

**ผลของคอเลสเทอรอลแอนโพลอกส์ต่อผนังเนื้อเยื่อซึ่งมีความแตกต่างของทีเอช
ในการกักเก็บยากลุ่มเอมีนในลิโปโซม**

นางสาววิมลพร ทรัพย์รุ่งเรือง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเภสัชเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2539

ISBN 974-633-659-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**INFLUENCE OF CHOLESTEROL ANALOGUES ON
TRANSMEMBRANE pH GRADIENTS IN TRAPPING
OF AMINE DRUG IN LIPOSOME**

Miss Wattanaporn Suprungruang

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirments
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmaceutical Chemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1996
ISBN 974-633-659-2**

Thesis Title Influence of Cholesterol Analogues on Transmembrane pH
 Gradients in Trapping of Amine Drug in Liposome.
By Miss Wattanaporn Suprungruang
Department Pharmaceutical Chemistry
Thesis Advisor Assistant Professor Usa Glagasigij, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Santi Thoongsuwan
.....Dean of Graduate School
(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Commitee

Boonardt Saisorn
.....Chairman
(Associate Professor Boonardt Saisorn, M.Sc. in Pharm.)

Usa Glagasigij
.....Thesis Advisor
(Assistant Professor Usa Glagasigij, Ph.D.)

Mitr Pathipvanich
.....Member
(Mitr Pathipvanich, Ph.D.)

P. Kulvanich
.....Member
(Associate Professor Poj Kulvanich, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว



ผู้พิมพ์ ทรัพย์รุ่งเรือง : ผลของคอเลสเตอรอลแอนะล็อกส์ต่อผนังเนื้อเยื่อซึ่งมีความแตกต่างของพีเอชในการกักเก็บยา กลุ่มเอมีนในลิโปโซม (INFLUENCE OF CHOLESTEROL ANALOGUES ON TRANSMEMBRANE pH GRADIENTS IN TRAPPING OF AMINE DRUG IN LIPOSOME) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.อุษา กล้ากลกิจ, 88 หน้า. ISBN 974-633-659-2.

จากการศึกษาถึงการเคลื่อนที่ของยา กลุ่มเอมีน (เช่น โพรพรานอลอล) ผ่านผนังเนื้อเยื่อต่อความแตกต่างของพีเอชพบว่า โพรพรานอลสามารถกักเก็บเข้าไปในลิโปโซมซึ่งประกอบด้วยฟอสฟาติดีลโคลีนจากไข่แดง ที่แสดงความแตกต่างของพีเอช (ภายในเป็นกรด) ได้อย่างรวดเร็ว ความแตกต่างของโพรพรานอลในลิโปโซมซึ่งมีความแตกต่างของ พีเอช (ภายในเป็นกรด) แสดงให้เห็นถึงขบวนการนำซึ่งควบคุมโดยการเคลื่อนที่ของโพรพรานอลในรูปที่เป็นกลางทางประจุซึ่งการกระจายตัวเป็นไปตามสมมูลของเฮนเดอลัน-เฮสเซลเบช วิธีการกักเก็บโดยตรงนี้จะให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเพิ่มขึ้นถึง 98% จากการประเมินถึงอิทธิพลของพีเอชภายในและภายนอก, ความจุของบัฟเฟอร์ภายใน, อัตราส่วนของตัวยาต่อลิปิด และส่วนประกอบของลิปิด ได้แสดงให้เห็นว่าการลดพีเอชภายใน, การเพิ่มความจุของบัฟเฟอร์ภายใน และการเพิ่มความยาวของหมู่เอซิลซึ่งอิมิตัวของโมเลกุลฟอสโฟลิปิด มีผลทำให้เพิ่มการกักเก็บของยา การศึกษาอิทธิพลของคอเลสเตอรอล และแอนะล็อกส์ของคอเลสเตอรอลต่อการกักเก็บยาแสดงให้เห็นว่า คอเลสเตอรอล และแอนะล็อกส์ของคอเลสเตอรอลที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (ฟอสโฟลิปิดของไข่แดง:คอเลสเตอรอล หรือแอนะล็อกส์ 2:1, โดยโมล) ลดอัตราส่วนยาที่ถูกกักเก็บต่อลิปิด แต่ทำให้ยาถูกกักเก็บได้นานขึ้น

ภาควิชา เภสัชเคมี
สาขาวิชา เภสัชเคมี
ปีการศึกษา 2538

ลายมือชื่อนิติบัตร วิจิตพร ทรัพย์รุ่งเรือง
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อุษา กล้ากลกิจ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C675294 : MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY

