

粉防己碱阿霉素脂质体的制备与体外释放度的研究

潘峰, 胡春梅, 潘黎军, 王驰*

(重庆医科大学药学院, 重庆 400016)

摘要:目的 以阿霉素和粉防己碱为模型药物制备脂质体并进行工艺研究, 同时对该脂质体进行体外释放度的研究。方法 采用3种不同脂质体制备方法, 并以包封率为指标采用正交设计法进行处方筛选和工艺优化。结果 确定了硫酸铵梯度法结合pH梯度法制备脂质体的最佳制备处方为: 药脂比为1:20, 磷脂与胆固醇质量的比例为3:1, 水相pH值为7.6, 孵育温度50℃, 硫酸铵浓度为250 mmol/L。释放度试验显示脂质体中阿霉素和粉防己碱分别在24 h和16 h内完全释放。结论 制备的粉防己碱阿霉素脂质体包封率及外观良好, 具有一定的缓释效果。

关键词: 粉防己碱阿霉素脂质体; 硫酸铵pH梯度法; 释放

中图分类号: R283.6; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)02-0215-06

Preparation of tetrandrine-doxorubicin complex liposomes and its release property in vitro

PAN Feng, HU Chun-mei, PAN Li-jun, WANG Chi

(College of Pharmacy, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract : Objective Selecting doxorubicin and tetrandrine as model drug to prepare complex liposomes, study the methods of preparation, and research its release property *in vitro*. **Methods** The formulation of tetrandrine-doxorubicin complex liposomes was optimized by three different kinds of methods. And the optimum formula was selected through the orthogonal test according to the entrapment efficiency. **Results** Tetrandrine-doxorubicin complex liposomes were prepared by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -gradient method combined with pH gradient method. One optimum recipe was founded that tetrandrine-doxorubicin complex liposomes/ egg phosphatidyl choline was 1:20, egg phosphatidyl choline/ cholesterol was 3:1, pH value was 7.6, incubation temperature was 50℃, concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was 250 mmol/L. The doxorubicin completely released within 24 h, and the tetrandrine released within 16 h. **Conclusion** Tetrandrine-doxorubicin complex liposomes have high entrapment efficiency with fine-looking, which is better for the further studies

Key words: tetrandrine-doxorubicin complex liposomes; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -pH gradient method; release

粉防己碱是千金藤属防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的主要活性成分, 化学结构属于双苄基异喹啉类化合物。粉防己碱具有抑制肿瘤细胞生长、放疗增敏、减轻放疗、化疗毒性反应、逆转肿瘤细胞多药耐药等多种作用, 在肿瘤治疗中展现广泛的应用前景^[1]。粉防己碱能逆转多种耐药细胞株的耐药, 逆转作用明显优于维拉帕米以及其他中药单体^[2], 且毒性较低。还能够逆转多药耐药的粉防己碱与阿霉素制成复合脂质体, 不仅降低了阿霉素的毒性, 而且由于脂质体可以提高渗透性与停滞的效果, 使其能够达到被动靶向的作用, 增加药物在实体瘤上的蓄积, 从而用低于常规化疗剂量可达到相同的化疗效果。因此本实验将粉防己碱与阿霉素同时装载于脂质体中, 制成可逆转多药耐药

脂质体, 并经过试验筛选, 确定了硫酸铵梯度法合并pH梯度法制备复合脂质体, 并对其进行了稳定性与体外释放度的研究。

1 仪器与材料

1100 高效液相色谱仪、1100 检测器及色谱数据处理系统(美国 Agilent), Sartorius BS210S 电子天平(德国 Sartorius 公司), KQ2200B 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), WH-1 型旋涡仪(上海沪西分析仪器厂), pH S-3C 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂)。

粉防己碱原料药为实验室自制, 质量分数为98%, 阿霉素原料药由浙江海正药业股份有限公司提供, 胆固醇(广州天马精细化工厂), 卵磷脂(上海国药集团化学试剂有限公司), PBS 缓冲液(pH

* 收稿日期: 2008-06-06

作者简介: 潘峰(1983—), 女, 重庆人, 重庆医科大学药学院生物制药与生物医用材料在读硕士研究生, 主要研究方向为靶向药物制剂。
E-mail: ppff-034@163.com

