

脂质体包封率的研究进展

李唐棣,郝丽梅综述 梅兴国* 审校

(军事医学科学院毒物药物研究所,北京 100850)

摘要:包封率一直是脂质体研究的热点,脂质体对药物的有效包载,是其发挥临床治疗作用的关键。近年来发展了许多包封率的测定方法,特别是核磁共振、电子自旋共振光谱等不经分离的直接测定方法,使包封率的结果更加客观可靠。本文主要从脂质体的制备方法和结构类型、类脂膜的组成与电性、药物的性质和浓度三个方面分析了影响脂质体包封率的因素,综述了国外研究的一些新发现和进展,并对提高包封率的方法和技术进行了总结,以促进脂质体作为药物载体的开发和应用。

关键词:包封率;脂质体;前体药物法;冻融法;离子梯度法

中图分类号:R94 文献标识码:A 文章编号:1001-0971(2006)03-0224-04

脂质体作为一种新型药物转运系统,具有独特的优势。药物由脂质体携带后,能改变其体内的药代动力学行为,降低不良反应和提高疗效,已被用于抗肿瘤药物的靶向递送、介导基因转移及影像诊断等。但脂质体作为药物载体还存在包封率不高、稳定性差、药物易渗漏等问题。通过对脂质体膜表面进行结构修饰^[1~3],可获得具有长循环、主动靶向性等特点的“隐形脂质体”,延长其在循环系统中的存留时间。同时,提高脂质体载药量和包封率的理论及方法也处于不断探索之中,本文综述了包封率测定方法的新进展、影响包封率的主要因素及提高脂质体包封率的新理论和新技术,以促进脂质体的研究和开发。

1 包封率定义及其测定方法

1.1 包封率的定义

包封率英文名可以用“percent encapsulation”、“incorporation efficiency”、“trapping efficiency”、“entrapment efficiency”等词表述,是脂质体质量评价的一个重要指标。包封率有3种表示方法:重量包封率(Q_w)、容积包封率(Q_v)、药脂包封比率(E_w)。 Q_w 是指包入脂质体内的药物量与投料量的重量百分比,也是通常所称的包封率; Q_v 为每摩尔脂质形成脂质

体后所包裹溶液的体积,能形象地反映多层脂质体结构中的包封特性,通常也称为包封容积,将脂质体离心沉淀弃上清液后,用氧化氘(D_2O)重悬,测定氘的放射性强度可求得脂质体的内水相体积,从而计算出 Q_v ; E_w 是指类脂与包封药物的重量百分比,表示制剂中药物与辅料的关系,也简称药脂比。

1.2 包封率的测定方法

据文献报道,脂质体包封率测定方法可以分为:(1)直接测定法;(2)将游离药物与脂质体分离后测定。常见的测定方法是经透析、柱层析或离心等分离步骤,分别测定游离药物和脂质体内的药物量,计算包封率。常用的层析柱为葡聚糖凝胶(Sephadex)柱和琼脂糖凝胶(Sepharse)柱,利用脂质体和游离药物相对分子质量(M_r)的差异进行分离,但存在洗脱时间长、洗脱体积大、药物浓度低等问题。Fry首先报道了一种葡聚糖微型凝胶柱快速测定包封率的方法,可大大缩短常规柱所需的分离时间,因而得到了广泛的应用。据文献报道,在对微型凝胶柱的洗脱条件进行优化后,洗脱时间可由1~2 h缩短到6 min左右;对 M_r 大的生物药物,常规的柱层析分离会造成洗脱峰重叠,一个改进的方法是在低流速下采用 Sephacryl S 1000 柱,或 TSK-G6000、TSK-G5000、TSK-G4000 PW 等 HPLC 柱分离。

分离大分子生物药物脂质体的常用方法是超速离心法。但该方法成本较高,通常需要离心1 h以上,且各批样品间重现性差。Schubert等采用超速离心法($140\ 000 \times g$)分离菊粉时发现,该方法测得的包封率显著低于 Sepharose CL-4B 柱分离法,可能是

