

• 制剂与质量 •

主动载药法制备盐酸去氢骆驼蓬碱脂质体

杜松, 邓英杰, 张威

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 制备高包封率的盐酸去氢骆驼蓬碱脂质体。方法 处方前研究测定了药物在不同 pH 值缓冲液中的溶解度和表观油水分配系数;采用 pH 梯度进行主动载药。超滤法分离脂质体与游离药物,测定包封率,考察了外水相 pH 值、孵育温度、药脂比对包封率的影响。结果 随 pH 值的增大,盐酸去氢骆驼蓬碱的溶解度降低,表观油水分配系数增大;采用主动载药法,包封率随脂质体内外相 pH 梯度的减少而降低,受孵育温度的影响不大,在药脂比小于 1:5 时脂质体包封率达到 80% 以上。结论 主动载药法可制得包封率较高的去氢骆驼蓬碱脂质体。

关键词:盐酸去氢骆驼蓬碱;脂质体;包封率;pH 梯度;主动载药

中图分类号:R283.6; R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)05-0673-04

Preparation of harmine hydrochloride liposome by active loading method

DU Song, DENG Ying-jie, ZHANG Wei

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To prepare a harmine hydrochloride liposome formulation with high encapsulation efficiency. **Methods** Preformulation investigation was carried out to obtain the drug physicochemical properties such as solubility and $\lg D$ in buffers of different pH value. Harmine hydrochloride was encapsulated into liposomes by active loading method. Encapsulation efficiency of liposomes was determined after the free drug was separated from liposome by ultrafiltration. The influence factors on the encapsulation efficiency including drug-lipid weight ratio, incubation temperature, pH value of external water phase were investigated. **Results** As the pH value increasing, the solubility of harmine hydrochloride was decreased, while the apparent oil-water distribution coefficient was increased. By active loading method, the encapsulation efficiency could be over 80% when the drug to lipid weight ratio was under 1:5. The pH gradient between intervesicle and intravesicle obviously influenced the encapsulation efficiency, while incubation temperature had little effect on encapsulation efficiency. **Conclusion** Active loading is suitable for preparing harmine hydrochloride liposome with high encapsulation efficiency.

Key words: harmine hydrochloride; liposome; encapsulation efficiency; pH gradient; active loading

去氢骆驼蓬碱(harmine)是骆驼蓬 *Peganum harmala* Linn. 种子中分离的一种 β -咔保啉类生物碱。去氢骆驼蓬碱具有中枢神经系统和单胺氧化酶的抑制作用、辐射防护作用、抗包虫作用和广泛的抗肿瘤活性,用于治疗肝癌等癌症^[1]。近年来对去氢骆驼蓬碱开展了许多新剂型研究,主要有脂质体^[2]、乳剂^[3]、脉冲释放胶囊^[4]、微球^[5]等。脂质体具有被动靶向的作用,可使药物较多的分布在肝、脾等巨噬细胞丰富的器官,从而提高这些器官的血药浓度,降低全身的药物浓度,对提高去氢骆驼蓬碱抗寄生虫和抗肝癌疗效、降低药物不良反应等方面起到很好的作用。

采用乙醚注入法制备去氢骆驼蓬碱脂质体,包封率仅有 30%^[2]。采用添加双十六烷基磷酸脂(DCP)负电荷脂类制成去氢骆驼蓬碱多层脂质体,包封率有所提高,达到 65%^[6],但 DCP 为合成磷脂,价格较贵,且在体内不能被代谢。为了更好的发挥药效,需要寻找较高包封率的脂质体的制备方法。pH 梯度法已经成功的将许多弱碱性的药物包封入脂质体^[7],如抗癌药物阿霉素、长春新碱、拓扑替康等,可以达到很高的包封率。本实验进行了去氢骆驼蓬碱 pH 梯度法主动载药研究,以期制得较高包封率的脂质体。

