

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1705.R.20130613.1627.013.html>

doi:10.3969/j.issn.1674-2257.2013.03.010

• 论 著 •

硝酸毛果芸香碱眼用液晶纳米粒的研究

李菁¹, 吴卫军¹, 辛洪亮¹, 吴萌萌², 吴琳¹, 王中元¹, 王宝彦¹, 徐群为^{1*}

(1. 南京医科大学药学院, 南京 210029; 2. 南京市口腔医院药学部, 南京 210008)

【摘要】 目的 制备硝酸毛果芸香碱纳米液晶制剂, 以包封率(EE)和粒径为考察指标对方剂进行单因素考察, 然后以正交设计对方剂进行筛选。方法 处方前研究硝酸毛果芸香碱的平衡溶解度、油水分配系数, 为剂型设计提供理论依据; 选择高压均质法制备硝酸毛果芸香碱液晶纳米粒; 以 EE 和粒径为考察指标对方剂进行单因素考察, 然后以正交设计对方剂进行筛选。结果 药物在水中易溶, 溶解度约为 146.87 mg/mL, 油水分配系数 $\log P$ 约为 -0.278。本研究通过单因素考察了单油酸甘油酯(GMO)/水的比例、搅拌速度、滴加速度、均质压力和均质次数。综合考虑最大 EE 和粒径, 选用的最佳处方工艺为: GMO: 泊洛沙姆 407: 水 = 2: 0.22: 20, 搅拌速度为 1 000 r/min, 均质压力为 350 bar, 均质次数为 3 次。结论 硝酸毛果芸香碱液晶纳米粒制备工艺简单, 稳定性好, 具有临床应用价值。

【关键词】 硝酸毛果芸香碱; 纳米液晶; 单油酸甘油酯; 高压均质法; 单因素考察

【中图分类号】 R914.2; R988.1 **【文献标志码】** A

Research on Liquid Crystal Nanoparticles Loaded with Pilocarpine Nitrate for Effective Ocular Drug Delivery LI Jing¹, WU Wei-jun¹, XIN Hong-liang¹, WU Meng-meng², WU Lin¹, WANG Zhong-yuan¹, WANG Bao-yan¹, XU Qun-wei^{1*} (1. College of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2. Pharmaceutical Department, Nanjing Stomatological Hospital, Nanjing 210008, China)

【Abstract】 **Objective** To prepare liquid crystal nanoparticles loaded with pilocarpine nitrate (PN-LCNPs) for effective ocular drug delivery. Indexes of the optimal formulation of entrapment efficiency and particle size were obtained by single factor evaluation. **Methods** Based on the investigation on solubility and partition coefficients of pilocarpine, PN-LCNPs was prepared by the method of high-pressure homogenization. The optimal formulation of entrapment efficiency and particle size was obtained by single factor evaluation. **Results** PN was soluble in water, about 146.87 mg/mL. the partition coefficient of PN in octanol/water system was about -0.278. Optimal formulation of PN-LCNPs was as follows: the mixture of GMO, F127 was heated to 37 °C and dissolved in water under stirring at 1 000 rpm (GMO: F127: water = 2: 0.22: 20). The resulting dispersion was extruded through high-pressure homogenizer by three cycles at 350 bars to form an opalescent dispersion. **Conclusion** The preparation of PN-LCNPs is simple, however, had a good stability, so it has good prospects for clinical application.

【Key words】 Pilocarpine nitrate; Liquid crystal nanoparticle; Glycerol monooleate; High-pressure homogenization; Single factor evaluation

角膜的上皮细胞层和内皮细胞层是水溶性药物的主要屏障, 它往往限制了许多药物在眼组织发挥药效。因此, 亲水性药物比亲脂性药物更难透过角膜上皮进入眼组织内部并达到有效的治疗浓度。硝

酸毛果芸香碱(PN)作为缩瞳剂用于治疗开角型青光眼、慢性和急性闭角型青光眼已 100 多年。目前, 硝酸毛果芸香碱临床上的常用剂型是硝酸毛果芸香碱滴眼液, 局部给药之后很难透过角膜上皮细胞进入眼球, 它还存在其他的局限性, 如容易被泪液清除、角膜滞留时间短等, 这些都会导致较低的眼部生物利用度。因此, 在治疗过程中需要频繁给药, 这将

