

载塞来昔布-聚乳酸/羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及表征

王敏^{1*}, 谢鹏^{2#}, 杨益民², 李秋艳², 薛强³(1.唐山职业技术学院, 河北唐山 063004; 2.唐山市协和医院药剂科, 河北唐山 063004; 3.唐山市工人医院, 河北唐山 063000)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3561-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.35

摘要 目的:制备载塞来昔布-聚乳酸/羟基乙酸共聚物(PLGA)纳米粒,并对其进行表征。方法:采用乳化-溶剂蒸发法制备塞来昔布-PLGA纳米粒,以包封率、粒径为指标,首选Plackett-Burman试验设计筛选出对纳米粒性质影响显著的处方和工艺变量,然后对筛选出的变量(PLGA质量分数、超声功率、超声时间)应用Box-Behnken效应面法进一步优化,并进行验证。采用粒度分析仪测定最优处方工艺所制纳米粒的粒径分布和Zeta电位,采用透射电镜考察其形态,并考察纳米粒的体外释药行为和稳定性(25、5℃)。结果:最优处方工艺为PLGA质量分数30.0%、超声功率180W、超声时间8min;所制纳米粒的包封率和粒径分别为(85.7±4.1)%、(226.1±36.1)nm($n=3$),粒径分布为(176.2±41.2)nm,多分散系数为0.211±0.021,Zeta电位为(-37.3±1.6)mV;电镜下微乳粒径均一,呈球状或椭圆形,24h累积释放度为52.4%;纳米粒在5℃条件下放置3个月内稳定。结论:成功制得塞来昔布-PLGA纳米粒。

关键词 塞来昔布;聚乳酸/羟基乙酸共聚物;纳米粒;乳化-溶剂蒸发法;Plackett-Burman试验设计;Box-Behnken试验设计

Preparation and Characterization of Celecoxib-loaded PLGA Nanoparticles

WANG Min¹, XIE Peng², YANG Yi-min², LI Qiu-yan², XUE Qiang³(1.Tangshan Vocational & Technical College, Hebei Tangshan 063004, China; 2.Dept. of Pharmacy, Tangshan Union Hospital, Hebei Tangshan 063004, China; 3.Tangshan Workers' Hospital, Hebei Tangshan 063000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare and characterize celecoxib-loaded PLGA nanoparticles. METHODS: Emulsification-solvent evaporation method was adopted to prepare celecoxib-loaded PLGA nanoparticles. With encapsulation efficiency and particle size as the indexes, Plackett-Burman design was preferred to screen the formulation and variables which had a significant effect on the property of nanoparticles. And then Box-Behnken response surface method was used to further optimize selected variables including mass concentration of PLGA, ultrasonic power and ultrasonic time, followed by verification. Malvern particle size analyzer was used to determine the particle size distribution of nanoparticles and Zeta potential of nanoparticle by the optimal formulation technology, and transmission electron microscope was used to observe the morphology of the nanoparticles, and their drug release *in vitro* behavior and stability (25, 5℃) were also observed. RESULTS: The optimal formulation and technology was as follows as PLGA mass concentration of 30.0%, ultrasonic power of 180 W and ultrasonic time of 8 min. For the prepared nanoparticles, encapsulation efficiency and particle size were (85.7±4.1)% and (226.1±36.1) nm ($n=3$) respectively; particle size distribution was (176.2±41.2) nm, polydispersity index was 0.211±0.021, and Zeta potential was (-37.3±1.6) mV. Under the electron microscope, the nanoparticles were homogeneous in particle size and distributed spheroidally, with 24 h accumulative release of 52.4%. They were stable within 3 months at 5℃. CONCLUSIONS: Celecoxib-loaded PLGA nanoparticles have been prepared successfully.

