

盐酸倍他洛尔-蒙脱石脂质体的制备与性能考察

李娟¹, 侯冬枝^{1*}, 胡晟¹, 黄焱¹, 田双艳¹, 陈燕忠¹,
吕竹芬¹, 段豪云², 周庆军²

(1. 广东药科大学药科学院, 广东省局部精准递药制剂工程技术研究中心, 广东省药物新剂型重点实验室, 广州 510006; 2. 山东省眼科研究所, 山东青岛 266071)

[摘要] 目的:优化盐酸倍他洛尔-蒙脱石脂质体(Mt-BH-LP)的处方及制备工艺,考察其体外释放性能和渗透性能。方法:采用乙醇注入法-硫酸铵梯度法制备Mt-BH-LP;以包封率和载药量为评价指标,采用正交试验优化Mt-BH-LP的处方;通过透析法考察Mt-BH-LP的体外释放性能;以家兔离体角膜为模型,采用体外改良的Franz扩散池法研究Mt-BH-LP的渗透性,以人永生角膜上皮细胞(iHCEC)为模型,研究Mt-BH-LP的渗透性。结果:Mt-BH-LP处方工艺条件为卵磷脂-BH(5:1),卵磷脂-胆固醇(9:1),硫酸铵浓度 $0.15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,卵磷脂质量225 mg。Mt-BH-LP包封率($75.85\pm 2.15\%$),载药量($11.41\pm 0.29\%$),平均粒径($218\pm 22.32\text{ nm}$),Zeta电位($17.03\pm 0.25\text{ mV}$);体外释放试验表明Mt-BH-LP在10 h累计释放度达到60.2%,离体角膜透过试验结果表明Mt-BH-LP的角膜水化值[($76.72\pm 2.68\%$)]在正常范围内。结论:采用乙醇注入法-硫酸铵梯度法制备的Mt-BH-LP包封率和载药量较高,缓释性能良好,具有良好的开发与应用前景。

[关键词] 盐酸倍他洛尔;蒙脱石;脂质体;人永生角膜上皮细胞;包封率;载药量;体外释放;渗透性

[中图分类号] R283.6;R945;R285.5;R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)23-0007-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017230007

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170912.1501.068.html>

[网络出版时间] 2017-09-12 15:01

Preparation and Properties of Montmorillonite-betaxolol Hydrochloride Liposomes

LI Juan¹, HOU Dong-zhi^{1*}, HU Sheng¹, HUANG Yi¹, TIAN Shuang-yan¹, CHEN Yan-zhong¹,
LYU Zhu-fen¹, DUAN Hao-yun², ZHOU Qing-jun²

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery, Guangdong Engineering and Technology Research Center of Topical Precise Drug Delivery System, School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize formulation and preparation technology of montmorillonite-betaxolol hydrochloride liposomes (Mt-BH-LP), and evaluate its *in vitro* release performance and permeability. **Method:** Mt-BH-LP was prepared by ethanol injection combined with ammonium sulfate gradient method. With composite score of encapsulation efficiency and drug loading as index, Orthogonal test was used to optimize the formulation. The *in vitro* release of Mt-BH-LP was detected by dialysis method. With isolated corneas of rabbit as a model, the *in vitro* modified Franz diffusion cell method was used to measure the permeability of Mt-BH-LP. The permeability of Mt-BH-LP was further studied by taking human immortalized corneal epithelial cells (iHCEC) as model. **Result:** Optimum prescription was as following: ammonium sulfate concentration of $0.15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, lecithin quality of 225 mg, lecithin-BH (5:1), lecithin-cholesterol (9:1). Encapsulation efficiency of Mt-BH-LP was ($75.85\pm 2.15\%$), its drug loading, average particle size and Zeta potential were ($11.41\pm 0.29\%$), ($218\pm$

[收稿日期] 20170418(024)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(51102052);广东省医学科学技术研究项目(A2016275)

[第一作者] 李娟,在读硕士,从事药物新剂型和新制剂研究,Tel:15989174890,E-mail:1173889421@qq.com

[通讯作者] *侯冬枝,博士,副教授,从事药物新剂型与新制剂研究,Tel:15915727835,E-mail:houdongzhi@sina.com

22.32) nm and (17.03 ± 0.25) mV, respectively. The cumulative release of Mt-BH-LP was 60.2% in 10 h, the corneal hydration value of Mt-BH-LP was (76.72 ± 2.68)% within the normal range. **Conclusion:** Mt-BH-LP prepared by optimized formulation has high encapsulation efficiency and drug loading, which displays good sustained-release performance, and it has a good development of application prospect.