收稿日期 2005-10-20

作者简介:李唐棣,女,在读硕士研究生,研究方向:缓控释制剂。

Tel 010-66932654 E-mail LTDDSHZLI@163.com

* 通讯作者:梅兴国,男,教授,博士生导师,研究方向:药物新剂型

与新技术。Tel 010-66932654 E-mail xg_mei@163.com

由于离心过程中造成一部分小脂质体丢失,或离心力导致脂质体中药物渗漏丢失。

由于分离过程本身可能破坏脂质体或造成脂质体的渗漏,近年来发展了大量不经分离直接测定的方法,如通过荧光染料钙黄绿素的荧光淬灭反应测定包封率,该方法是利用添加钴阳离子后,未包封的钙黄绿素发生荧光淬灭来间接指示包封率。电子自旋共振光谱(ESR)也被用于包封率的测定,当添加顺磁性试剂如铁氢化物时,外部标记物的电子自旋谱带会显著加宽。还可以利用包裹在脂质体内部的标记物与游离标记物间扩散系数的不同来测定包封率,Zhang等^[4]报道了一种快速、简便测定脂质体包封率的新方法,通过¹H NMR结合pH敏感标记物高肌肽测定。比较了建立跨膜的pH梯度和添加化学位移试剂如铈(Ⅲ)-1,4,7,10-四氮杂十二环烷-1,4,7,10-四亚甲基磷酸钠(TmDOTP⁵⁻)两种方法,其对同一脂质体样品的Q_w和Q_v的测定结果基本一致,说明该方法是可靠的。

2 影响脂质体包封率的因素

影响脂质体包封率的因素很多,除制备工艺外,还包括药物的M_r、极性、电性、磷脂的组成及比例、溶剂的pH值、脂质体的类型及膜修饰物等。

2.1 脂质体的制备方法和结构类型

制备方法是影响包封率的最主要因素之一。当药物与脂质材料相同,制备方法不同时,包封率会有很大差异。Galovic-Rengel等^[5]分别采用水化法、脱水-再水化法、前体脂质体法,以大豆卵磷脂(SPC)制备了超氧化物歧化酶(SOD)脂质体,前体脂质体法的包封率较高(39.0%~65.4%),而水化法和脱水-再水化法的包封率分别为0.7%~12.6%和1.8%~2.9%。为提高难包载的水溶性药物的包封率,Brandl等^[6]报道了一种采用高压均质法制备的半固体制剂——脂质囊泡凝胶(vesicular phospholipid gels,VPG),VPG主要由小单层囊泡组成,由于它具有较高的脂质浓度,内水相体积大大提高,用于包载水溶性药物可获得更高的包封率(>50%)。一种以脂质为基质的组装液晶结构开始引起药剂学家的兴趣,这是一种立方相或六角相的结构(Cubosome[®]和Hexosome[®]),其特点是脂质浓度很高(50%~70%),每一个单体都由若干小单元相互连接组成的,因而表面积巨大,载药量很高。同时,Cubosome[®]内部曲折的扩散路径,可最大限度地实现药物的控制释放,

避免由于突释效应所造成的潜在毒性,目前,可用于Cubosome[®]和Hexosome[®]的制备方法主要包括超声和高压均质法。

2.2 类脂膜的组成和电性

类脂膜组成与脂质体的包封率大小关系密切,如Corvo等采用与Galovic-Rengel等相同的脱水-再水化法制备SOD脂质体时,包封率高达(66±5)%,原因可能是采用了饱和度较高的蛋黄卵磷脂(EPC)和胆固醇,使脂肪链的氧化程度大大降低,胆固醇填充了磷脂分子间的空隙,使膜上的磷脂排列更加紧密。

国外文献报道,脂质体多采用合成磷脂或氢化的天然磷脂制备^[7,8],常用的合成磷脂如二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)等,由于其高度饱和,脂肪链长,与普通的卵磷脂相比,具有更高的稳定性,在制备过程中一般不需要通氮气保护或加入抗氧化剂,得到的脂质体包封率高,渗漏低,稳定性好。Nii等^[9]研究了饱和程度不同的磷脂制备的脂质体,结果发现磷脂的氢化程度对脂质体的包封率影响显著,碘值为20的氢化卵磷脂的包封率高于碘值为5的氢化卵磷脂所制备的脂质体,且当有机溶剂为氯仿、第二步乳化温度为50℃时,制备的脂质体包封率最高,而有机溶剂温度提高到70℃时,高于氢化卵磷脂的相变温度,模型药物钙黄绿素的扩散速率和渗漏速率同时增加,包封率反而下降。