KEYWORDS Celecoxib; PLGA; Nanoparticles; Emulsification-solvent evaporation method; Plackett-Burman design; Box-Behnken design

塞来昔布(Celecoxib)是一种非甾体抗炎药,能特异性地抑制环氧化酶2(COX-2)的产生,临床主要用于治疗急性慢性骨关节炎和类风湿性关节炎。塞来昔布在生物药剂分类上属于II类药物,水溶性很差,溶解度为3~7 μg/ml。溶出度是其体内吸收的限制因素,导致其口服制剂生物利用度低且吸收差异较大^[1]。自塞来昔布上市以来,国外许多药剂工作者曾通过多种方法提高塞来昔布的溶解度,改善塞来昔布的溶出性能^[2-3],但是效果均不理想。因此如何改善塞来昔布的水溶性,提高

塞来昔布在胃肠道内的溶出度,进而提高塞来昔布的体内生物利用度,对塞来昔布的临床应用具有重要意义。

聚乳酸/羟基乙酸共聚物(PLGA)是一种无毒、可降解的功能高分子有机化合物,具有良好的生物相容性,良好的成囊和成膜的性能^[4],被广泛应用于制药、医用工程材料和现代化工业领域。在美国,PLGA通过FDA认证,被正式作为药用辅料收录进美国药典。本研究以PLGA为载体材料制备塞来昔布-PLGA纳米粒,以延长药物在胃肠道的滞留时间,提高口服生物利用度。

1 材料

1.1 仪器

Agilent-1200高效液相色谱系统(安捷伦科技有限公司);

* 副教授,硕士。研究方向:药学及临床药理。电话:0315-2565778

通信作者:主任药师。研究方向:药学及临床药学。电话:0315-3406191。E-mail:xiepdr@163.com

BP211D 电子天平(德国赛多利斯集团公司);DF2101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(河南巩义英峪予华仪器厂);Mastersizer 2000 粒度分析仪、Zetasizer Nano 电位分析仪(英国马尔文公司);JM21200EX 透射电镜(日本电子公司);GC2120GX 日立冷冻离心机(日本日立公司)

1.2 药品与试剂

塞来昔布原料药(江苏正大清江制药有限公司,批号:130316,纯度:99.6%);塞来昔布对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100006-201104,纯度:99.9%);PLGA(山东医疗器械研究所,乳酸(LA)/羟基乙酸(GA):50:50,分子质量:20 kDa);聚乙烯醇(PVA,美国 Sigma 公司,批号:10918AE);甲醇(色谱纯,天津博迪化工有限公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 塞来昔布的含量测定

2.1.1 色谱条件^[5] 色谱柱:Hypersil ODS-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(85:15,V/V),流速:0.8 ml/min;柱温:室温;进样量:20 μl;检测波长:254 nm。

2.1.2 方法学考察 称取塞来昔布对照品 10.0 mg,置于 100 ml 棕色量瓶中,加入少量甲醇超声溶解,放冷至室温,加入流动相定容,作为对照品贮备液(100 μg/ml)。精密量取对照品贮备液 0.5、1.0、2.0、5.0、10 ml,分别置于 50 ml 量瓶中,稀释成 1.0、2.0、4.0、10.0、20.0 μg/ml 的对照品溶液。按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以塞来昔布质量浓度(*c*)对峰面积(*A*)进行线性回归,得回归方程为 $A=28\ 719c-384.2$ ($r=0.999\ 9$, $n=5$),线性范围为 1.0~20.0 μg/ml;日内 RSD 为 0.69% ($n=6$),日间 RSD 为 1.12% ($n=6$);平均回收率为 100.3%,RSD 为 0.91% ($n=9$)。

2.2 塞来昔布-PLGA 纳米粒的制备

采用乳化-溶剂蒸发法^[6],将处方量的塞来昔布和 PLGA 溶解于 5 ml 二氯甲烷-丙酮(4:1,V/V)混合溶剂中,作为有机相;称取处方量的 PVA 置于纯化水中分散均匀,形成水相;在高速磁力搅拌(3 000 r/min)下,将有机相缓慢滴加到水相中,持续搅拌 30 min,制得初乳。将初乳在冰浴中超声,40 ℃ 条件下减压蒸去有机溶剂,得到带乳光的塞来昔布-PLGA 纳米粒溶液。

2.3 包封率的测定^[7]

采用离心超滤法,取 1.0 ml 塞来昔布-PLGA 纳米粒溶液置于超滤离心管(截留分子质量:10 kDa)上端,5 000 r/min(离心半径:10 cm)离心 10 min,收集所有滤液至 10 ml 量瓶中,加入甲醇溶解,定容,测定游离塞来昔布质量浓度($c_{游离}$);另取 1.0 ml 塞来昔布-PLGA 纳米粒溶液至 10 ml 量瓶中,加入甲醇溶解,定容,测定塞来昔布总质量浓度($c_{总}$)。计算包封率(%)= $(1-c_{游离}/c_{总})\times 100\%$ 。

