

Celecoxib 나노지질 운반체의 제형개발 및 최적화

이수환, 최서정, 나미선, 윤희리, 추서영, 이계원, 조영호
건양대학교 제약생명공학과

pckmon@konyang.ac.kr and micael@konyang.ac.kr

Development and Optimization of Celecoxib loaded Nanostructured lipid Carrier

Su-Hwan Lee, Seo-Jeong Choi, Mi-Seon Na, Hye-Ri Yoon, Seo-Young Chu, Gye-Won Lee, Young-Ho, Jo

Dept. of Pharmaceutics & Biotechnology, Konyang University

요약

본 연구에서는 난용성 약물인 세레콕시브(Celecoxib, CXB)를 이용하여 나노지질 운반체(Nanostructured Lipid Carrier, NLC)를 제조하였다. CXB는 투여 시 위장장애 등의 부작용이 적어 관절염 치료제로 널리 사용되지만 물에 거의 용해되지 않는 난용성 약물로 제제화가 어렵고, 생체이용률이 낮다는 단점이 존재한다. 이러한 난용성 약물의 용해도를 증진시키기 위해 나노지질 운반체를 제조하였다. 용해도 실험을 바탕으로 고체지질 Glycerol Monostearate, 액체지질 Kollisolve GTA, 계면활성제 Tween 80을 선정하고, NLC 제조 당일과 24시간 후 안정성을 바탕으로 Poloxamer 407을 선정하였다. Total lipid(%), Total Surfactant(%), Liquid Lipid ratio를 독립 변수로 두고 종속변수로서 Particle Size, PDI, Zeta Potential, Entrapment Efficiency, Loading Efficiency를 평가하여 최적의 비율을 선정하였다. CXB-NLC는 순수 약물보다 용해도가 pH 4.0 및 6.8에서 평균적으로 3.1, 2.3배 증가하였으며, pH 4.0에서 최대 6.3배 개선되었으며, 이를 통해 생체이용률의 향상을 기대할 수 있다.

1. 서론

선택적 COX-2 억제제인 세레콕시브(Celecoxib, CXB)는 BCS Class II에 속하는 난용성 약물로서 체내에서 약물의 흡수가 낮기 때문에 제제화가 어려운 단점이 있다. 류마티스 관절염, 골관절염, 급성 통증 등 만성 질환의 염증과 통증을 감소시키기 위해 사용되는 소염진통제로 사용되어왔다.

NLC(Nanostructured Lipid Carriers)는 고체지질 및 액체지질과 계면활성제를 혼합한 imperfect matrix 구조를 형성하는 나노지질 운반체이다. Oil이 고체 지질과 합쳐져 있기 때문에 우수한 약물 방출이 이루어진다. 지질 기반 약물 전달 시스템은 투여 경로에 상관없이 다양한 분양 적용이 가능하며 위장관에서 난용성 약물의 용해도를 증가시키고 생체 이용률을 향상시킬 수 있는 장점을 가지고 있다.

설계기반 품질고도화(Quality by Design, QbD)는 중요한 공정 매개변수의 영향을 이해하고 공정조건을 최적화하기 위한 다용도 접근방식으로, 이는 목표를 사전 설정하여 합리적인 과학과 품질관리를 기반으로 제품 및 공정 이해, 공정관리를 강조하는 체계적인 개발방식이다.

QbD 접근법에서 사용되는 실험 설계법(DoE)의 핵심 요소들은 통계를 통하여 최적 처방을 도출할 수 있으며, 설계 공간 내에서 원하는 품질 속성의 예측에도 활용될 수 있다.

본 실험에서는 NLC에 CXB를 봉입하여 용해도를 개선시키고 생체 이용률의 상승을 목적으로 하였으며, 최적화의 가능성을 확인 하고자 하였다.

2. 기기 및 시약

2.1 기기

기기는 Analytical Balance(PW-214, ADAM, UK), Magnetic Stirrer(MSH-20A, WITEG, Germany) Water Bath(WB-6, WITEG, Germany), Homogenizer(T 25 basic, IKA, Germany), Sonicator(Power Sonic 410, WHASHIN, Korea), Incubated Shaker(IST-3075R, JEIO TECH, Korea), Dynamic Light Scattering (DL S, ZetaSizer 90, Malvern Panalytical, USA), UV/Vis Spectrophotometer(UV-1900i, SHIMADZU, Japan), Freeze Dryer(FDU-8606, OPERON, Spain), Dissolution Apparatus(708-DS, AGILENT, USA)를 사용하였다.

