

壳聚糖包覆的硝酸毛果芸香碱眼用亚微乳的研究

危 军, 何泓良, 郑春丽, 朱家璧*

(中国药科大学药物制剂研究所, 江苏 南京 210009)

摘要: 本文设计了一种壳聚糖包覆的硝酸毛果芸香碱眼用亚微乳 (chitosan-coated pilocarpine nitrate submicro emulsion, CS-PN/SE), 旨在开发一种新型的具有黏膜黏附性的亚微乳眼部给药系统, 以延长药物在眼表滞留时间, 促进药物的眼部吸收。以中长链甘油三酯 (medium chain triglycerides, MCT) 为油相, Tween 80 为主乳化剂, 采用高速剪切工艺制备硝酸毛果芸香碱亚微乳 (pilocarpine nitrate submicro emulsion, PN/SE), 进一步采用孵育法制备 CS-PN/SE, 并利用星点设计-效应面优化法进行处方优化。对其粒径、zeta 电位、包封率和微观形态进行表征, 以新西兰白兔为动物模型, 评价了 CS-PN/SE 在兔眼表滞留特性以及缩瞳作用。眼表滞留特性评价结果显示, 与硝酸毛果芸香碱溶液剂组 (pilocarpine nitrate solution, PNs) 和 PN/SE 组相比, CS-PN/SE 组在眼表的清除率下降, $K_{CS-PN/SE}$ 为 $(0.0064 \pm 0.0003) \text{ min}^{-1}$, 平均驻留时间 (mean residence time, MRT) 延长, 为 155.4 min ($P < 0.05$)。缩瞳药效学结果显示, CS-PN/SE 组的最大缩瞳率为 46.3%, 缩瞳作用时间长达 480 min, 较 PNs 组和 PN/SE 组分别延长了 255 min 和 105 min, 缩瞳率-时间曲线下面积 AUC 提高为 PNs 组和 PN/SE 组的 1.6 倍和 1.2 倍 ($P < 0.05$)。上述结果表明 CS-PN/SE 可显著延长药物在眼表滞留时间, 增加药物在眼表黏膜层中的渗透力, 从而延长缩瞳作用时间, 提高药物的眼部生物利用度, 实现减少给药频次的目的。

关键词: 硝酸毛果芸香碱; 壳聚糖; 黏膜黏附性; 眼表滞留特性; 缩瞳作用

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 08-0990-07

Chitosan-coated ophthalmic submicro emulsion for pilocarpine nitrate

WEI Jun, HE Hong-liang, ZHENG Chun-li, ZHU Jia-bi*

(Pharmaceutical Research Institute, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: The study is to design chitosan-coated pilocarpine nitrate submicro emulsion (CS-PN/SE) for the development of a novel mucoadhesive submicro emulsion, aiming to prolong the precorneal retention time and improve the ocular absorption. CS-PN/SE was fabricated in two steps: firstly, pilocarpine nitrate submicro emulsion (PN/SE) was prepared by high-speed shear with medium chain triglycerides (MCT) as oil phase and Tween 80 as the main emulsifier, and then incubated with chitosan (CS) acetic solution. The preparation process was optimized by central composite design-response surface methodology. Besides the particle size, zeta potential, entrapment efficiency and micromorphology were investigated, CS-PN/SE's precorneal residence properties and miotic effect were especially studied using New Zealand rabbits as the animal model. When CS-PN/SE was administered topically to rabbit eyes, the ocular clearance and the mean resident time (MRT) of pilocarpine nitrate were found to be dramatically improved ($P < 0.05$) compared with PN/SE and pilocarpine nitrate solution (PNs), since the $K_{CS-PN/SE}$ was declined to $0.0064 \pm 0.0003 \text{ min}^{-1}$ while MRT was prolonged up to 155.4 min. Pharmacodynamics results showed that the maximum miosis of CS-PN/SE was as high as 46.3%, while the

收稿日期: 2011-03-20.

*通讯作者 Tel: 86-25-85338217, E-mail: Zhujiabi001@yahoo.com

miotic response lasted 480 min which is 255 min and 105 min longer than that of PNs and PN/SE, respectively. A larger area under the miotic percentage vs time curve (AUC) of CS-PN/SE was exhibited which is 1.6 folds and 1.2 folds as much as that of PNs and PN/SE, respectively ($P < 0.05$). Therefore, CS-PN/SE could enhance the duration of action and ocular bioavailability by improving the precorneal residence and ocular absorption significantly.

