



· 制剂与炮制 ·

树枝状聚合物 PAMAM 包覆葛根素 脂质体角膜渗透性研究

刘毅, 孙考祥*, 姚文军, 梁娜, 慕宏杰, 梁荣才, 姚晨
(烟台大学药学院药剂教研室, 山东烟台 264005)

[摘要] 目的:研究树枝状聚合物 PAMAM 包覆葛根素 (puerarin, PUE) 脂质体的角膜渗透特性。方法:制备 PAMAM G2 和 PAMAM G3 包覆的葛根素脂质体,以葛根素水溶液和未包覆葛根素脂质体为对照,进行兔离体角膜渗透试验,同时考察包覆脂质体中,不同的摩尔投料比(PAMAM/磷脂=0.1%,0.5%,1.0%,2.0%),PAMAM 对角膜渗透性的影响,计算渗透参数。结果:PAMAM/磷脂摩尔比为 1.0% (PAMAM G2) 和 0.5% (PAMAM G3) 的包覆脂质体的 P_{app} (表观渗透系数), J_{ss} (稳态流量) 均明显高于葛根素水溶液和未包覆脂质体 ($P < 0.01$), 且 PAMAM/磷脂摩尔比为 1.0% (PAMAM G2) 和 0.5% (PAMAM G3) 包覆脂质体的促角膜渗透性高于其他比例包覆的脂质体 ($P < 0.01$)。结论:PAMAM 包覆葛根素脂质体可以显著改善葛根素在兔眼部的角膜渗透性,作为眼用载体有希望增加药物的眼部吸收和生物利用度。

[关键词] PAMAM; 树枝状聚合物; 葛根素; 包覆脂质体; 角膜渗透性

葛根素 (puerarin, PUE) 是豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (wild) ohwi 或干葛藤 *P. thomsoni* 的干燥块根提取分离得到的 8- β -D-葡萄糖吡喃糖-4',7-二羟基异黄酮。PUE 具有 β 受体阻滞作用,能降低眼内压,增强眼部血流量与视网膜功能,并能改善眼底微循环,PUE 滴眼液在临床上治疗青光眼已得到广泛的应用。然而普通的 PUE 滴眼液使用后,眼部生物利用度较低,这是目前普通滴眼液普遍存在的问题,其中一个主要原因是由于角膜的屏障作用所致,PUE 渗透性较低,需重复给药维持眼内药物浓度。改善药物的角膜渗透性,提高 PUE 滴眼液的生物利用度是亟待解决的问题。

据文献报道,加入渗透促进剂,如某些表面活性剂、胆盐、螯合剂等^[1-2],以及采用微粒给药系统^[3],如脂质体、纳米粒等可以改善角膜的渗透性,提高生物利用度。包覆脂质体作为一种新型的药物载体,可以使剂型同时具有脂质体和包覆材料的特性,并可改变脂质体的电性和不稳定性,例如壳聚糖包覆脂质体是目前研究的热点^[4]。聚酰胺-胺 [poly

(amidoamine), PAMAM] 为树枝状聚合物中的一个特殊家族,它结构精细,高度分支,拥有可容纳客体分子的内部空腔,是一类具有大量可供修饰的表面官能团的三维球形高分子。文献表明^[5-6]其具有很好的生物相容性,低细胞毒性和无免疫原性特点,同时整代 PAMAM 的末端-NH² 可以完全质子化成为-NH³⁺。另有研究报道^[7],PAMAM 能够打开细胞间的紧密连接,增加药物在生物膜的透过作用。

作者已成功制备了 PAMAM 包覆的 PUE 脂质体并进行了表征。采用分别具有 16 个末端-NH² 的 PAMAM G2 和 32 个末端-NH² 的 PAMAM G3 对脂质体进行包覆,得到荷正电的包覆脂质体,本研究的目的是评价和考察 PAMAM 包覆脂质体对 PUE 角膜透过性的影响,为提高 PUE 眼部生物利用度,构建新型眼用药物载体进行探索。