1 仪器和试剂

收稿日期:2004-07-01

作者简介:杜松(1975-),男,黑龙江省佳木斯市人,博士研究生,从事药物新剂型科研工作。

Tel: (024) 23917603 E-mail: dusong75@yahoo.com.cn

UV—9100 型紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);ZFQ85A 型旋转蒸发器(上海医械专机厂);Lipex 挤出仪(加拿大 Northernlipids);微孔滤膜(上海新亚净化器厂);HPLC 高效液相色谱仪:SPD—10AVP 紫外可见检测器,LC—10ATVP 泵(日本岛津)。

盐酸去氢骆驼蓬碱(质量分数 98%)由新疆医科大学孙殿甲教授赠送;大豆磷脂(EPIKURON 200,PC 质量分数 >93%,德国 Degussa);胆固醇(沈阳市医药公司,进口分装);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 盐酸去氢骆驼蓬碱的测定

2.1.1 色谱条件:色谱柱:Kromasil C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-50 mmol/L 磷酸(三乙胺调 pH 至 3)(50 : 50);体积流量:0.8 mL/min;柱温:室温;检测波长:320 nm;进样量:20 μL。

2.1.2 标准曲线的制备:精密称取盐酸去氢骆驼蓬碱对照品 25.0 mg,置 25 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,制得 1.0 mg/mL 对照品溶液。分别精密吸取该溶液适量,用蒸馏水稀释制成 0.1、0.5、3.0、5.0、10.0、15.0、20.0 μg/mL 的系列溶液,按上述色谱条件进行测定。以峰面积积分值(A)为横坐标,质量浓度(C)为纵坐标进行线性回归,得回归方程: $C = 225.144 A - 1.460$, $r = 0.9995$,表明盐酸去氢骆驼蓬碱在 0.1~20.0 μg/mL 与峰面积积分值有良好的线性关系。

2.2 处方前研究

2.2.1 不同 pH 条件下盐酸去氢骆驼蓬碱溶解度的测定:50 mmol/L 柠檬酸溶液和 150 mmol/L 碳酸钠溶液按不同比例混合,配制成 pH 值分别为 3.62、5.73、6.60、8.16、8.37 的缓冲溶液。分别精密称取去氢骆驼蓬碱对照品适量,置 10 mL 量瓶中,加不同 pH 值的缓冲溶液至刻度,超声,制成不同 pH 值盐酸去氢骆驼蓬碱过饱和溶液,放置 24 h,吸取上清液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,滤液稀释至线性范围,按上述色谱条件进行测定,标准曲线法计算去氢骆驼蓬碱的质量浓度,得去氢骆驼蓬碱不同 pH 值下的溶解度,结果见表 1。

2.2.2 不同 pH 条件下盐酸去氢骆驼蓬碱表观油水分配系数的测定:精密吸取不同 pH 值去氢骆驼蓬碱溶液 5 mL,置三角瓶中,分别与水和正辛醇 5 mL 混合,25 °C 水浴中振荡 2 h,取出静置,2 000 r/min 离心 10 min,取水相适量,用水将其质量浓度

稀释至线性范围,按上述色谱条件进行测定。以初始水相的药物质量浓度与正辛醇萃取后水相药物质量浓度差作为正辛醇相质量浓度,计算表观油水分配系数 $D = C_{\text{正辛醇}} / C_{\text{水}}$,计算 lgD,结果见表 1。

表 1 不同 pH 缓冲液中盐酸去氢骆驼蓬碱溶解度和表观油水分配系数

Table 1 Solubility and apparent oil-water distribution coefficient of harmine hydrochloride in buffers with different pH values

pH 值	溶解度/(mg · mL ⁻¹)	lgD
3.62	44.59	0.30
5.73	32.38	1.43
6.60	1.56	2.45
8.16	0.04	2.49
8.37	0.0003	未测