[**Key words**] betaxolol hydrochloride; montmorillonite; liposomes; human immortalized corneal epithelial cells; entrapment efficiency; drug loading; *in vitro* release; permeability

青光眼是眼球内的压力超过了眼球内部组织,特别是视神经所能承受的限度,而引起视神经萎缩和视野缺损的一种疾病^[1]。因此,降低眼内压可有效延缓病情的恶化。盐酸倍他洛尔(betaxolol hydrochloride, BH)是一种 β_1 受体阻滞剂,可抑制房水产生和加速泪液外排,进而产生降眼压作用,同时其还具备改善眼部供血和保护视神经的作用,临床上常用于治疗高眼压和开角型青光眼^[2-3]。传统的眼部给药方式为局部给药,由于眼球特殊的生理屏障作用,导致药物角膜前滞留时间短、角膜透过性差,生物利用度往往不到 5%^[4-5]。目前, BH 在眼科应用的剂型主要为滴眼剂,与传统的眼部给药方式存在相似的缺点,如因鼻泪管引流而产生的全身不良反应(眼部刺激、心动过缓、炎症反应、头痛等),生物利用度低,药效维持时间短等。因此,非常有必要研究一种新型眼用制剂,以延长药物的角膜前停留时间,减少给药次数和不良反应,提高药物的生物利用度^[6]。

脂质体是类脂质双分子层包裹内水相核形成的微型泡囊,具有无毒性、生物相容性好、无免疫原性等优点^[7]。脂质体作为眼部给药系统时,药物可以被包封于脂质体内部水相中,也可以分散于类脂双分子层中,并且易与生物融合,促进药物对生物膜的穿透性,提高药物滴眼的跨角膜转运效率,在眼部疾病治疗方面应用广泛。另外,局部滴眼脂质体体积较大,不易从泪道排出,增加药物在局部的滞留时间,并通过角膜细胞的吞噬作用进入眼内,也可通过球结膜、巩膜进入眼内,使药物层缓慢释放^[8]。蒙脱石(montmorillonite, Mt)是一种含硅氧四面体亚层和铝氧八面体亚层的黏土矿物材料,而硅氧四面体亚层和铝氧八面体亚层能发生类质同象置换反应,使得蒙脱石结构层带负电荷,在结构层间域形成可交换的阳离子和水分子^[9-10]。这样的结构使得 Mt 具有离子交换性、膨胀性、悬浮性等特性^[11]。本实验以 BH 为模型药物,药物以离子交换方式进入 Mt 层中,采用乙醇注入-硫酸铵梯度法^[12]制备 Mt-BH 脂质体,以改善药物的释放性能并增强其与眼部的

相互作用,进而提高药物眼部生物利用度并减少不良反应。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), RH basic 2 型集热式搅拌(德国 IKA 公司), RCT 安全型磁力搅拌器(德国 IKA 公司), ZD-85A 型气浴恒温振荡器(金坛市宏华仪器厂), DelsaNano 型 Zeta 电位及激光粒度测定仪(美国 Beckman Coulter 仪器公司), BL-220H 型 1/1 万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], UV1800 型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司), PHS-3C 型 pH 计(上海雷磁仪器厂), JY92-II 型超声细胞粉碎仪(上海习仁仪器有限公司), TK-12D 型透皮扩散试验仪(上海锴凯科技贸易有限公司)。

盐酸倍他洛尔(BH, 济南浩化有限公司, 批号 JNHH121101, 纯度 ≥ 99%), 卵磷脂(上海太伟药业有限公司, 纯度 ≥ 72%), 胆固醇(上海阿拉丁试剂有限公司), 十八胺(上海一研生物有限公司, 纯度 ≥ 97%), 青霉素-链霉素溶液(美国 Hyclone 公司), 胎牛血清(美国 Gbico 公司), 氧化型谷胱甘肽(日本 Biosharp 生物科技有限公司), 葡萄糖(天津大茂化学试剂厂), 人永生化角膜上皮细胞(iHCEC)由山东省眼科研究所提供, 水为去离子水, 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