1 材料

粒度分布及 Zeta 电位检测仪 (PSS NICOMP 380, 美国 PSS 公司); 高效液相色谱仪 (Agilent 1100, 安捷伦公司); Valia-Chien 水平扩散池 (中国科学院上海有机化学研究所); 超速离心机 (SORVALL Biofuge PrimoR); 超声波细胞粉碎机 (Scientz-II D, 宁波新芝科器研究所)。

PUE (西安赛邦医药有限公司, 相对分子质量 416.27, 纯度 99%, 批号 080702); 注射用大豆磷脂

[收稿日期] 2009-10-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30873447)

[通信作者] * 孙考祥, 教授, 主要从事药物新剂型和新型药物载体的研究, Tel: (0535) 6706021, E-mail: sunkx@ytu.edu.cn



(上海太伟药业有限公司, 纯度 90%, 批号 081012); 胆固醇(国药集团化学试剂有限公司, 批号 20080528); PAMAM G2 和 PAMAM G3(Sigma 公司); 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

家兔, 雌雄兼有, 体重 2.5 ~ 3.0 kg, 由山东绿叶制药有限公司实验动物中心提供, 合格证号 SYXK(鲁) 2003-0020。

2 方法

2.1 PUE 脂质体和 PAMAM 包覆 PUE 脂质体的制备

薄膜分散-超声法制备 PUE 脂质体: 取注射用大豆磷脂、胆固醇、PUE 适量, 溶于 30 mL 乙醇中, 40 °C 恒温水浴下减压蒸发成薄膜, 加入一定量的 PBS(pH 7.0) 洗膜, 将此混悬液超声 10 min, 既得 PUE 脂质体。

制备 PAMAM 包覆脂质体时, 为确定 PAMAM 和脂质体的投料比, 本实验采用 Stewart 法^[8] 确定磷脂含量来间接代表脂质体的量。将一定量的 PAMAM G2 和 PAMAM G3 溶于 PBS(pH 7.0), 分别缓慢滴加到 PUE 脂质体中, 常温避光下磁力搅拌 4 h, 既得 PAMAM 包覆的 PUE 脂质体。

2.2 色谱条件及专属性考察

Spherisorb ODS 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.1% 的枸橼酸水溶液 (35:65); 柱温 30 °C; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 249 nm。为验证其专属性, 分别取林格溶液、含有角膜内容物的林格溶液和 PUE 林格溶液各 20 μL 进样, 分离测定, 记录色谱图。

2.3 兔离体角膜渗透试验

采用 Valia-Chien 扩散池角膜渗透装置^[9], 取体重为 2.5 ~ 3.0 kg 的家兔, 耳缘静脉空气栓塞使之安乐死。迅速取出眼球, 剥离眼角膜并用林格溶液冲洗后固定于两个半池之间, 上皮层朝向样品池, 内皮层朝向接受池。为保持角膜原有的曲率, 首先加 5.0 mL 林格溶液于接受池, 再加入 4.5 mL 药物于样品池。37 °C 恒温水浴下对两半池进行磁力搅拌, 并同时通入 CO₂ 和 O₂ (95:5) 的混合气体。分别在 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.5, 3.0 h 从接受池取样 200 μL, 同时补加 200 μL。样品经 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进柱, HPLC 测定 PUE 浓度, 计算 PUE 累积透过量。

2.4 不同代数的 PAMAM 包覆 PUE 脂质体对角膜的渗透性影响

分别取 PAMAM G2 (PAMAM/磷脂的摩尔投料比为 1.0%) 和 PAMAM G3 (PAMAM/磷

脂的摩尔投料比为 0.5%) 包覆脂质体于样品池, 以 PUE 水溶液和未包覆脂质体为对照, 按 2.3 项操作, 测定不同代数的 PAMAM 包覆 PUE 脂质体的角膜渗透性。

2.5 包覆 PUE 脂质体中 PAMAM 的投料比对角膜的渗透性影响

为探究 PAMAM 包覆 PUE 脂质体中 PAMAM 和脂质体的投料比与角膜渗透性的关系, 在 PAMAM (G2, G3) 和磷脂的摩尔投料比分别为 PAMAM/磷脂为 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0% 条件下, 按 2.3 项操作, 测定其角膜渗透性。

