

• 药剂与工艺 •

小菜蛾抗菌肽聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及体外评价

刘朝勇^{1,2}, 肖云芝^{1,2}, 李瑞生², 李晓荣^{1,2}, 韩 晋^{2*}, 袁海龙^{2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 中国人民解放军第三〇二医院, 北京 100039

摘要: 目的 制备小菜蛾抗菌肽(CA)聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)纳米粒(CA-PLGA-NPs), 并对其理化性质及体外释放度进行研究。方法 采用 S/W/O/W 复乳法结合高压均质法制备 CA-PLGA-NPs, 对其纳米粒的形态、粒径、多分散指数(PDI)、载药量、包封率和体外释放度进行研究。结果 CA-PLGA-NPs 呈球形或类球形, 粒径、PDI、载药量、包封率分别为 (358.76 ± 22.51) nm、 0.1681 ± 0.0122 、 $(10.50 \pm 0.28)\%$ 、 $(60.92 \pm 1.58)\%$, 突释现象不明显, 2~10 d 内达到释药稳定期。结论 S/W/O/W 复乳法结合高压均质法制备 CA-PLGA-NPs 工艺可行, 为小菜蛾抗菌肽给药提供了制剂学基础。

关键词: 小菜蛾抗菌肽; S/W/O/W 复乳; 高压均质; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; 载药量; 包封率

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)03-0348-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.03.008

Preparation and *in vitro* evaluation of antibacterial peptides from *Plutella xylostella* poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles

LIU Chao-yong^{1,2}, XIAO Yun-zhi^{1,2}, LI Rui-sheng², LI Xiao-rong^{1,2}, HAN Jin², YUAN Hai-long²

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China

Abstract: **Objective** To prepare the antibacterial peptides from *Plutella xylostella*-loaded nanoparticles based on poly(lactic-co-glycolic acid) (CA-PLGA-NPs) and evaluate its physicochemical property and *in vitro* release. **Methods** CA-PLGA-NPs were prepared by S/W/O/W double emulsion method combined with high-pressure homogenization. The morphology, particle size, polydispersion index (PDI), drug loading, encapsulation efficiency (EE), and *in vitro* release of the nanoparticles were studied. **Results** CA-PLGA-NPs were spherical or similarly spherical, and the average particle size, PDI, drug loading, and EE were (358.76 ± 22.51) nm, 0.1681 ± 0.0122 , $(10.50 \pm 0.28)\%$, and $(60.92 \pm 1.58)\%$, respectively. And burst phenomenon was not significant. The drug delivery stable phase was 2—10 d. **Conclusion** S/W/O/W double emulsion method combined with high pressure homogenization method is suitable for the preparation of CA-PLGA-NPs, and provides a pharmaceutical basis for CA administration.

Key words: antibacterial peptides from *Plutella xylostella*; S/W/O/W double emulsion; high pressure homogenization; poly(lactic-co-glycolic acid); drug loading; encapsulation efficiency

小菜蛾抗菌肽 [antibacterial peptides from *Plutella xylostella* (pxCECA1), CA] 属于天蚕素抗菌肽大家族中的一种, 是从昆虫小菜蛾幼虫体内提

取分离而得, 具有抗菌活性高, 抗菌谱广的特点^[1]。它是一种相对分子质量为 4 500 的 α 螺旋形的阳离子抗菌肽, 能选择性与带负电荷多的细胞膜结合,

收稿日期: 2014-09-19

基金项目: 国家新药创制重大专项 (2011ZX092J12108-04C)

作者简介: 刘朝勇, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术研究。Tel: 18075623736 E-mail: 506055047@qq.com

*通信作者 袁海龙 Tel: (010)66933367 E-mail: yhlpharm@126.com

韩 晋 Tel: (010)66933225 E-mail: hanjin302emba@163.com

如肿瘤细胞细胞膜,破坏肿瘤细胞膜结构的完整性并产生穿孔现象,使肿瘤细胞内液外流而凋亡^[2-3]。但CA易受温度、pH值等外界因素的影响而变性失活,也能发生自身聚集,或者与其他粒子无法逆转的结合而失去生物活性^[4],所以其半衰期特别短,限制了这类多肽药物的临床应用。

纳米给药系统(nano drug delivery system)具有降低药物毒性和刺激性、延缓药物降解、延长药物释放时间、靶向释放等优点^[5-8],将药物包封于其中,可实现调节药物释放速率,改变药物在体内的分布、提高药物生物利用度等目的,具有巨大的应用前景。目前,可生物降解的合成聚合物材料聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]由于其无毒、成球性好、化学稳定性高、具有控制释放能力等特点被广泛用作纳米给药系统的载体^[9-11]。