家兔, 体重 2.2 ~ 2.5 kg, 雌雄兼用, 由南方医科大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(粤)2010-0015, 本研究获得广东药科大学实验动物中心伦理委员会批准, 编号 gdpulac2016051。

2 方法与结果

2.1 载药蒙脱石(Mt-BH)的制备^[13] 将 Na-Mt 加入 5% 硫酸溶液中, 于 50 °C 酸化一定时间, 过滤, 用水洗至中性, 80 °C 烘干, 粉碎, 过 200 目筛, 即得酸化蒙脱石(acid-Mt)。取 3 g·L⁻¹ BH 水溶液 100 mL 和 acid-Mt 100 mg, 置于烧杯中混合, 用盐酸将 pH 调至 4, 将混合物置于 50 °C 水浴锅中, 静态吸附 6 h。吸附完成后, 离心(3 000 r·min⁻¹, 30 min), 干燥, 得 Mt-BH。

2.2 Mt-BH-LP的制备与普通BH脂质体(BH-LP)的制备 采用乙醇注入-硫酸铵梯度法制备脂质体。精密称取处方量卵磷脂、胆固醇、十八胺,加入到5 mL乙醇中,于60 ℃溶解,溶解完全后加入Mt-BH 10 mg,于冰水浴中超声10 min,将此混合溶液作为油相。硫酸铵溶液为水相。在60 ℃水浴锅中,保持水相与油相温度相同,将油相用5 mL注射器缓慢注入水相中,持续搅拌以挥发乙醇,待溶液中的乙醇挥发除去完全后,冷却至室温,于生理盐水中透析4 h,加入适量BH到透析后的脂质体中,于50 ℃载药30 min,即得Mt-BH-LP混悬液。BH-LP的制备中,除不加Mt-BH之外,其他处方及操作步骤与Mt-BH-LP的制备一样。

2.3 BH的含量测定

2.3.1 色谱条件 采用Inertsil® ODS-3色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相0.2%三乙胺-乙腈(70:30, pH 3),检测波长275 nm,柱温30 ℃,进样量20 μL,流速1.0 mL·min⁻¹。

2.3.2 标准曲线的制备 分别以生理盐水、人工泪液、谷胱甘肽-碳酸氢钠林格溶液(简称GBR^[14]),由A液和B液组成,其中A液为NaCl 1.24 g, KCl 71.6 mg, NaH₂PO₄·H₂O 20.6 mg和NaHCO₃ 490.8 mg依次溶于100 mL水中。B液为CaCl₂·2H₂O 0.023 g, MgCl₂·5H₂O 31.8 mg,葡萄糖0.18 g和氧化型谷胱甘肽18.4 mg依次溶于100 mL的水中。两者需新鲜配制,使用前等量混合即可)为溶剂,精密配置系列质量浓度的BH溶液,按2.3.1项下色谱条件测定,记录峰面积,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得BH在生理盐水、人工泪液和GBR中的回归方程分别为 $Y = 5.8576X + 8.4996$ ($r = 0.9997$), $Y = 5.4365X - 2.6174$ ($r = 0.9995$), $Y = 5.5919X + 2.6174$ ($r = 0.9995$), 三者的线性范围依次为10 ~ 150, 10 ~ 150, 0.5 ~ 15 mg·L⁻¹。

2.3.3 精密度考察 取高、中、低质量浓度(80, 40, 10 mg·L⁻¹)的BH溶液,于1 d内不同时间各进样6次,连续测定5 d(每天进样1次),按2.3.1项下色谱条件测定,计算日间和日内精密度的RSD均 < 2%,说明仪器精密度良好。

2.4 包封率和载药量的测定 精密量取Mt-BH-LP混悬液5 mL置于透析袋中,扎紧两端,将透析袋置于含介质(生理盐水)50 mL的带塞广口瓶中,置于34 ℃恒温振荡器中,搅拌速度120 r·min⁻¹。待达到透析平衡后(直至游离药物透出完全),取透析袋外

的透析介质,过0.22 μm微孔滤膜,经HPLC测定,通过绘制的BH-生理盐水标准曲线求得透析量,计算包封率和载药量,包封率 = (投药量 - 游离药物)/投药量 × 100%,载药量 = 被包封药物质量/脂质体质量 × 100%。