2.3 盐酸去氢骆驼蓬碱脂质体的制备

2.3.1 空白脂质体的制备:按质量比 4 : 1 称取磷脂和胆固醇,用适量的氯仿溶解,减压蒸发,得磷脂膜。加入 50 mmol/L 柠檬酸溶液(pH 2.0)水化,制备空白脂质体。将所得的脂质体依次通过 0.80、0.45、0.22 μm 微孔滤膜,不同孔径滤膜各滤过 5 次,进行整粒,制得粒径均匀的空白脂质体。

2.3.2 主动载药工艺:吸取 1 mL 整粒后的空白脂质体,加入适量 10 mg/mL 盐酸去氢骆驼蓬碱溶液,并用 150 mmol/L 碳酸钠溶液将外相 pH 值调至近中性,置 50 °C 水浴中温育 10 min,然后用 5% 葡萄糖溶液定容至 10 mL 量瓶中,即得盐酸去氢骆驼蓬碱脂质体。

2.4 影响包封率的因素考察

2.4.1 包封率的测定方法:对于含有生物碱的脂质体来说,阳离子交换树脂可以吸附游离未包封的生物碱药物,而不吸附含药的脂质体,可以较方便的测定其包封率。实验中发现盐酸去氢骆驼蓬碱不能被阳离子交换树脂完全吸附,不宜用此法测定脂质体的包封率。最终选用超滤法分离游离药物和脂质体,并采用紫外分光光度法测定包封率。

因不同 pH 值下药物的紫外吸收值不同,制定了不同 pH 值下测定药物的标准曲线。精密称取适量盐酸去氢骆驼蓬碱对照品,用蒸馏水制成 10 mg/mL 盐酸去氢骆驼蓬碱溶液。分别取 50 mmol/L 柠檬酸溶液(pH 2.0) 0.8 mL 置 10 mL 量瓶中,加入 150 mmol/L 碳酸钠溶液 0.5 mL,加入 10 mg/mL 盐酸去氢骆驼蓬碱溶液适量,用 5% 葡萄糖溶液稀释,分别制成 10.0、12.5、15.0、17.5、20.0 μg/mL 盐酸去氢骆驼蓬碱对照品溶液,于 301 nm 测吸光

度值(A)。以 A 为横坐标,质量浓度(C)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程 $C=0.035 A-0.024 2$, $r=0.999 9$ (pH 6.8),表明盐酸去氢骆驼蓬碱在 10.0~20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 A 具有良好的线性关系。

另外以 50 mmol/L 柠檬酸溶液 (pH 2.0) 0.8 mL,分别加入 150 mmol/L 碳酸钠溶液 0.4、0.3 mL,同法制得 pH 5.9 和 pH 5.3 盐酸去氢骆驼蓬碱溶液,回归方程分别为 $C=0.050 A-0.123 6$, $r=0.999 9$ (pH 5.9) 和 $C=0.050 A-0.111 1$, $r=0.999 8$ (pH 5.3),表明盐酸去氢骆驼蓬碱在 10.0~20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (pH 5.9) 和 7.7~23.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (pH 5.3) 与吸光度具有良好的线性关系。

吸取盐酸去氢骆驼蓬碱脂质体适量,用 5% 葡萄糖溶液稀释,超滤,滤液用蒸馏水将其质量浓度稀释到线性范围,在 301 nm 测 A,代入标准曲线方程计算相应的质量浓度,按下式计算包封率。

$$E=(C_T-C_H)/C_T \times 100\%$$

E 为包封率; C_T 为加入脂质体中药物总质量浓度; C_H 为超滤后的游离药物的质量浓度

2.4.2 不同 pH 梯度的影响:吸取空白脂质体 1 mL 各 3 份,分别加入不同量的 150 mmol/L 碳酸钠溶液调外相的 pH 值,用 pH 梯度法载药。在不同的 pH 梯度下,药物的包封率不同,包封率随外水相 pH 值的减小而降低,结果见表 2。

表 2 外水相不同 pH 下药物的包封率

Table 2 Encapsulation efficiency of harmine hydrochloride in various intravesicle with different pH values

