

油酸多相脂质体(139)注射液包封率 测定方法的研究

邓英杰 史淑芬 顾学裘

(沈阳药学院)

提要 本文提出了油酸多相脂质体 139 注射液中脂质体的药物包封率和药物含量的测定方法,以凝胶过滤法 Sephadex G-50 柱测定 139 注射液中多相脂质体的重量包封率 Q_w 平均为 94.2%; 同时又以显微镜照像及统计方法测量了脂质体的体积包封率 Q_v 平均为 97.1%。并讨论了影响脂质体中药物包封率的各种因素。

关键词 多相脂质体 139 注射液; 脂质体包封率测定方法

多相脂质体 139 (polyphase liposome 139) 即油酸多相脂质体⁽¹⁾ 是将具有抗癌活性的油酸⁽²⁾ 包封在脂质体中, 通过特定的工艺制成以脂质体为主体的多相分散体系⁽³⁾。这些运载抗癌药物的超微粒载体, 通过一定的给药途径给药后, 能将药物导向靶区、癌变部位直接作用于癌细胞⁽⁴⁾, 同时对机体无毒副作用。这种靶向作用使抗癌药物的剂量减少、疗效提高、毒副作用降低。药物只有被包封在脂质体等载体中才能具有靶向作用, 因此将包封在药物载体中的药物量与药物总量之比称为药物包封率。脂质体剂型药物的包封率是与其临床疗效、毒副作用直接有关的质量参数。本文主要研究了油酸多相脂质体 139 注射液包封率的测定方法并讨论了影响脂质体剂型药物包封率的主要因素。

实验部分

一. 油酸多相脂质体 139 注射液的含量测定方法

油酸多相脂质体 139 注射液是一个组成很复杂的缓冲溶液体系, 其中以油酸为主的多不饱和脂肪酸 (以下简称总酸) 为其抗癌的主要成分⁽²⁾, 总酸中各种酸的含量已由气相色谱-质谱联用的方法测定⁽⁵⁾, 它是由十几种不饱和脂肪酸组成, 这些不饱和脂肪酸均为抗癌的活性成分。因此制剂中主药成分的含量测定应以测定总酸量为合适。我们考查了高效液相色谱法、电位滴定法、电导滴定法、碘量法和中和法等几种分析方法, 确定以中和法测定总酸量的方法精密度高、重现性好。

实验步骤: 精密称定一支 (约 10 g) 多相脂质体 139 注射液置 250 ml 三角烧瓶中, 定量加入 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液 15.00 ml, 再加中性乙醇 10 ml, 小火回流 1 h, 用 50 ml 新鲜蒸馏水分次洗涤冷凝器于三角烧瓶中, 冷却后加酚酞指示液 2 滴, 用 0.5 mol/L 盐酸标准溶液滴至粉红色消失, 并用空白试验校正。每 1 ml 0.5 mol/L NaOH 相当于 141.3 mg $C_{18}H_{34}O_2$ 。

二. 油酸多相脂质体 139 注射液包封率测定方法

(一) 凝胶过滤法测重量包封率 Q_w

采用 Sephadex G-50 凝胶柱 (2×16 cm) 过滤分离脂质体和游离药物乳滴, 然后分别测定脂质体包封的油酸量 I 和注射液中的总油酸量 I_0 , 重量包封率 $Q_w = \frac{I}{I_0} \times 100\%$ 。

实验步骤: 将一支 139 注射液 (约 10 g) 精密称定后, 加于事先以磷酸盐缓冲溶液平衡的 Sephadex G-50 柱上方, 以 70 ml 磷酸盐缓冲溶液分次洗脱, 收集洗脱液, 按照含量测定方法的步骤从定量加入 0.5 mol/L NaOH 溶液 15.00 ml 开始, 测定洗脱液即脂质体中包封的油酸量 I 。并测定未经 Sephadex G-50 柱分离的同批号 139 注射液 (加入 70 ml 磷酸盐缓冲液) 的总酸量 I_0 , 计算重量包封率 Q_w 。

实验结果: 同一批号油酸多相脂质体 139 注射液 (841011, 放置 15 个月) 药物包封率测定结果见表 1。

Tab 1. The percentage of drug entrapment in polyphase liposome of the injection(139)

No.	Oleic acid entrapped in liposome I (%)	Total Oleic acid in injection	
		I_0 (%)	Percent entrapment Q_w (%)
1	4.15	4.33	95.8
2	4.19	4.48	93.5
3	4.08	4.40	92.7
4	4.24	4.49	94.4
5	4.14	4.45	93.0
Average	4.16	4.43	93.9
SD			1.25
CV			1.33

七个批号油酸多相脂质体 139 注射液 (放置时间从 2.5 个月至 32 个月) 脂质体中药物包封率测定结果见表 2。

(二) 重量包封率 Q_w 测定方法验证

1. 回收率实验 分别将三个批号油酸多相脂质体 139 注射液通过分子筛, 以磷酸盐缓冲溶液洗脱, 收集脂质体部分, 制备完全被脂质体包封的标准样品, 分别测定每一批号的脂质体包封的酸量 (I_1); 再按包封率测定方法测定每一批号得实验值 (I_2), 计算回收率见表 3。