* 通讯作者 王驰 Tel: (023) 68485578 E-mail: wchi639@sohu.com

7. 4) (自制), Sepharose CL-4B (Sigma 公司), 透析袋 (MW 12 000 ~ 14 000) (Sigma 公司), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 CHCl_3 、 Na_2HPO_4 (重庆川东化工厂), 混合纤维微孔滤膜 (0.2、0.45、0.8 μm) (上海市新亚净化器件厂), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 脂质体制备方法的筛选

2.1.1 薄膜法: 卵磷脂与胆固醇按质量 4 : 1 比例溶于 10 mL 氯仿中, 40 °C 旋转减压蒸发除去氯仿, 在瓶壁内形成均匀的脂质薄膜, 40 °C 真空干燥过夜。加入 10 mL 含有 5 mg 阿霉素、2.5 mg 粉防己碱的 PBS 缓冲液, 搅拌使膜溶解, 放置 2 h 使其充分水化, 间歇超声 10 min, 过 0.2 μm 滤膜, 即得。

2.1.2 硫酸铵梯度法: 卵磷脂与胆固醇按质量 4 : 1 比例溶于 10 mL 氯仿中, 40 °C 旋转减压蒸发除去氯仿, 在瓶壁内形成均匀的脂质薄膜, 40 °C 真空干燥过夜。加入 10 mL 125 mmol/L 硫酸铵溶液, 60 °C 水化 30 min 后, 间歇超声 5 min, 置于透析袋中, 于 PBS 液中透析, 2000 mL/次, 共透析 2 次, 6 h/次, 依此过 0.8、0.45、0.2 μm 微孔滤膜两次, 形成空白脂质体。在上述空白脂质体中滴入含 5 mg 阿霉素、2.5 mg 粉防己碱的溶液, 混匀, 水浴 50 °C 孵育 20 min, 即得。

2.1.3 硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法: 卵磷脂与胆固醇按质量 4 : 1 比例溶于 10 mL 氯仿中, 40 °C 旋转减压蒸发除去氯仿, 在瓶壁内形成均匀的脂质薄膜, 40 °C 真空干燥过夜。加入 10 mL 125 mmol/L 硫酸铵溶液, 60 °C 水化 30 min 后, 间歇超声 5 min, 置于透析袋中, 于 PBS 液中透析, 2 000 mL/次, 共透析 2 次, 6 h/次, 依此过 0.8、0.45、0.2 μm 微孔滤膜两次, 形成空白脂质体。在上述空白脂质体中滴入含 5 mg 阿霉素溶液, 混匀, 水浴 50 °C 孵育 30 min。加入 Na_2HPO_4 调节外水相 pH 值为 7.2, 滴入含有粉防己碱 2.5 mg 的溶液, 混匀, 水浴 50 °C 孵育 30 min, 即得。

2.2 粉防己碱的 HPLC 法的测定

2.2.1 色谱条件: 色谱柱为 Lichrospher C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温为 25 °C, 流动相为乙腈-20 mmol/L 磷酸二氢钾-三乙胺 (80 : 20 : 0.06), 检测波长为 282 nm, 体积流量为 1 mL/min, 进样量为 50 μL 。在此色谱条件下粉防己碱得到很好分离, 保留时间为 11.8 min。

2.2.2 标准曲线的制备: 精密称取粉防己碱对照品适量, 加甲醇制成 100 $\mu\text{g/mL}$ 溶液, 作为对照品溶

液。精密吸取上述该溶液分置于 1 mL 量瓶中, 制成质量浓度为 0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 粉防己碱对照品溶液, 加甲醇稀释并定容至刻度, 混匀, 各取 50 μL 进样, 记录峰面积。以峰面积 (A) 与质量浓度 (C) 作线性回归, 回归方程为 $A = 37.934 C + 6.5978$, $r = 0.9998$ 。结果表明粉防己碱在 0.5 ~ 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积线性关系良好。

2.2.3 回收率试验: 精密量取 0.5 mL 空白脂质体溶液, 分别加入至 0.05、0.50、2.50 mL 100 $\mu\text{g/mL}$ 粉防己碱对照品溶液中, 每个样品各 3 份, 以适量 Triton X-100 破乳后, 用甲醇定容至 10 mL。根据测得的粉防己碱的量与加入粉防己碱量的比值计算回收率。结果低、中、高 3 个质量浓度的回收率分别是 104.0%、100.4%、100.6%。可见辅料对测定没有干扰。