Key words: pilocarpine nitrate; chitosan; mucoadhesive; precorneal retention property; miotic effect

硝酸毛果芸香碱 (pilocarpine nitrate, PN) 是最常用的胆碱能药物之一, 应用于青光眼的治疗已有 100 多年的历史, 其主要通过直接刺激虹膜和睫状体中毒蕈碱 M 受体, 引起虹膜和睫状体的收缩, 进而打开前房角, 促进房水经小梁网结构外排, 产生降眼内压的药效作用。由于水溶性好, PN 在眼科临床使用的制剂主要是其溶液剂 (PNs) 和凝胶剂 (PN-gel)。与普通滴眼剂类似, 因角结膜囊体积小且眼部存在保护性生理作用 (包括眨眼、眼球转动和流泪等), PNs 在眼表的滞留时间短, 眼部生物利用度低 (0.1%~3%), 药效维持时间较短, 需频繁给药 (4 次/天)^[1]。PN-gel 可实现 1 次/天给药, 但其制剂黏度较大 (600 mPa·s 左右), 存在糊视和剂量不准确等不足^[2]。

针对硝酸毛果芸香碱在临床应用中的局限性, 研究其新型药物传递系统显得尤为重要。其中, 亚微乳 (submicro emulsion, SE) 作为一种新型的眼部给药系统, 具有改善难溶性药物溶解度, 增加药物脂溶性, 减小刺激性, 缓释以及提高眼部生物利用度等优点^[3]。因此 PN/SE 可增加 PN 的脂溶性, 进一步提高 PN 的角膜渗透性, 有利于其进入虹膜和睫状肌作用部位, 促进吸收。另外, 滞留在角结膜囊内的亚微乳可作为药物储库, 持续释放药物, 实现一定缓释效果^[4]。

近年来, 研究发现阳离子型眼用亚微乳在眼表铺展更加均匀, 并能与眼表带负电的黏蛋白产生静电吸附, 眼表滞留时间更长, 有利于药物持续吸收^[5]。壳聚糖 (chitosan, CS) 作为一种天然阳离子型黏多糖, 具有无毒性、生物黏附性、生物相容性、促渗透性和生物可降解性等众多优良的生物学性质^[6, 7], 已被广泛应用于眼用制剂的研究中。本研究将 PN 包裹于亚微乳中, 继而与 CS 醋酸溶液孵育使得 CS 包覆在乳滴表面, 制成具有黏膜黏附性的亚微乳 CS-PN/SE, 并对其理化性质和微观形态进行了表征。另外, 以硝酸毛果芸香碱的眼用亚微乳 PN/SE 及溶液剂 PNs 为对照组, 评价了 CS-PN/SE 在兔眼表滞留特性和缩瞳作用。

材料与方法

仪器 动态光散射粒径测定仪 (3000HS, 马尔文公司, 英国); 高速分散均质机 (FJ-200, 上海标本模型厂); 旋转流变仪 (DV-III, Brookfield 公司, 美国); 透射电子显微镜 (H-7650, HITACHI 日立集团, 日本); HP1100 高效液相色谱系统 (包括 G1311 四元泵, G1379A 在线脱气机, G1328B 手动进样器, G1314A VWD 检测器, 数据处理色谱工作站: HPchemstation Rev.A.10.01, Agilent 公司, 美国)。

药品与试剂 硝酸毛果芸香碱 (PN, 纯度 98%, 巴西进口, 广东利玮医药有限公司分装); 硝酸毛果芸香碱溶液剂 (PNs, 1%, w/v, 山东博士伦福瑞达制药有限公司); 中链甘油三酸酯 (MCT, 德国 Lipoid 公司); Tween 80, Span 80 及甘油 (南京威尔化工有限公司); 油酸 (马来西亚进口, 江苏无锡市多利佳贸易有限公司); 壳聚糖 (CS, 分子质量约为 150 kD, 脱乙酰度 95%, 浙江金壳生物科技有限公司); 其他试剂均为国产色谱纯或分析纯。

动物 新西兰白兔, 体重 (2.5±0.5) kg, 中国药科大学实验动物中心提供。(19±1) °C, (50±5) RH, (20±5) lux 下于标准笼中饲养, 同时标准饮食, 任意饮水。

油水分配系数的测定 精密称取 PN 约 800 mg 至 10 mL 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 后, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 移取水层 20 μL 至 50 mL 量瓶, 用正辛醇饱和的水定容至刻度, 在 220 nm 波长处测定吸收度, 代入标准曲线 ($A = 0.0397C - 0.0139$, $R^2 = 0.9998$) 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 (C 指原来水相中药物浓度, C_w 指平衡后水相中药物浓度)。同法操作 3 次, 取平均值。

PN 溶解度的测定 测定 PN 在去离子水、不同的油 (Soybean oil、Castor oil 和 MCT)、表面活性剂 (Tween 80、Span 80、Poloxamer 188 和 Cremophor EL) 和稳定剂 (Oleic acid 和 Vitamin E) 中的溶解度。取

