

姜黄素-PLGA 纳米粒温敏原位凝胶的制备及其在兔眼房水中的药动学研究

李林芝^{1*}, 刘梅², 常颖^{1#} (1.重庆市人民医院老年科, 重庆 400014; 2.重庆市中医院药剂科, 重庆 400021)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)05-0640-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.05.16

摘要 目的:制备载姜黄素(CUR)-聚乳酸/羟基乙酸共聚物(PLGA)纳米粒的温敏原位凝胶(CUR-PLGA-GEL),研究其在兔眼房水中的药动学特征。方法:采用改良的乳化-溶剂挥发法制备 CUR-PLGA 纳米粒,以泊洛沙姆 407(P407)和泊洛沙姆 188(P188)为凝胶基质,冷溶法制备 CUR-PLGA-GEL,高效液相色谱法测定凝胶中 CUR 水平,并考察其对兔眼的刺激性(5只兔左、右眼自身对照,采用 Draize 测试进行刺激性评分);10只新西兰白兔随机分为2组,每组5只,左眼分别滴加 CUR-PLGA-GEL 或 CUR 混悬液(含 CUR 8 mg),分别测定给药前及给药后 1、2、4、6、8、10、12、24 h 时兔眼房水中 CUR 的浓度;采用 DAS 2.0 软件计算药动学参数。结果:成功制备了 CUR-PLGA-GEL,其兔眼刺激性评分总分为 0 分,表明其对兔眼刺激性小。兔眼房水中, CUR-PLGA-GEL 的 c_{max} 和 AUC_{0-24h} 分别是 CUR 混悬液的 2.48 和 2.71 倍。结论:制备的 CUR-PLGA-GEL 可用于眼部给药,可提高 CUR 在眼部的利用度。

关键词 姜黄素;聚乳酸/羟基乙酸共聚物纳米粒;温敏原位凝胶;眼部给药;刺激性;兔;房水;药动学

Study on Preparation of Curcumin-PLGA Nanoparticles Thermosensitive in-situ Gel and Its Pharmacokinetics in Aqueous Humor of Rabbits

LI Linzhi¹, LIU Mei², CHANG Ying¹ (1.Dept. of Geriatrics, Chongqing People's Hospital, Chongqing 400014, China; 2.Dept. of Pharmacy, Chongqing Hospital of TCM, Chongqing 400021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare curcumin (CUR)-Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles (CUR-PLGA) thermosensitive in-situ gel (CUR-PLGA-GEL), and to study pharmacokinetic characteristics of it in aqueous humor of rabbits. METHODS: CUR-PLGA was prepared with modified emulsion-solvent evaporation method. CUR-PLGA-GEL was prepared by cold-dissolving method using poloxamer407 (P407) and poloxamer 188 (P188) as gel matrix. The level of CUR in gel was determined by HPLC, and the irritation of it to rabbit eyes was investigated (self-control of left and right eyes of 5 rabbits were taken, while the Draize test was used to evaluate the irritation). 10 New Zealand white rabbits were randomly divided into 2 groups, with 5 rabbits in each group. Left eyes were given CUR-PLGA-GEL and CUR suspension (containing CUR 8 mg), respectively. The concentrations of CUR in aqueous humor of rabbits were determined before medication and 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h after medication. The pharmacokinetic parameters were calculated by using DAS 2.0 software. RESULTS: CUR-PLGA-GEL was successfully prepared and the total score of irritation was 0, which indicated irritative to rabbits. In aqueous humor of rabbits, c_{max} and AUC_{0-24h} of CUR-PLGA-GEL were 2.48 and 2.71 fold of CUR suspension. CONCLUSIONS: Prepared CUR-PLGA-GEL can be used for ophthalmic delivery and can improve the utilization of CUR in the eye.