2.5 Mt-BH-LP的制备工艺考察

2.5.1 脂质体制备方法考察 脂质体的制备方法有乙醇注入法、薄膜分散法、逆向蒸发法、复乳法、硫酸铵梯度法和pH梯度法等。在制备Mt-BH-LP时,考察了以下3种方法:①乙醇注入法。精密称取处方量卵磷脂、胆固醇、十八胺,于60 ℃条件下用无水乙醇充分溶解,分别加入Mt-BH 10 mg和BH适量,此混合溶液为油相;量取适量磷酸盐缓冲液(PBS, pH 4.8)于烧杯作为水相,保持与油相相同的温度;将油相用5 mL注射器缓慢注入水相中,持续搅拌挥发乙醇,待溶液中的乙醇挥发除去完全后,冷却至室温,即得Mt-BH-LP。②薄膜分散法。精密称取处方量卵磷脂、胆固醇及十八胺置于旋蒸瓶中,加入适量三氯甲烷使溶解,在旋转蒸发仪上减压蒸发,去除三氯甲烷,使溶液在瓶壁上形成均匀的薄膜层。另取适量BH和Mt-BH 10 mg,冰水浴超声一段时间,即得Mt-BH-LP。③乙醇注入-硫酸铵梯度法。制备过程同2.2项下方法。以包封率和载药量为指标考察上述3种脂质体制备方法,结果乙醇注入法、薄膜分散法、乙醇注入-硫酸铵梯度法所制Mt-BH-LP的包封率分别为(35.46 ± 1.12)%, (36.16 ± 1.56)%和(72.84 ± 2.31)%,载药量分别为(2.94 ± 0.81)%, (3.01 ± 0.97)%和(6.28 ± 0.56)%,故选择乙醇注入-硫酸铵梯度法。

2.5.2 水相体积对Mt-BH-LP包封率和载药量的影响 采用乙醇注入-硫酸铵梯度法制备Mt-BH-LP,选取固定处方量的卵磷脂、胆固醇、十八胺,并固定其他影响因素,考察水相体积对Mt-BH-LP包封率和载药量的影响,见表1。结果发现水相体积对Mt-BH-LP包封率和载药量几乎无影响。为了易于达到给药质量浓度(2.8 g·L⁻¹),故选择油水体积比1:2。

2.5.3 正交试验 选取对Mt-BH-LP制备影响较显著的4个影响因素作为考察对象,即卵磷脂质量、卵磷脂-胆固醇、卵磷脂与药物的比例及硫酸铵浓度,每个因素选3个水平,按L₉(3⁴)正交表设计试验方案,每次取样3份,每份取Mt-BH-LP 5 mL。以包封率和载药量的综合评分为指标,权重各为0.5。试验安排及结果见表2,方差分析见表3。

表 1 水相体积对 Mt-BH-LP 包封率与载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of aqueous phase volume on entrapment efficiency and drug loading of Mt-BH-LP ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

油水体积比	包封率	载药量
1:2	86.00 ± 2.23	3.78 ± 1.12
1:3	87.93 ± 1.76	3.94 ± 0.68
1:4	83.47 ± 0.29	3.65 ± 0.91
1:5	83.33 ± 0.34	3.74 ± 0.38

表 2 Mt-BH-LP 处方优选的正交试验分析

Table 2 Orthogonal test analysis for optimizing formulation of Mt-BH-LP

No.	A 卵磷脂质量 /mg	B 卵磷脂-胆固醇	C 卵磷脂-药物	D 硫酸铵浓度 /mol·L ⁻¹	包封率 /%	载药量 /%	综合评分 /%
1	75	3:1	5:1	0.15	66.3	13.6	86.8
2	75	6:1	6:1	0.25	79.6	9.7	79.8
3	75	9:1	10:1	0.30	77.6	6.2	65.9
4	150	3:1	6:1	0.30	72.9	8.0	69.9
5	150	6:1	10:1	0.15	90.1	6.8	75.0
6	150	9:1	5:1	0.25	81.7	12.2	90.2
7	225	3:1	10:1	0.25	87.6	5.9	70.3
8	225	6:1	5:1	0.30	75.3	10.9	81.9
9	225	9:1	6:1	0.15	84.1	10.6	85.6