过量 PN 置于 10 mL 具塞刻度试管中, 分别加入各种油、表面活性剂和稳定剂 5 mL, 密封, 避光, 涡旋混匀, 于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温水浴中机械震荡 72 h。达到平衡后, $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取部分上清液用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜保温过滤。取续滤液, 用流动相适当稀释, HPLC 检测药物浓度, 即得 PN 的表观溶解度。同法操作 3 次, 取平均值。

CS-PN/SE 的制备^[8] 将处方量的 MCT (5%, w/v), Tween 80 (4%), Span 80 (1%), 油酸 (0.88%), PN (1%) 研磨混合均匀, 预热到 40°C 作为油相; 另将处方量的甘油 (2.2%) 和去离子水预热到 40°C 作为水相。将水相缓慢加入油相中, $6\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速剪切 6 min 制得 PN/SE。

按照一定体积比, 在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 和磁力搅拌 ($300\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 下, 将 CS 的醋酸溶液缓慢滴加至 PN/SE 中, 滴加完毕后持续搅拌 30 min, 然后用 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 调节 pH 至 5.0~5.5, 得到 CS-PN/SE, $2\sim 6^\circ\text{C}$ 放置备用。

CS-PN/SE 的优化^[9] 根据单因素实验结果, 采用 3 因素、3 水平的星点设计-效应面法优化处方。各因素的取值范围分别为: Span 80 浓度 (X_1 , 0~2%)、油酸浓度 (X_2 , 0.26%~1.5%) 以及 CS 浓度 (X_3 , 0.25%~1.0%), 各因素和水平见表 1。以平均粒径、多分散系数 (PI)、电位、包封率作为因变量 (效应), 用 Design-Expert 7.0 软件将效应与因素进行模型拟合, 描绘等高线图, 从效应的较优区读取优化处方范围, 并对其进行实验验证。

Table 1 Levels of independent variables

Variable	Level		
	-1	0	1
X_1 (Span 80, %)	0	1	2
X_2 (Oleic acid, %)	0.26	0.88	1.5
X_3 (Chitosan, %)	0.25	0.625	1.0

PN 包封率测定 采用超滤法测定 PN/SE 和 CS-PN/SE 的包封率 (encapsulation efficiency, EE%), 取制剂 0.5 mL 至超滤离心管 (分子截留量 10 kD) 中, $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集 3 个离心套管的上清液至 1 mL 量瓶中, 加入内标 ($90\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 苯甲酸) $200\text{ }\mu\text{L}$, 用流动相定容, HPLC 检测, 经换算得游离药物浓度 C_1 。按照含量测定方法测得制剂中总的药物浓度 C_0 。包封率可按式计算: $\text{EE}\% = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100\%$ 。

PN/SE 和 CS-PN/SE 的质量评价 采用马尔文

激光粒度测定仪测定 PN/SE 和 CS-PN/SE 的粒径和 zeta 电位。采用磷钨酸 (1%, w/v) 负染法, 通过透射电子显微镜观察 PN/SE 外层包覆 CS 前后粒径和形态的变化。

眼表滞留性研究^[10] PNs (1%, w/v)、PN/SE (1%) 和 CS-PN/SE (1%) 3 组制剂随机分配家兔, 每组制剂各时间点均包括 3 只兔眼的的数据。分别于家兔结膜囊内给予上述制剂各 $50\text{ }\mu\text{L}$, 轻轻闭合 10 s。给药 5、10、15、20、25、30、45、60、75、90、120、150 和 180 min 后, 用毛细管在角结膜囊内吸取泪液约 $2\text{ }\mu\text{L}$, 冻存待测。

缩瞳药效学研究^[11] PNs (1%, w/v)、PN/SE (1%) 和 CS-PN/SE (1%) 3 组制剂随机分配家兔, 每组制剂各时间点均包括 3 只兔眼的的数据。给药前用瞳孔尺记录左右眼瞳孔的直径, 记作基础值 d_0 , 分别于结膜囊内给予上述制剂 $50\text{ }\mu\text{L}$, 轻轻闭合 10 s。在给药后 2.5、5、10、15、20、25、30、45、60、90、120、180、240、300、360、420 和 480 min, 记录瞳孔直径, 记为 d_t 。3 组制剂各时间点的缩瞳率可按下式计算: $\text{缩瞳率} = (d_0 - d_t) / d_0 \times 100\%$, 并绘制缩瞳率-时间药效曲线。

眼刺激性实验 取新西兰白兔随机分成 3 组, 每组 3 只。各组左眼均给予生理盐水 $50\text{ }\mu\text{L}$ 作为对照, 右眼分别给予 PNs (1%, w/v)、PN/SE (1%) 和 CS-PN/SE (1%) $50\text{ }\mu\text{L}$ 。给药后 2、12、24、48 和 72 h 记录眼部是否出现眼睑痉挛, 结膜充血、水肿、流泪和分泌物增多等刺激症状, 以及口角流涎的全身副反应。根据 Draize 评分标准, 将角膜、虹膜和结膜的刺激性分数累加作为每只兔的眼部刺激分值。