基金编号: 中国高校医学期刊临床专项资金项目(NO:11321062)

通讯作者: 徐群为, E-mail: qwx@163.com

引起一些治疗外的不良反应如近视和瞳孔缩小等。纳米液晶(LCNPs)在口服给药^[1]、静脉注射给药^[2]、透皮给药^[3]方面已有报道。为了增加角膜渗透性,提高药物在眼表的滞留时间并延长药物的药理学活性,本研究将硝酸毛果芸香碱包裹于液晶中,制成硝酸毛果芸香碱液晶纳米粒,并对制剂工艺进行优化。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

单油酸甘油酯(GMO)(阿拉丁化学品试剂有限公司);泊洛沙姆 407(F127)(德国 BASF);公司硝酸毛果芸香碱($\geq 99\%$,广东利玮医药有限公司);其他试剂(甲醇、无水醋酸钠、醋酸)均为分析纯;水为去离子水。

1.2 仪器

PHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂);高效液相色谱仪(日本岛津公司);KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TMC L A S S I C 超纯水机(德国 P A L L 公司);NanoGenizer 高压

均质机(苏州微流纳米生物技术有限公司)

1.3 方法

1.3.1 油水分配系数的测定 精密称取 PN 约 800 mg 至 10 mL 的量瓶中,用正辛醇饱和的水完全溶解,定容,移取 5 mL 至具塞试管中,加入被水饱和的正辛醇 5 mL,制得水-正辛醇(1:1)的分配液。涡旋 30 min 之后,以 4 000 r/min 转速离心 20 min,移取水层 20 μ L 至 50 mL 量瓶,用正辛醇饱和的水定容至刻度,在 215 nm 波长处测定吸收度,代入标准曲线中得到水相中药物浓度,用公式 $P = (C - C_w)/C_w$ 计算表观油水分配系数。同法操作 3 次,取平均值。

1.3.2 硝酸毛果芸香碱平衡溶解度的测定 1)硝酸毛果芸香碱在水中的溶解度:精密称取过量硝酸毛果芸香碱原料药,各置离心管中,加入水 5 mL,密封,避光,涡旋混匀,于 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、150 r/min 恒温水浴锅中机械震荡 72 h。达到平衡之后,于离心机中 4 000 r/min 离心 10 min,取部分上清液用 0.45 μ m 的微孔滤膜保温过滤,取续滤液,用水稀释至适当比例定容,以高效液相色谱法测定药物浓度,求算硝酸毛果芸香碱的表观溶解度。同法操作 3 次,取平均值。2)硝酸毛果芸香碱在 GMO 中的溶解度:由于 GMO 在 35 $^\circ\text{C}$ 时熔融而成的油状液体粘度较大,在高速离心的条件下也不能将溶解的硝酸毛果

芸香碱和未溶的药物分离开来,所以采用逐次递加法测定原料药物在 GMO 中的溶解度。精密称取硝酸毛果芸香碱 0.01 mg,加 5 g 于 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 熔融的 GMO 中,磁力搅拌 24 h,定时检查溶解状况。若溶解,体系呈现透明油状,每次加入 0.01 mg,若不溶,继续搅拌 24 h,如果仍未溶解,计算硝酸毛果芸香碱的累积加入量。同法操作 3 次,取平均值,求得 GMO 中的平衡溶解度。

1.3.3 硝酸毛果芸香碱纳米液晶(PN-LCNPs)的制备 纳米液晶采用高压均质法^[4],分别称取一定量的 GMO 和 F127,熔融混匀后,缓慢逐滴加入到含药的水溶液中,在一定压力下高压均质后冷却至室温。随后,加入适量甘油调节渗透压至生理等渗,用 0.1 mol/L NaOH 溶液,调节 pH 至 6~8,即得成品。