本研究选用PLGA为载体材料,CA为模型药物,以S/W/O/W结合高压均质法制备小菜蛾抗菌肽PLGA纳米粒(CA-PLGA-NPs),通过正交试验,以2、6、14 d累积释放率为评价指标对方工艺进行优化筛选,对其粒径、多分散指数(PDI)、电位等理化性质进行表征,以透射电镜(TEM)观察其基本形态,并对其进行体外释药行为考察。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪,含在线脱气机、四元梯度泵、自动进样器、DAD 检测器、HP Chemstation 化学工作站,Agilent 公司;S-4800 扫描电镜,日本日立;NanoZS90 粒径分析仪,Malvern 公司;JS94W 温控型 Zeta 电位测量仪,北京中仪科信科技有限公司;GYB40-10S 高压均质机,Nano Bee 公司;JHBE-20A 高速探头超声仪,河南金鼎科技发展有限公司;旋转蒸发器,上海医械专机厂;冷冻干燥机,美国 Labconco 公司。

CA 原料药,98.6%,批号 20140421,由解放军第三〇二医院药学部制剂研究室自制;CA 对照品,99.8%,批号 20140405,由武汉大学提供;PLGA,2 单体比例 1:1,相对分子质量 15 000,山东省医疗器械研究所;羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD),上海谱振生物科技有限公司;聚乙烯醇(PVA),广州伟伯化工有限公司;聚乙二醇 2000(PEG 2000),上海酶联生物科技有限公司;甘露醇,天津市科密欧化学试剂有限公司;色谱甲醇,瑞典 Oceanpak;重蒸水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 CA-PLGA-NPs 的制备

取 0.5 g CA,PEG 2000 与 HP-β-CD 的等比例混合物加入到去离子水溶液中,冷冻干燥得到 CA 的多肽微粉^[8]。将含有 50 mg CA 的多肽微粉加入到 20 mL PLGA 的二氯甲烷中,高压乳均,充分乳化后加入含氯化钠的 PVA 溶液 200 mL^[9-10],高速探头超声 5 min,将其加入到高压均质机中高压均质(100.0 MPa)循环 5 次,得复乳,减压旋转除去有机溶剂,高速离心取沉淀后蒸馏水洗涤 3 次,收集纳米粒,加入 3%甘露醇,冷冻干燥(-50 ℃、10 Pa),即得。

2.2 HPLC 法测定 CA 方法建立^[11]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Alltima C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为 0.05%三氟乙酸(TFA)水溶液-甲醇-乙腈(95:2.5:2.5),体积流量 1.0 mL/min,进样量 10 μL,检测波长 275 nm,柱温 25 ℃。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取 CA 对照品 10 mg,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,即得 200 μg/mL CA 对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称定 CA-PLGA-NPs 冻干粉 10 mg,分别置于 25 mL 量瓶中,加 90%乙腈稀释并定容至 25 mL,即得供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取 200 μg/mL CA 对照品储备液适量,用流动相稀释配制成 8、16、32、48、80 μg/mL 的 CA 对照品溶液,分别吸取上述溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标(Y),进样量为横坐标(X),得线性回归方程为 $Y = 3.959 \times 10^4 X + 1.017 \times 10^3$, $r = 0.999 1$ 。结果表明 CA 在 8~80 μg/mL 线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 分别取低、中、高 3 个质量浓度(16、48、80 μg/mL)的 CA 对照品溶液,于同日内重复测定 5 次,计算日内精密度;连续测定 5 d,计算日间精密度,结果其日内精密度 RSD 为 1.21%、1.34%、1.22%;其日间精密度 RSD 分别为 1.64%、2.11%、1.23%。

2.2.6 重复性试验 取 CA-PLGA-NPs 冻干粉 6 份,用 90%乙腈溶解后,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别进样 10 μL,记录抗菌肽色谱峰的峰面积值,代入“2.2.4”项下回归方程,计算其量。结果冻干粉中抗菌肽的量平均值为 10.48%,RSD 为 1.30%,表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件分别于 0、1、2、4、6、8 h 测定,记录抗菌肽峰面积值,计算其 RSD 为 1.54%。结果表明,供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已测定的 CA 原料药 6 份,分别精密加入一定量的抗菌肽 CA 对照品(约相当于样品中各量的 50%、100%、150%),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,进样 10 μ L,测定抗菌肽 CA 的量,计算得加样回收率 100.7%,RSD 为 1.49%。