统计学处理 用 t 检验对各药动学参数进行统计学分析。

结果

1 硝酸毛果芸香碱的油水分分配系数

采用摇瓶-紫外分光光度法测得硝酸毛果芸香碱的油水分分配系数 $\text{Log}P$ 为 -0.296 , 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。

2 硝酸毛果芸香碱的溶解度

考察了硝酸毛果芸香碱在水、不同油、表面活性剂和稳定剂中的表观溶解度, 结果见表 2。硝酸毛果芸香碱在水中易溶, 溶解度约为 $123.7\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而在油相中的溶解性差。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被吸收, 故

需选择对药物溶解能力大的油相、表面活性剂和稳定剂,并能以较少的表面活性剂用量制得药物包封率高、稳定性好的亚微乳。

相对大豆油和蓖麻油而言, MCT 亲水性好, 硝酸毛果芸香碱在其中的溶解度较大, 故选择其作为油相。Tween 80 具有良好的安全性和乳化性能, 对硝酸毛果芸香碱的溶解能力相对强些, 故选其作为乳化剂。虽然硝酸毛果芸香碱在 Span 80 中的溶解度小, 但 Span 80 与 Tween 80 相容性好, 且能提高乳剂的稳定性, 故选择 Span 80 为助乳化剂。此外预实验结果表明, 油酸能与毛果芸香碱形成脂溶性复合物, 有效阻止其从油相中迁移至水相中, 提高药物在油相中的分布, 故选择油酸作为稳定剂^[12]。

Table 2 Saturated solubility of pilocarpine nitrate (PN) in different solutions

Solution	Solubility /mg·mL ⁻¹	Solution	Solubility /mg·mL ⁻¹
MCT	0.634 ± 0.011	Tween 80	0.426 ± 0.013
Soybean oil	0.201 ± 0.020	Poloxamer 188	0.293 ± 0.018
Castor oil	0.158 ± 0.009	Span 80	0.252 ± 0.007
Oleic acid	0.223 ± 0.010	Vitamin E	0.185 ± 0.020
Deionized water	123.7 ± 0.2	Cremorph EL	0.245 ± 0.015

3 CS-PN/SE 的制备和优化

星点设计各水平实验结果见表 3, 表中 OD (overall desirability, OD) 值是将每个指标按归一化法标准化为 0~1 之间的“归一值”, 各指标的“归一值”求算几何平均得总评“归一值”, 具体求算方

Table 3 The results of central composite design. PI: Polydispersity index; EE: Encapsulation efficiency; OD: Overall desirability of prepared formulation's particle size, PI, zeta potential and EE

No.	X ₁ /%	X ₂ /%	X ₃ /%	Particle size/nm	PI	Zeta /mV	EE/%	OD
1	0	0.88	0.25	178.0	0.28	28.6	82.1	0.501
2	2	0.88	1.00	240.9	0.51	30.0	81.4	0.284
3	1	0.88	0.63	159.4	0.31	20.0	93.2	0.451
4	2	0.88	0.25	218.8	0.24	23.5	75.4	0.323
5	1	0.26	1.00	210.4	0.50	27.5	88.8	0.369
6	1	0.88	0.63	150.7	0.34	24.5	92.0	0.517
7	1	1.50	0.25	177.0	0.25	16.8	89.5	0.290
8	0	0.26	0.63	145.2	0.54	33.9	73.5	0.284
9	2	1.50	0.63	227.9	0.30	30.0	80.7	0.409
10	1	0.26	0.25	201.9	0.40	27.0	89.8	0.453
11	0	1.50	0.63	155.7	0.31	35.0	80.9	0.555
12	2	0.26	0.63	213.4	0.30	31.0	78.6	0.421
13	1	1.50	1.00	187.4	0.25	38.5	85.5	0.613
14	0	0.88	1.00	152.1	0.26	37.5	82.1	0.616
15	1	0.88	0.63	162.4	0.29	18.6	96.2	0.421

法见参考文献^[13]。采用 Design-Expert 7.0 软件对各水平进行多元非线性回归, 得到如下二项式:

$$OD = 0.448 + 0.1X_1 - 0.091X_2 - 0.178X_3 - 0.011X_1X_2 - 0.103X_1X_3 + 0.438X_2X_3 \quad (R = 0.855, P < 0.05)$$

由上式可以看出 Span 80、油酸和 CS 浓度均会影响总评“归一值”(OD), 且 3 因素之间还存在相互作用。为确定处方的最优取值区域, 根据上述方程应用 Design-Expert 7.0 描绘 OD 值的等高线图 (图 1~3)。