KEYWORDS Curcumin; Poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles; Thermosensitive in-situ gel; Ophthalmic delivery; Irritation; Rabbit; Aqueous humor; Pharmacokinetics

糖尿病视网膜病变(Diabetic retinopathy, DR)在糖尿病患者中是最常见的并发症之一,是导致中老年糖尿病患者失明的主要原因^[1]。姜黄素(Curcumin, CUR)对 DR 具有较好的治疗效果,并在糖尿病患者及糖尿病模型大鼠中均已得到证实^[2],可通过抗炎、抗氧化、抗细胞凋亡、保护视网膜细胞等作用改善糖尿病引起的眼部病理改变^[3-7],在眼科具有良好的应用前景。局部给药是目

前常用的治疗 DR 的手段之一,但常规给药后药物在眼部的生物利用度极低^[7]。用于眼部给药的温敏原位凝胶是一种新型眼部给药系统^[8],该剂型制剂可根据环境温度的变化发生转变,由液体制剂转变成半固体凝胶,使得制剂的黏度增加,药物在眼部的滞留时间延长,进而达到提高药物在眼部生物利用度的目的^[9]。因此,本研究以聚乳酸/羟基乙酸共聚物(PLGA)和泊洛沙姆为载体材料,制备了 CUR-PLGA 纳米粒温敏原位凝胶(CUR-PLGA-GEL),旨在提高 CUR 在眼部的滞留时间,进而提高 CUR 的生物利用度,为 DR 的给药新剂型的研发提供理论依据。

* 主治医师,硕士。研究方向:糖尿病及其并发症。电话:023-63516954。E-mail:lilinzhi518@163.com

通信作者:副主任医师,博士。研究方向:糖尿病及其并发症。电话:023-63516954。E-mail:chang1982@163.com

1 材料

1.1 仪器

UV-2501 紫外分光光度计(日本岛津公司);JA 1003 精密电子天平(上海方瑞仪器有限公司);SM-1000C 超声波纳米材料分散器(南京舜玛仪器设备有限公司);Zetasizer Nano 纳米粒度仪(英国 Malvern 公司);1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司)。

1.2 药材与试剂

CUR、聚乙烯醇原料药(美国 Sigma 公司,批号:458377、16796TJ,纯度:≥99.5%、≥99%);PLGA(长春圣博玛生物材料有限公司,50:50, V/V);泊洛沙姆 407(P407)、泊洛沙姆 188(P188)均购自德国 Basf 公司,其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

新西兰白兔 10 只,体质量 2~2.5 kg,3 月龄,♀ ♂ 各半,健康无眼疾,由重庆医科大学动物实验中心提供,使用许可证号:SYXK(渝)2017-0023。

2 方法与结果

2.1 CUR-PLGA 纳米粒的制备

采用改良的乳化-溶剂挥发法制备 CUR-PLGA 纳米粒^[10-11],具体操作如下:按质量比为 5:1 精密称取 PLGA 和 CUR,共同溶于有机相二氯甲烷溶液中。以 3% 聚乙烯醇(pH 1.2)为水相,将有机相加入水相后,高速(15 000 r/min)搅拌 3 min,使用超声波纳米材料分散器超声 200 s 后,室温下置于磁力搅拌器上搅拌 4 h 以挥发有机溶剂。在 4℃ 条件下离心(离心半径为 5 cm,18 000 r/min) 20 min,收集纳米粒,用超纯水洗涤后冷冻干燥,即得 CUR-PLGA 纳米粒冻干粉。精密称取 10 mg CUR-PLGA 纳米粒冻干粉置于 10 mL 量瓶中,以丙酮为溶剂,超声使纳米粒完全溶解,定容,稀释约 15 倍后以紫外分光光度法测定其吸光度值,以粗略计算 CUR-PLGA 纳米粒中 CUR 的载药量(PLGA 中所含药物量/PLGA 的总量×100%)。经测定,制得的 CUR-PLGA 纳米粒平均载药量为(16.1±1.1)%,换算为质量浓度约为 0.16 mg/mL,符合其 20 mg/L 即可发挥较好的药理作用的研究结果,给药剂量合理。