1.3.4 PN-LCNPs 的优化 1)单因素考察:以纳米粒的粒径和包封率(EE)为评价指标对纳米粒进行了单因素考察,考察了 GMO/水比例(2/20、1.5/20、1/20、0.5/20、0.25/20)、搅拌速度(500、750、1 000、1 250、1 500 r/min)、滴加速度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/min)、均质压力(150、250、350、450、550 bar)和均质次数(1、2、3、4、5 次)。2)正交设计^[5]:根据单因素考察的结果,采用 4 因素 3 水平进行正交设计,以 GMO 的量(A)、F127 的量(B)、水量(C)、均质压力(D)为因素,以 EE 作为评价指标,通过正交设计助手 II V3.1 软件,进行处方考察并测定 EE(见表 1)。

表 1 因素水平表

因素	A GMO/mg	B F127 /mg	C 水/mL	D 均质压力/bar
水平 1	2.00	0.22	30.00	150
水平 2	1.00	0.11	25.00	350
水平 3	0.50	0.02	20.00	550

2 结果

2.1 油水分配系数的测定^[6]

本实验采用高效液相色谱法测得硝酸毛果芸香碱的油水分配系数 $\text{Log}P$ 为 -0.278,表明药物亲水性好,脂溶性差,可以预测药物在脂溶性的眼表黏膜中渗透性不高,需要适合的给药系统改善硝酸毛果芸香碱的角膜渗透能力。

2.2 硝酸毛果芸香碱平衡溶解度的测定

在生理温度下(37 $^\circ\text{C}$)硝酸毛果芸香碱在水中

易溶,而在 GMO 中的溶解性度 $<1 \text{ mg/mL}$ (见表 2)。

表 2 硝酸毛果芸香碱的平衡溶解度($n=3$)

制剂	溶解度/(mg/mL)	RSD/%
水	146.870 ± 0.200	1.530
GMO	0.116 ± 0.355	0.013

2.3 单因素考察

2.3.1 GMO/水比例的选择 随着 GMO 浓度的降低,EE 显著降低,粒径在 $202 \sim 183 \text{ nm}$ 内也呈现下降趋势。GMO 高浓度时 EE 也比较高,这可能是由于高浓度的 GMO 形成更多的液晶颗粒,使得更多的药物包载其中。综合考虑包封率,兼顾粒径因素,最终选择较高浓度的 GMO 即 2/20 作为 GMO/水的比例(见图 1)。

2.3.2 搅拌速度的选择 随搅拌速度的提高,粒径略有减小,以 EE 为指标,兼顾粒径因素,最终选择 1000 r/min 作为搅拌速度(见图 2)。

2.3.3 滴加速度的选择 滴加速度对粒径的影响并不明显,滴加速度在 0.4 g/min 时 EE 较高,综合考虑滴加速度为 0.4 g/min (见图 3)。

2.3.4 均质压力的选择 随着均质压力增大到 350 bar 以上时,粒径有减小的趋势,EE 在 350 bar 时最大,均质压力对 EE 并没有造成明显趋势,因此选择均质压力为 350 bar (见图 4)。

2.3.5 均质次数的选择 均质次数为 2 次以上时,粒径有一定的减小趋势,均质次数对 EE 影响并不明显。综合考虑,选择均质次数为 3 次(见图 5)。

2.4 处方优化

根据极差分析和方差分析可知,影响 PN-LCNPs EE 的 4 个因素的主次顺序为 $A > C > B > D$,其中 A 因素具有显著性意义($P < 0.05$),即 GMO 的浓度主要影响因素;F127 的量和水量是 2 个次要因素;通过综合考虑确定为:GMO 为 2 g ,F127 为 0.22 g ,水量为 20 mL 。

本研究根据单因素考察和正交设计的结果选择制备硝酸毛果芸香碱液晶纳米粒的工艺为:取 2.0 g GMO、 0.22 g F127 置 37°C 水浴中保存,以 0.4 g/min 的速度滴入以 1000 r/min 速度搅拌的含药的水溶液中,持续搅拌 30 min ,恢复到室温, 350 bar 的高压均质 3 次得到均一的乳白色纳米粒。按照上述处方制备 3 批 PN-LCNPs,测得 EE 为 $(61.36 \pm 0.$

