release *in vitro* and precorneal retention *in vivo* of both CMC-PRN-LDH nanosheets and PRN-LDHs nanoparticles were evaluated. It was found that CMC-PRN-LDH nanosheets were electrostatically stabilized by CMC absorbed on the surface of LDH nanosheets, but PRN-LDHs nanoparticles aggregated in phosphate buffered saline. 12-hr accumulative release percentage of PRN from CMC-PRN-LDH nanosheets and PRN-LDHs nanoparticles were 70.44% and 44.21% *in vitro*, respectively. Compared with the commercial PRN eye drops, there existed 4.18-fold

increase in AUC_{0-6 h} and 1.79-fold in mean retention time of CMC-PRN-LDH nanosheets. Negligible levels of PRN-LDHs nanoparticles might be attributed to inter-groups difference. Draize test showed that CMC-PRN-LDH nanosheets were non-irritant to the rabbit eyes after single and repeated dosing. It suggest that this novel LDH nanosheet could be a promising carrier for ocular drug delivery with prolonged residence time.

Key words layered double hydroxides; nanosheets; nanoparticles; exfoliation; piroxine sodium; *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)

传统眼用制剂通常只有 10% 甚至更少的药物到达眼前段组织, 而到达眼后段的药物量则少于 1%^[1]。近年来, 研究热点集中于开发眼部滞留时间长、具有缓控释能力、可增加眼部生物利用度的新型药物传递系统, 如胶体给药系统、原位凝胶系统和生物黏附给药系统^[2]等。

层状双氢氧化物 (layered double hydroxides, LDHs) 是一类新型的无机纳米载体材料。主体层板由二元或多元金属氢氧化物组成, 原子间为共价键合; 层间由可交换的阴离子及溶剂分子构成, 其与层板之间为弱的相互作用。LDHs 具备良好的生物相容性、可提高药物稳定性及实现药物的缓控释等优点, 广泛用作有机阴离子药物载体、生物大分子载体、基因载体以及磁性载体^[3-6]。基于本课题组前期研究结果, 表明药物-LDHs 纳米复合物能显著提高药物在家兔眼部滞留时间, 为进一步提高药物在眼部的渗透性和生物利用度提供了可能性^[7-9]。

LDHs 主体层板内部表面的不可触及性, 在一定程度上限制了其应用范围^[10]。目前研究热点之一是 LDHs 的可剥层性以及剥层后组装成复合功能材料^[11]。LDHs 经剥离后可形成单层或若干层的片状纳米材料, 具备纳米尺度的开放结构。与层状结构的 LDHs 相比, LDH 纳米片比表面积可增大 25~30 倍^[12], 表面活性显著提高, 显示出许多新颖的理化特性, 可作为功能基元用于制备多功能纳米复合物, 如聚合物/LDH 纳米复合物、多功能壳核结构材料、超薄膜、催化剂、电极材料、磁性材料及生物无机杂化材料等^[13]。然而, LDH 纳米片胶体溶液在浓度较高、引入电解质或干燥等条件下会发生聚集沉淀, 恢复层状结构。如何提高 LDH 纳米片的稳定性是目前研究的难点之一, 有学者尝试在 LDH 纳米片表面包覆羧甲基纤维素钠、海藻酸

钠或白蛋白^[14-16], 通过二者之间较强的相互作用, 以增加 LDH 纳米片在水中的静电稳定性和空间稳定性。

为研究该新型纳米片在眼部应用的可能性, 本研究在前期研究的基础上, 首次尝试选用 Zn-Al-LDH 纳米片为药物载体, 羧甲基纤维素钠 (CMC) 为稳定剂, 吡诺克辛钠 (pirroxine sodium, PRN) 为模型药物, 制备 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物, 考察了 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物与 PRN-LDHs 插层纳米粒的理化性质、体外稳定性、体外释放及家兔角膜前滞留行为, 评价两种药物载体在 PRN 眼部应用上的差异。

1 材 料

1.1 药品与试剂

吡诺克辛钠(成都新恒创药业, 含量: 98%, 批号: 140503); 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); L-乳酸锌(成都艾科达化学试剂有限公司); 乳酸铝(美国 Sigma-Aldrich 公司); 羧甲基纤维素钠(美国 Sigma-Aldrich 公司, 相对分子质量 90 000, 4% 水溶液 25℃ 黏度 50~200 cps); 甲醇、乙腈为色谱纯; 水为双蒸水; 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

LC-2010CHT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); Zeta Plus 激光粒度仪(美国 Brook Haven 公司); Nano Scope IIIa 型原子力显微镜(美国 Veeco 精密仪器有限公司); JEM-200CX 型透射电子显微镜(日本 Jeol 公司); D/max-2500/PC 型转靶 X 射线衍射仪(日本理学公司); 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); 透析袋(截留相对分子质量 8~14 kD, 南京晚晴化

