

胆酸钠/ 磷脂混合胶团对环孢素 A 的增溶作用研究

吴涛¹, 平其能¹, 郭健新¹, 陈颖¹, 沈洁² (1. 中国药科大学药剂学教研室, 江苏 南京 210009; 2. 中国药科大学 2001 届本科毕业生)

摘要:目的 研究胆酸钠/ 磷脂混合胶团对难溶性多肽环孢素 A(CyA) 的增溶作用。方法 采用共沉淀法制备胆酸钠/ 磷脂混合胶团, 并对影响增溶作用的处方及工艺进行考查。结果 相同胆酸钠浓度条件下, 混合胶团对 CyA 的增溶能力远大于胆酸钠胶团, 增大混合胶团中的磷脂用量或者降低胆酸钠/ 磷脂(摩尔比) 均有利于提高混合胶团对药物的增溶能力。升高水合温度, 增加水合介质的离子强度, 加入抗氧化剂维生素 E(VE) 及胆固醇, 均不同程度的降低了混合胶团的增溶能力。通过优化各个影响因素可获得最大的增溶量(> 5 mg/ mL), 增加 CyA 溶解度 100 倍以上。结论 胆酸钠/ 磷脂混合胶团可以成为 CyA 等难溶性多肽药物的一种新型增溶载体。

关键词:胆酸钠/ 磷脂混合胶团; 环孢素 A; 增溶

中图分类号: R943.4; R978.16 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2004)02-0140-04

Study on solubilization of CyA by using sodium cholate/ lecithin mixed micelles

WU Tao, PING Qi-neng, GUO Jian-xin, CHEN Ying, SHEN Jie (*Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China*)

ABSTRACT:OBJECTIVE To investigate the effect of solubilization by using sodium cholate/ lecithin mixed micelles on poorly soluble drug, CyA. **METHOD** The mixed micelles was prepared by coprecipitation. The formulation components and preparation procedures which may affect the solubility were studied. **RESULTS** The molar ratio of sodium cholate to lecithin, and their concentration affected the solubility of CyA in the micelles. Ionic strength of the dispersion medium, temperature, and the additives such as VE and cholesterol also altered the solubilization capacity of the micelles. The largest solubility(> 5 mg/ mL) of CyA in the micelles solution can be achieved by optimizing the studied factors. There is a more than 100 fold and 12 fold increase to the solubility of CyA in water and in cholate micellar solution, respectively. **CONCLUSION** It is desirable that mixed micelles can be a new drug carrier system for some poorly soluble drugs.

KEY WORDS: sodium cholate/ lecithin mixed micelles; CyA; solubilization

将难溶性药物制成注射剂, 尤其是静脉注射剂和输液剂 是多年来药剂学上的一个难题。目前通常将难溶性药物成

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(39930200)
作者简介: 吴涛, 男, 硕士研究生; 平其能, 男, 教授, 博士生导师, Tel: 025-3271321

盐或者添加有机溶剂、表面活性剂等方法增加其溶解度,脂质体作为某些难溶性药物制成注射剂的优良载体也有研究报道。胆盐/磷脂混合胶团(bile salt/PC mixed micelles)是国外研究较多的一种胶体溶液系统,特别是近年来广泛用于难溶性药物的增溶。如脂溶性维生素类、紫杉醇、芬拉西泮(氯羟去甲安定)等^[1,2]。本实验研究了胆酸钠/磷脂混合胶团对难溶性多肽药物环孢素A的增溶作用。

1 实验材料

ZFQ85A型旋转蒸发仪(上海医械专机厂);电热恒温水浴(江苏东台电器厂);0.15 μ m微孔滤膜(上海医药工业研究院实验仪器厂);高效液相色谱仪(岛津LG5A,日本);岛津SPD-6A型紫外检测器。

环孢素A(CyA,药用,浙江温州第二制药厂);豆磷脂(PC,上海东尚实业有限公司,批号001105,纯度>92%);胆酸钠(SC,Serva进口分装,批号960426,上海化学试剂站分装厂),去氧胆酸钠(DOSC,Serva进口分装,批号960201,上海化学试剂站分装厂),其化试剂均为市售分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 含量测定方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱,Spherisorb C8(4.6mm $\times$ 150mm);流动相,甲醇-乙醚-水-磷酸(350:10:140:1);柱温,70 $^{\circ}$ C;流速,1.2mL/min;检测波长,UV210nm;进样体积,20 μ L。