表 3 综合评分的方差分析

Table 3 Variance analysis of composite score

方差来源	SS	F	P
A(误差)	4.70	1.00	
B	37.25	8.00	>0.05
C	379.23	80.99	<0.05
D	160.36	34.25	<0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

由直观分析可知,影响 Mt-BH-LP 综合评分的 4 个因素排序为 $C > D > B > A$, 最佳处方组合为 $A_3B_3C_1D_1$ 。以极差最小的 A 因素为误差项进行方差分析,结果发现因素 C, D 有显著性差异,而因素 B 则无显著性差异,综合考虑,选择最佳处方组合 $A_3B_3C_1D_1$, 即卵磷脂-BH (5:1), 卵磷脂-胆固醇 (9:1), 硫酸铵浓度 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 卵磷脂质量 225 mg。按最优处方制备 3 批 Mt-BH-LP, 结果载药量和包封率分别为 $(11.41 \pm 0.29)\%$ 和 $(75.85 \pm 2.15)\%$ ($n = 3$), RSD 均 $< 3.0\%$, 表明该最优工艺条件重复性好且稳定。

2.6 粒径和 Zeta 电位的测定 取稀释适当倍数后的 Mt-BH-LP 混悬液和 BH-LP 混悬液适量, 测定粒径与 Zeta 电位 ($n = 3$), 结果粒径分别为 (218 ± 22.32) , (166.4 ± 1.89) nm, Zeta 电位依次为 (17.03 ± 0.25) , (19.33 ± 0.41) mV, 多分散系数 (PDI) 分别为 0.191 ± 0.064 , 0.155 ± 0.019 。Mt-

BH-LP 的粒度分布均匀, 但其 PDI 较 BH-LP 混悬液有所增加, 应该是 Mt-BH 的加入影响了 Mt-BH-LP 的粒径与形态。

2.7 体外释放度考察 精密量取 BH 水溶液和 Mt-BH-LP 混悬液各 5 mL (BH 的质量浓度均设定为 $2.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 分别置于透析袋中, 两端绑紧, 置于 100 mL 的人工泪液中, 在 $(34 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$, $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下水浴震荡, 分别在 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8, 10 h 取样品溶液 5 mL, 同时补充等体积的透析介质。样品经 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 使用 HPLC 测定, 计算累计释放度, 绘制体外释放曲线, 见图 1。结果发现 BH 水溶液迅速释放并在 2.5 h 内释放完全, 而 Mt-BH-LP 在 2.5 h 时累计释放量仅 43.7%。Mt-BH-LP 在 10 h 内的累计释放量 60.2%。BH 从 Mt-BH-LP 中释放首先是突释部分, 突释过后是持续缓释阶段。相比于 BH 水溶液, Mt-BH-LP 能够明显降低 BH 的突释现象, 且 Mt-BH-LP 的缓释性能明显高于 BH 水溶液, 说明制备的 Mt-BH-LP 能够降低药物的释放速度, 改善药物的释放性能。这可能是由于 Mt 的特征吸附-解吸附作用与离子交换作用, 以及药物穿过磷脂双分子层需要时间, 从而产生了缓释作用, 延长了 BH 的释放时间, 使 Mt-BH-LP 比 BH 水溶液具有更强的缓释作用。

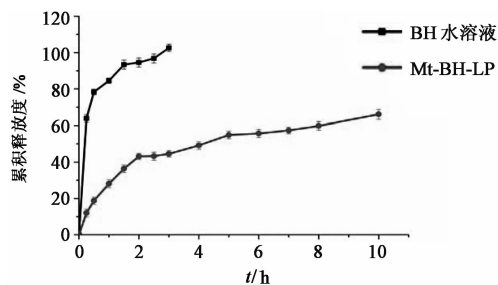


图 1 BH 水溶液和 Mt-BH-LP 的体外释放曲线
Fig. 1 In vitro release curves of betaxolol hydrochloride aqueous solution and Mt-BH-LP