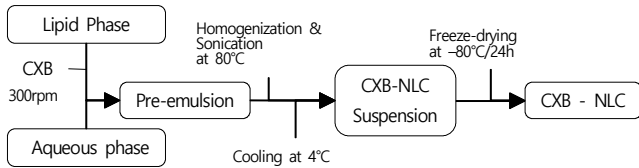
2.2 시약

모델 약물인 Celecoxib(CXB)는 국전약품사에서 제공받았으며, Glycerol Monostearate, Potassium Phosphate Monobasic, Polyethylene Glycol 200, Polyethylene Glycol 400, Oleic Acid는 DAEJUNG사에서, Kollisolv GTA, Kolliphor® P407 Geismar, Kolliphor® P188 Geismar, Kolliphor® P338 Geismar, Kolliwax HCO, Solutol® HS 15, Kolliphor® EL, Kolliwax GMSII, Kolliphor RH 40, Kollisolv MCT 70, Soluplus는 BASF사에서, Tween80, Sodium Acetate, Acetic Acid, Hydrochloric Acid, Sodium Phosphate Dibasic, Sodium Chloride, Stearic Acid는 SAMCHUN사, Gelucire 43/01, Maisine CC, Labrafac Lipophile WL 1349, M 1944 CC CG, Capryol 90, Compritol 888 ATO, Precirol ATO 5, Labrafil M 2125 CS, Pluronic Oleique CC 497, Labrasol, Lauroglycol FCC, Peceol TM, Transcutol HP은 GATTEFOSSE사, Tetraglycol는 SIGMA사에서 제공받아 사용하였다.

3. 실험 방법

3.1 CXB-NLC의 제조

Lipid phase에 용융된 solid lipid, liquid lipid, surfactant를, Aqueous phase에 Co-Surfactant를 사용하여 Scheme I에 따라 Vial 50mL에 NLC를 제조하였다. 제조된 NLC는 동결 건조하여 용해도를 평가하였다.



[Scheme 1] Preparation of CXB-NLC

3.2 CXB-NLC의 물리화학적 특성

NLC의 입자크기와 PDI, Zeta potential은 DLS를 사용하여 측정하였다. 동결 건조된 NLC는 증류수에 적절히 희석하고 초음파 처리하였다. 약물의 봉입률과 로딩률은 NLC 분말을 증류수에 분산시킨 뒤, Amicon Tube에 0.3mL를 취하여 15000rpm에서 5분간 원심분리를 진행하였다. 여액을 증류수에 적절히 희석하여 UV/Vis Spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. 봉입률과 로딩률은 다음과 같은 식을 사용하여 계산하였다.

3.3 CXB-NLC의 용해도 개선 평가

동결 건조한 NLC와 Celecoxib 분말을 증류수, pH 1.2, 4.0, 6.8에 대해 용해도를 확인하였다. Eppendorf Tube에 Celecoxib 해당량에 대해 칭량하고 Shaking Incubator를 이용해 37°C ±0.5°C에서 48시간 동안 250rpm으로 교반시킨 후, 15000rpm

에서 5분간 원심분리하여 상층액 0.1mL를 각각의 용매에 희석하여 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정해 용해도를 확인하였다.

3.4 CXB-NLC 실험 설계

NLC의 구성은 central composite face-centered (CCF) 설계를 통해 세 가지 독립변수 및 5 가지 반응에 대해 최적화되었다[표 1]. 실험 설계 및 통계 분석은 Minitab (Minitab Inc., USA)을 사용하여 수행하였다.

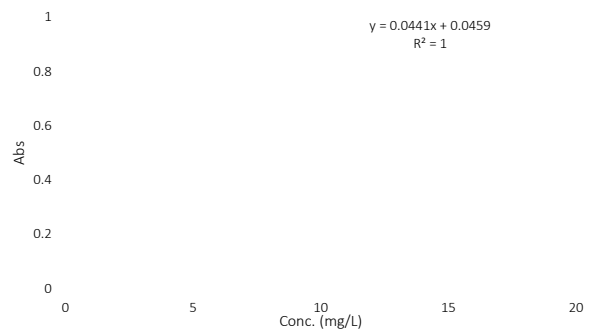
[표 1] Independent factors with their levels for optimal design of design of CXB -NLC dependent variables used in CCF

