

脂质体分析方法新进展

杨美燕, 梅兴国*

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 脂质体给药系统可降低药物的毒性, 增加药物在靶点的聚集并提高药物的疗效。近代物理学实验技术的发展, 使脂质体的质量研究进入分子水平。本文主要就近年来脂质体的定性定量分析方法的最新进展作一综述。

关键词: 脂质体; 粒径; 包封率; 脂双层; 磷脂

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2007)02-0119-04

Progress of methods for analysis of liposomes

YANG Mei-yan, MEI Xing-guo

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Liposomes can increase the drug concentration in the target, reduce the toxicity and improve the therapeutic efficacy of drugs. The study of quality control of liposomes achieves molecular level with the development of modern physical techniques. In this article, techniques and methods that can be used for qualitative and quantitative analysis of liposomes are described.

Key words: liposomes; particle size; entrapment efficiency; lamellarity; phospholipids

脂质体(liposomes)是一种由排列有序的脂质双分子层组成的多层微囊,具有类似生物膜双分子层的近晶型液晶结构,大小通常为几十纳米到几十微米。脂质体给药系统可降低药物的毒性,增加药物在靶点的聚集,提高药物的疗效,目前广泛应用于递送蛋白质、基因及抗菌抗肿瘤药物等。近代物理学实验技术的发展及其与生物科学的结合和相互渗透,使脂质体的质量研究进入分子水平。本文主要讨论了一些脂质体定性和定量分析技术和方法的新进展。

1 脂双层结构类型测定

脂质体的磷脂组成和制备工艺不同,所形成的脂质体的类型不同,如小单室脂质体、大单室脂质体、多室脂质体以及多囊脂质体。脂双层结构的测

定多采用 ^{31}P 核磁共振技术,其原理是加入 Mn^{2+} 可以作用于磷脂的负电荷基团,淬灭位于相界面上磷脂的 ^{31}P 核磁共振信号,引起定量信号的展宽和削弱,因此可以通过加入 Mn^{2+} 前后的信号比确定脂双层的结构,而且 Mn^{2+} 和缓冲液的浓度会影响测定结果^[1]。测定脂双层结构的其他方法还包括电镜法、小角度X线散射法,或者通过加入其他试剂后引起所标记磷脂的可见或荧光吸收发生改变,从而确定其结构。

2 粒径测定

目前常用的脂质体粒径测定的电镜技术包括:透射电镜^[2]、冰冻断裂透射电镜^[3]、冷冻电镜^[4,5]。上述方法样品制备复杂,比较耗时,不适宜作为常规分析方法。

最近常用的另一种粒径测定方法是原子力显微镜技术^[6],可用于研究脂质体的形态、大小和稳定性。将样品置于固定在压电扫描仪的云母或玻璃上,然后用纳米级尺度的探针在样品表面进行光栅扫描,通过光电二极管阵列检测器检测反射回的激

收稿日期:2006-09-30

作者简介:杨美燕,女,在读博士研究生,研究方向:抗肿瘤药物脂质体, Tel:010-66932654, E-mail:ymyzi@163.com

* 通讯作者:梅兴国,男,博士生导师,研究方向:生物技术药物及靶向给药制剂, Tel:010-66932644, E-mail:xg_mei@yahoo.com

光束强度,就可以得到样品的表面信息。可以采用不同的模式,如恒高、恒偏移、敲击模式和非接触/吸引模式,其分辨率高达 $0.1 \text{ nm}^{[7,8]}$ 。

传统的空间排阻色谱目前常用于脂质体的制备和包封率的测定。将其和 HPLC 相结合的高效空间排阻色谱^[9],可以提高分辨率,减少样品体积,提高重现性。常用的填料是乙基乙二醇甲基丙烯酸酯,流动相须保持渗透压平衡,可采用折光检测器、光散射检测器或者荧光检测器检测荧光标记磷脂。目前主要应用于脂质体特征分析(包括粒度分布、粒子的稳定性、脂质体的聚集和重组)和分级分析(释放动力学、渗透性、包封率的稳定性)。其缺点主要是对柱填料有亲和作用(范德华力和静电作用)、流动相的流速的影响较大、目前的填料对于大于 $0.8 \mu\text{m}$ 的粒子不适合等。