2.6 角膜渗透参数的计算

离体角膜渗透参数由以下公式求得:

$$Q_n = V_0 (C_n + V/V_0 \sum_{i=1}^{n-1} C_i) = V_0 C_n + V \sum_{i=1}^{n-1} C_i;$$
$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t \cdot C_0 \cdot A \cdot 60}; J_{ss} = C_0 \cdot P_{app}; D = \delta^2 / 6\tau;$$
$$K = J_{ss} \cdot \delta / D \cdot C_0.$$

其中 Q_n 为 PUE 累积透过量, V_0 为接受池溶液体积, V 为取样体积, C_0 为供给池初始药物浓度, A 为有效透过面积 (0.781 cm²), P_{app} 为表观渗透系数, J_{ss} 为稳态流量, D 为角膜的扩散系数, δ 为角膜厚度 (0.0597 cm), τ 为时滞, 即曲线的直线部分延伸与时间轴相交所得, K 为角膜的分配系数。

3 结果

3.1 PAMAM 包覆 PUE 脂质体的制备

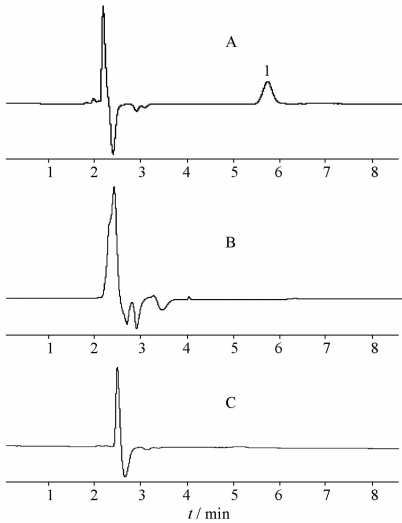
PAMAM 包覆 PUE 脂质体后, 粒径增大, Zeta 电位由负变正。包覆前脂质体平均粒径和 Zeta 电位分别为 358.8 nm 和 -12.16 mV, PAMAM G2 和 PAMAM G3 包覆后, 平均粒径分别增加到 379.4 nm 和 378.8 nm, 平均 Zeta 电位分别变为 21.21 mV 和 20.83 mV。这说明 PAMAM 在 PUE 脂质体的外表面形成一层外壳, 增加了脂质体粒径, 同时使脂质体显正电性, 表明已得到 PAMAM 包覆脂质体。

3.2 接受液 PUE 检测方法

专属性考察见图 1, 可见, 林格溶液和角膜内容物不干扰 PUE 的测定。PUE 在林格溶液中的标准曲线方程为 $A = 88.973C + 1.5811 (n=7), R^2 = 0.9999$, 线性范围 0.1 ~ 16.0 mg · L⁻¹, 高、中、低 3 组浓度的平均回收率分别为 103.84%, 101.56% 和 101.14%, 日内 RSD 分别为 2.4%, 1.1% 和 0.9%; 日间 RSD 分别为 1.7%, 2.4% 和 1.1% ($n=5$)。

3.3 不同代数的 PAMAM 包覆脂质体对角膜的渗透性影响

取 PAMAM G2 (1.0%) 和 PAMAM G3



A. PUE 的林格溶液; B. 含有角膜内容物的林格溶液;
C. 林格溶液; 1. PUE。

图 1 林格溶液及其含有 PUE 和角膜内容物的 HPLC 图

(0.5%) 包覆的脂质体于样品池, 以 PUE 水溶液和未包覆脂质体为对照, 研究包覆脂质体的角膜渗透性。PUE 水溶液和 PAMAM 包覆前后脂质体的累积角膜渗透曲线见图 2, 由图 2 可见, 脂质体的累积透过量最低, 这与文献报道^[10]中性脂质体包封非脂溶

性药物一般不能明显增加角膜的渗透一致。PAMAM 包覆后, 其每个时间点的累积透过量要高于 PUE 水溶液和 PUE 脂质体, 并且 PAMAM G3 (0.5%) 的促角膜渗透效果最佳。离体角膜渗透参数见表 1, 可知, PAMAM G2 (1.0%) 和 PAMAM G3 (0.5%) 包覆脂质体的 P_{app} 和 J_{ss} 均明显高于 PUE 水溶液和 PUE 脂质体 ($P < 0.01$), 且 PAMAM G3 (0.5%) 包覆脂质体的 P_{app} 和 J_{ss} 与 PAMAM G2 (1.0%) 包覆脂质体也具有差异显著性 ($P < 0.01$)。