2.1.2 标准曲线

精密称取CyA对照品,用无水乙醇配制成100 μ g/mL的标准溶液,分别精密吸取0.05,0.1,0.2,0.5,1mL至10mL量瓶中,加50%乙醇溶液至刻度,进样20 μ L,以样品浓度C(μ g/mL)对峰面积A作图得标准曲线方程 $A=8.27\times10^3C-129.71$ ($r^2=0.9999$),线性范围0.5~10 μ g/mL,CyA高、中、低三种浓度时的回收率分别为(98.7 $\pm$ 2.9)%, (99.3 $\pm$ 2.2)%, (101.4 $\pm$ 1.8)%,平均日内及日间RSD分别为1.7%和2.5%。

2.1.3 含量测定

用微量进样器吸取胶团溶液适量,加入50%无水乙醇溶解,并定容至10mL,同法进样测定。

2.2 混合胶团的制备

参考文献共沉淀法^[3]和预实验的基础上,确定制备混合胶团的方法如下:取处方量的SC或DOSC,PC和过量药物用甲醇-氯仿(1:1)溶解,旋转蒸发除去有机溶剂,真空放置过夜,加入水合介质,一定温度下旋转洗脱,放置2h,洗脱液过0.15 μ m微孔滤膜除去不溶物,即得药物的混合胶团溶液。另取药物加入到SC水溶液中,相同温度搅拌至溶解平衡,同法过滤得到药物的胆酸钠胶团溶液。

2.3 脂质体的形态和大小的测定

应用1%磷钨酸负染色制备样品,于透射电镜下观测并照相。图1为透射电镜图,可见混合胶团为球形粒子,大小较均一。应用Zetamaster光子相关光谱仪测定纳米脂质体的平均粒径为(4.5 $\pm$ 2.4)nm。

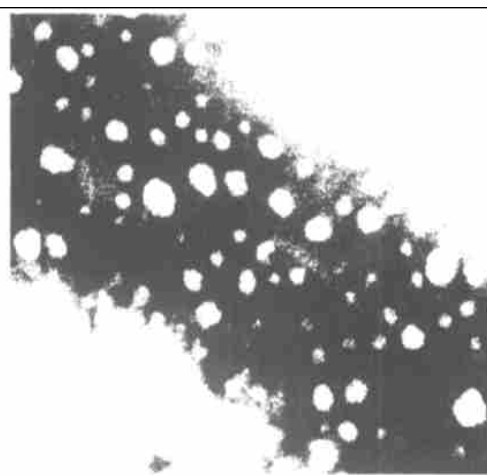


图1 混合胶团透射电镜图($\times 8000$ 倍)

Fig 1 The transmission electron micrograph of mixed micelles

2.4 混合胶团和胆酸钠胶团对CyA增溶能力的比较

25 $^{\circ}$ C时以重蒸水为水合介质考查PC浓度50mg/mL,SC浓度28.7mg/mL的混合胶团及SC浓度28.7mg/mL的简单胶团对CyA的增溶作用,并测定同温度下药物在水合介质中的溶解度。结果表明,药物溶解度极低,仅(1.8 $\pm$ 0.2) $\times 10^{-4}$ mg/mL,混合胶团和胆酸钠胶团对CyA的增溶量分别为(4.85 $\pm$ 0.09)mg/mL和(0.39 $\pm$ 0.01)mg/mL($n=3$)。显然,SC和PC形成混合胶团后对CyA的增溶能力大大提高。

2.5 影响混合胶团增溶的因素

2.5.1 PC用量及SC/PC(摩尔比)对混合胶团增溶能力的影响

PC用量为20,50,80,100mg/mL,SC与PC的摩尔比为0.9:1,1:1,1.1:1,1.2:1,以重蒸水为水合介质在20 $^{\circ}$ C下考查胆酸钠/磷脂混合胶团对CyA的增溶能力。结果发现PC的用量以及SC与PC的摩尔比对CyA的增溶量有较大的影响。从图2可以看出,在固定PC用量的条件下,随着混合胶团中PC比例的增加,对CyA的增溶量增加。这可能与混合胶团自身的结构有关。研究报道当混合胶团中SC与PC的摩尔比小于2:1时,混合胶团为层状结构,随磷脂比例增加,胶团体积变大^[4],故增溶能力加强。在PC用量为20mg/mL时,溶液中胶团数量相对较小,故对CyA的增溶量受SC/PC比例影响相对较小。