玻仪器有限公司)。

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:No. 201505373。

2 方 法

2.1 空白 LDHs、LDH 纳米片及 CMC-LDH 纳米片复合物的制备

2.1.1 空白 LDHs 的制备 采用共沉淀法制备插层离子为乳酸根和碳酸氢根的空白 LDHs^[17]。称取 $Zn(C_3H_5O_3)_2$ 0.913 g, $Al(C_3H_5O_3)_3$ 0.368 g 溶于水 100 mL, 得混合盐溶液 A; 精密称取 $NaHCO_3$ 52.5 mg 溶于水 100 mL, 得溶液 B; 2 mol/L $NaOH$ 为溶液 C。剧烈搅拌下, 将溶液 B 缓慢加入 A 中形成均匀混合溶液, 向混合溶液中缓慢滴加溶液 C 至体系 pH 8.0 ± 0.1, 滴加完毕后静置老化 12 h。生成的白色浆液反复离心水洗 5 次, 沉淀置于表面皿, 50 °C 烘箱干燥 18 h, 得空白 LDHs 粉末。

2.1.2 LDH 纳米片的制备 将上述制备的空白 LDHs 浆状沉淀置水 50 mL 中, 20 000 r/min 高速分散 2 min, 500 r/min 室温搅拌 8 h, 至白色混悬液变为透明胶体溶液, 得剥离 LDH 纳米片溶液。

2.1.3 CMC-LDH 纳米片复合物(CMC-LDH)的制备 称取适量 CMC, 分别配制质量浓度为 1, 2, 4, 8 mg/mL 的 CMC 水溶液, 水浴加热搅拌至完全溶解, 冷却至室温。强烈搅拌下, 将 LDH 纳米片胶体溶液(1 mg/mL)1 mL 缓慢滴加至等量 CMC(质量浓度分别为 1, 2, 4, 8 mg/mL)溶液中, 使 CMC 与 LDH 质量比分别为 1:1, 2:1, 4:1 及 8:1, 滴加完毕后继续搅拌 1 h, 得 CMC-LDH 纳米片复合物溶液。

2.2 载药 LDH 纳米复合物的制备

2.2.1 PRN-LDH 纳米片复合物的制备 精密称取适量 PRN 溶于水中(1 mg/mL), 强烈搅拌下, 逐滴加入到适量 LDH 纳米片胶体溶液(1 mg/mL), 使 PRN 与 LDH 质量比为 1:6。滴加完毕后继续搅拌 1 h, 得 PRN-LDH 纳米片复合物溶液。

2.2.2 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物的制备 精密称取适量 PRN 溶解于水中(1 mg/mL), 强烈搅拌下, 缓慢加入到 1 mL CMC 溶液(4 mg/mL)中, 再向其中逐滴滴加 1 mL LDH 纳米片胶体溶液(1 mg/mL), 使 PRN 与 LDH 质量比为 1:6。滴加

完毕后继续搅拌 1 h, 得 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物溶液。

2.2.3 PRN-LDHs 插层纳米粒复合物的制备 按照文献[9]方法, 采用共沉淀法制备 $Zn-Al-PRN-LDHs$ 插层纳米粒复合物。称取 $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 1.19 g, $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 0.75 g 溶于水 3 mL 中, 得混合盐溶液。称取 $NaOH$ 0.505 g 溶于水 3 mL 中, 得碱液。称取 PRN 140 mg 溶于水 70 mL 中, 作为反应介质。全程氮气保护, 0 °C 剧烈磁力搅拌下, 向反应介质中同步缓慢滴加混合盐溶液和碱液, 控制反应体系 pH 7~8, 滴加完毕后继续搅拌 1 h, 反应液反复离心水洗至上清液无色, 除去游离药物分子。离心洗涤后得到的 LDHs 浆液重新分散于去离子水 60 mL 中, 置反应釜中 100 °C 水热处理 5 h, 得 PRN-LDHs 插层纳米粒复合物溶液。冷冻干燥, 得插层 PRN-LDHs 纳米复合物粉末。

2.3 载药量的测定

采用 HPLC 法测定载药 LDH 纳米复合物载药量。测定条件: 色谱柱为 Intertsil OSD-SP(4.6 mm × 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); 流速为 1 mL/min; 柱温为 35 °C; 检测波长为 230 nm; 进样量为 20 μL^[9]。

将“2.2”项下制备的 PRN-LDH 纳米片复合物和 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物溶液, 置于透析袋中, 双蒸水透析过夜, 将透析后的载药-LDH 纳米片复合物溶液置于 10 mL 量瓶中, 加入 5 mol/L HCl 1 mL 破坏 LDH, 加入 DMSO 定容至刻度, 高速离心后取上清液用 DMSO 稀释至一定浓度, 通过 HPLC 测定峰面积, 代入标准曲线计算载药量。

精密称取 PRN-LDHs 插层纳米粒复合物粉末 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。高速离心后取上清液用 DMSO 稀释至一定浓度, 通过 HPLC 测定峰面积, 代入标准曲线计算载药量^[9]。