Independent variables	level	Dependent variables	Constarint
X1 = Lipid amount(%)	10~20	Y1 = Particle size (nm)	Minimum
		Y2 = PDI	Minimum
X2 = Surfactant amount(%)	2~4	Y3 = Zeta Potential (ZP, mV)	Maximum
		Y4 = Entrapment efficiency (EE, %)	Maximum
X3 = Liquid lipid ratio	0.3~0.5	Y5 = Loading efficiency (LE, %)	Maximum

4. 결과 및 고찰

4.1 UV-Vis를 이용한 CXB의 정량

CXB 표준품을 메탄올에 용해하여 251nm에서 1.25, 2.5, 5, 10, 20 ppm의 범위 검량선을 작성하였다. 높은 직선성(R²=1.0000)을 나타내 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 CXB의 정량에 사용하였다.



[그림 1.] Calibration curve of CXB at 251nm

4.2 용해도 기반 Screening

Liquid lipid, Solid lipid, Surfactant에 대한 CXB의 용해도를 기반으로 하여 Screening 하였다. 과량의 CXB를 포함하는 Liquid lipid, Surfactant 1mL를 Shaking Incubator에서 37°C±0.

5°C에서 48시간 동안 250rpm으로 교반시킨 후 15000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액 0.1mL를 적당히 희석하여 UV-VIS spectrophotometer로 흡광도를 측정해 용해도를 확인하였다 [표 2]. Kollisolve GTA가 53.83±0.04(mg/mL), Tween 80이 51.71±0.04(mg/mL)로 가장 높은 용해도를 나타냈다.

[표 2] Solubility of celecoxib in Liquid lipid

(mg/mL)	Solubility	(mg/mL)	Solubility
Cremophor ELP	52.64±0.17	Kollisolve® GTA	53.83±0.04
Oleic acid	49.93±0.12	Labrasol	31.04±0.05
PEG 200	49.82±0.05	Pulroloeiue CC 497	23.34±0.03
Labrafil® M1944 CS	48.64±0.46	Labrafac® lipophile WL 1349	21.88±0.06
Tetraglycol	47.73±0.15	Maisin® CC	20.65±0.08
PEG 400	46.00±0.14	Kollisolve® MCT 70	20.5±0.17
Labrafil®M 2125 CS	44.91±0.11	Lauroglycol® FCC	20.34±0.08
Capryol 90	43.44±0.04	Peceol TM	18.26±0.12
Transcutol HP	43.38±0.18	Tween 80	51.71±0.04

Solid lipid의 경우 용점+5~10°C의 온도로 가열하여 용융된 지질에 CXB를 첨가하여 더 이상 용해되지 않는 지점까지의 측정하여 가용화 양을 결정하였다[표 3]. 이 때, Glycerol Monostearate가 45.1(mg)로 가장 높은 가용화도를 나타냈다.

따라서 앞에서 언급한 Solid lipid, Liquid lipid, Surfactant로 NLC를 제조하였다.

[표 3] Amount of CXB required to solubilize 1g of solid lipid

Solid lipid	Amount(mg)
Precrol ATO 5	27.4
Stearyl alcohol	20.2
Cetyl alcohol	23
Compritol ATO 888	15
Stearic acid	2
Glycerol Monostearate	45.1
Gelucire 43/01	12.9
Kolliphor P338 Geismar	7.9
Kolliwax GMS II	18.5
Kolliwax HCO	9.8

4.3 Co-Surfactant의 선택

NLC 제조 당일과 24시간 보관 후 NLC 1g을 증류수 9mL 넣어 초음파처리를 진행하여 분산액을 제조하였다. 입자크기와 PDI, ZP을 측정하여 가장 안정성이 높은 보조계면활성제를 선택하였다. Kolliphor RH40, Poloxamer 407, Poloxamer 188을 NLC 제조 당일과 24시간 후 안정성을 비교하였을 때 Poloxamer 407이 입자 크기 143.5±9.085(nm), PDI는 0.155±0.116, Zeta Potential -14.8±0.231(mV)으로 제조 당일과 24시간 후 가장 큰 차이를 보이지 않아 보조계면활성제로 선정하여 NLC를 제조하였다.