2.4 处方工艺优化

2.4.1 Plackett-Burman 试验设计 通过对塞来昔布-PLGA 纳米粒处方和制备工艺的研究,以 PLGA 质量分数(X_1 ,%)、PVA 质量分数(X_2 ,%)、主药质量分数(X_3 ,%)、超声功率(X_4 ,W)、超声时间(X_5 ,min)为考察对象,以包封率(Y_1 ,%)、粒径(Y_2 ,nm)为评价指标,利用 Plackett-Burman 试验设计筛选出对塞来昔布-PLGA 纳米粒性质影响较显著的因素。因素与水平见表 1,试验安排与结果见表 2,变量筛选的 Pareto 图见图 1。

表 1 Plackett-Burman 试验设计的因素与水平

Tab 1 Factors and levels of Plackett-Burman design

因素	水平	
	低(-1)	高(+1)
X_1 (PLGA 质量分数),%	15	40
X_2 (PVA 质量分数),%	1	3
X_3 (主药质量分数),%	5	10
X_4 (超声功率),W	100	200
X_5 (超声时间),min	5	10

表 2 Plackett-Burman 试验安排与结果

Tab 2 Results of Plackett-Burman design

序号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Y_1 ,%	Y_2 ,nm
1	15	3	10	200	5	81.2	192.4
2	40	1	10	200	5	94.5	235.7
3	15	3	10	100	10	81.5	257.3
4	15	1	5	200	10	77.6	153.6
5	40	1	10	100	5	92.4	413.6
6	40	3	10	100	10	95.3	258.4
7	15	3	5	100	5	80.4	313.4
8	40	3	5	200	5	96.1	274.1
9	15	1	5	100	5	77.2	315.7
10	15	1	10	200	10	79.5	181.5
11	40	3	5	200	10	92.5	198.6
12	40	1	5	100	10	94.1	278.2

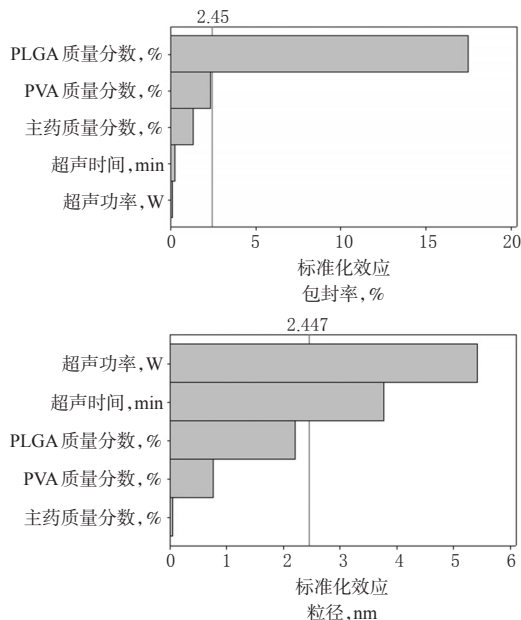


图 1 Plackett-Burman 试验变量筛选的 Pareto 图

Fig 1 Pareto figures for screening the variables of Plackett-Burman design

由图 1 可知,PLGA 质量分数对塞来昔布-PLGA 纳米粒包封率有显著影响($P<0.05$);超声功率和超声时间对塞来昔布-PLGA 纳米粒的粒径分布有显著影响($P<0.05$)。因此,固定主药质量分数和 PVA 质量分数不变,分别为 5% 和 1.0%,选取 PLGA 质量分数 15%~40%、超声功率 100~200 W、超声时间 5~10 min,应用 Box-Behnken 效应面法进一步对处方工艺进行优化。

2.4.2 Box-Behnken 效应面法优化 以 PLGA 质量分数

($X_1, \%$)、超声功率(X_2, W)、超声时间(X_3, min)为考察对象,以包封率($Y_1, \%$)、平均粒径(Y_2, nm)为指标,利用 Box-Behnken 效应面法对塞来昔布-PLGA 纳米粒处方和工艺进行优化。因素与水平见表3,试验安排与结果见表4,拟合方程中各项的相关系数及显著性检验结果见表5。