2.4 LDH 样品理化性质的表征

将“2.1”“2.2”项下制备的样品分别稀释至 1 mg/mL, 测定样品粒径及电位。

使用 X 射线衍射仪(Cu 靶, $K\alpha$ 射线, $\lambda = 0.154$ nm, 2θ 范围 $2^\circ \sim 70^\circ$, 扫描速度为 $2^\circ/\text{min}$, 工作电压为 40 kV, 工作电流 40 mA) 测定样品的

晶体结构。LDH 纳米片, CMC-LDH、PRN-LDH 及 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物溶液, 12 000 r/min 高速离心 30 min 得透明胶状沉淀为 X 射线衍射样品。

室温下, 将“2.1”项下制备的 LDH 纳米片溶液稀释一定倍数后滴于石英片上, 室温放置自然晾干, 轻敲模式下使用原子力显微镜 (AFM) 观察粒子形态、粒径及分散性。

室温下, 将“2.1”项下制备的 LDH 纳米片和 CMC-LDH 纳米片复合物溶液稀释一定倍数后滴于铜网上, 室温放置形成薄膜, 使用透射电镜 (TEM) 观察样品的形态、粒径及分散性。

2.5 载药 LDH 纳米复合物体外稳定性考察

2.5.1 在人工泪液中的稳定性 取“2.2”项下制备的 PRN-LDH、CMC-PRN-LDH 纳米片复合物及 PRN-LDHs 插层纳米粒复合物溶液适量, 与等体积标准人工泪液混合, 同法配制同浓度 PRN 人工泪液作为对照。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, 调节 pH 至 7.4^[8], 在 35 ℃ 下分别于 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 h 测定 PRN 含量。

2.5.2 在磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中的稳定性 参考《中华人民共和国药典》2010 年版, 配制磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4)。取“2.2”项下制备的 PRN-LDH、CMC-PRN-LDH 纳米片复合物及 PRN-LDHs 插层纳米粒复合物溶液适量, 与等体积 PBS 缓冲溶液混合, 在 35 ℃ 下分别于 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 h 测定载药纳米复合物粒径及 PRN 含量。

2.6 载药 LDH 纳米复合物体外释放考察

采用动态透析法研究载药-LDH 纳米复合物在 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 的体外释放行为。量取 PRN 溶液、CMC-PRN-LDH 纳米片复合物溶液及 PRN-LDHs 插层纳米粒复合物各 1 mL (PRN 质量浓度均为 0.05 mg/mL) 置于透析袋, 然后将透析袋置于 PBS 缓冲溶液 50 mL 中, 于 (35 ± 0.5) ℃, 400 r/min 磁力搅拌下进行体外释放实验。分别于 10, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 480, 720 min 取样 0.5 mL 并补加等体积释放介质, 释放溶液 0.45 μm 微孔滤膜过滤。取续滤液按“2.3”项下色谱条件测定 PRN 含量, 计算累积释放百分率并绘制释放曲线。

2.7 家兔角膜前滞留行为考察

2.7.1 滴眼液的配制

CMC-PRN 滴眼液的配制 精密称取适量 PRN 溶解于水中 (1 mg/mL), 强烈搅拌下, 缓慢加入到 CMC 溶液 (2 mg/mL) 2 mL 中, 使 PRN 质量浓度为 0.05 mg/mL, 加入 0.25% 三氯叔丁醇和 6% 葡萄糖, 得 CMC-PRN 滴眼液。

载药 LDH 纳米复合物滴眼液的配制 取“2.2”项下制备的 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物和 PRN-LDHs 插层纳米粒溶液适量 (PRN 质量浓度为 0.05 mg/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 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物滴眼液和 PRN-LDHs 插层纳米粒复合物滴眼液。

2.7.2 给药方案

新西兰大白兔 24 只, 随机分成 4 组, 每组 6 只。4 组分别给予市售制剂 (PRN 质量浓度为 0.05 mg/mL), CMC-PRN 滴眼液, CMC-PRN-LDH 纳米片复合物滴眼液及 PRN-LDHs 插层纳米粒滴眼液。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, 取上清液按“2.3”项下色谱条件进样分析。

2.8 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物眼部刺激性实验

新西兰大白兔 3 只, 左眼给予 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物滴眼液 50 μL, 右眼给予生理盐水 50 μL 作为对照。单次给药眼刺激性试验, 给药 1 次, 给药后 1, 2, 4, 24, 48, 72 h 记录眼部各组织情况; 多次给药眼刺激性试验, 每日 3 次, 连续 5 d, 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^[7], 分别评价角膜、虹膜和结膜的刺激性反应分数, 累积计算平均分为每只兔的眼部刺激性分值。将每只动物的眼角膜、虹膜和结膜的刺激反应的分值相加, 即得一只受试动物的眼部刺激性反应总积分, 每只受试动物的刺激性反应积分总和除以动物数为该受试动物对眼部