2.3 阿霉素的紫外分光光度法测定

2.3.1 检测波长: 用 pH 7.4 PBS 缓冲液配制一定质量浓度的阿霉素标准品溶液, PBS 缓冲液为空白在 220 ~ 600 nm 波长处进行扫描, 根据扫描图谱选用可见光区吸收波长 480 nm 作为 PBS 的检测波长。

2.3.2 标准曲线的制备: 精密称取阿霉素标准品 10 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加 pH 7.4 PBS 缓冲液溶解定容, 混匀, 即得 100 $\mu\text{g/mL}$ 标准储备液。精密吸取上述标准储备液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 mL, 加至 10 mL 量瓶中, PBS 缓冲液稀释并定容至 10 mL 刻度, 混匀即得质量浓度为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0、60.0 $\mu\text{g/mL}$ 阿霉素标准液。以 PBS 为空白, 480 nm 波长处测定以上各溶液的吸光度值。以吸光度值 (A) 对阿霉素质量浓度 (C) 进行线性回归, 回归方程为 $A = 0.0189 C - 0.0065$, $r = 0.9995$ 。结果表明, 阿霉素在 1.0 ~ 60.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.4 包封率的比较: 取粉防己碱阿霉素脂质体混悬液 0.5 mL 上 Sepharose CL-4B 葡聚糖凝胶柱, 用 PBS 缓冲液以 0.3 mL/min 洗脱, 分离脂质体和游离药物, 收集 4 ~ 18 mL 洗脱液, UV 检测脂质体中阿霉素质量浓度, HPLC 检测粉防己碱质量浓度, 计算包封率 (包封率 = 包入脂质体的药物质量 / 投入的总药物质量 × 100%)。上述 3 种脂质体制备方法的包封率结果见表 1。通过以上 3 种方法的比较, 硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法的包封率最好, 此法极大的提高了脂质体中阿霉素与粉防己碱的包封率。因此, 确立了硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法作为复

表 1 不同制备方法的包封率比较

Table 1 Comparison of entrapment efficiency of tetrandrine-doxorubicin complex liposomes prepared by three methods

制备方法	包封率/ %	
	阿霉素	粉防己碱
薄膜法	35.29	27.31
硫酸铵梯度法	90.92	48.61
硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法	90.01	75.60

方脂质体的制备方法,下一步考察相关因素对包封率的影响。

2.5 单因素考察复方脂质体的处方和工艺:固定其他的条件不变,改变单个因素,以包封率为主要考察指标,同时观察脂质体的形态、放置是否沉淀来考察其处方和工艺。

2.5.1 孵育时间的影响:硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法制备脂质体,孵育时间分别为 5、10、20、25、30、35、40、45 min,孵育温度为 50℃,硫酸铵浓度为 125 mmol/L,外水相 pH 值为 7.2,卵磷脂与胆固醇质量比例为 4:1,药物与脂质质量比为 1:20,不同孵育时间制备的脂质体包封率结果见图 1。结果显示包封率随着孵育时间的延长而增大,当孵育时间为 30 min 时,包封率曲线趋于平缓,故选择 30 min 作为温育时间。

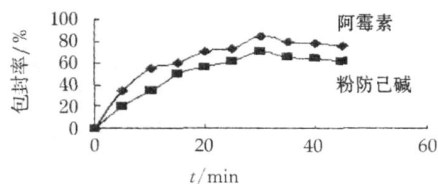


图 1 不同孵育时间对包封率的影响

Fig. 1 Effect of various incubation times on entrapment efficiency

2.5.2 孵育温度的影响:硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法制备脂质体,硫酸铵浓度为 125 mmol/L,卵磷脂与胆固醇质量比例为 4:1,药物与脂质质量比为 1:20,孵育温度分别为 30、40、50、60、70℃,孵育 30 min,外水相 pH 值为 7.2,不同孵育温度对制备的脂质体包封率影响见图 2。结果显示包封率随温度升高而增加,当温度升高到 50℃ 时达到平台,故选择 50℃ 作为孵育温度。

2.5.3 卵磷脂与胆固醇质量比例的影响:硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法制备脂质体,药物与脂质质量比为 1:20,硫酸铵浓度为 125 mmol/L,水浴 50℃ 孵育 30 min,外水相 pH 值为 7.2,卵磷脂与胆固醇质量比例为 2:1、4:1、8:1,对制备的脂质体包封