取适量 CUR-PLGA 纳米粒,超纯水稀释后,采用纳米粒度仪测定纳米粒的粒径大小及分布。结果显示,CUR-PLGA 纳米粒的平均粒径为 381 nm。CUR-PLGA 纳米粒粒径分布图见图 1。

2.2 CUR-PLGA-GEL 的制备

采用冷溶法^[12]制备 CUR-PLGA-GEL 溶液,具体操作如下:精密称取 10 mg CUR-PLGA 纳米粒溶于 10 mL 生理盐水中,于磁力搅拌器搅拌下按处方比例缓慢加入 0.419 g P188 和 2.500 g P407,搅拌 1 h,于 4℃ 冰箱中静置过夜,即得。

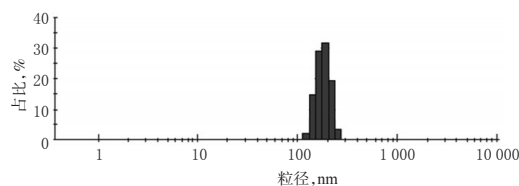


图 1 CUR-PLGA 纳米粒粒径分布图

Fig 1 Particle size distribution of CUR-PLGA nanoparticles

2.3 眼部刺激性实验

将 5 只新西兰白兔置于兔箱中 60 min 使其适应实验环境,在其右眼滴入 50 μL CUR-PLGA-GEL,左眼作为对照,滴加等体积生理盐水。滴入制剂后,将白兔眼睑闭合数秒,分别在给药 0、0.08、0.17、0.5、1、6、12、24、48、72 h 后观察白兔双眼角膜、虹膜、结膜、分泌物的变化和结膜水肿情况,根据 Draize 测试^[13]对制剂的刺激性进行评分。结果,给药后在各时间点白兔双眼的结膜均无肿胀、充血发生,眼部无明显异常分泌物,角膜无浑浊出现,巩膜未出现异常反应,制剂对眼部的刺激性评分总分为 0,说明制剂温和、刺激性小,作为眼部给药安全性高、可行性好。

2.4 CUR 含量检测方法的建立

2.4.1 色谱条件 色谱柱:Hypersil C₁₈(20 cm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-超纯水(含 1% 柠檬酸,73:27, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:423 nm;柱温:25℃;进样量:1 μL。

2.4.2 房水样品处理 取各时间点房水样品 200 μL,加入乙酸乙酯 2 mL、0.1 mmol/L 的盐酸 20 μL,涡旋混匀后离心(离心半径为 5 cm,12 000 r/min,下同)10 min,取上清液减压干燥,用 50 μL 流动相溶解混匀残留物,再次离心 10 min 后取上清液,进样测定。

2.4.3 专属性考察 分别取兔空白房水 200 μL,质量浓度为 375 ng/mL 的 CUR 甲醇溶液、兔空白房水+质量浓度为 375 ng/mL 的 CUR 甲醇溶液、房水样品(给药后 2 h),按“2.4.2”项下方法处理后,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定。结果,兔空白房水样品在 2.2 min 左右有溶剂峰出现,而 CUR 在 4.9 min 附近出峰,兔房水中的内源性物质不干扰 CUR 的测定,方法专属性较强。色谱图见图 2。

2.4.4 线性关系考察 取兔空白房水 200 μL,加入 CUR 甲醇溶液制成质量浓度为 11.718 75、23.437 5、46.875、93.75、187.5、375、750、1 500、3 000 ng/mL 的系列标准溶液,按照“2.4.2”下方法处理后,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定。以 CUR 质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程为 $y=0.230 6x+0.039 2$ ($r=0.998 2$),表明 CUR 在质量浓度为 11.718 75~3 000 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