刺激性反应平均积分,根据平均积分计算受试动物眼刺激程度。

3 结果与讨论

3.1 LDH 纳米片

本课题组前期研究^[9],将 PRN 分别插层于 Zn-Al-NO₃-LDHs 和 Mg-Al-NO₃-LDHs 制备 Zn-Al-PRN-LDHs 和 Mg-Al-PRN-LDHs 插层纳米粒,由于不同金属离子组成的载药-LDHs 体外释放行为有较大差异,Zn-Al-PRN-LDHs 体外累积释放量低,所以最终选择 Mg-Al-PRN-LDHs 做后续研究。然而,Mg-Al-LDHs 需在 pH 大于 9 条件下形成,而 Zn-Al-LDHs 在 pH 7~8 条件下形成,与生理 pH 更接近,对眼部刺激性相对较小,因此本研究仍在 Zn-Al-LDHs 基础上制备 Zn-Al-LDH 纳米片,进行后续研究。鉴于硝酸根插层 LDHs 无法在水中剥离^[18],选用插层离子为乳酸根和碳酸氢根的 LDHs(简称空白 LDHs)进行剥离研究^[17]。共沉淀法制备 PRN-LDHs 插层纳米粒是 PRN 与混合盐溶液中阴离子竞争插层的过程,硝酸根易被其他阴离子竞争置换,因此将 PRN 插入 Zn-Al-NO₃-LDHs 层间来制备 PRN-LDHs 插层纳米粒复合物。

空白 LDHs 混悬液为乳白色(图 1-A),而剥离后 LDH 纳米片胶体溶液呈无色透明,存在明显的丁达尔现象(图 1-B)。LDH 纳米片粒径为 (47.5 ± 12) nm,多分散指数(PI)为 0.210 ± 0.021 ,与 TEM 结果基本一致(图 2-A),LDH 纳米片形态为六边形、圆形、椭圆形,形状不规则且粒径小,衬度微弱均一表明 LDH 纳米片片层极薄且厚度均匀。AFM(图 3)可观察到,LDH 纳米片横向尺寸约为 50 nm,厚度为 2~10 nm。

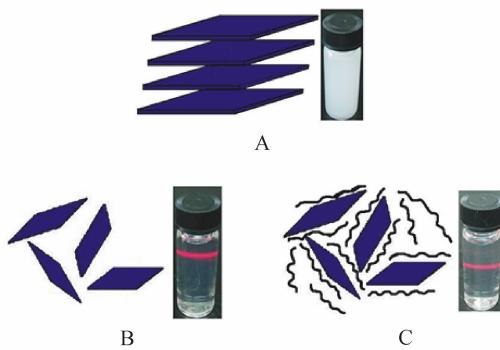


Figure 1 Schematic diagram and digital photographs of blank LDHs (A), LDH nanosheets (B) and CMC-LDH nanosheets (C)
LDH: Layered double hydroxide; CMC: Carboxymethyl cellulose

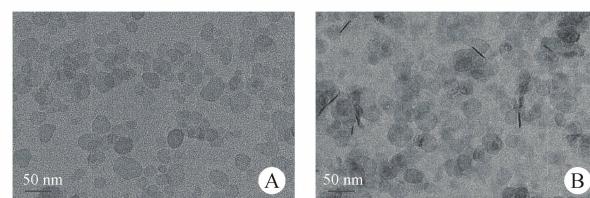


Figure 2 TEM micrographs of LDH nanosheets (A) and CMC-LDH nanosheets (B)

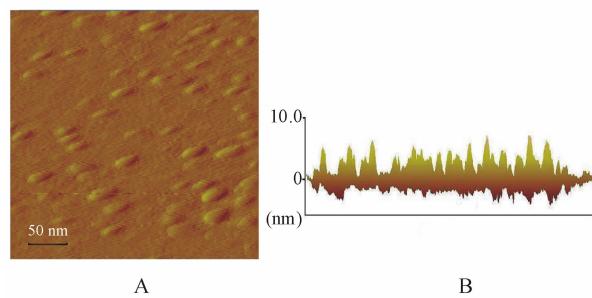


Figure 3 AFM micrographs of LDH nanosheets
A: Delaminated LDH nanosheets on a mica substrate; B: Height profile of LDH nanosheets

X 射线衍射可检测 LDH 剥离前后晶型变化,是判断 LDH 是否发生剥离的重要依据之一^[13]。图 4-A 为空白 LDHs 的 XRD 图,具有典型的 LDH 特征衍射峰,(003) 和(006) 号峰分别为 11.70° 和 23.24°,可计算出层间距 $d_{(003)}$ 为 7.56 nm,表明制备的空白 LDHs 具有完整的层状结构。图 4-B 为剥离后 LDH 纳米片的 XRD 图,低衍射角区的尖锐衍射峰消失,2θ 为 61° 处有一个小的 LDH 层板衍射峰(110),以上结果表明 LDHs 晶态结构被破坏,已形成纳米片。