2. 混合样品测定 在油酸多相脂质体 139 注射液中加入 0.1~0.16 g 游离油酸, 测定此混合样品的包封率并与原注射液的包封率测定结果比较见表 4。

3. 分离效果验证 通过定量地将油酸加于 Sephadex G-50 柱上方, 洗脱后定量的方法和将油酸染色乳化, 然后加于柱上; 洗脱并观察色带移动的方法均证实游离油酸及 O/W 乳滴完全被截留在凝胶柱的上方, 色带不移动, 只有包封在脂质体内的油酸才能通过 Sephadex G-50 柱。

(三) 显微镜照像法测量体积包封率 Q_v

使用 Zeiss 生物显微镜附带照像装置 (德国产) 拍照 10 个批号 50 张油酸多相脂质体 139 注射液显微镜照片, 放大 1350 倍显微镜照片见文献^(9,10)。每张照片中都可以清楚地看到有几个油球亮点 (O/W 乳滴) 和大量的具有双层磷脂膜的脂质体。精确测量每个油球粒径并计数每张照片上的油球数目和脂质体数目, 对于难以计数的照片可再放大 10 倍后计数或将注

Tab 2. The percentage of drug entrapment in polyphase liposome of 7 batches of injection(139)

Batch No.	Time after preparation (month)	Oleic acid entrapped in liposome I (%)	Total oleic acid in injection I ₀ (%)	Entrapment (%)	
				Q _w	Average
830518	32	3.60	3.91	92.1	93.1
		3.69	3.92	94.1	
830907	23	4.05	4.19	96.6	97.7
		4.16	4.21	98.8	
841011	15	4.19	4.48	93.5	93.9
		4.24	4.49	94.4	
850328	10	3.86	3.99	96.7	97.3
		3.96	4.04	98.0	
850329	10	3.72	4.05	91.9	92.8
		3.84	4.10	93.7	
850401	9	3.82	4.16	91.8	92.0
		3.90	4.23	92.2	
851107	2.5	3.59	3.86	93.0	92.4
		3.70	4.03	91.8	
Average of 7 batches of the injection(139)				94.2%	

Tab 3. Recovery of the measurement method

Batch No.	Oleic acid entrapped in sample I ₁ (%)	Measured I ₂ (%)	Recovery (%)
841024	3.94	3.93	99.75
850328	3.74	3.67	98.13
850329	3.27	3.25	99.39
Average			99.09

Tab 4. The percentage of entrapment of sample after addition of free oleic acid(0.1~0.16g) to the injection(139)

Batch No.	Weight of injection (g)	Weight of oleic acid (g)	Oleic acid entrapped in liposome I (%)	Total oleic acid in injection I ₀ (%)	Percent entrapment (%)	
					Mixed sample Q _{w+o}	Original injection Q _w
841011	10.4342	0.1580	4.72	5.74	82.2	93.9
	10.4571	0.1549	4.62	5.62	82.7	
850401	10.8039	0.0938	4.14	4.99	83.0	92.0
	10.6235	0.1078	4.21	4.99	84.4	

射液稀释 1 倍再拍照。计算每张照片上油球与脂质体的比数 $\frac{N_0}{N_1}$ ，50 张照片该比数平均为 3.10/1000。以 TAI 型 Coulter 计数仪（英国 Coulter 公司产）按文献⁽¹⁰⁾介绍的方法分别测量 10 个批号油酸多相脂质体 139 注射液中脂质体的粒度分布（由显微镜照片可知脂质体粒径在 5 μm 以下）见表 5，计算每批注射液脂质体的平均粒径，计算各批号注射液中油球的平均粒径，根据球形体积公式 $V = \frac{4}{3}\pi r^3 = \frac{\pi}{6}d^3$ 和各批号油球与脂质体的平均比数 $\frac{N_0}{N_1}$ ，可分别求出各批号油球与脂质体的体积比 $\frac{V_0}{V_1} = \frac{d_0^3}{d_1^3} \times \frac{N_0}{N_1}$ ，体积包封率 $Q_v = \frac{V_1}{V_0 + V_1} \times 100\%$ （见表 5）。

Tab 5. The distribution of liposome size and the percentage of drug entrapment by volume Q_v in the injection(139)