2.8 Mt-BH-LP 渗透性试验

2.8.1 兔体外角膜渗透试验^[15] 使用改进的 Franz 扩散池方法研究 BH 水溶液和 Mt-BH-LP 的角膜渗透性。GBR 溶液冲洗角膜后, 将其固定在 Franz 扩散池中, 角膜固定在供给池与接收池之间, 其中供给池与角膜的上皮细胞接触。将每个样品 0.5 mL 和新鲜配置的 GBR 溶液 5.0 mL 分别加入到供给池和吸收池中。搅拌速率和温度分别为 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $34 \text{ }^\circ\text{C}$ 。分别在 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 h 从接收池取样, 每次取样 0.5 mL, 并同时补加 GBR 溶液 0.5 mL 到接收池中。样品过 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤

膜,采用 HPLC 测定,计算单位面积累计扩散量 (Q_n)。在试验完成后,将角膜在 90 °C 下干燥 12 h,记录干燥前与干燥后的质量,测定角膜中剩余的药量,计算表观渗透系数 (P_{app}) 和角膜水化值 (HL),结果见表 4。

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

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} / (A \times C_0 \times 60)$$

表 4 BH 水溶液和 Mt-BH-LP 的角膜透过参数

Table 4 Corneal permeability parameters of betaxolol hydrochloride aqueous solution and Mt-BH-LP

样品	回归方程	r	$Q_{6h}/\mu\text{g}$	HL/%	$P_{app}/\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$
BH 水溶液	$Q = 1.638t - 43.98$	0.999 1	545.68	85.69 ± 1.45	0.975×10^{-5}
Mt-BH-LP	$Q = 0.122t - 2.163$	0.989 9	41.76	76.72 ± 2.68	0.073×10^{-5}

由表 4 可知,BH 水溶液的 Q_{6h} 显著高于 Mt-BH-LP,同时 BH 的 HL 也高于 Mt-BH-LP。角膜内 BH 浓度急剧增加易导致眼内压骤降和强毒副作用,而 Mt-BH-LP 中的药物的缓慢释放,有利于产生持续降眼压作用,能够有效地降低毒副作用。Mt-BH-LP 的 P_{app} 显著低于 BH 水溶液;BH 水溶液和 Mt-BH-LP 在角膜中所剩余的药量分别为 31.47,95.29 μg ,BH 水溶液在角膜内药物残留量大约为 Mt-BH-LP 的 1/3,随着时间的推移,角膜上残留的药物会逐渐释放,透过量会持续增加,延长作用效果。这可能与 Mt-BH-LP 药物释放机制有关,游离药物迅速透过角膜达到一定的药理作用,而脂质体在眼部的作用是通过脂质体内部的 BH 释放,Mt-BH 表面自由吸附的 BH 释放和 Mt-BH 内部 BH 的释放,这些途径的延长导致了 Mt-BH-LP 在角膜内残留的药物偏高以及药物的缓慢释放。

2.8.2 细胞渗透性试验 在使用动物离体角膜进行体外药物研究时,角膜离体之后活性降低且与人角膜存在种属差异^[16]。与动物离体角膜相比,iHCEC 具有重复性高、物种差异引起的问题减少等特点^[17]。以 10% 胎牛血清和 0.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 双抗(链霉素与青霉素)的 DMEM/F-12 为细胞培养液。在 5% CO_2 的水饱和湿度,37 °C 细胞培养箱中培养 iHCEC,培养 5~6 d 后即可进行传代。当细胞长至复层结构时可用于药物的角膜渗透研究。角膜上皮细胞的上层为供给池,下层为接收池。供给池加入样品 0.5 mL,接收池加入 GBR 溶液 1.5 mL,将 Transwell 培养板置于 34 °C 空气浴恒温振荡器中,分别在 30,60,90,120,180,240 min 时从接收池中取样 200 μL 并加入同体积的新鲜模拟泪液,采用 HPLC 测定,计算角膜累积透过量,细胞渗透曲线见图 2。

$$HL = (W_0 - W_1) / W_0$$

式中 C_i 和 C_n 分别是在 n 时间间隔的最初的药物浓度和最后的药物浓度, V_0 为接收池中溶液的体积, V 为样品的体积, $\frac{\Delta Q}{\Delta t}$ 为 Q_n 对时间 t 的曲线的斜率, A 为有效扩散面积(0.7 cm^2), C_0 为给药初始浓度, W_0 为角膜干燥前的质量, W_1 为角膜干燥后的质量。