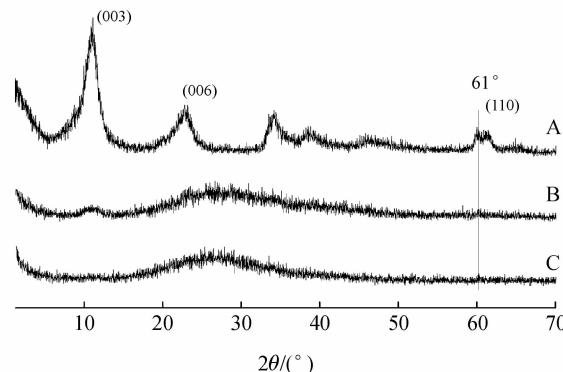


Figure 4 XRD patterns of blank LDHs (A), LDH nanosheets (B) and CMC-LDH nanosheets (C)

3.2 CMC-LDH 纳米片复合物

CMC 与 LDH 分别以质量比 1:1, 2:1, 4:1 及 8:1 杂化制备的 CMC-LDH 纳米片复合物粒径、PI

及电位如表 1 所示。当 CMC 与 LDH 质量比增加至 4:1 时, CMC-LDH 的电位不再发生明显变化, 但继续增加 CMC 的量, 粒径及多分散系数明显增大, 最后选择 CMC 与 LDH 的质量比为 4:1 做后续研究。CMC-LDH 纳米片复合物溶液同样存在明显的丁达尔现象, 如图 1-C 所示, 表明 CMC 的加入并未影响 LDH 纳米片胶体状态。TEM(图 2-B)可观察到, 与 LDH 纳米片相比, CMC-LDH 纳米片复合物粒子边缘模糊, 表明 LDH 纳米片表面被 CMC 包覆, 均匀分散在 CMC 中, 并未出现聚集, 厚度约为 2~10 nm, 与 LDH 纳米片基本一致。图 4-C 为 CMC-LDH 纳米片复合物 XRD 图, 与 LDH 纳米片相似, 低衍射角区的尖锐衍射峰消失, 说明 LDH 纳米片与 CMC 杂化后, 并未发生重组, 仍以纳米片的形式稳定分散在 CMC 中。

Table 1 Characterization of different kinds of CMC-LDH nanosheets ($\bar{x} \pm s, n=3$)

m (CMC)/ m (LDH)	Size/nm	PI	Zeta potential/mV
0:1	47.5 ± 12.1	0.210 ± 0.021	+35.4 ± 0.9
1:1	120.7 ± 5.3	0.200 ± 0.014	-45.3 ± 0.4
2:1	137.9 ± 4.8	0.237 ± 0.017	-47.4 ± 0.2
4:1	146.1 ± 4.4	0.282 ± 0.012	-49.3 ± 0.5
8:1	261.5 ± 6.4	0.494 ± 0.231	-49.6 ± 0.3

PI: Polydispersity index

3.3 载药 LDH 纳米复合物

LDH 纳米片由于具有更大的比表面积, 载药量远大于层状结构的 LDHs, 然而载药量越高, LDH 纳米片体系越不稳定。参考课题组前期研究^[9], Zn-Al-PRN-LDHs 插层纳米粒载药量为 (14.32 ± 0.52)%, 按此药物-载体比例制备 PRN-LDH 纳米片复合物和 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物, 按“2.3”项下测载药量方法, 双蒸水透析过夜, 测得药物含量分别为 (99.83 ± 0.13)% 和 (99.21 ± 0.35)%, 说明 PRN 与 LDH 以质量比为 1:6 载药, PRN 可完全吸附于 LDH 纳米片表面。因此, 以该药物-载体比例制备的 PRN-LDH 纳米片复合物和 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物, 一方面能保证载药纳米片复合物体系的稳定性, 另一方面在相同载药量的基础上可比较两种载体的其他特性。

载药 LDH 纳米复合物的粒径、电位、pH 和载药量的性质见表 2。直接通过共沉淀法制备的 PRN-LDHs 插层纳米粒复合物, 粒径较大, 由 XRD 结果计算可知(图 5-A)层间距 $d_{(003)}$ 为 1.27 nm,

与前期实验结果一致^[9]。LDH 纳米片直接吸附载药制备的 PRN-LDH 纳米片复合物, Zeta 电位 (21.1 ± 0.6)mV, 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较好的物理稳定性^[19], PRN-LDH 纳米片复合物电位较低。XRD 结果如图 5-B 所示, 出现了明显的(003)号衍射峰, 推测 PRN 的加入引起 LDH 纳米片体系不稳定, 部分 LDH 纳米片发生聚集, 恢复层状结构。CMC-PRN-LDH 纳米片复合物 XRD 结果见图 5-C, 未出现明显(003)号峰, 说明 CMC 的加入提高了 LDH 纳米片的稳定性, 载药 LDH 纳米片仍以稳定的形式分散在 CMC 中。

Table 2 Characterization of different kinds of PRN-LDH nanocomposites ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Sample	PRN-LDH nanosheets	CMC-PRN-LDH nanosheets	PRN-LDHs nanoparticles
Particle size/nm	164.5 ± 12.1	143.9 ± 5.4	205.3 ± 17.6
Zeta/mV	+21.1 ± 0.6	-53.0 ± 1.2	+27.6 ± 0.5
pH	6.17 ± 0.18	7.21 ± 0.23	7.17 ± 0.29
Drug loading/%	14.21 ± 0.33	14.28 ± 0.25	14.32 ± 0.52