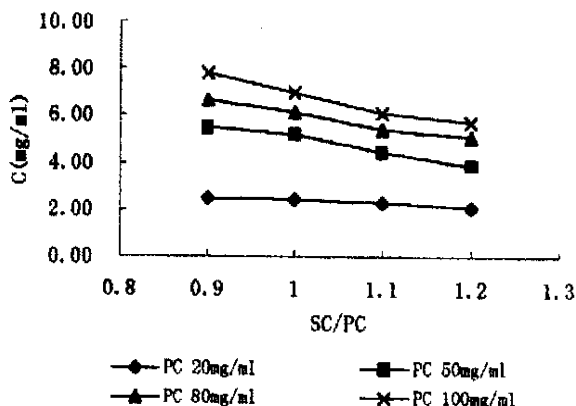


图2 不同PC浓度下混合胶团中的CyA含量随SC/PC(摩尔比)的变化图

Fig 2 Variance of CyA content in mixed micelles with SC/ PC (molar ratio) under the different concentration of PC

从图2还可以看出,固定SC/PC的比例,随着磷脂用量增加,即胶团数量增加时,对CyA的增溶量呈增大的趋势。然而,值得注意的是尽管增溶量呈增大的趋势,但增溶效率却有所下降。例如,由图3所示,当SC与PC的摩尔比固定为1.1:1时,随PC用量的增加,增溶的CyA与PC的质量比呈减小的趋势,其它摩尔比的条件下也可得到相似的结果。因此,在满足增溶CyA浓度要求的条件下,减小PC浓度有利于提高PC和SC的利用率。

2.5.2 温度对混合胶团溶能力的影响 以重蒸水为水合介质在10、25、40℃下考查制备的胆酸钠/磷脂混合胶团对CyA的增溶作用。结果见表1,随着温度升高,混合胶团对CyA增溶量呈下降趋势,这是由于温度升高,不利于混合胶团的形成,大大降低了胶团的数量^[3],从而降低了对药物的增溶能力。

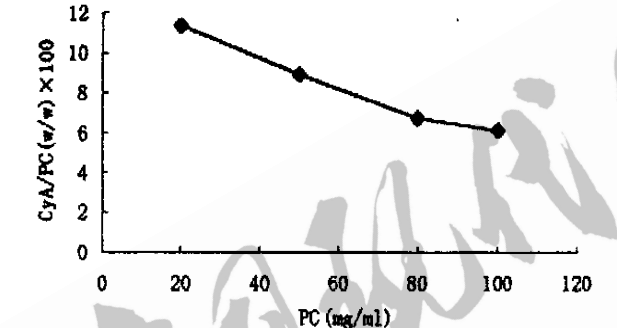


图3 磷脂用量对CyA增溶效率的影响

Fig 3 The effect of PC concentration on solubilization efficiency of CyA

表1 不同温度下胆酸钠/磷脂混合胶团对CyA的增溶结果

Tab 1 Solubilization of sodium cholate/lecithin mixed micelles to CyA at different temperature

温度(℃)	增溶(mg/ mL)
10	5.85 ± 0.08
25	4.85 ± 0.09
40	3.14 ± 0.06

PC = 50 mg/ mL, SC/ PC = 1: 1 (n = 3)

2.5.3 水合介质对混合胶团增溶能力的影响 比较以重蒸水(DDW)、不同浓度NaCl溶液和各种不同pH缓冲液为水合介质时,在20℃制备的混合胶团对CyA的增溶作用。结果见表2,随着溶液中NaCl浓度的增加,即离子强度增加,混合胶团对CyA的增溶量下降,这是由于无机盐离子的加入,不利于混合胶团的形成,使得混合胶团的数量减少^[3],增溶量下降。

考虑到胆酸的pKa通常在6.4左右^[5],故实验中选择pH高于6.4的水合介质。然而,与重蒸水相比,以不同pH缓冲液为介质的混合胶团对CyA的增溶量有所降低。

表2 含不同分散介质的胆酸钠/磷脂混合胶团对CyA的增

溶结果

Tab 2 Solubilization of sodium cholate/lecithin mixed micelles containing different dispersion medium to CyA

Dispersion medium	增溶(mg/ mL)
Double distilled water	5.17 ± 0.07
0.9 % NaCl solution	3.04 ± 0.14
1.8 % NaCl solution	2.45 ± 0.03
pH 7.0 Phosphate buffer	3.58 ± 0.13
pH 7.4 Phosphate buffer	3.84 ± 0.06
pH 7.8 Phosphate buffer	3.08 ± 0.11
pH 8.2 Tris buffer	4.35 ± 0.08
pH 9.0 Boric acid- KCl buffer	4.08 ± 0.14

PC = 50 mg/ mL, SC/ PC = 1: 1 (n = 3)