2.3 体外释放度测定

采用摇瓶培养法。精密称取 CA-PLGA-NPs 冻干粉 10 mg,置于 25 mL 量瓶中,加入 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液[含 0.5%十二烷基硫酸钠(SDS)] 25 mL,置于温度为(37.0 $\pm$ 1.0) $^{\circ}$ C,速率为 75 r/min 的恒温振荡仪中,于 0、1、2、3、4、6、8、10、12、14 d 取样 0.4 mL,同时补充介质 0.4 mL,立即滤过,取续滤液,按“2.2.1”项下色谱条件测定介质中药物的量,计算累积释放率。

$$\text{累积释放率} = \sum C_t / C_0$$

其中 C_t 为 t 时已释放的 CA 质量浓度, C_0 为完全释放时 CA 的质量浓度

2.4 制备工艺的优选

Lee 等^[8]研究发现用 PEG 2000 混合物制备的多肽微粉能有效地增强复乳法制备微球时蛋白药物的稳定性,PLGA 的质量浓度因为影响初乳的黏度所

以对微球的大小和形态有着重要影响,而由于氯化钠质量分数影响复乳的渗透压和 PVA 影响复乳的稳定性,故二者对包封率和载药量有决定性的意义。所以本实验选取 CA 与 PEG 2000 混合物的比例(A)、PLGA 质量浓度(B)、氯化钠质量分数(C)及 PVA 质量分数(D)为考察因素,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素水平见表 1。采用综合评分法对正交试验数据进行分析,以 CA 在 2、6、14 d 的累积释放率为综合评价指标,综合评分(Y) = $(Y_2 - 20)(40 - Y_2) + (Y_6 - 50)(70 - Y_6) + (Y_{14} - 80)(100 - Y_{14})$, Y_2 、 Y_6 、 Y_{14} 分别为 2、6、14 d 3 个时间点的累积释放率,同时 2、6、14 d 的累积释放率应分别满足 Y_2 在 20%~40%、 Y_6 在 50%~70%、 Y_{14} 在 80%~100%,当释放率偏离区间外,表示对 Y 的贡献为负, Y 值越大,因素水平越好。试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

由直观分析可知,影响 CA-PLGA-NPs 释药性质的因素顺序为 $A > C > B > D$ 。以极值最小的 D 因素为误差项进行方差分析,结果显示因素 A、C 具有极显著意义,C 因素无明显影响,结合实际工艺要求,确定最佳处方工艺为 $A_2B_1C_2D_2$,即 CA 与 PEG 2000 混合物的比例为 1:1,PLGA 质量浓度为 10 mg/mL,氯化钠质量分数和 PVA 质量分数分别为 4.0%、0.2%。

2.5 验证试验

按上述最佳工艺进行 3 批验证试验,取 50 mg

表 1 CA-PLGA-NPs 处方工艺正交试验设计及结果

Table 1 Orthogonal design and results for optimization of CA-PLGA-NPs prescription process

试验号	A	B/(mg·mL ⁻¹)	C/%	D/%	Y_2 /%	Y_6 /%	Y_{14} /%	Y
1	1:0(1)	10(1)	0(1)	0(1)	37.23	47.87	61.83	-692.96
2	1:0(1)	20(2)	4(2)	0.2(2)	27.12	46.24	65.76	-485.21
3	1:0(1)	30(3)	8(3)	0.5(3)	32.34	44.46	65.27	-558.54
4	1:1(2)	10(1)	4(2)	0.5(3)	25.21	64.13	90.89	259.21
5	1:1(2)	20(2)	8(3)	0(1)	32.56	60.01	86.21	279.08
6	1:1(2)	30(3)	0(1)	0.2(2)	36.75	65.41	82.12	163.08
7	1:2(3)	10(1)	8(3)	0.2(2)	23.54	62.35	83.34	208.39
8	1:2(3)	20(2)	0(1)	0.5(3)	36.98	66.73	79.56	96.99
9	1:2(3)	30(3)	4(2)	0(1)	34.62	63.22	89.71	268.20
K_1	-1 736.71	-225.36	-432.89	-145.68				
K_2	701.37	-109.14	42.20	-113.74				
K_3	573.58	-127.26	-71.07	-202.34				
R	2 438.08	116.22	475.09	88.60				

表 2 综合评分方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	1 255 333.806	2	935.228	$P < 0.01$
B	2 606.559	2	1.942	
C	41 050.479	2	30.583	$P < 0.05$
D (误差)	1 342.275	2		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