PRN: Piroxime sodium

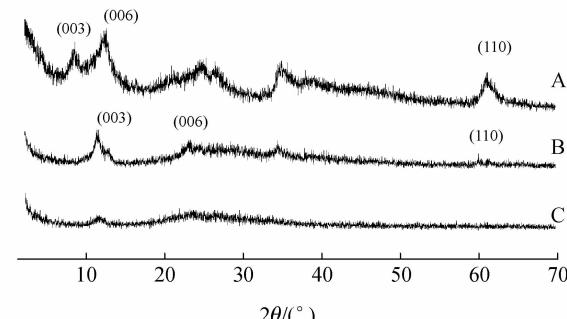


Figure 5 XRD patterns of PRN-LDHs nanoparticles (A), PRN-LDH nanosheets (B) and CMC-PRN-LDH nanosheets (C)

3.4 载药 LDH 纳米复合物体外稳定性

体外释放实验前, 本研究考察了 PRN, 载药 LDH 纳米复合物在释放介质中的稳定性。由表 3 可知, PRN 在人工泪液中稳定性差, 6 h 后 PRN 含量降至 15.16%, 表明 PRN 在人工泪液中不稳定。PRN-LDHs 插层纳米粒和 PRN-LDH 纳米片复合物置于人工泪液 0.5 h 后出现明显可见的沉淀, 推测原因为表面带有正电荷的 LDH 极易吸附盐溶液中的阴离子, 导致 LDH 电位持续下降, 粒子间静电排斥作用减弱, 出现聚集粒径显著增大的现象^[16]。CMC-PRN-LDH 纳米片复合物在人工泪液中相对稳定, 实验过程中未出现聚集沉淀, 表明 CMC 对

LDH 纳米片的稳定作用,6 h 后药物含量为 49.41%,与 PRN 相比含量提高了 3.26 倍,说明药物吸附在 LDH 纳米片表面后,在一定程度上提高了药物分子本身的稳定性。

Table 3 Content (%) of PRN, PRN-LDH nanosheets, CMC-PRN-LDH nanosheets and PRN-LDHs nanoparticles in artificial tear ($n=3$)

Group	0	0.5	1	2	4	6 h
PRN	100	89.36	77.59	66.21	34.43	15.16
PRN-LDH nanosheets	-	-	-	-	-	-
CMC-PRN-LDH nanosheets	100	98.99	85.29	84.9	67.08	49.41
PRN-LDHs nanoparticles	-	-	-	-	-	-

由上述实验结果可知人工泪液不适合作为体外释放介质,因此选择 pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)为体外释放介质,首先考察了 PRN、PRN-LDH 纳米片、CMC-PRN-LDH 纳米片复合物和 PRN-LDHs 插层纳米粒在 PBS 中的稳定性,结果如表 4,5 所示。PRN 在 35 °C 的 PBS 中 6 h 含量为 83.23%,与在人工泪液中相比相对稳定。PRN-LDHs 插层纳米粒置 35 °C 的 PBS 中,粒径持续增大,6 h 后有明显沉淀析出,稳定性较差。PRN-LDH 纳米片在 35 °C 的 PBS 中出现明显聚集沉淀,稳定性差。CMC-PRN-LDH 纳米片复合物置 35 °C 的 PBS 中,粒径有小幅度上下波动,但波动范围不大,粒径及 PRN 含量保持相对稳定。

Table 4 Content (%) of PRN, CMC-PRN-LDH nanosheets and PRN-LDHs nanoparticles in PBS ($n=3$)

Group	0	0.5	1	2	4	6 h
PRN	100	99.71	98.25	94.09	88.70	83.23
CMC-PRN-LDH nanosheets	100	102.95	93.67	91.90	86.75	80.65
PRN-LDHs nanoparticles	100	101.73	96.19	-	-	-

Table 5 Size (nm) of CMC-PRN-LDH nanosheets and PRN-LDHs nanoparticles in PBS ($n=3$)

Group	0	0.5	1	2	4	6 h
CMC-PRN-LDH nanosheets	145.2	151.5	147.3	152.9	158.6	167.1
PRN-LDHs nanoparticles	212.7	246.3	389.4	422.6	580.3	>1000

3.5 载药 LDH 纳米复合物体外释放

PRN 溶液、CMC-PRN 溶液、CMC-PRN-LDH 纳米片复合物及 PRN-LDHs 插层纳米粒溶液在 PBS 中的释放曲线如图 6 所示。PRN 和 CMC-PRN 溶液呈现快速释放,2 h 释放完全,二者释放行为基本一致。与 PRN 溶液相比,CMC-PRN-LDH 纳米片复合物和 PRN-LDHs 插层纳米粒都呈现缓慢释放,