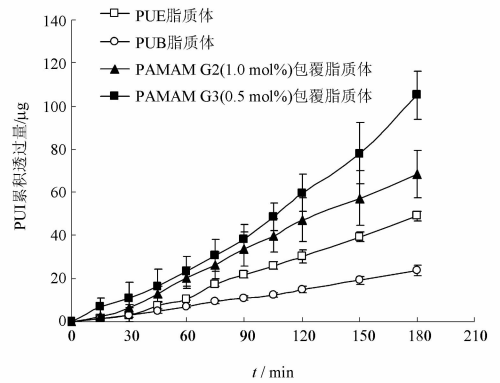


图 2 PAMAM 包覆前后脂质体和 PUE 水溶液的离体角膜累积渗透曲线 ($n = 6$)

表 1 PAMAM 包覆前后脂质体和 PUE 水溶液的离体角膜渗透参数 ($n = 6$)

组别	$P_{app} \times 10^6$ $/\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$J_{ss} \times 10^3$ $/\mu\text{g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$	$D \times 10^7$ $/\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$K \times 10$
PUE 水溶液	1.46 ± 0.39	6.57 ± 1.71	4.51 ± 0.36	1.94 ± 0.21
PUE 脂质体	0.65 ± 0.06	2.93 ± 0.26	5.07 ± 2.11	0.76 ± 0.11
PAMAM G2 (1.0 mol%) 包覆脂质体	$1.98 \pm 0.23^{2,3)}$	$8.88 \pm 1.02^{2,3)}$	$8.18 \pm 0.49^{2)}$	$1.45 \pm 0.09^{3)}$
PAMAM G3 (0.5 mol%) 包覆脂质体	$2.95 \pm 0.11^{1,2,3)}$	$13.3 \pm 0.99^{1,2,3)}$	$6.95 \pm 1.21^{2)}$	$2.53 \pm 0.15^{3)}$

注: 与 PAMAM G2 包覆脂质体组相比¹⁾ $P < 0.01$; 与 PUE 水溶液组相比²⁾ $P < 0.01$; 与 PUE 脂质体组相比³⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 PAMAM 包覆脂质体中 PAMAM 的加入量对角膜的渗透性影响 随着 PAMAM 加入量的增加, PUE 角膜渗透性有先增加后减小的趋势, 其角膜累积透过量见图 3~4, 离体角膜渗透参数见表 2。可见, PAMAM G2 包覆脂质体 (1.0%) 和 PAMAM G3 包覆脂质体 (0.5%) 每个时间点的角膜累积透过量、 P_{app} 、 J_{ss} 、 D 和 K 均高于其他比例的包覆脂质体。

4 讨论

本实验为得到较高包封率的脂质体, 采用药脂比和磷脂与胆固醇的比等单因素考察处方, 包封率达到 50% 以上, 与文献报道基本一致^[11], 符合包覆

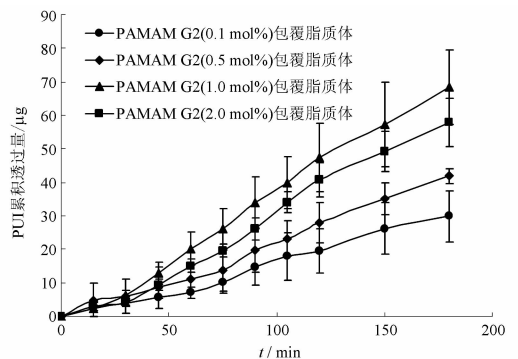


图 3 PAMAM G2 不同投料比包覆 PUE 脂质体的离体角膜累积渗透曲线 ($n = 6$)