CA, 50 mg PEG 2000 与 HP- β -CD 的等比例混合物加入到去离子水溶液中, 冷冻干燥得到 CA 的多肽微粉, 然后加入到 20 mL 10 mg/mL 的 PLGA 的二氯甲烷溶液中, 高压乳均, 充分乳化后加入到 200 mL 的含 4.0% 氯化钠的 0.2% PVA 溶液中, 高速探头超声和高压均质, 得 CA-PLGA-NPs 冻干粉, 累积释放曲线见图 1。结果表明, 3 批样品的累积释放率符合要求, 此制备工艺稳定可行。CA-PLGA-NPs 释放缓慢且均匀, 在 2、6、14 d 内的累积释放率分别为 $(26.41 \pm 0.35) \%$ 、 $(65.67 \pm 0.70) \%$ 、 $(90.52 \pm 0.74) \%$, 具有良好的缓释效果。

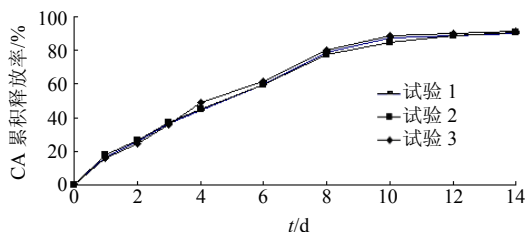


图 1 3 批 CA-PLGA-NPs 的体外释放曲线

Fig. 1 *In vitro* drug release profiles of three batches of CA-PLGA-NPs

2.6 CA-PLGA-NPs 理化性质表征

2.6.1 CA-PLGA-NPs 的粒径和 Zeta 电位 将 CA-PLGA-NPs 冻干粉复溶后, 稀释, 摇匀, 经激光散射粒度分析仪和表面电位分析仪测定粒径、PDI 和 Zeta 电位。由测定结果可知, CA-PLGA-NPs 粒径分布均一, 粒径为 $(358.76 \pm 22.51) \text{ nm}$, PDI 值为 $0.168 1 \pm 0.012 2$, 见图 2。Zeta 电位为 -21.7 mV 。

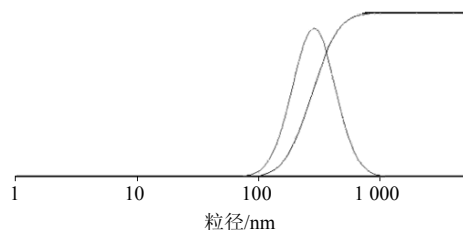


图 2 CA-PLGA-NPs 粒径图

Fig. 2 Profiles of particle size of CA-PLGA-NPs

2.6.2 CA-PLGA-NPs 载药量和包封率测定 精密称定 CA-PLGA-NPs 冻干粉 10 mg, 分别置于 25 mL 容量瓶中, 加 90% 乙醇稀释并定容至 25 mL, 不断振摇至完全溶解, 按“2.2.1”项下测定 CA 的量, 计算包封率、载药量。

$$\text{载药量} = C_{\text{CA}} V_{\text{CA}} / M_0$$

$$\text{包封率} = C_{\text{CA}} V_{\text{CA}} / M_1$$

其中 C_{CA} 为 HPLC 测定的 CA 质量浓度, V_{CA} 为 CA-PLGA-NPs 溶液体积, M_0 为 CA-PLGA-NPs 冻干粉取样量, M_1 为 CA-PLGA-NPs 冻干粉理论 CA 量

测得结果表明, CA-PLGA-NPs 中 CA 的载药量为 $(10.50 \pm 0.28) \%$, 包封率为 $(60.92 \pm 1.58) \%$ 。

2.6.3 CA-PLGA-NPs 体外释药 按“2.3”项下考察 CA-PLGA-NPs 体外释药度, 计算 0、1、2、3、4、6、8、10、12、14 d 的累积释放率, 累积释放曲线见图 3。由体外释药曲线结果可知, 制备的 CA-PLGA-NPs 突释现象不明显, 具有良好的缓控释效果。CA 为水溶性多肽, 原料药能快速分散溶解于水中, 累积释放曲线见图 3。

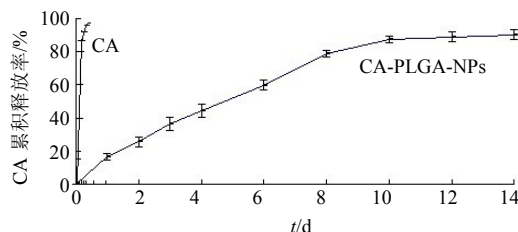


图 3 CA-PLGA-NPs 的体外释放曲线

Fig. 3 *In vitro* drug release profiles of CA-PLGA-NPs

2.7 CA-PLGA-NPs 的 TEM 形态观察

制备的 CA-PLGA-NPs 冻干粉适量溶于水, 将溶液滴于 TEM 铜网上, 置于蜡板上风干, 经 TEM 检测 (扫描电压为 200 kV)。由 TEM 图可看出 CA-PLGA-NPs 为网状球形或类球形, 见图 4。由图 4 可知, CA 微粉分散于 CA-PLGA-NPs 的网状结构内部, 形成了许多储药小室, 这些小室不仅能防止 CA 的大量聚集, 也能避免 CA 长时间与外界环境的接触, 从而提高 CA 的稳定性, 增加其体内的半衰期。