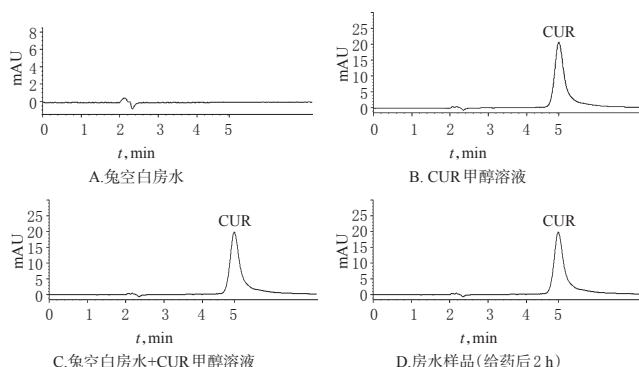


图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

2.4.5 精密度的考察 取兔空白房水 200 μL , 加入适量 CUR 甲醇溶液, 分别制成 CUR 低、中、高质量浓度 (11.718 75、375、3 000 ng/mL) 的样品, 经“2.4.2”项下方法处理后, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 得峰面积, 日内平行进样 5 次, 考察日内精密度的 RSD 分别为 1.88%、3.32%、2.25% ($n=5$), 日间精密度的 RSD 分别为 4.92%、3.12%、1.30% ($n=5$), 均符合相关规定。

2.4.6 稳定性考察 制备质量浓度为 375.00 ng/mL 的 CUR 房水样品, 按“2.4.2”项下方法处理后, 分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样检测, 结果, 稳定性试验的 RSD 为 2.71% ($n=6$), 表明供试品 12 h 内稳定性良好。

2.4.7 提取回收率考察 按“2.4.1”项下色谱条件测定质量浓度分别为 11.718 75、375、3 000 ng/mL 的 CUR 对照品溶液, 得峰面积 A_1 。同时取 200 μL 兔空白房水, 加入适量 CUR 甲醇溶液, 制成 CUR 质量浓度分别为 11.718 75、375、3 000 ng/mL 的房水样品, 按“2.4.2”项下方法处理后, 进样测得峰面积 A_2 。按 $A_2/A_1 \times 100\%$ 计算提取回收率。结果, 低、中、高质量浓度样品的平均提取回收率分别为 89.05%、88.88%、82.28% (RSD 分别为 8.54%、2.98%、2.49%, $n=3$), 表明本方法准确度良好。

2.4.8 方法回收率考察 取 200 μL 兔空白房水, 加入适量 CUR, 制成 CUR 质量浓度分别为 11.718 75、375、3 000 ng/mL 的样品溶液, 经“2.4.2”项下方法处理后, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 得峰面积, 代入回归方程中, 计算出 CUR 浓度。方法回收率 = 测得样品质量浓度 / 加入样品质量浓度 $\times 100\%$ 。结果, 低、中、高质量浓度样品的平均方法回收率分别为 91.56%、83.12%、87.04% (RSD 分别为 6.67%、3.31%、0.27%, $n=3$), 表明方法准确度良好。

2.5 药动学实验

10 只新西兰白兔随机分为 2 组, 每组 5 只。左眼分别滴加 CUR-PLGA-GEL、CUR 混悬液 (CUR-SUS, 称取一定量 CUR 混悬于生理盐水中, 振荡混匀制成 CUR 质

量浓度为 0.16 mg/mL 即可), 含 CUR 8 mg , 给药剂量根据预实验确定。给药时, 略微拉开白兔下眼睑, 滴入制剂后放开, 轻压内眦使眼睛闭合 15 s, 防止制剂溢出。分别于给药前及给药后 1、2、4、6、8、10、12、24 h 取房水 200 μL , 按“2.4.2”项下方法处理后, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定。药-时浓度曲线见图 3。采用 DAS 2.0 软件计算药动学参数, 结果见表 1。

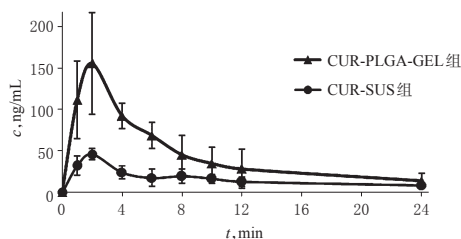


图3 两组兔眼房水中 CUR 的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig 3 Drug concentration-time curve of CUR in aqueous humor of rabbit in 2 groups ($\bar{x} \pm s, n=5$)