场流体分级分离技术对上述局限有所改进。常用到场的有电场、热场、沉降场和流体场等^[10]。其原理是利用半透膜的半透过性质,和待测样品粒径范围相对应截留分子量的流体可以透过该膜而粒子则不能。和高效空间排阻色谱不同,在场流体分级分离技术中,小粒径的脂质体由于其高度扩散性先流出,场流体分离技术的分离范围很宽,在 1 nm 左右到 $100 \mu\text{m}$ 范围内均有较高分辨率,而且不需要填料,因此减少了由于剪切力造成的破坏和由于吸附作用造成的样品信息损失。其缺点是比较复杂,设备昂贵,可供选择的半透膜品种较少。粒子的 Stoke's 半径和滞留时间的关系符合公式(1),其中 d_s 代表 Stoke's 半径, t_r 代表滞留时间, k 代表玻耳兹曼常数, T 代表温度, η 代表流体粘度, ω 代表槽的厚度, V 代表槽的流量速率, V_e 代表错流速率^[11]。

$$d_s = t_r \frac{2kTV}{\pi\eta\omega^2V_e} \quad (1)$$

上述几种分析分离技术的计算依据是滞留时间和分子量的相关关系,而静态光散射和动态光散射技术利用的则是激光信号和粒径分布的相关关系。其中动态光散射技术,又称作准弹性光散射或光子相关光谱。目前广泛用于脂质体的粒径分布分析,其原理是粒子的布朗运动会造成的光散射波动随时间的信号变化。根据光信号和 Stokes-Einstein 方程的拟合结果,得到样品的粒径及其分布。单模型分散型的粒子的散射光强度相关函数可以用公式(2)来描述,其中 I , t 和 τ 分别代表光强度、时间和测定计时。公式(3)表示,随着时间趋于无穷大,拟合曲

线的扩散系数 D 呈单指数衰减,式中 B 代表基线, A 代表振幅, q 则代表由介质的折射率、入射激光波长和检测散射光的角度决定的散射向量^[12]。

$$G(\tau) = \int_0^\infty I(t)I(t+\tau)dt \quad (2)$$

$$G(\tau) = B + A e^{-2q^2 D \tau} \quad (3)$$

而多模型分散的样品粒子相关函数符合多指数模型,随机噪声会降低指数衰减的产生。扩散系数 D 和流体半径 r_h 的关系符合 Stokes-Einstein 方程,见公式(4),其中 k , T 和 η 分别代表温度、玻耳兹曼常数和流体粘度。粒子的流体学半径(Stoke's 半径)实际上是用表面含水的水化粒子的表观半径来表示,二者有着相同的扩散速率,代入方程计算而得^[12]。

$$r_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (4)$$

这两种光散射法可以和上述的分离技术相结合,得到样品分布更为精确的结果。粒径及其分布测定的其他方法还包括磁共振技术、流式细胞计量术、直角光散射技术、毛细管区带电泳和浊度分析法等。

3 磷脂含量测定

采用可见分光光度法进行磷元素测定是基于含钼的试剂和磷脂进行显色反应,能产生蓝色的产物。例如传统的 Bartlett 分析法,用 160°C 的硫酸消化脂质体中的有机物,再用过氧化氢氧化成无机磷,产物再与钼酸铵反应后用 1,2,6-三氨基萘磺酸在 100°C 下还原,生成的磷钼酸盐在 830 nm 处检测,从而定量测定样品中磷。

分析卵磷脂和胆固醇,目前广泛采用酶分析法^[13,14]。磷脂的酶分析法是将 PC 用磷脂酶 D 水解释放出游离的胆碱,再用甜菜碱和过氧化氢氧化成甜菜醛,在胆碱氧化酶的作用下,最终产生的醌亚胺染料可以在 505 nm 处测定。胆固醇的酶分析法的依据是胆固醇脂在水解酶的作用下生成水解产物,加入胆固醇氧化酶和过氧化氢,最后产生的蓝色醌亚胺染料在 500 nm 处有较强吸收。

色谱技术如 TLC、HPLC 和 GC 也可应用于磷脂含量测定。和显色法相比,色谱法的优点是不仅可以混合磷脂中的各组分逐一分离并定量,还可以用来监测磷脂在贮存过程中是否发生水解和氧化。和酶分析法相比,色谱法干扰少且更方便快捷。TLC 分离磷脂混合物常用的展开剂是氯仿、甲醇、

水/氨水系统,通常采用钼蓝在硫酸中显色其中的磷酸盐基团,水合茚三酮显色其中的氨基基团,也可以用碘进行非专属性显色。样品中的组分用 TLC 分离后也可以采用上述的化学法显色,也可用火焰离子化检测器检测磷脂组分。由于磷脂没有发色基

团,HPLC-UV 法的检测波长为 200 ~ 210 nm,所以更常用的是折光指数检测器或蒸发光散射检测器。GC 分析磷脂通常需要衍生化步骤增加其挥发度;若采用 FID 或 MS 分析,之前要进行三甲基硅烷化或甲基酯化作用。