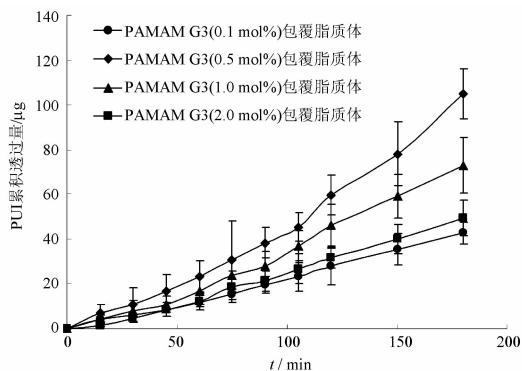


图 4 PAMAM G3 不同投料比包覆 PUE 脂质体的离体角膜累积渗透曲线 ($n = 6$)

表 2 PAMAM G2 和 PAMAM G3 不同投料比包覆 PUE 脂质体的离体角膜渗透参数 ($n = 6$)

PAMAM /mol%	PAMAM G2				PAMAM G3			
	$P_{app} \times 10^6 /$ $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$J_{ss} \times 10^3 /$ $\mu\text{g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$	$K \times 10^7 /$ $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$D \times 10$	$P_{app} \times 10^6 /$ $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$J_{ss} \times 10^3 /$ $\mu\text{g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$	$D \times 10^7 /$ $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$K \times 10$
0.1	0.81 ± 0.11	3.66 ± 0.96	3.91 ± 0.42	1.24 ± 0.19	1.21 ± 0.28	5.39 ± 0.54	4.49 ± 0.97	1.59 ± 0.21
0.5	1.03 ± 0.33	4.62 ± 1.28	5.63 ± 0.51	1.09 ± 0.22	2.95 ± 0.11	13.3 ± 0.99	6.95 ± 1.21	2.53 ± 0.15
1.0	1.98 ± 0.23	8.88 ± 1.02	8.18 ± 0.49	1.45 ± 0.09	2.14 ± 0.16	9.62 ± 2.14	5.95 ± 1.36	2.14 ± 0.22
2.0	1.76 ± 0.19	7.94 ± 2.01	7.43 ± 0.71	1.41 ± 0.26	1.43 ± 0.09	6.44 ± 2.17	4.84 ± 0.92	1.77 ± 0.08

于 PAMAM G2 包覆脂质体,这说明 PAMAM 打开细胞紧密连接的能力与外周-NH₂的个数有关,即与正电荷强弱有关。这与 Kitchens K M 等^[7]对不同代数 PAMAM 可以不同程度的透过 Caco-2 单层细胞的机制分析是一致的。

药物眼部透过吸收的程度和速率除了主要与角膜屏障有关外,还与药物的理化特性及热力学活性有关。有文献报道^[13],药物通过黏蛋白层是受扩散控制,而药物透过角膜则是膜控。PAMAM 虽可以打开角膜的细胞间隙,但因为 PAMAM 对 PUE 有增溶作用,当 PAMAM 加入较少时,供给池 PUE 处于饱和状态,药物的热力学活性高,角膜的渗透性随 PAMAM 的增加而增大。而 PAMAM 过量后,药物的热力学活性降低,试验中 PAMAM G2 和 PAMAM G3 的摩尔投料比分别为 2.0% 和 1.0% 时,可能已经过量,PUE 热力学活性降低,渗透性减小。

PAMAM G3 比 PAMAM G2 具有更多的外周基团和内部空腔,增溶能力更强,所以 PAMAM G3 比 PAMAM G2 更加明显的降低 PUE 的热力学活性,故 PAMAM G3 在摩尔投料比为 0.5% 时促渗透作用达

研究的试验要求。PAMAM 与脂质体的相互作用在国外已有文献报道,其主要靠静电引力和疏水引力与磷脂膜发生吸附^[12]。其中,依靠自身正电荷与脂质体表面负电荷发生吸附可能是主要的作用力。

角膜上皮细胞为药物透过角膜的主要限速屏障,角膜上皮细胞膜带负电荷。PAMAM 对 PUE 脂质体包覆后,PUE 的角膜累积透过量增加,可能是带正电荷的 PAMAM 与带负电荷的角膜上皮细胞通过静电作用,打开了角膜上皮细胞间的“紧密连接”(tight junction),使药物通过细胞旁途径(paracellular transport)进入细胞间隙,增加了角膜的渗透性。同时,PAMAM G3 包覆脂质体的累积透过量优

到最大,而 PAMAM G2 则为 1.0%。

综上所述,PUE 脂质体经 PAMAM 包覆后,促进了药物的角膜渗透性,提高了生物利用度。PAMAM 包覆脂质体有希望成为新型眼部用药物载体,其与角膜作用的机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Nanjawade B K, Manvi F V, Manjappa A S. In situ-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery[J]. J Control Release, 2007, 122(2): 119.