表 1 两组兔眼房水中 CUR 的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of CUR in aqueous humor of rabbit in 2 groups ($\bar{x} \pm s, n=5$)

药动学参数	CUR-SUS 组	CUR-PLGA-GEL 组
$c_{\max}, \text{ng/mL}$	45.65 ± 6.76	155.54 ± 61.50
t_{\max}, h	2.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00
$\text{AUC}_{0-24\text{h}}, \text{ng} \cdot \text{h} / \text{mL}$	413.60 ± 40.31	876.31 ± 41.20
$t_{1/2}, \text{h}$	5.97 ± 0.01	6.41 ± 0.04

结果, CUR-PLGA-GEL 给药后的房水中 CUR 的药物浓度明显高于 CUR-SUS。从药动学参数结果来看, CUR-PLGA-GEL 的 c_{\max} 和 $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ 分别是 CUR 混悬液的 2.48 和 2.71 倍。说明 CUR-PLGA-GEL 明显提高了 CUR 在房水中的浓度, 且 CUR-PLGA-GEL 的 $t_{1/2}$ 也长于 CUR-SUS, 说明 CUR-PLGA-GEL 在眼部的代谢较慢, 其延长了 CUR 在眼部的滞留时间, 其在眼部的吸收更符合一级吸收模型。

3 讨论

DR 作为糖尿病并发症中最严重的疾病困扰着众多糖尿病患者及医务工作者。虽然激光光凝治疗被认为是治疗 DR 最有效的方法, 但此疗法对部分患者的疗效并不理想, 而局部给药则是较为常用的一种给药途径^[14]。研究表明, 药物可以通过抗炎、抗氧化应激等作用改善 DR 的病理改变^[15]。但由于眼部特殊的生理结构和其特有的一些保护机制的存在, 使得普通的液体制剂在眼部迅速被排泄, 滞留时间短, 导致药物在眼部的利用度较低, 疗效不理想^[16]。为解决这一难题, 近年来科研工作者研发出了多种新型眼部给药系统, 常用的剂型有凝胶、纳米粒、植入剂等。温敏原位凝胶作为凝胶给药系统中一种新剂型, 由于其可对环境的改变产生响应, 并且刺激性、毒性较低, 而成为极具应用前景的眼部给药系统载体。

CUR作为一种具有多种药理活性的中药成分成为目前研究的热点,前期研究证实,CUR可以改善DR模型大鼠中视网膜的病理改变,抑制大鼠视网膜神经细胞凋亡而发挥对糖尿病眼底病变的防治作用,但由于其理化性质的不稳定性使其临床应用受到极大的限制。本研究的前期工作将CUR直接制备成温敏原位凝胶,但在考察制剂的稳定性时发现制剂的稳定性较差,48 h后凝胶制剂就会出现沉淀,因此本研究先将CUR制备成CUR-PLGA纳米粒,再制成CUR-PLGA-GEL,旨在提高制剂的稳定性及延长CUR在眼部的滞留时间,进一步提高CUR在眼部的利用度。PLGA是一种生物可降解聚合物材料,具有良好的生物相容性,可用于多种不同性质药物制剂的制备,包括缓释制剂、靶向制剂等^[7],因此本研究选择PLGA作为载体材料,制备成CUR-PLGA纳米粒,以提高药物的稳定性。CUR是一类酸性酚类物质,在碱性条件下会发生电子云偏离的共轭效应,变为红色,因此在制备过程中要注意保持反应体系的酸性条件。

本研究中的刺激性考察结果发现,CUR-PLGA-GEL的刺激性小,说明该制剂用于眼部给药是安全可行的。本研究建立了CUR在兔房水中的高效液相色谱检测方法和样品处理方法,方法学考察证明该法可行性良好,提取回收率和方法回收率较高、精密度良好,可用于CUR的测定。在制剂的眼部利用度实验中发现,将CUR制备成CUR-PLGA-GEL后,可以明显提高CUR在房水中的 c_{max} ,并且延长药物的 $t_{1/2}$,结果证明,CUR-PLGA-GEL可延长CUR在眼部的滞留时间并提高其眼部利用度。本研究在后续的工作中会建立DR模型,进一步研究该制剂对于该疾病的作用。

参考文献

[1] GARDNER TW, DAVILA JR. The neurovascular unit and the pathophysiologic basis of diabetic retinopathy[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2017, 255(1): 1-6.