综合考虑 OD 值的等高线图及制剂制备的实际情况, 选定较优处方为: Span 80 (X₁, 0.45%)、油酸 (X₂, 1.40%) 和 CS (X₃, 0.75%)。按照优化处方对各效

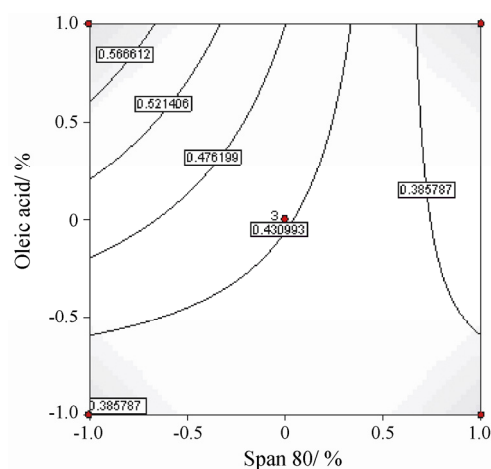


Figure 1 Two-dimensional contour diagrams of OD with two factors under the condition of X₃ (chitosan, %) = 0.63. Span 80 (%): Concentration of Span 80 (X₁, %); Oleic acid (%): Concentration of oleic acid (X₂, %); OD: Overall desirability of prepared formulation's particle size, PI, zeta potential and EE

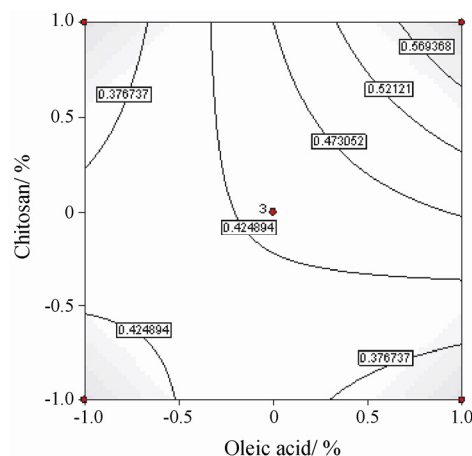


Figure 2 Two-dimensional contour diagrams of OD with two factors under the condition of X₁ (span 80, %) = 1. Oleic acid (%): Concentration of oleic acid (X₂, %); Chitosan (%): Concentration of chitosan (X₃, %); OD: Overall desirability of prepared formulation's particle size, PI, zeta potential and EE

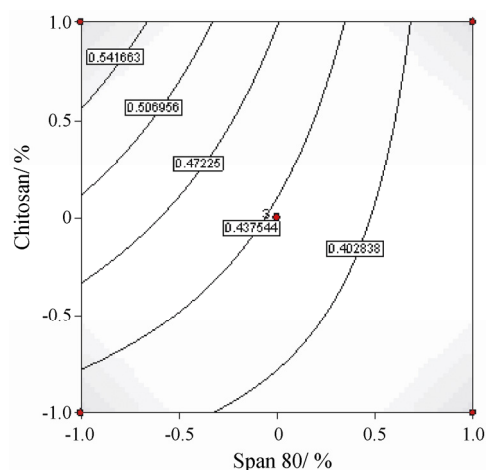


Figure 3 Two-dimensional contour diagrams of OD with two factors under the condition of X_2 (oleic acid, %) = 0.88. Span 80 (%): Concentration of Span 80 (X_1 , %); Chitosan (%): Concentration of chitosan (X_3 , %); OD: Overall desirability of prepared formulation's particle size, PI, zeta potential and EE

应值进行考察, 重复 3 次, 并对预测结果进行验证, 结果见表 4。结果显示, 实测值与预测值间偏差较小, 表明模型预测性良好, 优化结果具有较高的可靠性。

Table 4 Comparison of predictive value and practical value

Index	Predictive value	Practical value	Bias /%
Particle size /nm	153.6	162.5	5.7
PI	0.235	0.29	23.4
Zeta potential /mV	32.01	35.5	10.9
EE /%	88.48	90.1	0.8
OD	0.665	0.672	1.05

4 透射电镜特征

PN/SE 和 CS-PN/SE 的透射电镜照片见图 4。结果表明, PN/SE 呈球形, 圆整性好, 平均粒径在 100 nm 左右, 与粒度仪测得结果基本一致 (图 4A)。PN/SE 与 CS 孵育后, CS 可包覆在乳滴表面, 乳滴由圆整变