[2] Kaur I P, Smitha R. Penetration enhancers and ocular bioadhesives: Two new avenues for ophthalmic drug delivery[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2002, 28(4): 353.

[3] Vandervoort J, Ludwig A. Ocular drug delivery: Nanomedicine applications[J]. Nanomed, 2007, 2(1): 11.

[4] Phetdee M, Polnok A, Viyoch J. Development of chitosan-coated liposomes for sustained delivery of tamarind fruit pulp's extract to the skin[J]. Int J Cosmet Sci, 2008, 30(4): 285.

[5] Svenson S, Tomalia D A. Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57(15): 2106.

[6] Patri A K, Kukowska-Latallo J F, Baker J R Jr. Targeted drug delivery with dendrimers: comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex



- [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(15):2203.
- [7] Kitchens K M, Kolhatkar R B, Swaan P W, et al. Ghandehari H transport of poly (amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers; Influence of size, charge and fluorescent labeling[J]. *Pharm Res*, 2006, 23(12):2818.
- [8] Roger C C. *New liposomes: A practice approach*[M]. Oxford: Oxford University Press, 1994:108.
- [9] Majumdar S, Hippalgaonkar K, Repka M A. Effect of chitosan, benzalkonium chloride and ethylenediaminetetraacetic acid on permeation of acyclovir across isolated rabbit cornea[J]. *Int J Pharm*, 2008, 348(1/2):175
- [10] Singh K, Mezei M. Liposomal ophthalmic drug delivery system. II: Dihydrostreptomycin sulfate [J]. *Int J Pharmacol*, 1984, 19(3):263.
- [11] 王海刚, 翟光喜, 吕青志, 等. 壳聚糖包覆葛根素脂质体的制备及理化性质考察[J]. *中药材*, 2007, 30(1):89.
- [12] Klajnert B, Epan R M. PAMAM dendrimers and model membranes: Differential scanning calorimetry studies [J]. *Int J Pharm*, 2005, 305(1/2):154.
- [13] Loftsson I, Stefansson E. Effect of cyclodextrins on topical drug delivery to the eye [J]. *Drug Devel Ind Pharm*, 1997, 23(9):473.

Corneal penetration of PAMAM dendrimers-coated puerarin liposomes

LIU Yi, SUN Kaoxiang*, YAO Wenjun, LIANG Na, MU Hongjie, LIANG Rongcai, YAO Chen
(School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China)

[Abstract] **Objective:** To study the corneal penetration of PAMAM dendrimers-coated puerarin liposomes in rabbits. **Method:** Evaluated PAMAM (G2, G3) dendrimers-coated puerarin liposomes were prepared and the in vitro transcorneal penetration were compared to puerarin drop solution and uncoated liposomes. The effect of different proportion of PAMAM to phospholipids in formulation on corneal penetration and the penetration parameters were investigated. **Result:** The steady state fluxes and permeability coefficients of puerarin by PAMAM G2(1.0%) and PAMAM G3(0.5%) coated puerarin liposomes were greater than that by puerarin drop solution and uncoated liposomes ($P < 0.01$), meanwhile the PAMAM G2(1.0%) and PAMAM G3(0.5%) coated liposomes were better than other ratios of coated liposomes for improvement of corneal penetration ($P < 0.01$). **Conclusion:** The PAMAM coated liposomes is able to enhance the corneal penetration of puerarin and promising as an ocular drug carriers.

[Key words] PAMAM; dendrimer; puerarin; coated liposomes; transcorneal penetration

doi: 10.4268/cjcm20100106

[责任编辑 周驰]