[2] 张英,李冬梅,邢颖.姜黄素的药理作用与载体研究进展[J]. *中国药房*, 2015, 26(13): 1880-1883.

[3] MOSIENIAK G, ADAMOWICZ M, ALSTER O, et al. Curcumin induces permanent growth arrest of human colon cancer cells: link between senescence and autophagy[J]. *Mech Ageing Dev*, 2012, 133(6): 444-455.

[4] PESCOLIDO N, GIANNOTTI R, PLATEROTI AM, et al. Curcumin: therapeutic potential in ophthalmology[J]. *Planta Med*, 2014, 80(4): 249-254.

[5] SULAIMAN RS, BASAVARAJAPPA HD, CORSON TW. Natural product inhibitors of ocular angiogenesis[J]. *Exp Eye Res*, 2014, 129(8): 161-171.

[6] GRANATA G, PATERNITI I, GERACI C, et al. Potential eye drop based on a calixarene nanoassembly for curcumin delivery: enhanced drug solubility, stability, and anti-inflammatory effect[J]. *Mol Pharm*, 2017, 14(5): 1610-1622.

[7] LU CW, HAO JL, YAO L, et al. Efficacy of curcumin in inducing apoptosis and inhibiting the expression of VEGF in human pterygium fibroblasts[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(5): 1149-1154.

[8] PATEL N, NAKRANI H, RAVAL M, et al. Development of loteprednol etabonate-loaded cationic nanoemulsified in-situ ophthalmic gel for sustained delivery and enhanced ocular bioavailability[J]. *Drug Deliv*, 2016, 23(9): 3712-3723.

[9] PATEL N, THAKKAR V, METALIA V, et al. Formulation and development of ophthalmic in situ gel for the treatment ocular inflammation and infection using application of quality by design concept[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2016, 42(9): 1406-1423.

[10] 朱志新,钱颖,曹青日,等.姜黄素-PLGA纳米粒的制备与药效学评价[J]. *中成药*, 2011, 33(5): 776-779.

[11] 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): 717-721.

[12] 郝吉福,赵雪梅,王建筑,等.温度敏感型盐酸小檗碱眼用原位凝胶的制备研究[J]. *中草药*, 2010, 41(4): 550-555.

[13] BOZDAG S, GUMUS K, GUMUS O, et al. Formulation and in vitro evaluation of cysteamine hydrochloride viscous solutions for the treatment of corneal cystinosis[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 70(1): 260-269.

[14] PAI A, EL SHAFEI MM, MOHAMMED OA, et al. Current concepts in intravitreal drug therapy for diabetic retinopathy[J]. *Saudi J Ophthalmol*, 2010, 24(4): 143-149.

[15] LIAO PL, LIN CH, LI CH, et al. Anti-inflammatory properties of shikonin contribute to improved early-stage diabetic retinopathy[J]. *Sci Rep*, 2017. DOI: 10.1038/srep44985.

[16] LOU J, HU W, TIAN R, et al. Optimization and evaluation of a thermoresponsive ophthalmic in situ gel containing curcumin-loaded albumin nanoparticles[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014. DOI: 10.2147/IJN.S60270.ecollection2014.

[17] DANHIER F, ANSORENA E, SILVA JM, et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications[J]. *J Control Release*, 2012, 161(2): 505-522.

(收稿日期:2017-07-29 修回日期:2018-01-05)

(编辑:刘明伟)