$82)\%$,载药量为 $(3.38 \pm 0.45)\%$,粒径为 $(198.8 \pm 5.4) \text{ nm}$ (见表 3、表 4)。

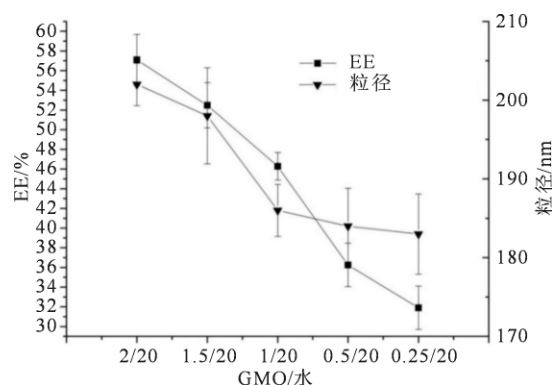


图 1 GMO 浓度的影响

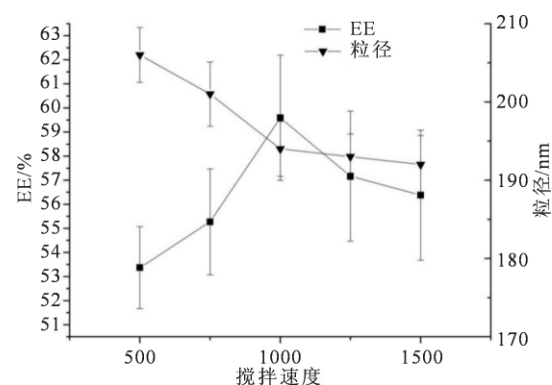


图 2 搅拌速度的影响

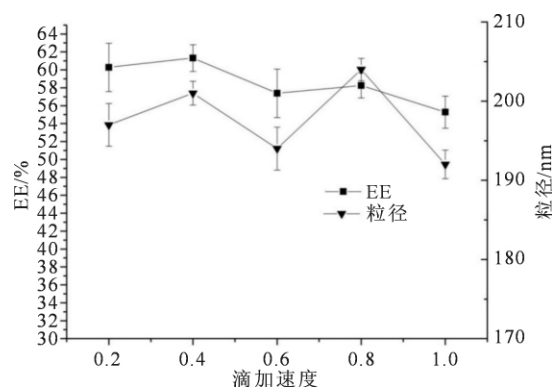


图 3 滴加速度的影响

3 讨论

青光眼是导致不可逆性失明最常见的原因,2020 年预计全世界青光眼患者有 8 千万人^[7]。临床常用抗青光眼药硝酸毛果芸香碱滴眼液与眼表的接触时间较短,为了维持有效药物浓度,需要增加滴眼频次,但同时药物的不良反应增加,还带来患者顺

表 3 正交设计结果

实验次序	GMO/g	F127/g	水/mL	均质压力/bar	EE/%
1	2.0	0.22	30	150	46.37
2	2.0	0.11	25	350	52.31
3	2.0	0.01	20	550	62.19
4	1.0	0.22	25	550	34.36
5	1.0	0.11	20	150	38.71
6	1.0	0.01	30	350	32.67
7	0.5	0.22	20	350	29.47
8	0.5	0.11	30	550	11.67
9	0.5	0.01	25	150	19.11
K1	53.623	34.733	28.237	34.730	-
K2	35.247	32.230	35.260	36.150	-
K3	16.083	37.990	41.457	34.073	-
Rj	37.540	5.760	13.220	2.077	-

表 4 方差分析

因素	SS	f	F	P
A	1 895.373	2	3.587	<0.05
B	24.997	2	0.047	>0.05
C	189.521	2	0.359	>0.05
D	441.267	2	0.007	>0.05
误差	2 113.72	8	-	-