表 1 磷脂含量测定的 HPLC 色谱条件

欲分析的磷脂组分	色谱柱	流动相	检测器
胆固醇	S-5 ODS-1 色谱柱	100% 甲醇	紫外
lyso-PC, PG, PC, PA	YMC Diol-NP 色谱柱	丙酮/三乙胺/乙酸/正己烷/甲醇,梯度洗脱	蒸发光散射检测器 ^[15]
Ch, DPPC 和糖标记的 DPPE	三甲基硅烷基色谱柱	氯仿、甲醇、水	蒸发光散射检测器 ^[16]

在进行 HPLC 分析之前,多要经过样品预处理步骤。比如,用醇类如甲醇、乙醇或异丙醇对脂质体悬液稀释,或将磷脂萃取到氯仿混合溶剂中或加入表面活性剂破坏脂双层。方法的选择取决于色谱柱及流动相以及磷脂的稳定性,也有报道指出不需要进行磷脂提取。

4 包封率测定

脂质体包封率测定方法通常分离出脂质体测定和直接测定两种,前者主要包括分光光度法、荧光分析法、酶分析法和电化学分析法。采用上述 HPLC、场流体分级分离技术、空间排阻色谱以及透析的方法分离出的游离药物和总药量相比,得到包封率,总药量可以通过加入表面活性剂如 Triton X-100 破坏脂双层的方法得到。对样品在贮存期间的游离药量进行检测就可以得出药物是否渗漏,或者测定不同的破坏条件对渗漏的影响。其他分离方法还包括超滤法、微型柱离心法和鱼精蛋白凝聚法等。

由于将游离药物分离的方法容易导致药物的渗漏,有时分离界限模糊,所以不需要分离的包封率测定方法引起了人们的兴趣。例如,¹H NMR 法,在外水相标记的游离药物显示出 pH 敏感的化学位移,而内水相标记的药物则没有^[17]。也有报道采用荧光分析法,其原理是内水相的药物由于高浓度而发生的荧光淬灭现象^[18]。还有依据在外相加入不能透过半透膜的试剂后会引引起游离药物的信号展宽的电子自旋共振法。

脂质体的包封率是脂质体质量控制的一个极其重要的指标,中国药典(2005 版)规定,脂质体的包封率的含义是脂质体中包封的药物占包封和未包封的药物总和的百分比。要根据药物的性质选择包封

率测定方法,并且要经过方法学验证才能保证结果的准确性。

5 体内分布测定

闪烁照相是评价脂质体的一种比较实用的方法,为非侵入性且可定量观测脂质体体内分布。可用于高质量成像的单中子放射性核素有钨-99m (^{99m}Tc)、铟-111 (¹¹¹In),镓-67 (⁶⁷Ga),碘-123 (¹²³I),铊-201 (²⁰¹Tl),目前最常用的是^{99m}Tc^[19]。例如将脂质体用^{99m}Tc 进行标记后,经注射或其他途径给药,γ 照相机照相,就可得到闪烁照相照片。关于以下类型脂质体的闪烁照相成像已有报道:长循环递氧脂质体,抗肿瘤药物、抗生素、抗真菌药物脂质体,以及脂质体靶向淋巴结,脂质体在体内的免疫反应研究也有报道。闪烁照相成像,可以作为脂质体处方评价的一种新方法。

在脂质体的质量控制的各指标中,粒径和包封率是两个比较重要的指标。除了上述一些指标外,《中国药典》(2005 版)规定的脂质体制剂在生产过程与贮藏期间的检查还应控制有害有机溶剂、渗漏率、脂质体氧化程度检查及靶向制剂评价等。随着脂质体在临床上的广泛应用,脂质体制剂的质量控制显得尤为重要,相信将会有越来越多的新技术和新方法应用到脂质体的质量控制中来。

参 考 文 献

- [1] Frohlich M, Brecht V, Peschka-Suss R. Parameters influencing the determination of liposome lamellarity by ³¹P-NMR[J]. *Chem Phys Lipids*, 2001, 109(1):103 - 112.
- [2] Muller M, Mackehen S, Muller-Goymann C. Physicochemical characterization of liposome with encapsulated local anaesthetics[J].