表3 Box-Behnken 试验设计的因素与水平

因素	水平		
	低(-1)	中(0)	高(+1)
X_1 (PLGA质量分数),%	15	27.5	40
X_2 (超声功率),W	100	150	200
X_3 (超声时间),min	5	7.5	10

表4 Box-Behnken 试验安排与结果
Tab 4 Results of Box-Behnken design

编号	X_1	X_2	X_3	$Y_1, \%$	Y_2, nm
1	15	150	5	74.2	186.4
2	27.5	100	10	85.1	225.2
3	27.5	100	5	86.1	359.1
4	27.5	150	7.5	91.2	225.3
5	15	100	7.5	82.2	232.3
6	27.5	150	7.5	88.4	195.4
7	27.5	150	7.5	93.7	213.6
8	40	150	10	95.6	381.5
9	27.5	200	10	85.6	201.9
10	15	200	7.5	77.4	164.3
11	40	200	7.5	91.5	331.1
12	40	150	5	93.5	409.1
13	40	100	7.5	95.6	297.5
14	15	150	10	82.5	217.7
15	27.5	200	5	88.4	237.1

表5 拟合方程中各项的相关系数及显著性检验结果

Tab 5 Correlation coefficients of fitting equation and significance test results

项	对 Y_1 的拟合结果			对 Y_2 的拟合结果		
	相关系数	F	P	相关系数	F	P
常数项	87.40	13.83	0.0005	211.43	11.61	0.0074
X_1	7.49	40.59	<0.0001	89.81	70.56	0.0004
X_2	-0.76	0.42	0.5298	-34.96	10.69	0.0222
X_3	0.82	0.49	0.4973	-20.68	13.74	0.0110
X_1X_2				0.40	6.53	0.0238
X_1X_3				-14.72	5.83	0.0315
X_2X_3				24.68	4.57	0.0621
X_1^2				56.36	12.82	0.0159
X_2^2				13.51	0.74	0.4299
X_3^2				30.88	3.85	0.1070

由表5可知,方程中PLGA质量分数对包封率影响较显著($P < 0.01$),超声功率与超声时间对包封率影响不显著($P > 0.05$);由相关系数可知,包封率与PLGA质量分数呈正相关。方程中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_1^2 对粒径影响较显著($P < 0.05$);由相关系数可知,粒径与PLGA质量分数呈正相关,与超声功率、超声时间呈负相关。

2.4.3 优化处方验证 根据 Design Expert 7.0 软件综合评价后给出的最佳处方工艺条件:PLGA 质量分数为30.0%、超声功率为180 W,超声时间为8 min。以优化的最优处方和制备工艺按照“2.2”项下方法制备3批塞来昔布-PLGA 纳米粒,测

定其包封率和粒径。结果显示,包封率和粒径的模型预测值分别为88.4%和211.8 nm,试验实测值分别为(85.7 ± 4.1)%和(226.1 ± 36.1) nm,实测值和预测值偏差分别为-3.1%和6.8%,比较接近,说明模型预测性良好。

2.5 塞来昔布-PLGA 纳米粒粒径分布及 Zeta 电位测定

取塞来昔布-PLGA 纳米粒溶液适量,用蒸馏水稀释适当倍数,采用粒度分析仪测定纳米粒的粒径分布和 Zeta 电位。塞来昔布-PLGA 纳米粒的粒径分布和 Zeta 电位见图2。

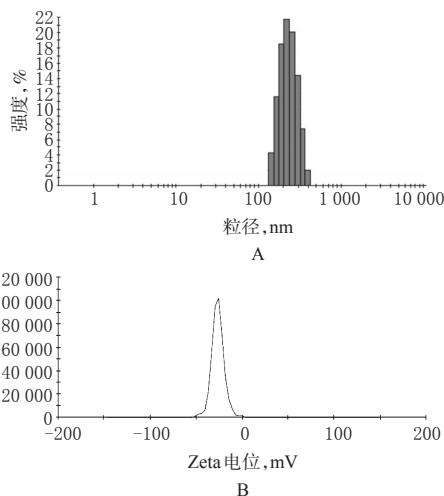


图2 塞来昔布-PLGA 纳米粒的粒径分布和 Zeta 电位
A. 粒径分布; B. Zeta 电位

Fig 2 Particle size distribution and Zeta potential of celecoxib-loaded PLGA nanoparticles