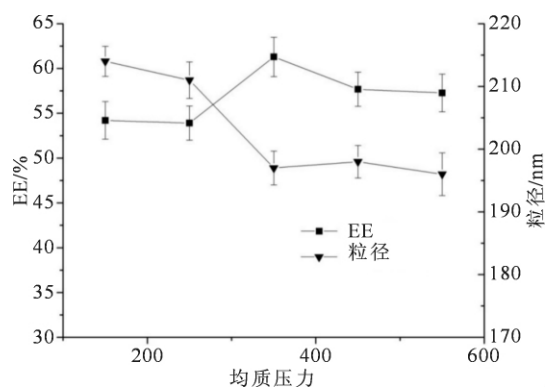


图 4 均质压力的影响

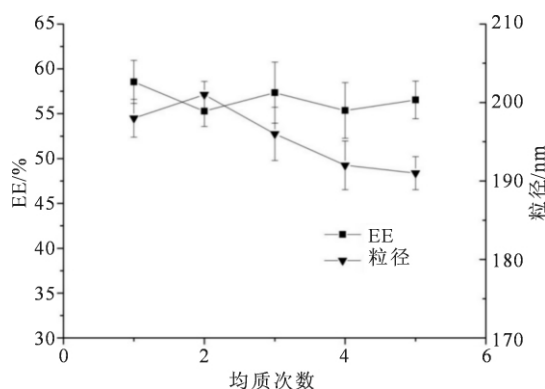


图 5 均质次数的影响

应性的问题。本研究将硝酸毛果芸香碱包裹于液晶中,制成硝酸毛果芸香碱液晶纳米粒,并对制剂工艺进行优化。

眼表黏膜层(如角膜、结膜)对于亲水性药物来说是药物吸收的主要屏障^[8]。提高眼用制剂眼部生物利用度的主要途径有:增加药物在眼表黏膜层中的渗透力和延长药物眼表滞留时间。纳米液晶是两亲性材料单油酸甘油酯在水溶液中自发形成的具有不同三维结构的体系,它具有一定粘度,可以帮助延长药物的眼表滞留时间,有报道^[9]指出,它还具有一定促进透皮渗透的作用。在处方前研究中显示硝酸毛果芸香碱在水中易溶,而在 GMO 中的溶解性差。然而溶解于油相中的药物由于脂溶性增加易于透过脂溶性的眼表黏膜而被吸收,故需要经过处方优化制得药物 EE 高、稳定性好的液晶纳米粒。本文选用正辛醇-水体系测定了硝酸毛果芸香碱的油/水分配系数。药物滴入眼睛后需转运通过角膜和结膜达到房水,如果药物具有很高的油/水分配系数,则易于进入角膜,但不能继续转运;如果油/水分配系数很低,则不易穿透生物膜。因硝酸毛果芸香碱药物的亲水性好,脂溶性差,油水分分配系数很低,可以预测药物在脂溶性的眼表黏膜中渗透性差,因此找到适合的递药系统以提高药物眼表黏膜渗透性有显著性意义。

本文借助制剂学手段将硝酸毛果芸香碱这个水溶性药物包裹在纳米液晶中,做了单因素考察,并在其基础上进行正交设计以提高药物的 EE,减少药物泄漏,改善了 PN 的脂溶性,进一步提高硝酸毛果芸香碱在角膜层中的渗透性,且滞留在角膜结膜囊内的液晶可作为药物储库,持续释放药物,起到一定的缓释作用;另外,因为液晶的生物粘附性,给药后能黏附于眼表黏膜层,降低眼部清除率,延长药物在眼表滞留时间,降低全身毒副作用。

参考文献

- [1] Um JY, Chung H, Kim KS, *et al.* In vitro cellular interaction and absorption of dispersed cubic particles[J]. Int J Pharm, 2003, 253(1-2): 71-80.
- [2] Leesajakul W, Nakano M, Taniguchi A, *et al.* Interaction of cubosomes with plasma components resulting in the destabilization of cubosomes in plasma[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2004, 34(4): 253-258.
- [3] Esposito E, Cortesi R, Drechsler M, *et al.* Cubosome dispersions as delivery systems for percutaneous administration of indomethacin[J]. Pharm Res, 2005, 22(12): 2163-2173.