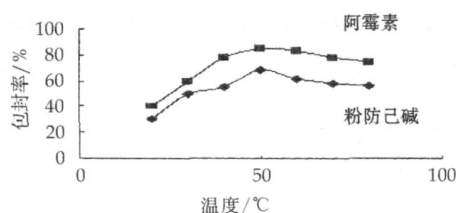


图 2 不同孵育温度对包封率的影响

Fig. 2 Effect of various incubation temperatures on entrapment efficiency

率影响结果见表 2。结果显示随着卵磷脂与胆固醇质量比例的增加,包封率有上升的趋势,同时卵磷脂与胆固醇质量比例为 8:1 时制备所得脂质体有少许沉淀现象,可见其比例对包封率有影响,故选择卵磷脂与胆固醇质量比例为 4:1。

表 2 不同卵磷脂与胆固醇质量比例下的包封率

Table 2 Effect of different proportions of egg phosphatidyl choline and cholesterol on entrapment efficiency

卵磷脂与胆固醇质量比例	包封率/ %	
	阿霉素	粉防己碱
2:1	36.07	28.67
4:1	85.56	67.02
8:1	87.31	69.57

2.5.4 硫酸铵浓度的影响:硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法制备脂质体,卵磷脂与胆固醇质量比例为 4:1,药物与脂质质量比为 1:20,水浴 50℃ 孵育 30 min,调节硫酸铵浓度分别为 125、250、300 mmol/L 时对脂质体包封率的影响,结果见表 3。从结果可知,随着硫酸铵浓度的增加,包封率有所增加。

表 3 硫酸铵浓度对包封率的影响

Table 3 Effect of different ammonium sulfate concentration on entrapment efficiency

硫酸铵浓度/ (mmol · L ⁻¹)	包封率/ %	
	阿霉素	粉防己碱
125	50.95	35.67
250	85.61	68.55
300	86.68	69.53

2.5.5 药物与脂质质量比的影响:硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法制备脂质体,药物与脂质质量比为 1:5、1:10、1:20,卵磷脂与胆固醇质量比例为 4:1,硫酸铵的浓度为 275 mmol/L,水浴 50℃,孵育 30 min。不同药物与脂质质量比制备的脂质体的包封率见表 4。结果显示,随着药物与脂质质量比的增大,包封率逐渐上升。

2.5.6 外水相 pH 值的影响:pH 梯度法制备脂质体,跨膜 pH 梯度是影响包封率最主要的因素。疏

表 4 不同药物与脂质质量比对包封率的影响

Table 4 Effect of ratio of (tetrandrine + doxorubicin)/ egg phosphatidyl choline on entrapment efficiency

药物/ 脂质	包封率/ %	
	阿霉素	粉防己碱
1 5	50. 67	40. 27
1 10	79. 30	66. 81
1 20	88. 14	79. 18

酸铵梯度法结合 pH 梯度法制备脂质体, 加入 Na_2HPO_4 调节外水相 pH 值为 6. 8、7. 2、7. 6、8. 0, 其他因素不变, 制备的脂质体包封率见表 5。结果表明, 外水相 pH 值对脂质体包封率有重要影响, 特别是对粉防己碱的包封率有明显影响。随着外水相 pH 值的升高, 粉防己碱包封率明显升高。

2. 5. 7 超声时间的影响: 在制备空白脂质体时, 当超声时间在 10 min 以上时, 所得脂质体形态均匀, 无沉淀聚集等现象发生, 故选取超声时间为 10 min。

表 5 不同外水相 pH 值对包封率的影响

Table 5 Effect of different pH values on entrapment efficiency

pH 值	包封率/ %	
	阿霉素	粉防己碱
6. 8	80. 14	65. 18
7. 2	87. 95	68. 91
7. 6	89. 63	82. 81
8. 0	85. 29	83. 63

2. 6 正交设计法优选最佳处方: 采用单因素筛选的条件, 初步制定粉防己碱阿霉素脂质体的制备处方, 在此基础上采用 $L_9(3^4)$ 的正交设计方案, 选择对粉防己碱包封率影响较大的药物与脂质质量比(A)、卵磷脂与胆固醇质量比例(B)、硫酸铵浓度(C)、外水相 pH 值(D) 4 个因素作为考察因素, 每个因素取 3 个水平, 经过 9 个处方的试验, 以阿霉素、粉防己碱的包封率为指标, 计算综合评分[综合评分 = (粉防己碱包封率 + 阿霉素包封率) $\times 0. 5$], 选择最佳制备条件。正交试验设计及结果见表 6。