A. particle size distribution; B. Zeta potential

由图2可知,塞来昔布-PLGA 纳米粒的平均粒径为(176.2 ± 41.2) nm,多分散系数(PDI)为0.211 ± 0.021,Zeta 电位为(-37.3 ± 1.6) mV。

2.6 塞来昔布-PLGA 纳米粒形态观察

采用磷钨酸负染法,取塞来昔布-PLGA 纳米粒溶液适量,经蒸馏水稀释后滴加在憎水基质的表面。将附 Formvar 膜的铜网放入纳米粒溶液中浸泡 20 min,用滤纸吸去水分,滴加 2% 的磷钨酸水溶液,染色 10 min,再次用滤纸吸去水分。将铜网取出,待干后用透射电镜观察塞来昔布-PLGA 纳米粒的形态结构。塞来昔布-PLGA 纳米粒的透射电镜图见图3。

由图3可见,塞来昔布-PLGA 纳米粒大小均匀,呈球形或椭圆形,大部分粒子的粒径在200 nm左右,未见过大粒子。透射电镜观察结果进一步确证了粒径测定数据的准确性。

2.7 体外释放行为考察

采用透析法考察塞来昔布-PLGA 纳米粒在磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)中的释放行为。释放介质为0.5% 十二烷基硫酸钠(SDS)的PBS,可以保证药物释放在漏槽状态下进行。精密吸取2.0 ml 塞来昔布-PLGA 纳米粒3份,分别置于处理好的透析袋(截留分子量:14 kDa)内,扎紧后置于溶出仪的浆叶底部。分别移取50 ml 释放介质放入250 ml 溶出杯中。恒温(37 ± 0.5) °C,转速50 r/min,分别于0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、12、16、24 h 吸取1 ml 释放介质(同时补加等量、同温的释放介质)。取出的释放介质用0.45 μm 微孔滤膜过滤,测定其中塞

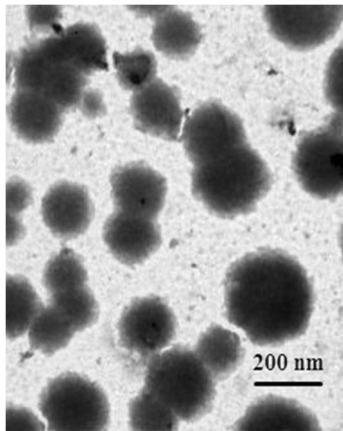


图3 塞来昔布-PLGA纳米粒的透射电镜图($\times 16\ 000$)

Fig 3 Transmission electron microscopy figure of celecoxib-loaded PLGA nanoparticles ($\times 16\ 000$)

来昔布的含量,并计算累积释放度。结果表明,在1 h内药物释放较快,表明纳米粒中药物开始出现突释,主要是由于纳米粒中游离药物首先释放;在1 h后药物释放较平缓,24 h累积释放度为52.4%,表明塞来昔布-PLGA纳米粒有延缓塞来昔布释放的作用。

2.8 稳定性考察

将塞来昔布-PLGA纳米粒分别放置在室温(25 ℃)和低温(5 ℃)条件下,分别于0、1、2、3周取样检测样品的外观、平均粒径、PDI、Zeta电位、包封率,考察塞来昔布-PLGA纳米粒的物理稳定性。塞来昔布-PLGA纳米粒的稳定性试验结果见表6(表中“-”表示瓶底有沉淀物出现,未进行测定)。

表6 塞来昔布-PLGA纳米粒的稳定性试验结果($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab 6 The stability test results of celecoxib-loaded PLGA nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

测定周期	25 ℃				5 ℃			
	粒径, nm	PDI	电位, mV	包封率, %	粒径, nm	PDI	电位, mV	包封率, %
0	181.1 \pm 32.1	0.192 \pm 0.029	-35.1 \pm 2.8	86.2 \pm 3.8	187.1 \pm 44.2	0.203 \pm 0.047	-36.1 \pm 4.3	86.8 \pm 3.2
1	346.8 \pm 53.2	0.263 \pm 0.052	-31.3 \pm 4.7	73.2 \pm 3.9	191.7 \pm 41.9	0.216 \pm 0.043	-35.9 \pm 3.2	85.9 \pm 4.6
2	-	-	-	-	203.1 \pm 45.0	0.208 \pm 0.038	-36.1 \pm 3.9	84.7 \pm 5.3
3	-	-	-	-	221.4 \pm 44.1	0.211 \pm 0.046	-33.0 \pm 4.7	84.1 \pm 4.1