4.5 CXB-NLC의 최적화

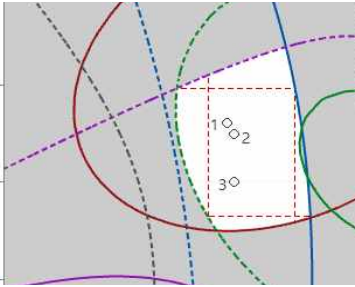
제조된 CXB-NLC의 반응을 [표 5]에 나타내었다. 이러한 결과를 토대로 [표 6]과 같은 모델을 얻을 수 있었으며, 중첩도 고선도 및 최적화를 통한 최적 처방 및 설계 공간을 얻을 수 있었다[그림 2].

[표 5] Response CCF, Y1; Particle size (nm), Y2; PDI, Y3; Zeta Potential (ZP, mV), Y4; Entrap efficiency (EE, %), Y5; Loading efficiency (LE, %)

Run #	Dependent variable				
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5
1	383±21.09	0.26±0.28	-20.7±0.12	91.93	53.08
2	259.4±10.89	0.158±0.17	-16.9±0.61	92.12	64.37
3	549.8±12.24	0.178±0.08	-22.3±0.46	96	96
4	363.4±24.81	0.172±0.11	-34.5±1.57	87.94	52.72
5	533.9±7.48	0.193±0.02	-21.9±0.33	79.99	47.96
6	245.9±11.77	0.187±0.07	-27.7±0.40	92.1	65.79
7	232.1±10.94	0.109±0.11	-21.6±0.57	92.65	92.65
8	323.3±20.21	0.224±0.06	-24.8±0.72	92.29	65.92
9	401.5±30.40	0.118±0.06	-15.4±0.50	80.6	44.78
10	202±13.13	0.265±0.04	-19.3±0.17	93.74	82.81
11	160.7±8.94	0.263±0.06	-18.1±0.55	93.2	82.33
12	313.8±14.40	0.203±0.09	-18.5±0.46	91.47	50.82
13	290.7±15.36	0.206±0.17	-25±0.38	93.83	67.02
14	213.3±9.57	0.176±0.08	-23.1±0.67	93.38	70.1
15	307.8±4.65	0.194±0.01	-24.6±0.27	92.33	65.95
16	330.3±3.86	0.254±0.05	-23.4±0.64	92.39	65.99
17	234.2±13.13	0.162±0.16	-32.4±0.75	92.83	66.31
18	354.6±13.05	0.297±0.01	-23.9±0.84	92.4	66
19	176.8±13.50	0.26±0.06	-21.3±0.46	92.38	86.5
20	238.8±18.01	0.306±0.10	-18.8±0.17	89.75	61.14

[표 6] Estimated coefficients of the fitted quadratic equation for different responses.

	Equation
Y1=	332 - 54.1X1 + 139X2 + 157X3 + 1.72X1*X1 - 10.8X2*X2 + 2557X3*X3 + 5.93X1*X2 - 4.5X1*X3 - 552X2*X3 (p-value = 0.076, R2=0.7010)
Y2=	-1.325 + 0.0086X1 + 0.226X2 + 5.64X3 + 0.00078 X1*X1 + 0.0004X2*X2 - 5.66X3*X3 - 0.00713 X1*X2 - 0.0328X1*X3 - 0.221 X2*X3 (p-value =0.091, R2=0.6868)
Y3=	-15.5 - 6.86X1 - 19.1X2 + 331X3 + 0.1325X1*X1 + 3.36X2*X2 - 439X3*X3 + 0.400X1*X2 + 3.80X1*X3 - 9.5X2*X3 (p-value = 0.106, R2=0.6739)
Y4=	46.3 + 2.48X1 + 12.00X2 + 94X3 - 0.0491X1*X1 - 1.82X2*X2 - 5X3*X3 + 0.146X1*X2 - 5.41X1*X3 - 8.51X2*X3 (p-value = 0.003, R2=0. 8591)
Y5=	158.6 - 7.92X1 - 3.50X2 + 39.7X3 + 0.1361X1*X1 - 0.769X2*X2 + 27.6X3*X3 + 0.461X1*X2 - 3.42X1*X3 - 6.39 X2*X3 (p-value = 0.000, R2=0. 9947)



[그림 2.] Overlaid Contour plot, Optimized formulation F1~3 was pointed (F1, X1:10.78, X2:2.58, X3:0.3; F2, X1:11.15, X2:2.48, X3:0.3; F3, X1:14.24, X2:2.01, X3:0.3)

4.5 CXB-NLC 용해도 개선 평가

제조된 NLC는 순수 CXB 분말보다 pH 1.2, 4.0, 6.8에서 2.02±1배, 3.07±1.19배 및 2.29±0.93배 용해도가 향상되었으며, 최대 4.41배, 6.33배 및 4.34배의 증가된 용해도를 나타내어 NLC를 이용한 CXB의 용해도가 증가되었으며, 이를 통한 생체이용률의 증가를 기대할 수 있다.