表 6 粉防己碱阿霉素脂质体的正交设计结果

Table 6 Design and results of orthogonal test of tetrandrine-doxorubicin complex liposomes

试验号	A	B	C	D	粉防己碱 包封率/ %	阿霉素包 封率/ %	综合评 分
1	1(1 15)	1(3 1)	1(225)	1(7. 4)	78. 22	86. 24	82. 23
2	1(1 15)	2(4 1)	2(250)	2(7. 6)	81. 07	85. 36	83. 22
3	1(1 15)	3(5 1)	3(275)	3(7. 8)	70. 35	87. 21	78. 78
4	2(1 20)	1(3 1)	2(250)	3(7. 8)	78. 12	85. 77	81. 45
5	2(1 20)	2(4 1)	3(275)	1(7. 4)	79. 45	86. 89	83. 17
6	2(1 20)	3(5 1)	1(225)	2(7. 6)	82. 43	87. 65	85. 04
7	3(1 25)	1(3 1)	3(275)	2(7. 6)	82. 73	84. 24	83. 49
8	3(1 25)	2(4 1)	1(225)	3(7. 8)	47. 21	85. 33	66. 27
9	3(1 25)	3(5 1)	2(250)	1(7. 4)	66. 53	88. 69	77. 61
K_1	81. 41	82. 39	77. 85	81. 00			
K_2	83. 22	77. 55	80. 76	83. 92			
K_3	75. 79	80. 48	81. 81	75. 50			
R	7. 43	4. 84	3. 97	8. 42			

采用直观分析法分析, 结果表明, 各因素对包封率的影响程度为 $D > A > B > C$ 。最佳组合为 $A_2B_1C_2D_2$, 即药物与脂质质量比为 1 20、卵磷脂与胆固醇质量比例为 3 1、硫酸铵浓度为 250 mmol/L, 外水相 pH 值为 7. 6。

2. 7 粉防己碱阿霉素脂质体的理化性质

2. 7. 1 形态及粒径的考察: 取适量粉防己碱阿霉素脂质体, 用 PBS 缓冲液稀释后, 滴至载玻片上, 用 2% 磷钨酸负染, 滴至专用铜网上, 自然挥干, 静置使粒子在铜网上沉积, 用透射电镜观察粒径大小和形

态并拍照, 见图 3。可见脂质体外观形态基本圆整, 未发生黏连。

2. 7. 2 包封率的考察: 取最佳工艺下制得的复合脂质体, 测定包封率, 结果阿霉素的包封率为 90. 99% ($n=5$), 粉防己碱的包封率为 80. 12% ($n=5$)。

2. 7. 3 稳定性的考察: 精密量取以上脂质体 0. 5 mL, 充氮保存于 25 与 4 , 分别测定包封率, 计算贮存过程中的渗漏率[渗漏率 = (制备时包封量 - 贮存一定时间后的包封量) / 制备时的包封量 $\times 100\%$], 结果见表 7。

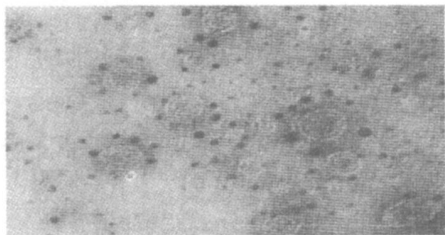


图 3 脂质体透射电镜照片
Fig. 3 Light microscope picture of tetrandrine-doxorubicin complex liposome

表 7 粉防己碱阿霉素脂质体渗漏率的变化

Table 7 Leaking ratio changes of tetrandrine-doxorubicin complex liposomes at different temperatures

温度	渗漏率/ %							
/	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	20 d	30 d
4	0.00	0.43	0.56	0.68	0.85	0.91	0.95	1.05
25	0.00	0.57	0.65	0.87	0.98	1.52	1.64	2.41

脂质体的粒径和分布与稳定性有关,直接影响脂质体在体内的组织分布。当不需要定量测定粒径小分布时,透光率测定法是测定脂质体相对大小的非常实用的方法^[3]。试验过程中以水为空白测定脂质体在 500 nm 处的透光率和吸光值,反映脂质体相对大小的变化情况,吸光值随透光率增加而减小。透光率大表明脂质体粒径相对较小。结果见图 4。