对脂质体包封率的研究表明,胆固醇的用量是一个重要影响因素,对于水溶性药物,适当提高磷脂和胆固醇中胆固醇的量,可以增加脂质体中水相的体积,提高药物的包封率。当在膜材中掺入酸性脂质或含氨基的脂质时,可以制备带负电荷或正电荷的脂质体,脂质体的表面电性会影响其包封率、稳定性和靶器官分布等,一般而言,带电荷的脂质体由于静电作用,可增加电性相反的药物离子的包封率。但Galovic-Rengel等在制备SOD脂质体时发现,对于pH7.0时带负电的SOD分子,带正电的脂质体(SPC/SA)与带负电的脂质体(SPC/SPG)的包封率基本一致,均高于中性脂质体的包封率。这表明除了电荷相互作用外,还有其他因素影响包封率的高低。因此,脂质体的最终包封率是多因素综合作用的结果。

2.3 药物的性质和浓度

固定了脂质材料组成和制备工艺后,脂质体的

包封率则由药物本身性质所决定,包括药物的溶解性、电性、 M_r 及药物浓度等。脂溶性大和水溶性特别好的药物,即 $4.5 < \lg P_{\text{oct}}$ 或 $\lg P_{\text{oct}} < 0.3$ 的药物在脂质体中包封率高($\lg P_{\text{oct}}$:正辛醇/水分配系数)。而 $\lg P_{\text{oct}}$ 为 $0.3 \sim 4.5$ 的药物很难形成高包封率的脂质体,因为制备时药物需在脂相和水相中重新分配,只有当药物能至少与脂相基质中的一个组分形成络合物时才能稳定地包封于脂质体中。Zhigaltsev等^[10]比较了三种结构相似的生物碱类化合物长春新碱、长春碱、长春瑞滨,采用离子梯度法载药的包封率。结果发现,25℃孵育2h,长春新碱和长春瑞滨的包封率均不到10%,当孵育温度提高到60℃后,包封率大大提高,但对长春碱而言,25℃孵育的包封率就可达60%左右,尽管其仍低于60℃孵育的包封率;对药物与脂膜的相互作用研究表明,尽管三种药物的化学结构高度相似,但其 $\lg P_{\text{oct}}$ 却有显著差异: $\lg P_{\text{长春碱}}(1.89) > \lg P_{\text{长春瑞滨}}(1.32) > \lg P_{\text{长春新碱}}(1.16)$,由于长春碱具有较高的疏水性,在跨膜pH梯度的驱动下更易穿过疏水的脂质膜,即使在低温下也能获得较高的包封率。

3 提高脂质体包封率的方法

3.1 前体药物法

通过适当修饰,将 $\lg P_{\text{oct}}$ 为 $0.3 \sim 4.5$ 的药物转变为水溶性或脂溶性大的药物,有利于提高包封率。一种方法是将药物成盐,使其水溶性增大;另一种方法是将药物酯化成亲脂性的前体药物。一些小分子的水溶性药物,如阿糖胞苷、5-氟尿苷、吉西他滨等,载入脂质体后很容易渗漏,影响了血浆半衰期和这类药物脂质体在临床上的应用,通过合成亲脂性前体药物可以大大提高其包封率。Immordino等^[11]通过对吉西他滨分子进行烷基化修饰,分别合成了4-N-戊酰基吉西他滨、4-N-庚酰基吉西他滨、4-N-十二酰基吉西他滨和4-N-十八酰基吉西他滨,结果发现,连接不同碳数的烷基链后,吉西他滨脂质体的包封率和载药量均有所提高,且包封率与4-N-酰基链长度密切相关,以 C_{12} 和 C_{18} 烷基链修饰的吉西他滨脂质体包封率最高($> 95\%$),脂质体最大载药量可达 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,采用差示扫描量热法(DSC)研究发现,吉西他滨包入脂质体后,峰位已发生了改变,提示烷基修饰的吉西他滨可能与磷脂的脂肪酸链结合,从而达到增大载药量和稳定的目的。