5. 결론

난용성 약물로 생체이용률이 낮은 CXB의 용해도를 증가시키기 위해 NLC를 제조하였으며, CCF 설계를 이용하여 설계 공간을 구하였다. 용해도 실험을 바탕으로 고체지질 Glyceryl Monostearate, 액체지질 Kollisolve GTA, 계면활성제 Tween 80을 선정하고, NLC 제조 당일과 24시간 후 안정성을 바탕으로 Poloxamer 407을 선정하였다. Total lipid(%), Total Surfactant(%), Liquid Lipid ratio를 독립 변수로 두고 종속변수로서 Particle Size, PDI, Zeta Potential, Entrapment Efficiency, Loading Efficiency를 평가하여 최적의 비율을 선정하였다. 제조된 CXB-NLC의 용매별 용해도는 pH 4.0에서 3.07±1.19배 용해도가 증가하였음이 확인되어 CXB-NLC의 가용화를 통한 생체 이용률 증가 및 복용량의 감소를 기대할 수 있었으며, 설계 공간을 통한 최적화의 가능성을 확인 할 수 있었다.

6. 참고문헌

[1] J eon, D. Y., Jang, J. E., Lee, J. H., Yang, J. W., Park, S. M., Lim, D., & Khang, G. "Characterization and Improvement of Dissolution Rate of Solid Dispersion of Celecoxib in PVP K30/Eudragit EPO", Polymer Korea, pp. 434-440, July, 2014

- [2] Medha Joshi, Vandana Patravale, "Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib", Int J Pharm, Volume 346, pp. 124-132, January, 2008
- [3] Fang, Chia-Lang; A. Al-Suwayeh, Saleh; Fang, Jia-You, "Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for Drug Delivery and Targeting", Recent Patents on Nanotechnology, Volume 7, pp. 41-55(15), January, 2013
- [4] Patrícia Severino, Maria Helena A. Santana, Eliana B. Souto, "Optimizing SLN and NLC by 22 full factorial design: Effect of homogenization technique", Materials Science and Engineering: C, Volume 32, pp. 1375-1379, August, 2012
- [5] Babar Iqbal, Javed Ali, Sanjula Baboota, "Silymarin loaded nanostructured lipid carrier: From design and dermatokinetic study to mechanistic analysis of epidermal drug deposition enhancement", Journal of Molecular Liquids, Volume 255, pp. 513-529, April, 2018
- [6] Teng Z, Yu M, Ding Y, Zhang H, Shen Y, Jiang M, Liu P, Opoku-Damoah Y, Webster TJ, Zhou J., "Preparation and characterization of nimodipine-loaded nanostructured lipid systems for enhanced solubility and bioavailability", Int J Nanomedicine. pp. 119-133, December, 2018
- [7] Tran TH, Ramasamy T, Truong DH, Choi HG, Yong CS, Kim JO. "Preparation and characterization of fenofibrate-loaded nanostructured lipid carriers for oral bioavailability enhancement", harmSciTech, volume 15, pp. 1509-1515, December, 2014
- [8] Severino P, Santana MH, Souto EB. "Optimizing SLN and NLC by full factorial design: effect of homogenization technique", Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. pp. 1375-9, August, 2012
- [9] Lee HJ, Jeong M, Na YG, Kim SJ, Lee HK, Cho CW. "An EGF- and Curcumin-Co-Encapsulated Nanostructured Lipid Carrier Accelerates Chronic-Wound Healing in Diabetic Rats", Molecules, pp. 2520-4610, October, 2020
- [10] Wang Q, Yang X, Gu X, Wei F, Cao W, Zheng L, Li Y, Ma T, Wu C, Wang Q. "Celecoxib nanocrystal-loaded dissolving microneedles with highly efficient for osteoarthritis treatment", Int J Pharm, pp. 122-108, September, 2022