成不规则状, 粒径增大, 染色效果发生改变。PN/SE 经磷钨酸染色后乳滴呈黑色, 即正染效果 (原因可能是乳滴中 Span 80 对磷钨酸具有较强吸附作用, 增强了电子的散射), 而处方中 CS 浓度为 0.75% 的 CS-PN/SE 在染色后仍呈现正染效果, 但是乳滴外周和中心出现了负染效果 (乳滴被部分染成白色, 图 4B)。为进一步证实 CS 能包覆在乳滴表面, 将处方中 CS 的浓度提高至 1.2% (w/v), 采用透射电镜进行表征, 结果发现, 经磷钨酸染色后呈现负染效果, 乳滴呈白色 (图 4C)。出现这种现象的原因可能是 CS 能包覆在大部分乳滴表面, 阻碍 PN/SE 中 Span 80 对磷钨酸的吸附, 减少电子的散射, 表现出负染效果。比较 PN/SE 和 CS-PN/SE 的 TEM 图发现, 经 CS 包覆后, 乳滴粒径、外观形态以及染色效果均发生改变, 且改变的程度与 CS 浓度呈正相关。

5 家兔眼表滞留特性

眼表滞留经时曲线 (图 5) 结果显示, 由于眨眼和泪液清除作用, 药物在眼表的消除符合一级动力学特征。市售 PNs 给药后被迅速消除 (K_{PNs} 为 $0.0135 \pm 0.0004 \text{ min}^{-1}$), 给药后 75 min 家兔泪液中药物质量浓度约为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而此后时间点下泪液中药物浓度已低于检测限, 药物在眼表的平均滞留时间 (MRT) 约为 74.4 min; 与 PNs 相比, PN/SE 的眼部消除减慢, 眼表滞留时间延长, 其消除速率常数 ($K_{PN/SE}$) 为 $0.0094 \pm 0.0004 \text{ min}^{-1}$, MRT 约为 107.1 min。相对 PNs 和 PN/SE 而言, CS-PN/SE 组的清除速率显著降低, $K_{CS-PN/SE}$ 为 $0.0064 \pm 0.0003 \text{ min}^{-1}$, 平均驻留时间 MRT (155.4 min) 明显延长, 约为 PNs 组的 2.1 倍, PN/SE 组的 1.5 倍。CS-PN/SE 组给药后 180 min 仍能检测到眼表滞留的药物, 长于 PNs 和 PN/SE 组的 75 min 和 150 min; 给药 20 min 后 CS-PN/SE 组滞

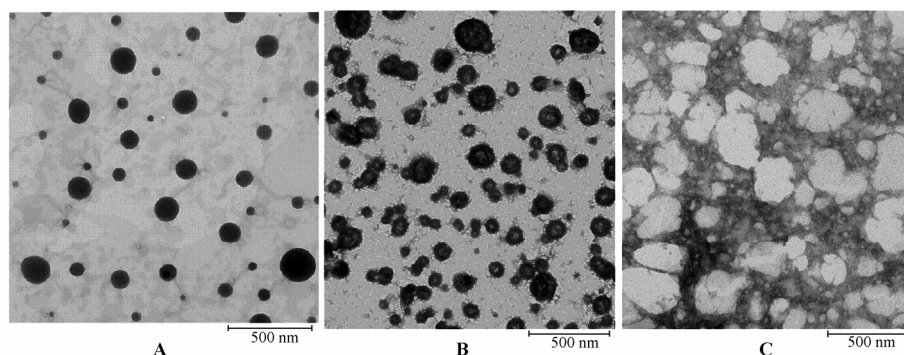


Figure 4 Transmission electron microscope photos of PN/SE (pilocarpine nitrate submicro emulsion, A), CS-PN/SE (chitosan-coated pilocarpine nitrate submicro emulsion in which the CS concentration is 0.75%, B) and CS-PN/SE (chitosan-coated pilocarpine nitrate submicro emulsion in which the CS concentration is 1.2%, C)

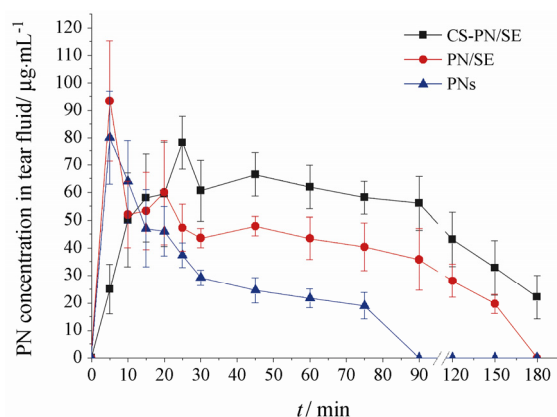


Figure 5 Ocular tear PN concentration of retention of PNs, PN/SE and CS-PN/SE formulation ($n = 3$). PNs: Pilocarpine nitrate solution; PN/SE: Pilocarpine nitrate submicro emulsion; CS-PN/SE: Chitosan-coated pilocarpine nitrate submicro emulsion