碳酸钠用量/mL	脂质体外水相 pH	包封率/%
0.3	5.3	44.60
0.4	5.9	83.20
0.5	6.8	90.26

2.4.3 温度对包封率的影响:吸取空白脂质体 1 mL,加入 150 mmol/L 碳酸钠溶液调节外相 pH 6.8,然后加入盐酸去氢骆驼蓬碱 6 mg,按主动载药工艺进行载药。孵育温度分别为 20、55 $^{\circ}\text{C}$,孵育 10 min。包封率结果见表 3。可见温度对脂质体包封率几乎没有影响,说明药物较容易穿过磷脂膜,达到很高的包封率。

表 3 孵育温度对脂质体包封率的影响

Table 3 Influence of incubation temperature on encapsulation efficiency

孵育温度/ $^{\circ}\text{C}$	孵育时间/min	包封率/%
20	10	85.3
55	10	87.8

2.4.4 药脂比对包封率的影响:取空白脂质体 1 mL 3 份,各加入 150 mmol/L 碳酸溶液调节外相

pH 6.8,按药物与磷脂的质量比为 1:20、1:10、1:5,按主动载药工艺进行载药。脂质体的包封率见表 4。表明药脂比小于 1:5 时,脂质体的包封率可达 80% 以上。

表 4 药脂比对脂质体包封率的影响

Table 4 Influence of drug-lipid weight ratio on encapsulation efficiency

药脂比/($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	包封率/%
1:20	89.20
1:10	90.37
1:5	90.19

3 讨论

文献报道去氢骆驼蓬碱的解离常数 pK_a 为 7.70^[8]。处方前实验研究表明,在 pH 值高于 6.6 时去氢骆驼蓬碱的溶解度较低,容易析出。而在 pH 值低于 6.6 时,则有较高的溶解度。实验中选择 pH 值 6.8 左右,此时药物具有较高的溶解度和较高的油水分配系数,可增大脂质体的载药量。

实验中发现孵育温度对药物的包封率影响不大,与文献报道^[9]的小檗碱脂质体主动载药受温度影响较大的结论不同,可能与药物的理化性质有关。

通常而言,将药物装载于脂质体之中有被动载药法和主动载药法两大类方法。被动载药法是指药物的装载和脂质体的形成同时完成。对于水溶性药物,如果与磷脂没有相互作用,一般被动载药包封率都不同。这也是以往采用乙醚注入法的包封率不到 30% 的原因。引入负电荷脂质双十六烷基磷酸脂 (DCP) 制备的多层脂质体,可在 pH 7.2 时与带正电药物产生相互作用,因而包封率得到一定的提高。pH 梯度主动载药法通常包含两个步骤:即先形成空白脂质体,随后在脂质体膜内外形成 pH 梯度,使加入的药物穿越脂质体膜,主动载入脂质体中。选择好合适的条件,可以达到较高的包封率。

中药中有众多的生物碱有效成分,采用 pH 梯度主动载药法制得高包封率的生物碱脂质体制剂,可以降低药物不良反应,提高疗效,更好地发挥药物的作用。

感谢新疆医科大学孙殿甲教授、李岩博士赠送盐酸去氢骆驼蓬碱。Degussa (德固赛) 公司赠送大豆磷脂。

References:

[1] Sun D J, Li Y. Advance on the research of *Reganum harmala* L. and the major constituent harmine [J]. *J Xinjiang Med Univ* (新疆医科大学学报), 2003, 26 (2): 125-128.
 [2] Zhang X N, Sun D J, Li G H. Study on liposome of harmine [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 1994, 25 (10):