3.2 冻融法

反复冻融可以提高脂质体的包封率,方法是先制备空白的小单室脂质体,在冷冻前将待包封的药物加入,在快速冷冻过程中,由于冰晶的形成使脂质体膜破裂,形成冰晶与破碎的脂膜同时存在的不稳定状态,然后在一定温度下缓慢融化,此时暴露的脂膜会互相融合重新形成脂质体。冻融法特点是不需要有机溶剂,但必须避免糖类、高强度的离子如二价阳离子的存在,因为它们会干扰冻融过程,并降低包封率。

Huang等^[12]制备了钙黄绿素声敏脂质囊泡(卵磷脂/二棕榈酰磷脂酰乙醇胺/二棕榈酰磷脂酰甘油/胆固醇=69:8:8:15),在冻融过程中发现,以甘露醇为保护剂的脂质体粒径和包封率均显著增加,而海藻糖则无上述作用,进一步研究发现,甘露醇作为保护剂时,DSC谱图上有一明显的发热峰,表明在脂质体冻融过程中发生了反玻璃化转变,即冻结的脂质体在融解过程中从玻璃态向晶态转变,这会造成脂质体膜的破裂和重新融合,药物则随质膜重组被包入脂质体内。同时,这种脂质囊泡的破裂性质又能够增加超声反射率,有利于声敏脂质囊泡的形成。Ueno等^[13]报道,在探讨冻融过程中粒径对包封率的影响时,脂质体经反复冻融(10次以上)后平均粒径会达到一个相对恒定的范围(80~150nm),不论其初始平均粒径 $< 80 \text{ nm}$ 或 $> 150 \text{ nm}$,表明在脂质体冻融过程中,伴随脂质膜的破裂和融合,受磷脂非极性头基空间位阻和脂质膜曲率半径的双重影响,过大或过小的囊泡均无法形成,最终使脂质体囊泡平均粒径趋于一个恒定范围。

3.3 离子梯度法

离子梯度法是一类主动载药技术,包括pH梯度法和硫酸铵梯度法,可以制备稳定性好、包封率高的脂质体。用于两亲性药物如多柔比星、米托蒽醌、环丙沙星等的跨膜转运,包封率可达90%以上。影响梯度法载药的因素很多,主要包括跨膜pH梯度、孵育时间和温度、内水相介质浓度及药物-脂质比例等。跨膜pH梯度是影响包封率的重要因素,已建立了许多测定跨膜pH梯度的方法,包括 ^{14}C -甲胺法、9-氨基吡啶法等^[14,15],此外,也可利用阳离子染色剂吡啶橙荧光吸收光谱的蓝移和淬灭检测。

Stensrud等^[16]采用pH梯度法制备了伯氨喹(PQ)脂质体,溶液中存在 $\text{PQ} \rightarrow \text{PQ}^+ \rightarrow \text{PQ}^{2+}$ 的平衡,外水相中的PQ在pH梯度的驱动下载入脂质体,平衡向右移动,进入内水相后形成离子型 PQ^+ 。由于

内水相的柠檬酸缓冲液具有较高的离子强度, PQ^+ 进一步转化为渗透系数很低的 PQ^{2+} , 阻止药物向脂质体外渗漏。pH 梯度法载药技术的关键是维持恒定的跨膜 pH 梯度, 研究发现, 药物转运可能造成 pH 梯度的下降。一些文献中使用了离子载体 A23187^[10, 14], A23187 是一种细胞钙离子载体, 能选择性催化二价金属离子 (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} 等) 和质子的交换。Abraham 等^[14] 报道了 $MnSO_4$ 或 $MnCl_2$ 结合离子载体 A23187 建立跨膜 pH 梯度的方法, 其基本操作是: 首先将金属离子 Mn^{2+} 包埋在脂质体内, 通过凝胶过滤除去外面的金属离子后会产生跨膜的离子梯度, 然后将要包载的药物、细胞离子载体和其他辅助剂加入载药体系, 离子载体 A23187 可以促使金属离子 Mn^{2+} 向外转移(离子梯度的低浓度方向), 同时将两个质子转移到脂质体内, 从而形成脂质体内外的 pH 梯度。实验发现, 由硫酸铵或柠檬酸建立的跨膜 pH 梯度, 在载药过程中会发生崩溃, 而离子载体 A23187 可以有效维持载药前后的跨膜 pH 梯度。其他细胞离子载体还包括尼日利亚菌素(negreicin)和拉沙洛西(lasalocid A)。