留在眼表的药物浓度均高于参比组,且均存在显著性差异 ($P < 0.05$)。上述结果表明,CS-PN/SE 能显著地减缓药物眼表清除速率,延长药物在眼表的滞留时间。

6 缩瞳药效学

各制剂的缩瞳药效经时曲线见图 6,表 5 的主要药效学参数由对数梯形法计算得到。参比组 PNs 和 PN/SE 在给药后 20 min,达到最大缩瞳率分别为 36.7% 和 38.7%,缩瞳药效持续的时间分别为 225 min 和 375 min。由于角膜滞留和增加角膜渗透作用,CS-PN/SE 组的最大缩瞳率 (46.3%) 约为参比组的 1.2 倍,且给药 15 min 后缩瞳率均高于参比组,缩瞳药效持续时间明显延长 (480 min),缩瞳率-时间曲线下面积 AUC 提高,为 PNs 组和 PN/SE 组的 1.6 倍和 1.2 倍 (表 5)。以上结果表明,CS-PN/SE 能促进药物的跨角结膜吸收,延长缩瞳药效持续时间,提高药物的眼部生物利用度,可实现减少给药频次的目的。

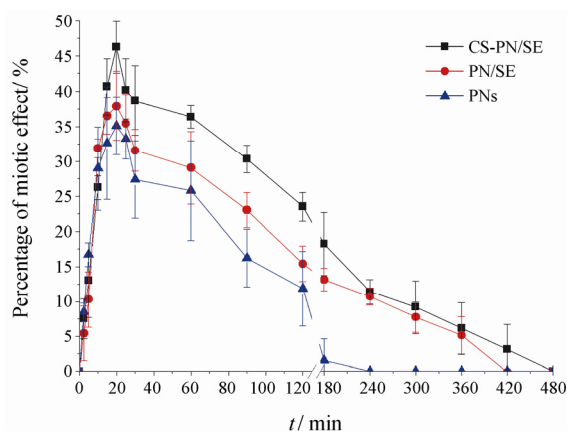


Figure 6 Miotic response profiles obtained after topical application of PNs, PN/SE and CS-PN/SE formulation ($n = 3$)

Table 5 The main pharmacodynamic parameters calculated for PN miotic response of PNs, PN/SE and CS-PN/SE formulation ($n = 3$). T_{max} : Time to reach the peak miotic intensity; Peak: Peak miotic response; Duration: Duration of miotic response; AUC: Area under the miotic percentage vs time curve. $^{**}P < 0.01$ vs PNs; $^{\Delta}P < 0.05$ vs PN/SE

Parameter	PNs	PN/SE	CS-PN/SE
T_{max}/min	20	20	20
Peak/%	36.67 ± 3.24	38.65 ± 4.06	$46.29 \pm 3.69^{**\Delta}$
Duration/min	4.25 ± 0.50	6.25 ± 0.50	$8.00 \pm 1.15^{**}$
AUC	$4\ 508.3 \pm 797.1$	$5\ 793.2 \pm 263.1$	$7\ 360.4 \pm 1\ 076.1^{**\Delta}$

7 眼刺激性实验

各制剂组在各时间点均未出现兔眼睑痉挛,结膜充血、水肿、流泪及分泌物增多等刺激症状,也未出现口角流涎的全身副反应。兔眼部刺激性结果见表 6。结果显示,CS-PN/SE 单次眼部给药,其角膜、虹膜和结膜组织均无明显变化,根据刺激性评价标准可判断 CS/PN-NE 无刺激性。

Table 6 Rabbit eye irritation by single dosage ($n = 3$)

Time after dosage/h	PNs	PN/SE	CS-PN/SE
2	0.3	0.7	0.9
12	0.6	0.6	1.3
24	0.5	0.9	0.7
48	0.7	0.8	1.0
72	0.5	0.5	0.5

讨论

硝酸毛果芸香碱是治疗原发性闭角型青光眼的主要药物,其普通溶液剂易被结膜囊内的泪液稀释并从泪道排走,因此制剂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,但同时药物的副反应增加,还带来患者顺应性的问题。本研究制备了具有黏膜黏附性的亚微乳,并重点评价了 CS-PN/SE 的眼表滞留特性和缩瞳药效作用。

眼表黏膜层 (如角膜、结膜) 是药物吸收的主要屏障^[5],提高眼用制剂的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。

CS-PN/SE 采用 O/W 型亚微乳载体,借助制剂学手段将 PN 包裹在油相中,改善了 PN 的脂溶性,进一步提高 PN 在角膜层中的渗透性,有助于其进入虹膜和睫状肌等作用部位,且滞留在角结膜囊内的亚微乳可作为药物储库,持续释放药物,起到一定的缓释作用^[3];另外,乳滴表面包覆的 CS 赋予亚微乳黏膜黏附性,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^[14, 15], 有利于药物持续扩散进入角结膜, 可能的机制是 CS-PN/SE 外层的壳聚糖分子中带正电的铵基与眼表黏膜中带负电的唾液酸残基间形成的静电吸附^[16]。同时 CS 还能可逆性地改变角膜中细胞间和细胞内的转运通道, 短暂性地打开上皮细胞间的紧密连接, 在一定程度上增加细胞膜的渗透性, 促进药物的角膜透过性^[17]。