3 讨论

在本制剂处方中选用等比例的 PEG 2000 与羟丙基- β -环糊精的混合物作为保护剂^[8], 在制备初乳时, 保护剂迅速进入初乳的水相液滴内部, 从而减少 CA 与二氯甲烷的接触时间。同时, PEG 2000 能减小乳滴的油相与水相表面张力, 减少乳滴破裂从

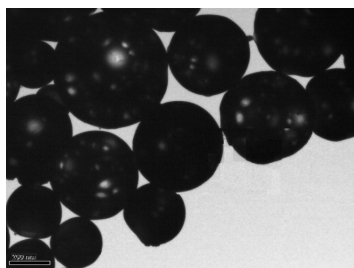


图4 CA-PLGA-NP在TEM下的形态图

Fig. 4 TEM image of CA-PLGA-NPs

而保护水滴中的CA分子。PLGA用量对CA-PLGA-NPs理化性质影响较小。由于高压均质机对流体的粘度有一定的要求,本实验中PLGA的最大质量浓度设定在30 mg/mL。溶液黏度过大将降低高压均质机的工作性能,实验结果表明,10 mg/mL的PLGA能满足本处方的要求。处方中的氯化钠^[9]不仅能提高外水相的渗透压,防止因内水相压力过大而破乳,也能加速内水相的水分子向外迁移,提高包封率,还能使CA-PLGA-NPs更加致密,延长释药时间。PVA常作为表面活性剂用于CA-PLGA-NPs的制备,其质量分数对CA-PLGA-NPs的制备影响较小,提高PVA的质量分数能增加初乳的稳定性,从而减少CA的泄漏,达到提高包封率、减少突释的效果。

通过本研究采用S/W/O/W结合高压均质法制备的CA-PLGA-NPs粒径较小且均一,工艺稳定可行,为抗菌肽类药物的新型给药系统研究提供制剂学基础。

参考文献

- [1] Wang H, Meng X L, Xu J P, *et al.* Production, purification, and characterization of the cecropin from *Plutella xylostella*, pxCCEA1, using an intein-induced self-cleavable system in *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94(4): 1031-1039.
- [2] Chang W T, Pan C Y, Rajanbabu V, *et al.* Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) antimicrobial peptide, hepcidin 1-5, shows antitumor activity in cancer cells [J]. *Peptides*, 2011, 32(2): 342-352.
- [3] Li J G, Liu S P, Lakshminarayanan R, *et al.* Molecular simulations suggest how a branched antimicrobial peptide perturbs a bacterial membrane and enhances permeability [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1828(3): 1112-1121.
- [4] Laquintana V, Denora N, Lopalco A, *et al.* Translocator protein ligand-PLGA conjugated nanoparticles for 5-fluorouracil delivery to glioma cancer cells [J]. *Mol Pharm*, 2014, 11(3): 859-871.
- [5] 陈婷, 鲁莹. 包裹多烯紫杉醇 PLGA-PEG 纳米粒的制备及体外释放度考察 [J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(3): 295-298.
- [6] 华苏, 许向阳, 周建平. 复乳法制备蛋白质药物 PLGA 微球的影响因素 [J]. 药学进展, 2009, 33(10): 451-457.
- [7] Lee E S, Kwon M J, Lee H, *et al.* Stabilization of protein encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) microspheres by novel viscous S/W/O/W method [J]. *Int J Pharm*, 2007, 331(1): 27-37.
- [8] Gomes A L, Bochot A, Doyle A, *et al.* Sustained release of nanosized complexes of polyethylenimine and anti-iTGF-beta 2 oligonucleotide improves the outcome of glaucoma surgery [J]. *J Controlled Release*, 2006, 112(3): 369-381.
- [9] Chi E Y, Krishnan S, Randolph T W, *et al.* Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation [J]. *Pharm Res*, 2003, 20(9): 1325-1336.
- [10] Freitas S, Merkle H P, Gander B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology [J]. *J Controlled Release*, 2005, 102(2): 313-332.
- [11] 徐和, 靳世英, 徐平华, 等. 高效液相色谱法测定小菜蛾中抗菌肽 CA 含量 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(6): 470-472.