KEY WORD: CHOLESTEROL ANALOGUES/TRANSMEMBRANE pH GRADIENTS/LIPOSOME

WATTANAPORN SUPRUNGRUANG : INFLUENCE OF CHOLESTEROL ANALOGUES
ON TRANSMEMBRANE pH GRADIENTS IN TRAPPING OF AMINE DRUG IN
LIPOSOME. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. USA GLAGASIGIJ, Ph.D.
88 pp. ISBN 974-633-659-2

Transmembrane movement of amine drugs (such as propranolol) in response to pH gradients had been investigated. It was shown that propranolol could accumulated rapidly into REVs composed of EPC exhibiting pH gradient (inside acidic). The transmembrane propranolol gradients formed in REVs systems exhibiting ΔpH (inside acidic) indicated that the transport process could be dictated by movement of the neutral form of propranolol which redistributed according to a simple Henderson-Hasselbach equilibrium. This active loading gave rise to trapping efficiencies as high as 98%. The influence of internal and external pH, interior buffering capacity, drug-to-lipid ratio and lipid composition on propranolol uptake into REVs systems in response to transmembrane pH gradients had been estimated. It was shown that decreasing the interior pH, increasing the interior buffering capacity and increasing the (saturated) acyl chain length of PC molecules all resulted in increased drug uptake. A study of influence of the cholesterol and cholesterol analogues on drug uptake revealed that cholesterol and hydroxyl cholesterol analogues (EPC:Chol or analogue 2:1, by mol) decreased entrapped drug /lipid ratio, but prolonged its retention.

ภาควิชา.....เภสัชเคมี
สาขาวิชา.....เภสัชเคมี
ปีการศึกษา.....2538

ลายมือชื่อนิสิต..... วิไลพร ทรัพย์รุ่งเรือง
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อ.ชว. กว. ก. น. น.
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I am sincerely indebted to my thesis advisor, Assistant Professor Usa Glagasigij, for her inestimable advice, guidance, concern, understanding, kindness, and encouragement throughout the period of my graduate study.

I would like to express my thankfulness to Associate Professor Suttatip chantaraskul, Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry, for her hospitality and providing facilities.

I would like to express my gratitude to Associate Professor Chaiyo Chaichantippayut, Head of the Department of Pharmacognosy for his suggestion about separation of egg yolk lecithin.

I am obligated to the members of thesis committee for their valuable scrutinizing and discussion.

Thankful expression is also extended to all staffs of the Department of Pharmaceutical Chemistry for their cooperation.

I wish to express my gratitude to the Graduate School of Chulalongkorn University for granting partial financial support.

I am grateful to all of my friends for their encouragement.

Finally, I would like to express my indefinite gratitude to my parents, grandfather, sisters and my friends for their endless love, care, and encouragement throughout my study.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI	iv
ABSTRACT IN ENGLISH	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
LIST OF TABLES	viii
LIST OF FIGURES	xi
ABBREVIATIONS	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II BACKGROUND.....	7
III EXPERIMENTAL.....	25
IV RESULTS AND DISCUSSION.....	32
V CONCLUSION.....	86
REFERENCES.....	89
VITA.....	96

LIST OF TABLES

	Page
Table 1. Influence of pH_{in} on propranolol uptake when pH_{ex} was 7.5.....	34
Table 2. Influence of pH_{ex} on propranolol uptake when pH_{in} was 4.0.....	34
Table 3. Influence of citric acid concentration on propranolol uptake.....	39
Table 4. Influence of incubation temperature and time on propranolol uptake.....	42
Table 5. Influence of propranolol concentration on propranolol uptake.....	46
Table 6. Influence of acyl chain length on propranolol uptake.....	52
Table 7 Influence of charged amphiphile on propranolol uptake.....	55
Table 8 Influence of cholesterol and cholesterol analogues on propranolol uptake.....	59
Table 9. Retention of propranolol in EPC liposomes at 10 °C.....	67
Table 10. Retention of propranolol in EPC liposomes at 25 °C.....	68
Table 11. Retention of propranolol in EPC liposomes at 37 °C.....	68
Table 12. Retention of propranolol in EPC:Chol:DCP liposomes (2:1:0.1, by mol) at 10 °C.....	69
Table 13. Retention of propranolol in EPC:Chol:DCP liposomes (2:1:0.1, by mol) at 25 °C.....	70
Table 14. Retention of propranolol in EPC:Chol:DCP liposomes (2:1:0.1, by mol) at 37 °C.....	70