- Int J Pharm*, 2004, 274(1/2):139 – 148.
- [3] Frederik M, Hubert DH. Cryoelectron microscopy of liposomes [J]. *Methods Enzymol*, 2005, 391(1):431 – 448.
- [4] Egelhaaf SU, Wehrli E, Müller M, *et al.* Determination of the size distribution of lecithin liposomes; a comparative study using freeze fracture, cryoelectron microscopy and dynamic light scattering[J]. *J Microsc*, 1996, 184(3):214 – 228.
- [5] Berclaz N, Blöchliger E, Müller M, *et al.* Matrix effect of vesicle formation as investigated by cryotransmission electron microscopy [J]. *J Phys Chem B*, 2001, 105(5):1065 – 1071.
- [6] Ruozzi B, Tosi G, Forni F, *et al.* Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 25(1):81 – 89.
- [7] Jass J, Tjarnhage T, Puu G. Atomic force microscopy imaging of liposomes[J]. *Methods Enzymol*, 2003, 367:199 – 213.
- [8] Liang X, Mao G, Ng KY. Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mice by atomic force microscopy[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2004, 278(1):53 – 62.
- [9] Grabielle-Madelmont C, Lesieur S, Ollivon M. Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography[J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2003, 56(1 – 3):189 – 217.
- [10] Gimbert LJ, Andrew KN, Haygarth PM, *et al.* Environmental applications of flow field-flow fractionation (FIEFF) [J]. *Trac-Trend Anal Chem*, 2003, 22(9):615 – 633.
- [11] Arifin DR, Palmer AF. Determination of size distribution and encapsulation efficiency of liposome-encapsulated hemoglobin blood substitutes using asymmetric flow field-flow fractionation coupled with multi-angle static light scattering [J]. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(6):1798 – 1811.
- [12] Mattison K, Morfesis A, Kaszuba M. A primer on particle sizing using dynamic light scattering[J]. *Am Biotechnol Lab*, 2003, 12:20 – 22.
- [13] Shimizu Y, Nakata M, Matsunuma J, *et al.* Simultaneous quantification of components of neoglycolipid coated liposomes using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection[J]. *J Chromatogr B*, 2001, 754(1):127 – 133.
- [14] Ingebrigtsen L, Brandl M. Determination of the size distribution of liposomes by SEC fractionation, and PCS analysis and enzymatic assay of lipid content[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2002, 3(2):E7.
- [15] Sas B, Peys E, Helsen M. Efficient method for (lyso) phospholipid class separation by high-performance liquid chromatography using an evaporative light-scattering detector [J]. *J Chromatogr A*, 1999, 864(1):179 – 182.
- [16] Katoh S, Kishimura M, Tomioka K. Immune lysis assay of antibodies by use of antigen-coupled liposomes [J]. *Colloids Surfaces*, 1996, 109:195 – 200.
- [17] Zhang XM, Patel AB, de Graaf RA, *et al.* Determination of liposomal encapsulation efficiency using proton NMR spectroscopy [J]. *Chem Phys Lipids*, 2004, 127(1):113 – 120.
- [18] Mehlhorn RJ, Candau P, Packer L. Measurements of volumes and electrochemical gradients with spin probes in membrane vesicles[J]. *Methods Enzymol*, 1982, 88:751 – 772.
- [19] Goins BA, Phillips WT. The use of scintigraphic imaging as a tool in the development of liposome formulations [J]. *Prog Lipid Res*, 2001, 40(1/2):95 – 123.
-
- (上接第 118 页)
- composite microspheres [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323(4):1321 – 1327.
- [11] Kim HK, Chung HJ, Park TG. Biodegradable polymeric microspheres with "open/closed" pores for sustained release of human growth hormone[J]. *J Control Release*, 2006, 112(2):167 – 174.
- [12] Jaganathan KS, Rao YU, Singh P, *et al.* Development of a single dose tetanus toxoid formulation based on polymeric microspheres: a comparative study of poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) versus chitosan microspheres[J]. *Int J Pharm*, 2005, 294(1/2):23 – 32.
- [13] De Rosa G, Larobina D, Immacolata La Rotonda M, *et al.* How cyclodextrin incorporation affects the properties of protein-loaded PLGA-based microspheres; the case of insulin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin system[J]. *J Control Release*, 2005, 102(1):71 – 83.
- [14] Dorati R, Genta I, Montanari L, *et al.* The effect of γ -irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin[J]. *J Control Release*, 2005, 107(1):78 – 90.
- [15] Duncan G, Jess TJ, Mohamed F, *et al.* The influence of protein solubilisation, conformation and size on the burst release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres [J]. *J Control Release*, 2005, 110(1):34 – 48.
- [16] Kim JH, Taluja A, Knutson K, *et al.* Stability of bovine serum albumin complexed with PEG-poly(L-histidine) diblock copolymer in PLGA microspheres [J]. *J Control Release*, 2005, 109(1 – 3):86 – 100.
- [17] Chen FM, Wu ZF, Sun HH, *et al.* Release of bioactive BMP from dextran-derived microspheres: a novel delivery concept [J]. *Int J Pharm*, 2006, 307(1):23 – 32.
- [18] Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery [J]. *J Control Release*, 2003, 90(3):261 – 280.