眼表滞留特性结果显示, CS-PN/SE 在眼部的消除率明显降低 ($K_{CS-PN/SE}$ 为 0.0064 min^{-1}), 给药 20 min 后, 滞留眼表的 PN 浓度均高于 PNs 和 PN/SE 组, 在眼表滞留时间超过 180 min, MRT (155.4 min) 分别是 PNs 和 PN/SE 组的 2.1 倍和 1.5 倍。缩瞳药效学结果也进一步证实, CS-PN/SE 可通过改善药物在眼表的滞留, 实现延长药效持续时间, CS-PN/SE 组缩瞳药效时间可达 480 min。此外, CS-PN/SE 组的最大缩瞳率可达到 46.3%, 给药 15 min 后缩瞳率均高于 PNs 和 PN/SE 组, 缩瞳率-时间曲线下面积 AUC 明显提高。

然而, 本文仍存在一些不足, 未考察不同分子量的 CS 对 CS-PN/SE 在兔眼表滞留特性的影响, 尚待进一步研究。

综上所述, CS-PN/SE 具有强黏膜黏附性、眼部刺激性小、持续缓慢释药及提高药效等特点, 能有效地减少用药次数, 改善顺应性。此外, CS-PN/SE 的制剂黏度低、给药剂量准确和用药方便等优势均预示具有黏膜黏附性的阳离子型亚微乳是一种具有良好应用前景的新型滴眼给药系统。

References

- [1] Anumolu SS, Singh Y, Gao D, et al. Design and evaluation of novel fast forming pilocarpine-loaded ocular hydrogels for sustained pharmacological response [J]. *J Control Release*, 2009, 137: 152–159.
- [2] Ma SW, Gan Y, Zhu JB, et al. Preparation and *in vitro* corneal retention behavior of novel cationic microemulsion / *in situ* gel system [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 749–755.
- [3] Tamilvanan S, Benita S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58: 357–368.
- [4] Naveh N, Muchtar S, Benita S. Pilocarpine incorporated into a submicron emulsion vehicle causes an unexpectedly prolonged ocular hypotensive effect in rabbits [J]. *J Ocul Pharmacol*, 1994, 10: 509–520.
- [5] Fuente M, Ravina M, Paolicelli P, et al. Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62: 100–117.
- [6] Gratieri T, Gelfuso GM, Rocha EM, et al. A poloxamer/chitosan *in situ* forming gel with prolonged retention time for ocular delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 75: 186–193.
- [7] Li N, Zhuang CY, Wang M, et al. Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2009, 379: 131–138.
- [8] Shen JQ, Gan Y, Zhu JB, et al. Ion-sensitive nanoemulsion-*in situ* gel system for ophthalmic delivery of flurbiprofen axetil [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 120–125.
- [9] Zhang ZH, Tang X, Peng B, et al. Optimization of a floating osmotic pump system of dipyrindamole using central composite design-response surface methodology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 203–207.
- [10] Shen J, Wang Y, Ping QN et al. Mucoadhesive effect of thiolated PEG stearate and its modified NLC for ocular drug delivery [J]. *J Control Release*, 2009, 137: 217–223.
- [11] Chan J, Maghraby GMM, Alany RG, et al. Phase transition water-in-oil microemulsions as ocular drug delivery systems: *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2007, 238: 65–71.
- [12] SD Pharmaceuticals, Inc. Compositions for delivering highly water soluble drugs: WO, 2006/017246 A2 [P]. 2006-02-16.
- [13] Wu W, Cui GH, Lu B. Optimization of multiple variables: application of central composite design and desirability [J]. *Chin Pharm J (中国药杂志)*, 2000, 35: 529–533.
- [14] Badawi AA, El-Laithy HM, El Qidra RK, et al. Chitosan based nanocarriers for indomethacin ocular delivery [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31: 1040–1049.
- [15] Yamaguchi M, Ueda K, Isowaki A, et al. Mucoadhesive properties of chitosan-coated ophthalmic lipid emulsion containing indomethacin in tear fluid [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32: 1266–1271.
- [16] Sogias I, Williams A, Khutoryanskiy V. Why is chitosan mucoadhesive [J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 1837–1842.
- [17] De Salamanca AE, Diebold Y, Calonge M, et al. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: toxicity, uptake mechanism and *in vivo* tolerance [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47: 1416–1425.