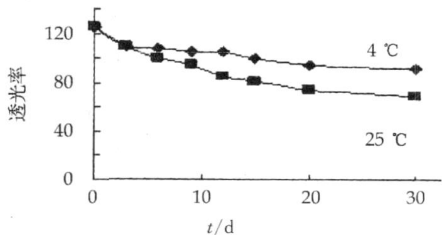


图 4 粉防己碱阿霉素脂质体在不同温度下的透光率变化
Fig. 4 Transmittancy changes of tetrandrine-doxorubicin complex liposomes at different temperatures

2. 7. 4 磷脂的量的测定:采用硫氰铁铵显色法测定磷脂的量^[4]。精密吸取 2 mL 脂质体用适量乙醇裂解后,加硫氰酸铁铵溶液 2.0 mL,再补加氯仿,使每个试管中氯仿的最终体积为 2.0 mL。将以上溶液分别转移至 25 mL 分液漏斗,充分振摇 1 min 静置,取下层,以氯仿为空白,在 488 nm 处测定吸光度,根据标准曲线 $C = 0.4159A - 0.0066$, $r = 0.9996$ 计算磷脂的量,结果见表 8。从结果可知,放置 30 d 内,25 时,脂质体渗漏率明显增加,磷脂的量明显降低,粒径增大明显,说明温度对脂质体稳定性影响较大,在 4 时则相对稳定,故应低温充氮保存。

2. 7. 5 脂质体体外释放试验^[5]:分别取粉防己碱阿

表 8 粉防己碱阿霉素的磷脂的变化

Table 8 Phospholipids changes of tetrandrine-doxorubicin complex liposomes at different temperatures

温度	磷脂/ mg							
/	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	20 d	30 d
4	1.46	1.43	1.41	1.39	1.36	1.35	1.34	1.32
25	1.46	1.40	1.38	1.28	1.24	1.19	1.15	1.05

霉素脂质体和阿霉素、粉防己碱水溶液 5 mL,加入长约 10 cm 的透析袋中,两端扎紧后,悬置于盛有 50 mL PBS(pH 7.4)缓冲液的具塞锥形瓶中,密塞,于 37 水浴恒温振荡,定时取外液 2.0 mL,同时补加等量同温的 PBS 缓冲液。参照复方脂质体的包封率测定方法,测定释药介质中两药物质量浓度,并计算累积释放率 $Q(Q = \text{释药介质中药物的质量} / \text{包入脂质体的药物质量} \times 100\%)$,见图 5。由结果可知,脂质体中阿霉素和粉防己碱分别在 24 h 和 16 h 内释放完全,而水溶液中阿霉素和粉防己碱分别在 8 h 和 4 h 内就释放完全。结果表明脂质体形式对阿霉素和粉防己碱均起到了较好的缓释作用。

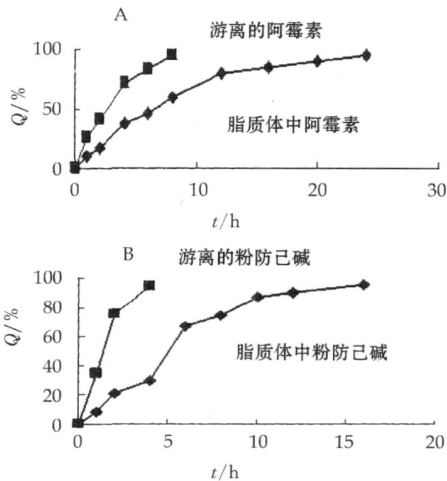


图 5 阿霉素(A)和粉防己碱(B)分别在溶液和脂质体中的累积释放率

Fig. 5 Accumulated release rate of doxorubicin (A) and tetrandrine (B) from water solution of tetrandrine-doxorubicin and tetrandrine-doxorubicin complex liposomes

3 讨论

在制备脂质体中,采用硫酸铵梯度法时,阿霉素取得了较高包封率;粉防己碱属于生物碱,适合采用 pH 梯度法制备,本实验利用 pH 梯度法的原理将粉防己碱包封于脂质体中,使两种药物达到了较高的包封率。经紫外检测阿霉素的包封率平均达到 90.77%,粉防己碱包封率平均达到 80.12%。因此

确定了采用硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法制备粉防己碱阿霉素脂质体。

稳定性的检查是脂质体制备中质量控制的重要环节。该实验对复合脂质体稳定性进行了一系列的检查。发现用硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法制备的粉防己碱阿霉素脂质体需要在 4℃ 充氮气保存下,药物的渗漏率、粒径的大小变化和磷脂含量的变化最小。在后续的实验中,提高复合脂质体稳定性是重要的研究工作之一。