由表6可知,塞来昔布-PLGA纳米粒在室温(25 ℃)条件下放置1周后,粒径明显变大;当放置2周后,瓶底有沉淀析出,说明塞来昔布-PLGA纳米粒放置在室温(25 ℃)条件下不稳定。而在低温(5 ℃)条件下放置3周,外观、平均粒径、PDI、Zeta电位和包封率基本未发生变化,说明塞来昔布-PLGA纳米粒放置在低温(5 ℃)条件下稳定性良好。

3 讨论

纳米给药系统近年来成为药剂工作者研究热点。与普通制剂相比,纳米粒作为药物载体具有许多优点:①体积超微小,能够穿过组织间隙,从而提高药物利用率;②可以有效地保护药物,避免其降解和泄漏,提高药物的体内稳定性;③可以控制药物的释放,延长体内半衰期;④易实现靶向和定位。据研究报道,纳米粒口服后首先经普通肠细胞、细胞旁路以及集合淋巴结(PPs)的M细胞转运而穿过胃肠道,进而进入全身

循环^[8]。在制备纳米粒制剂所用的载体材料中,可生物降解性聚合物受到普遍重视并得到广泛的应用,其中以PLGA的报道最多^[9-10]。该聚合物在体内可被逐渐降解为乳酸和羟基乙酸,后经三羧酸循环最终转化为二氧化碳和水,在人体内无积蓄问题,安全无毒。由于PLGA具有良好的组织相容性和生物可降解性,故成为目前制备纳米粒的首选材料。

PLGA纳米粒包封率的测定方法有超滤法、透析法、超速离心法和凝胶柱层析法等,其中超滤法在常温下进行,无相变化且设备简单、易于操作。因此,本试验综合考虑各方法的优劣及塞来昔布-PLGA纳米粒的性质,最终选择超滤法分离塞来昔布-PLGA纳米粒和游离药物,可以快速、准确地测定塞来昔布-PLGA纳米粒的包封率。

参考文献

- [1] 王敏,谢鹏,杨益民,等.塞来昔布固体脂质纳米粒的制备及其在大鼠体内的药动学[J].中国医院药学杂志,2015,35(1):31.
- [2] Malkani A, Date AA, Hegde D. Celecoxib nanosuspension: single-step fabrication using a modified nanoprecipitation method and in vivo evaluation[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2014, 4(4):365.
- [3] Tan A, Simovic S, Davey AK, et al. Silica-lipid hybrid (SLH) microcapsules: a novel oral delivery system for poorly soluble drugs[J]. *J Control Release*, 2009, 134(1):62.
- [4] Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems [J]. *Colloids Surf B Biointerf*, 2010, 75(1):1.
- [5] 李祥,陈志良.塞来昔布微球的制备及体外释放考察[J].中国医院药学杂志,2010,30(11):918.
- [6] 徐红,高萌,张成鸿,等.青藤碱乳酸羟基乙酸共聚物-水溶性维生素E纳米粒的制备及处方工艺优化[J].中国药房,2015,26(4):5258.
- [7] Keum CG, Noh YW, Baek JS, et al. Practical preparation procedures for docetaxel-loaded nanoparticles using poly(lactic acid-co-glycolic acid) [J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6(12):2225.
- [8] Alexander TF, Anya MH, Nasir H, et al. Nanoparticles as carriers for oral peptide absorption: studies on particle uptake and fate[J]. *J Control Release*, 1995, 36(1):39.
- [9] 李洁丽,郑春丽,刘建平,等.多柔比星PLGA纳米粒的处方工艺优化及体外释药行为研究[J].药学报,2013,48(5):759.
- [10] 郑毅,郑施施,王增寿.姜黄素-PLGA纳米粒提高口服给药生物利用度的研究[J].中国现代应用药学,2014,31(6):717.

(收稿日期:2015-02-12 修回日期:2015-04-11)

(编辑:邹丽娟)