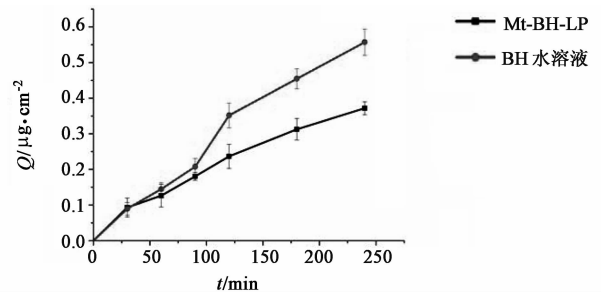


图 2 BH 水溶液和 Mt-BH-LP 在 iHCEC 中的渗透曲线

Fig. 2 Permeability curves of betaxolol hydrochloride aqueous solution and Mt-BH-LP in iHCEC

Mt-BH-LP 的细胞渗透系数与药物透过量分别为 $0.765 \times 10^{-5} \mu\text{g}\cdot\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 和 1.32 μg ,低于 BH 水溶液的细胞渗透系数($1.214 \times 10^{-5} \mu\text{g}\cdot\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$)与药物透过量(1.81 μg),这可能是由于 BH 水溶液为溶液剂,可以快速释放完全;Mt-BH-LP 为缓释制剂,具有明显的缓释性能,且药物释放需要从骨架中通过扩散释放出来,因此 Mt-BH-LP 细胞渗透系数与药物透过量相对 BH 水溶液较低。细胞渗透性试验的结果进一步表明了 Mt-BH-LP 具有很好的缓释性能。

3 讨论

硫酸铵梯度法是一种主动载药法,利用硫酸铵水溶液为脂质体的内水相,缓冲溶液为外水相,在磷脂双分子层两侧产生硫酸铵的浓度梯度。外水相中的弱碱性药物分子通过磷脂双分子层进入内水相后,与 SO_4^{2-} 形成硫酸盐,因磷酸盐难以跨越双分子层,不能再返回外水相而滞留在脂质体内水相。这样,外水相中的弱碱性分子持续不断地进入内水相,而使药物具有很高的包封率^[18]。倍他洛尔为弱碱性化合物,分子状态具有亲脂性,易于穿过磷脂双分子膜。因此,采用乙醇注入-硫酸铵梯度法制备新型

眼部给药系统 Mt-BH-LP, 具有操作简单、重复性好、载药迅速、包封率高的特点, 并且粒径及其稳定性均达到要求。

由于 BH 在 Mt-BH-LP 中的运输时间和吸附作用, 很大程度上增加了药物 BH 的缓释能力, 使 Mt-BH-LP 中的 BH 释放时间达到了 10 h, 累计释放度达到了 60.2%。在渗透性试验中, 脂质体与角膜细胞作用的机制主要有脂质交换、稳定吸附、胞吞和融合。基于角膜的特性, 脂质体与角膜细胞作用可能有某种程度的融合, 但主要的机制可能是吸附和表面脂质交换^[19]。采用 Franz-离体角膜和 iHCEC 进行渗透性研究时, 两者的结果都显示 BH 水溶液的渗透性大于 Mt-BH-LP, 但在离体角膜透过试验中, 测得的 Mt-BH-LP 在离体角膜剩余药量是 BH 水溶液在离体角膜剩余药量的 3 倍。说明 Mt-BH-LP 能一定程度上提高药物在角膜前停留时间, 可使药物进行缓慢释放, 有利于产生持续的降眼压作用。虽然 BH 水溶液在 6 h 的累积透过量高于 Mt-BH-LP, 但 BH 水溶液的 HL 也高于 Mt-BH-LP。研究报告正常角膜的水化值处于 76% ~ 80%, HL > 83% 即可判定角膜受到了一定程度的损伤, 说明 BH 水溶液对角膜有一定的刺激性^[20]。而 Mt-BH-LP 的角膜水化值在正常范围内, 说明其对角膜没有明显的刺激性。因此, 相比于 BH 水溶液, 新制备的 Mt-BH-LP 在眼部滞留时间、缓释性能都有很大程度的提高, 并且能有效减低药物的毒副作用。

体外渗透性研究有一定的局限性, 在实验过程中, 供给池中长时间保持了一定量的药物, 这在活体内是不可能保持的^[21]。离体角膜及 iHCEC 渗透试验只能研究 BH 水溶液和 Mt-BH-LP 的大致渗透趋势, 还需通过进一步的体内试验研究 Mt-BH-LP 的渗透机制, 并提高 Mt-BH-LP 的渗透量。