2.5.4 不同胆盐的影响 比较相同磷脂浓度及胆盐/磷脂摩尔比的条件下,胆酸钠/磷脂、去氧胆酸钠/磷脂混合胶团对CyA的增溶能力。结果见表3,选择不同类型的胆盐与磷脂形成的混合胶团,对CyA的增溶能力不一样。相同条件下,胆盐分子结构中,羟基数量越多,亲脂性越弱,所形成的混合胶团对药物的增溶能力也就越弱^[5],去氧胆酸钠分子结构中较胆酸钠少一个羟基,故与磷脂所形成的混合胶团对CyA的增溶能力强于胆酸钠。

表3 不同胆盐/磷脂混合胶团对CyA的增溶结果

Tab 3 Solubilization of different mixed micelles to CyA

System	Dispersion medium	solubility(mg/ mL)
SC/ PC- MM	DDW	5.17 ± 0.07
DOSC/ PC- MM	DDW	5.42 ± 0.16

PC = 50 mg/ mL, SC/ PC = 1: 1 (n = 3)

2.5.5 维生素E、胆固醇的影响 将磷脂、胆酸钠、CyA以及一定量的维生素E或胆固醇一起成膜,以重蒸水(DDW)为水合介质制备混合胶团,考查其对CyA的增溶作用。结果见表4,从表中可知,VE、胆固醇的加入,均使得CyA的含量有所下降。VE分子量较小,对环孢素A的影响也较小,当加入量在磷脂质量的5%以内几乎无影响。胆固醇分子具有刚性结构,并且与磷脂具有较强的结合力,占据混合胶团的增溶空间,大大降低了混合胶团对药物的增溶能力^[3]。

表4 维生素E和胆固醇对混合胶团增溶CyA的影响

Tab 4 The influence of VE and cholesterol on solubilization of mixed micelles to CyA

System	Dispersion medium	solubility(mg/ mL)
SC/ PC- MM	DDW	5.17 ± 0.07
SC/ PC- MM + 5 % VE	DDW	5.13 ± 0.14
SC/ PC- MM + 10 % VE	DDW	4.84 ± 0.07
SC/ PC- MM + 5 % Cholesterol	DDW	4.36 ± 0.11
SC/ PC- MM + 10 % Cholesterol	DDW	3.98 ± 0.09

PC = 50 mg/ mL, SC/ PC = 1: 1 (n = 3)

3 讨论

环孢素A是一种难溶性环状多肽,在水中的溶解度通常只有40μg/ mL左右。胆酸钠胶团由于胶团体积较小,故对CyA的增溶能力有限。胆酸钠/磷脂混合胶团中由于磷脂的存在大大增加了胶团的体积以及胶团对药物的亲合力^[3],从而大大提高了对难溶多肽药物的增溶能力。选择适当的胆酸钠/磷脂摩尔比,适宜的磷脂浓度和水合介质可以最大程

度地提高胆酸钠/磷脂混合胶团的增溶能力。文献报道磷脂的存在大大降低了胆盐的溶血作用和刺激性^[6],目前也已有部分混合胶团产品上市^[7]。因此,胆酸钠/磷脂混合胶团有可能成为难溶性多肽注射给药的新型增溶载体。

参考文献

- [1] Hayat AO, Suganthi R, Hee-Byung Chai, *et al*. A Mixed micellar formulation suitable for the parenteral administration of taxol [J]. Pharm Res, 1994, 11(2):206.
- [2] Hammad MA, Muller BW. Solubility and stability of lorazepam in bile salt/soya phosphatidylcholine-mixed micelles [J]. Drug Dev Ind Pharm, 1999, 25(4):409.
- [3] Hayat AO, Kyonghee Son. Mixed micelles as Proliposomes for the sol-

ubilization of Teniposide [J]. Pharm Res, 1992, 9(12):1556.

- [4] Karl Muller. Structural dimorphism of bile/lecithin mixed micelles [J]. Biochem 1981, 20:404.
- [5] Hammad MA, Muller BW. Increasing drug solubility by means of bile salt-phosphatidylcholine-based mixed micelles [J]. Eur J Pharm Biopharm, 1998, 46:361.
- [6] Narain PK, MD, de Maria EJ, *et al*. Lecithin Protects against plasma membrane disruption by bile salts [J]. J Surg Res, 1998, 72(2):131.
- [7] Manfred Durr, Jorg Hager, Josef Peter Lohr. Investigations on mixed micelles and liposome preparations for parenteral use based on soya phosphatidylcholine [J]. Eur J Pharm Biopharm, 1994, 40(3):147.

收稿日期:2002-06-18