体外释药实验表明脂质体中的药物在 24 h 内几乎全部释放,而游离的药物在 8 h 内就已经释放完全,证明了脂质体具有较好的缓释作用,原因可能与药物被脂质体包裹后形成了难溶盐很难透过脂质体膜有关。此外,药物与脂质膜结合力大小也可能

会对缓释作用产生一定的影响。

本实验通过对粉防己碱阿霉素复方脂质体的工艺优化、稳定性及释放度试验,表明了将两种药物同时封装于同一脂质体的可能,为下一步粉防己碱阿霉素复方脂质体逆转乳腺癌耐阿霉素细胞 MCF-7/DOX 最佳比例试验提供参考。

参考文献:

- [1] Chen YJ. Potential role of tetrandrine in cancer therapy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(12): 1102-1106.
- [2] 潘启超,田 晖. 多种中药单体逆转肿瘤多药耐药性[J]. 科学通报, 1995, 40(20): 38-40.
- [3] 张灵芝. 脂质体制备及其在生物医学中的应用[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 57-58.
- [4] 朱 莉,潘黎军,胡春梅,等. 5-氟尿嘧啶核苷前药脂质体中磷脂含量的测定[J]. 中国药房, 2008, 19(7): 547-548.
- [5] 张 青,朱家璧,邱丽梅. 盐酸左氧氟沙星脂质体的封装率和体外释放研究[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(6): 208-512.

Caco-2 细胞单层研究淫羊藿黄酮类成分的吸收转运

陈 彦¹, 贾晓斌¹, HU Ming^{2*}

(1. 江苏省中医药研究院, 江苏省现代中药制剂工程技术研究中心, 江苏 南京 210028;

2. University of Houston, Houston 77030, USA)

摘要:目的 研究淫羊藿黄酮类成分在 Caco-2 细胞模型中的吸收转运。方法 采用超高压液相法测定药物浓度, 计算表观渗透系数 (P_{app}), 研究淫羊藿黄酮 5 个主要成分淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、宝藿苷 在 Caco-2 细胞模型中的双向转运。结果 淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 的吸收渗透系数 (P_{AB}) 较小, 分别为 5.91×10^{-7} 、 3.22×10^{-7} 、 2.76×10^{-7} 、 4.23×10^{-7} cm/s, 宝藿苷 相对较大, 为 1.46×10^{-6} cm/s; 5 个化合物的分泌渗透系数 (P_{BA}) 都比其相应的吸收渗透系数要大, 其中宝藿苷 的分泌渗透系数是其吸收渗透系数的 9.8 倍。结论 淫羊藿黄酮类成分的肠道吸收较差, 可能存在肠道转运蛋白的外排机制, 其中三糖苷 (朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C) 的吸收要小于二糖苷 (淫羊藿苷), 二糖苷的吸收要小于单糖苷 (宝藿苷)。

关键词:淫羊藿黄酮; Caco-2 细胞单层模型; 淫羊藿苷; 渗透系数

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)02-0220-05

Absorption and transportation of flavonoids in Herb Epimedii across Caco-2 monolayer model

CHEN Yan¹, JIA Xiao-bin¹, HU Ming²

(1. Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Modern Chinese Pharmaceutical Preparation, Nanjing 210028, China;

2. University of Houston, Houston 77030, USA)

Abstract: **Objective** To study the absorption and transportation of flavonoids in Herb Epimedii by using Caco-2 monolayer model. **Methods** Caco-2 cell monolayer model was used to study the bi-direction transport of icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, and baohuoside. The concentration of the five flavonoids in cell culture medium was measured by UPLC and the apparent permeability coefficients (P_{app}) were calculated. **Results** The absorptive permeability coefficients (P_{AB}) of icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, and baohuoside were 5.91×10^{-7} , 3.22×10^{-7} , 2.76×10^{-7} , 4.23×10^{-7} , and

* 收稿日期: 2008-04-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572372)

作者简介: 陈彦 (1968—), 女, 江苏南京人, 副研究员, 博士, 江苏大学硕士生导师, 中华中医药学会炮制分会委员, 美国休斯顿大学高级访问学者, 主要从事中药制剂学研究, 特别在中药多组分离子型, 如中药滴丸、多组分微丸、复方微乳等研究领域。

Tel: (025) 85608672 E-mail: ychen202@yahoo.com.cn