4 结语

近年来, 脂质体膜修饰物对包封率的影响也引起人们的关注, Hwang 等^[17] 的研究表明, 大豆甾醇修饰对脂质体的包封率有很大影响。提高包封率一直是脂质体研究中的热点和难点, 目前, 用于提高包封率的方法还存在许多局限, 如离子梯度法仅用于弱碱性药物, 未见包封弱酸性药物的报道, 冻融法一般只适用于水溶性药物。因此, 深入研究包载过程中药物与脂质体膜相互作用, 将成为新的技术和方法的理论依据, 促进脂质体作为药物载体的开发和使用。

参 考 文 献

- [1] Fabani MM, Gargini R, Taira MC, *et al.* Study of *in vitro* stability of liposomes and *in vivo* antibody response to antigen associated with liposomes containing CMI after oral and subcutaneous immunization [J]. *J Liposome Res*, 2002, 1(1/2): 13-27.
- [2] Sadzuka Y, Nakade A, Tsuruda T, *et al.* Study on the characterization of mixed polyethylene glycol modified liposomes containing doxorubicin [J]. *J Control Release*, 2003, 9(3): 271-280.
- [3] Sivakumar PA, Rao KP. The use of cholesteryl pullulan for the preparation of stable vincristine liposomes [J]. *Carbohydr Polym*, 2003, 51(3): 327-332.
- [4] 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.
- [5] Galovic-Rengel R, Barisic K, Pavelic Z, *et al.* High efficiency entrapment of superoxide dismutase into mucoadhesive chitosan-coated liposomes [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2002, 15(5): 441-448.
- [6] Brandl M, Drechsler M, Bachmann D, *et al.* Preparation and characterisation of semi-solid phospholipid dispersions and dilutions thereof [J]. *Int J Pharm*, 1998, 17(2): 187-199.
- [7] Zhang JX, Zalipsky S, Mullah N, *et al.* Pharmacological attributes of dioleoylphosphatidylethanolamine/cholesterylhemisuccinate liposomes containing different types of cleavable lipopolymers [J]. *Pharmacol Res*, 2004, 49(2): 185-198.
- [8] Charrois GJ, Allen TM. Rate of biodistribution of STEALTH® liposomes to tumor and skin: influence of liposome diameter and implications for toxicity and therapeutic activity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 160(1): 102-108.
- [9] Nii T, Takamura A, Mohri K, *et al.* Factors affecting physicochemical properties of liposomes prepared with hydrogenated purified egg yolk lecithins by the microencapsulation vesicle method [J]. *Colloid Surface B: Biointerfaces*, 2002, 27(4): 323-332.
- [10] Zhigaltsev IV, Maurer N, Akhong QF, *et al.* Liposome-encapsulated vincristine, vinblastine and vinorelbine: a comparative study of drug loading and retention [J]. *J Control Release*, 2005, 104(1): 103-111.
- [11] Immordino ML, Brusa P, Rocco F, *et al.* Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gemcitabine prodrugs [J]. *J Control Release*, 2004, 100(3): 331-346.
- [12] Huang SL, MacDonald RC. Acoustically active liposomes for drug encapsulation and ultrasound-triggered release [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1665(1/2): 134-141.
- [13] Ueno M, Riwoongsitanont S. Effect of PEG lipid on fusion and fission of phospholipid vesicles in the process of freeze-thawing [J]. *Polymer*, 2005, 46(4): 1257-1267.
- [14] Abraham SA, Edwards K, Karlsson G, *et al.* An evaluation of transmembrane ion gradient-mediated encapsulation of topotecan within liposomes [J]. *J Control Release*, 2004, 96(3): 449-461.
- [15] Biloti DN, Santana MH, Pessine FB. Lipid membrane with low proton permeability [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1611(1/2): 1-4.
- [16] Stensrud G, Sande SA, Kristensen S, *et al.* Formulation and characterization of primaquine loaded liposomes prepared by a pH gradient using experimental design [J]. *Int J Pharm*, 2000, 198(2): 213-228.
- [17] Hwang S, Maitani Y, Qi XR, *et al.* Remote loading of diclofenac insulin and fluorescein isothiocyanate labeled insulin into liposomes by pH and acetate gradient method [J]. *Int J Pharm*, 1999, 179(1): 85-95.