[参考文献]

[1] 刘冠禹, 杨炜. 青光眼视神经损伤发病机制的研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(8): 1223-1226.
[2] Osborne N N, Ugarte M, CHAO M, et al. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma [J]. Surv Ophthalmol, 1999, 43(1): 102-128.
[3] 孙兴怀. 青光眼局部降眼压药及其合理应用(上) [J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2004, 4(4): 205-208.
[4] 胡晟, 侯冬枝, 潘育方, 等. 盐酸倍他洛尔-蒙脱石离子交换微球混悬剂的制备及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(19): 14-18.
[5] HOU D Z, HU S, HUANG Y, et al. Preparation and *in vitro* study of lipid nanoparticles encapsulating drug loaded montmorillonite for ocular delivery[J]. Appl Clay Sci, 2016, 119(10): 277-283.

[6] Rupenthal I D, Green C R, Alany R G. Comparison of ion-activated *in situ* gelling systems for ocular drug delivery. Part I: physicochemical characterisation and *in vitro* release [J]. Int J Pharm, 2011, 411(1/2): 69-77.
[7] Lajunen T, Hisazumi K, Kanazawa T, et al. Topical drug delivery to retinal pigment epithelium with microfluidizer produced small liposomes [J]. Eur J Pharm Sci, 2014, 62(4): 23-32.
[8] 吴建国, 周和政. 脂质体在青光眼治疗中的应用进展 [J]. 医药导报, 2006, 25(9): 936-939.
[9] HUANG Y, TAO Q, HOU D Z, et al. A novel ion-exchange carrier based upon liposome-encapsulated montmorillonite for ophthalmic delivery of betaxolol hydrochloride [J]. Int J Nanomedicine, 2017, doi: 10.2147/IJN.S122747.
[10] 田双艳, 侯冬枝, 桂茹艺, 等. 载药蒙脱石壳聚糖纳米粒的制备及其生物学性能评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 12-16.
[11] Koeleman H A, Zyl R V, Steyn N, et al. Influence of montmorillonite on the dissolution and bioavailability of phenytoin [J]. Drug Dev Ind Pharm, 1990, 16(5): 795-805.
[12] CHEN J, LIN A, CHEN Z, et al. Ammonium sulfate gradient loading of brucine into liposomes: effect of phospholipid composition on entrapment efficiency and physicochemical properties *in vitro* [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2010, 36(3): 245-253.
[13] 侯冬枝, 刘莉, 桂茹艺, 等. 马来酸噻吗洛尔缓释微球的制备方法: 中国, CN2013106978278 [P]. 2014-04-23.
[14] Rojanasakul Y, Robinson J R. Transport mechanisms of the cornea: characterization of barrier permselectivity [J]. Int J Pharm, 1989, 55(2): 237-246.
[15] 卢荣枝, 唐干益, 宫琦. 阿昔洛韦眼用凝胶在兔离体角膜中的渗透释药行为研究 [J]. 中国药房, 2006, 17(4): 258-259.
[16] 姚晨, 孙考祥, 梁娜. 角膜上皮细胞培养模型及其在眼部药物研究中的应用进展 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(23): 2147-2151.
[17] Offord E A, Sharif N A, Macé K, et al. Immortalized human corneal epithelial cells for ocular toxicity and inflammation studies [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(6): 1091-1101.
[18] 吴国友, 张珺, 李艳红, 等. 硫酸铵梯度法制备莫西沙星脂质体的工艺研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(6): 855-860.
[19] Carvalho E L, De I F M, Seijo R B. Liposomes as ocular drug delivery systems [J]. Arch Soc Esp Oftalmol, 2004, 79(4): 151-152.
[20] Saettone M F, Chetoni P, Cerbai R, et al. Evaluation of ocular permeation enhancers: *in vitro* effect on corneal transport of four β -blockers, and *in vitro/in vivo* toxic activity [J]. Int J Pharm, 1996, 142(1): 103-113.
[21] 张慧慧, 聂淑芳, 李想, 等. 马来酸噻吗洛尔眼用脂质体的研制及其离体角膜透过试验 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(16): 1556-1559.

[责任编辑 刘德文]