12 h 药物累积释放百分率分别为 70.44% 和 44.21%。PRN-LDHs 插层纳米粒与 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物相比,药物释放过程更为缓慢,体外累积释放量低,与前期研究结果一致^[9]。两种载药形式药物释放机制不同,药物-LDHs 插层纳米粒的释放主要包括离子交换和层板溶蚀两个过程。在 pH 7.4 条件下,药物在 PBS 中的释放主要是通过药物分子与释放介质中的离子交换来实现。PRN-LDHs 插层纳米粒层板水合程度低,层间 PRN 与 LDH 层板结合力强,扩散和离子交换阻力大,导致药物释放过程缓慢且累积释放量低。相比 PRN-LDHs 插层纳米粒,CMC-PRN-LDH 纳米片复合物中 PRN 直接吸附于 LDH 层板表面,更容易被释放介质中的阴离子置换,因而释放相对较快^[20]。PRN-LDHs 插层纳米粒在释放实验过程中仍然出现少量聚集沉淀现象,可能与释放介质中大量离子进入透析袋引起 PRN-LDHs 插层纳米粒不稳定有关。

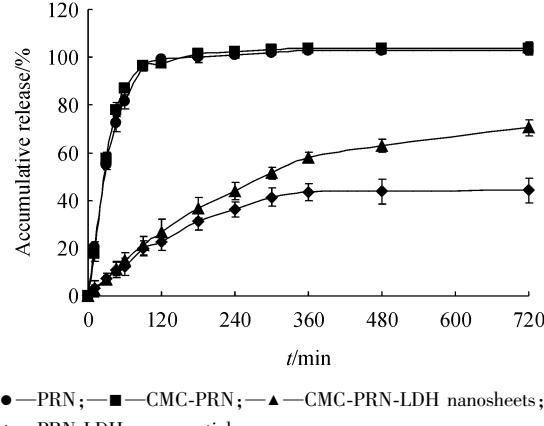


Figure 6 Accumulative release-time profiles of PRN, CMC-PRN, CMC-PRN-LDH nanosheets and PRN-LDHs nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.6 载药 LDH 纳米复合物滴眼液在家兔泪液的药代动力学

制剂滴眼给药后 PRN 浓度随时间延长呈衰减趋势,其结果见图 7。市售制剂和 CMC-PRN 制剂组仅能检测到 2 h 内泪液中的 PRN 浓度,而 CMC-PRN-LDH 制剂组可以检测到 4 h 内泪液中的 PRN 浓度。PRN-LDHs 插层纳米粒制剂仅能检测到 10 min 泪液中 PRN 浓度,且差异较大。结合前述体外稳定性及体外释放结果,推测由于 PRN-LDHs 插层纳米粒稳定性较差,且体外释放不完全,因而在泪液中无法有效检测。使用 PK Solver 软件,根

据 AIC 最小原则进行模型拟合,3 种制剂在家兔泪液中的经时变化过程符合一级消除过程,拟合结果见表 6。CMC-PRN 滴眼液的 AUC_{0-6h} 和 MRT 分别为市售制剂的 1.24 和 1.11 倍,CMC 可在一定程度上提高药物在眼部的滞留,但效果并不明显。CMC-PRN-LDH 纳米片复合物滴眼液 AUC_{0-6h} 和 MRT 分别为市售制剂的 4.18 和 1.79 倍,具有显著性提高($P < 0.01$),这可能与 LDH 纳米片本身较强的表面活性相关,LDH 纳米片可通过氢键作用与覆盖在角膜和结膜表面的黏蛋白相互作用,从而延长药物在眼部的滞留时间。

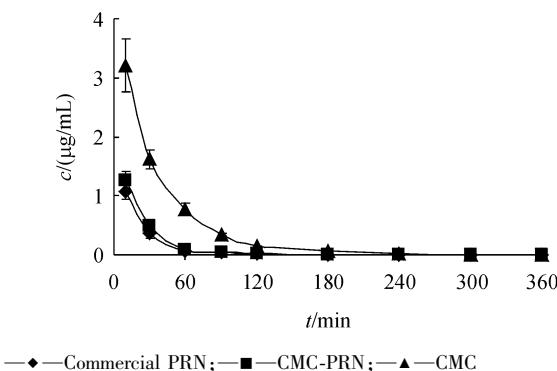


Figure 7 Concentration-time curve of PRN in tear samples of commercial PRN eye drops, CMC-PRN and CMC-PRN-LDH nanosheets formulations ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Pharmacokinetic parameters of commercial PRN eye drops, CMC-PRN and CMC-PRN-LDH nanosheets formulations ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Group	$AUC_{0-6h}/(\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL})$	MRT/min
Commercial PRN eye drops	34.05 ± 3.13	18.69 ± 3.68
CMC-PRN	$42.35 \pm 6.51^*$	20.79 ± 1.84
CMC-PRN-LDH nanosheets	$142.28 \pm 13.04^{**}$	$33.51 \pm 2.86^{**}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs commercial PRN eye drops group