- 441-443.
- [3] Gao X L, Sun D J, Cheng L Y, *et al.* Study on phase distribution and release *in vitro* of harmine emulsion for intravenous injection [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 22 (2): 111-115.
- [4] Sun D J, Wang C H, Kou Y H. A research on pulse-released capsule of harmine hydrochloride [J]. *J Xinjiang Med Univ* (新疆医科大学学报), 2003, 26 (2): 103-105.
- [5] Li Y, Sun D J, Yang Y X, *et al.* Study of harmine hydrochloride gelatin microspheres for hepatic arterial embolization on preparation [J]. *J Xinjiang Med Univ* (新疆医科大学学报), 2003, 26 (2): 109-112.
- [6] Lala S, Pramanick S, Mukhopadhyay S, *et al.* Harmine: evaluation of its antileishmanial properties in various vesicular delivery systems [J]. *Drug Target*, 2004, 12 (3): 165-175.
- [7] Mayer L D, Madden T D, Bally M B, *et al.* pH Gradient-mediated drug entrapment in liposomes [A]. Gregoriadis G. *Liposome Technology* [M]. Boca Raton: CRC Press, 1993.
- [8] *Merk Index* [S]. 13 th. 2001.
- [9] Deng Y H, Wang S N, Wu Q, *et al.* Preparation of berberine hydrochloride liposomes by active loading method [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2004, 39 (1): 40-42.

知母微粉的溶出及活性研究

张陆军¹, 王伟¹, 邢东明¹, 盖国胜², 苏慧¹, 何希辉³, 杜力军¹

(1. 清华大学 生物科学与技术系, 北京 100084; 2. 清华大学 材料系, 北京 100084;
3. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

摘要:目的 观察知母微粉体外成分溶出以及体内活性, 对微细化工艺在中药中的应用进行评价。方法 采用 HPLC 法定量芒果苷, 比较知母微粉和知母粉中芒果苷溶出速度及不同时间点溶出百分率; 采用小鼠悬尾和强迫游泳试验, 测定最大耐受量, 观察知母微粉与知母提取物体内活性和安全性。结果 体外溶出时, 知母微粉中芒果苷的溶出速度较知母粉明显加快, 在不同时间点芒果苷的溶出百分率亦有所提高; 以相同治疗剂量给药时, 知母微粉与知母提取物表现出相当的作用, 知母微粉最大给药剂量为 20 g/kg。结论 知母制成微粉后能在一定程度上改善体外成分的溶出和体内活性。

关键词:知母; 微细化工艺; 溶出度

中图分类号:R286.02; R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)05-0676-04

Dissolution and effect of *Anemarrhena asphodeloides* micropowder prepared by super fine crushing technique

ZHANG Lu-jun¹, WANG Wei¹, XING Dong-ming¹, GAI Guo-sheng²,
SU Hui¹, HE Xi-hui³, DU Li-jun¹

(1. Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Department of Materials, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 3. Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Abstract: Objective To investigate the ingredients dissolution and bioactivities of *Anemarrhena asphodeloides* micropowder prepared by super fine crushing technique. **Methods** The dissolution of the marker ingredient—mangiferin of the micropowder was compared with that of the normally processed powder by HPLC for mangiferin; the anti-depression effect of the micropowder and *A. asphodeloides* extract was investigated in tail suspension test and forced-swimming test. Meanwhile, toxicities were evaluated by the determination of the maximum tolerated dose (MTD). **Results** The dissolution velocity of mangiferin in the micropowder was more obviously improved than that in the common powder and the dissolution percentages at different intervals had been increased slightly. The micropowder showed as much anti-depression effect as that of the *A. asphodeloides* extract when administered at the same dosage, while they both resulted in relatively obvious toxicity reactions (MTD is 20 kg/g). **Conclusion** Super fine crushing technique can help to improve the ingredients dissolution rate and bioactivities of *A. asphodeloides* micropowder without bringing about additional toxicity.

Key words: *Anemarrhena asphodeloides* Bunge; super fine crushing technique; dissolution

收稿日期: 2004-08-05

基金项目: 清华大学基础研究资金资助项目(JC2001050)

作者简介: 张陆军(1977—), 男, 安徽肥西人, 博士研究生, 主要从事药理学、心脑血管药理学研究以及中药新产品的研发。

Tel: (010) 62796270 Fax: (010) 62773630 E-mail: zhanglujuns@163.com