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1705.R.20130605.1039.001.html>

doi:10.3969/j.issn.1674-2257.2013.03.011

· 论 著 ·

钩端螺旋体病患者血清 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-2 的检测及分析

王贵霞, 曾跃*, 张廷君, 林家福, 孟黄花

(川北医学院附属医院感染科, 南充 637000)

【摘要】 目的 检测 49 例流感伤寒型、黄疸出血型、肺出血型钩端螺旋体病(钩体病)患者 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-2 的水平, 分析这些细胞因子在钩体病发生发展中的作用。方法 采用 ELISA 法检测钩体病患者血清 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-2 的水平, 统计分析 3 种类型钩体病患者以及健康对照组血清中 3 种细胞因子水平的差异性。结果 钩体病患者血清 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 水平均显著高于对照组($P<0.01$); 钩体病 3 种临床类型相比, 肺出血型患者血清 $\text{TNF-}\alpha$ 水平显著高于流感伤寒型及黄疸出血型($P<0.05$); IL-6 在黄疸出血型、肺出血型患者血清中的水平也明显高于流感伤寒型($P<0.01$); 钩体病患者血清 IL-2 水平与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 钩体病患者血清中 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 水平明显增高, 可能与钩体病发生发展及器官损伤有关。

【关键词】 钩端螺旋体病; ELISA; $\text{TNF-}\alpha$; IL-6; IL-2; 血清**【中图分类号】** R514.4 **【文献标志码】** A

Detection of $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-2 in the Serum of Patients with Leptospirosis WANG Gui-xia, ZENG Yue*, ZHANG Ting-jun, LIN Jia-fu, MENG Huang-hua (Department of Infection, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

【Abstract】 **Objective** To detect the levels of $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 and IL-2 in the serum of 49 patients with Flu typhoid, Weil's syndrome and PDH of leptospirosis, and to explore the role of the three cytokines in the leptospirosis development. **Methods** The levels of $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 and IL-2 were detected using ELISA. The differences of the three cytokines among the Flu typhoid, Weil's syndrome, PDH and healthy control were analyzed. **Results** The patients with leptospirosis have significant higher expressions levels of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6 than healthy control($P<0.01$). The level of $\text{TNF-}\alpha$ of patients with PDH was dramatically increased (16.2 ± 6.4) pg/mL compared with Flu typhoid and Weil's syndrome patients ($P<0.05$); and the levels of IL-6 of both Weil's syndrome and PDH patients increased significantly (138.9 ± 40.4 and 202.3 ± 73.3) pg/mL than Flu typhoid ones ($P<0.01$). There was no difference in the levels of IL-2 between the patients with leptospirosis and healthy control ($P>0.05$). **Conclusions** Levels of $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 in serum of patients with leptospirosis were increased, which may be related to the occurrence and development of leptospirosis and organ injury.

【Key words】 Leptospirosis; ELISA; $\text{TNF-}\alpha$; IL-6; IL-2; Serum

通讯作者: 曾跃, E-mail: 260684196@qq.com

- [4] Gan L, Han S, Shen J, *et al.* Self-assembled liquid crystalline nanoparticles as a novel ophthalmic delivery system for dexamethasone: Improving precorneal retention and ocular bioavailability[J]. Int J Pharm, 2010, 396(1-2): 179-187.
- [5] 田春雨, 薄海美, 喇孝瑾, 等. 正交设计法优选双益降糖方中葛根素的提取工艺[J]. 河北联合大学学报: 医学版, 2013, 15(2): 158-159.
- [6] 张立军, 潘岳峰, 张多婷. 高效液相色谱法测定去氧氟尿苷在不同介质中的平衡溶解度和表观油水分配系数[J]. 中南药学, 2009, 7(12): 923-926.
- [7] Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020[J]. Br J Ophthalmol, 2006, 90(3): 262-267.
- [8] de la Fuente M, Raviña M, Paolicelli P, *et al.* Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62(1): 100-117.
- [9] Saino V, Monti D, Burgalassi S, *et al.* Optimization of skin permeation and distribution of ibuprofen by using nanostructures (coagels) based on alkyl vitamin C derivatives[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2010, 76(3): 443-449.
- (2013-02-10 收稿, 2013-03-16 修回)