3.7 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物滴眼液的眼部刺激性

右眼生理盐水组单次给药和多次给药的眼刺激性平均分数分别为 0.35 和 1, 左眼 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物滴眼液组单次给药和多次给药的眼刺激性平均分数分别为 0.58 和 1.46。根据 Draize 眼刺激性评价标准, 可认为 CMC-PRN-LDH 纳米复合物滴眼液对眼部无刺激性。

4 结 论

本研究以新型 LDH 纳米片为载体, CMC 为稳定剂制备了 CMC-PRN-LDH 纳米片复合物, 以共沉淀法制备了 PRN-LDHs 插层纳米粒。通过体外稳

定性, 体外释放行为及家兔泪液滞留行为的考察, 比较了两种形式的载药-LDH 纳米复合物性质的差异。CMC-PRN-LDH 纳米片复合物体外稳定性较好, 在 PBS 中能够缓慢释放, 家兔泪液滞留时间与市售制剂相比有显著性提高, 而 PRN-LDHs 插层纳米粒稳定性较差, 体外累积释放量低, 眼部滞留结果差异较大。以上研究表明, LDH 纳米片载药后能显著延长药物在角膜前的滞留时间, 为提高其进入角膜或其他眼部组织的能力和眼部的生物利用度提供了新的策略, 具有较好的应用前景。后续将着重研究载药 LDH 纳米片复合物在眼部的渗透性及其吸收机制。

参 考 文 献

- [1] du Toit LC, Pillay V, Choonara YE, et al. Ocular drug delivery—a look towards nanobioadhesives [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011, **8**(1): 71–94.
- [2] Achouri D, Alhanout K, Piccerelle P, et al. Recent advances in ocular drug delivery [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, **39**(11): 1599–1617.
- [3] 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.
- [4] Gu Z, Rolfe BE, Xu ZP, et al. Antibody-targeted drug delivery to injured arteries using layered double hydroxide nanoparticles [J]. *Adv Health Mater*, 2012, **1**(5): 669–673.
- [5] Balcomb B, Singh M, Singh S. Synthesis and characterization of layered double hydroxides and their potential as nonviral gene delivery vehicles [J]. *Chemistry Open*, 2015, **4**(2): 137–145.
- [6] Tunceli G, Ay AN, Zümreoglu-Karan B. 5-Fluorouracil intercalated iron oxide @ layered double hydroxide core-shell nanocomposites with isotropic and anisotropic architectures for shape-selective drug delivery applications [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, **55**: 562–568.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Zhang J, Chi HB, Cheng YJ, et al. Ophthalmic solution of thiolated chitosan-pirenoxine sodium-layered double hydroxides hybrid nanocomposites [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2015, **46**(2): 201–208.
- [10] Liang D, Yue W, Sun G, et al. Direct synthesis of unilamellar Mg, Al-LDH nanosheets and stacking in aqueous solution [J].

- Langmuir*, 2015, **31**(45):12464–12471.
- [11] Nicolosi V, Chhowalla M, Kanatzidis MG, et al. Liquid exfoliation of layered materials [J]. *Science*, 2013, **340**(6139):1226419.
- [12] Wang Q, O'Hare D. Large-scale synthesis of highly dispersed layered double hydroxide powders containing delaminated single layer nanosheets [J]. *Chem Commun*, 2013, **49**(56):6301–6303.
- [13] Wang Q, O'Hare D. Recent advances in the synthesis and application of layered double hydroxide(LDH) nanosheets [J]. *Chem Rev*, 2012, **112**(7):4124–4155.
- [14] Kang HL, Huang GL, Ma SL, et al. Coassembly of inorganic macromolecule of exfoliated LDH nanosheets with cellulose [J]. *J Phys Chem C*, 2009, **113**(21):9157–9163.
- [15] Kang HL, Shu Y, Li Z, et al. An effect of alginate on the stability of LDH nanosheets in aqueous solution and preparation of alginate/LDH nanocomposites [J]. *Cabohydr Polym*, 2014, **100**(2):158–165.
- [16] Gu Z, Zuo HL, Li L, et al. Pre-coating layered double hydroxide nanoparticles with albumin to improve colloidal stability and cellular uptake [J]. *J Mater Chem B*, 2015, **3**(16):3331–3339.
- [17] Hibino T. A new method for preparation of nanoplates of Zn-Al layered double hydroxides [J]. *Appl Clay Sci*, 2011, **54**(1):83–89.
- [18] Wu QL, Olafsen A, Frimulv BV, et al. Delamination and restacking of a layered double hydroxide with nitrate as counter anion [J]. *J Mater Chem*, 2005, **15**(44):4695–4700.
- [19] Wang Y, Zhu LY, Dong Z, et al. Preparation and stability study of norfloxacin-loaded solid lipid nanoparticle suspensions [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012, **98**(10):105–111.
- [20] Bugatti V, Gorrasi G, Montanari F, et al. Modified layered double hydroxides in polycaprolactone as a tunable delivery system: *in vitro* release of antimicrobial benzoate derivatives [J]. *Appl Clay Sci*, 2011, **52**(1):34–40.