	Page
Table 15. Retention of propranolol in EPC:cholesterol liposomes (2:1, by mol) at 10 °C.....	71
Table 16. Retention of propranolol in EPC:cholesterol liposomes (2:1, by mol) at 25 °C.....	71
Table 17. Retention of propranolol in EPC:cholesterol liposomes (2:1, by mol) at 37 °C.....	72
Table 18. Retention of propranolol in EPC:Cpd I liposomes (2:1, by mol) at 10 °C.....	72
Table 19. Retention of propranolol in EPC:Cpd I liposomes (2:1, by mol) at 25 °C.....	73
Table 20 Retention of propranolol in EPC:Cpd I liposomes (2:1, by mol) at 37 °C.....	73
Table 21. Retention of propranolol in EPC:Cpd II liposomes (2:1, by mol) at 10 °C.....	74
Table 22. Retention of propranolol in EPC:Cpd II liposomes (2:1, by mol) at 25 °C.....	74
Table 23. Retention of propranolol in EPC:Cpd II liposomes (2:1, by mol) at 37 °C.....	75
Table 24. Retention of propranolol in EPC:Cpd III liposomes (2:1, by mol) at 10 °C.....	75
Table 25. Retention of propranolol in EPC:Cpd III liposomes (2:1, by mol) at 25 °C.....	76

Table 26. Retention of propranolol in EPC:Cpd III liposomes (2:1, by mol)

at 37 °C.....76

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1. Structure of cholesterol.....	2
Figure 2. Liposome and chemical diversity in the headgroup and acyl chain regions of phospholipids.....	7
Figure 3. Diagrammatic representations of (a) a phospholipid-stabilized triglyceride emulsion droplet and (b) a phospholipid bilayer vesicle or liposome.....	10
Figure 4. Schematic representation of the lipid bilayer matrix that serves as the basic structural element of liposome (and cells).....	11
Figure 5. Structure of cholesterol analogues.....	20
Figure 6. Influence of a pH gradient on the transbilayer distribution of amine drug (HA^+) in LUV.....	23
Figure 7. Chemical structure of propranolol.....	27
Figure 8. Chemical structure of N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2- ethanesulfonic acid.....	27
Figure 9. Fluorescence spectra between 250 and 400 nm for propranolol in methanol.....	32
Figure 10. Influence of ΔpH on propranolol uptake into EPC liposomes when pH_{ex} was 7.5 (A) and when pH_{in} was 4.0 (B).....	35

	Page
Figure 11. Chemical structure of lysolecithin.....	36
Figure 12. Influence of interior buffering capacity on propranolol uptake into EPC liposomes.....	40
Figure 13. Influence of incubation temperature and time on propranolol uptake into EPC liposomes.....	43
Figure 14. Influence of propranolol concentration added on propranolol uptake into EPC liposomes.....	47
Figure 15. Influence of propranolol concentration added on % trapping efficiency of propranolol uptake into EPC liposomes.....	48
Figure 16. Influence of acyl chain length on propranolol uptake.....	53
Figure 17. Structure of dicetylphosphate (A) and stearylamine (B).....	54
Figure 18. Influence of charged amphiphiles on propranolol uptake.....	56
Figure 19. Influence of cholesterol and cholesterol analogues on propranolol uptake.....	60
Figure 20. Water molecules are attracted to the polar heads of lipids, particularly by the charges.....	61
Figure 21. Possible H-bonding between cholesterol and phospholipid.....	62
Figure 22. Aggregation of EPC and cholesterol analogues compound V or VI during REV's preparation.....	64
Figure 23. Retention of propranolol in EPC liposomes.....	77
Figure 24. Retention of propranolol in EPC:cholesterol:DCP liposomes (2:1:0.1, by mol).....	78

	Page
Figure 25. Retention of propranolol in EPC:cholesterol liposomes (2:1, by mol).....	79
Figure 26. Retention of propranolol in EPC:Cpd I liposomes (2:1, by mol).....	80
Figure 27. Retention of propranolol in EPC:Cpd II liposomes (2:1, by mol).....	81
Figure 28. Retention of propranolol in EPC:Cpd III liposomes (2:1, by mol).....	82
Figure 29. Retention of propranolol in liposomes at 10 °C.....	83
Figure 30. Retention of propranolol in liposomes at 25 °C.....	84
Figure 31. Retention of propranolol in liposomes at 37 °C.....	85

ABBREVIATIONS

$^{\circ}\text{C}$	Degree Celcius
Chol	Cholesterol
Cpd 0	Cholesterol analogue 0
Cpd I	Cholesterol analogue I
Cpd II	Cholesterol analogue II
Cpd III	Cholesterol analogue III
Cpd IV	Cholesterol analogue IV
Cpd V	Cholesterol analogue V
Cpd VI	Cholesterol analogue V
DCP	Dicetyl phosphate
DLPC	Dilauroylphosphatidylcholine
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DSPC	Distearoylphosphatidylcholine
EPC	Egg phosphatidylcholine
LUVs	Large unilamellar vesicles
PC	Phosphatidylcholine
REVs	Reverses phase evaporation vesicles
SL	Stearylamine
T_c	Phase transition temperature