Batch No.	Size(μm)						Liposome total number	Liposome average diameter (μm)	Oleic acid average diameter (μm)	Entrapment percentage Q_v %
	1.26~1.58	1.58~2.00	2.00~2.52	2.52~3.17	3.17~4.00	4.00~5.04				
	Liposome number									
840405	34174	10508	3389	1288	408	140	49907	1.458	3.1	97.1
840406	30534	13151	4124	1484	449	156	49899	1.469	3.1	97.2
841112	29667	12944	4941	1710	509	146	49917	1.487	3.2	97.0
841115	32594	11324	3843	1475	504	164	49904	1.455	3.0	97.3
841121	28200	12257	5466	2544	944	377	49788	1.541	3.3	97.0
841211	22624	13843	7613	3724	1387	469	49660	1.636	3.4	97.2
841220	32778	10926	3941	1489	559	186	49878	1.458	3.1	97.1
841222	31783	12035	3950	1422	527	186	49887	1.463	3.1	97.1
841224	30659	11993	4593	1761	640	221	49867	1.486	3.2	97.0
841226	31397	11931	4117	1579	603	223	49850	1.473	3.2	96.9

讨 论

一、脂质体中药物包封率是受多种因素影响的，例如脂质体的类型、使用的膜材和制备工艺等。一般多室脂质体和大的单室脂质体的包封率较高，小单室脂质体的包封率较低。使用的膜材主要与磷脂的性质有关，如果在膜材中加入一定比例的胆固醇，不仅能防止药物渗漏增加脂质体稳定性，也常能提高药物的包封率。采用反相蒸发法、熔融法制备的脂质体包封率较高，成膜法制备的脂质体包封率常较低，使用超声法制备小单室脂质体的过程常使脂质体包封率下降，制备脂质体的冻干制剂也会使其包封率下降。对于一定的膜材和工艺制备的脂质体其包封率则由被包封药物本身的性质决定，主要是药物在脂—水两组中的溶解度性质决定。Fabienne 等⁽⁶⁾使用六种具有典型脂—水相分配系数的胆碱及其衍生物，将它们分别包成脂质体，测定它们从脂质体中不同的释放速率实验⁽⁷⁾，很好说明了药物性质与脂质体包封率的关系。实验说明包封脂质体最合适的药物是脂溶性好或水溶性特别好的两种类型药物，一般使用药物在辛醇—水两相中的分配系数 Poct 值来表示这种性质，只有该值对数 Log Poct 大于 4.5 的脂溶性药物或 Log Poct 小于 -0.3 的水溶性药物，才能包封成具有较高包封率稳定的脂质体。对于具有中间值的药物包封脂质体后，药物迅速地渗漏，欲将这类药物包封脂质体，应在保持药物活性的前提下，首先将药物制成合适溶解度的前体药物再包封脂质体。例如，有人^(8,9)将氢化考的松 ($0.59 < \text{Log Poct} < 1.93$) 先制成氢化考的松辛酸酯 (Log

Poct \approx 4.75) 或氢化考的松棕榈酸酯 (Log Poct \approx 9), 而后制备了包封率高且稳定的脂质体。总之, 具有较高和稳定的药物包封率是脂质体剂型临床疗效好的保证, 而选择具有合适溶解度的药物包封脂质体是制备这种理想脂质体的前提。油酸多相脂质体 139 注射液中的油酸 (Log Poct $>$ 5) 是包封脂质体的理想药物, 从表 1,2 可见不仅包封率高而且在两年多的贮存期间包封率不变。

二. 据报道测定脂质体包封率的方法有凝胶过滤法、超速离心法、透析法、超滤膜过滤法及微型柱离心法。以上方法均为测定脂质体中包封药物的重量包封率的方法。我们比较了这几种方法, 实验说明凝胶过滤法较其它方法准确、方便、重现性好。超速离心法和超滤膜过滤法不能将与脂质体粒度相近的其它粒子, 如未包封的油酸形成的 O/W 乳滴分出, 影响测定结果; 透析法很费时间; 微型柱离心法不仅繁琐且重复性欠佳; 均不如凝胶过滤法。

另外, 本文提出了用显微镜照像和 Coulter 计数统计方法测量脂质体的体积包封率。该方法直观、准确、重现性好, 方法可靠。由结果可知油酸多相脂质体 139 注射液的体积包封率 Q_v 高于其重量包封率 Q_w , 是因为在每个脂质体内除油相外还有一定体积的内水相, 体积包封率是计算脂质体的整个体积 (包括内水相) 与粒子的总体积比; 而重量包封率则是脂质体内包封的药物量与药物总重量之比。体积包封率与重量包封率同样都可以衡量脂质体中药物的包封量, 同时, 测量体积包封率时通过显微镜照片可以直接观察脂质体的形态, 比较其它方法能更好地分辨出多相脂质体中的乳滴等其它粒子。但该方法不如凝胶过滤法简便、省时省力, 更适合于生产中进行质量控制。目前, 本文介绍的凝胶过滤法已作为油酸多相脂质体 139 注射液生产中法定的质量检查方法之一。

参 考 文 献

1. 顾学裘, 等. 多相脂质体 139 等抗癌活性的筛选. 中草药 1982; 13:157.
2. 陈建智, 等. 多不饱和脂肪酸与癌. 肿瘤 1983; 6:268.
3. 邓英杰, 等. 多相脂质体 139 注射液物理稳定性的研究. 药理学报 1984; 19:282.
4. 李民, 等. 油酸对艾氏腹水癌细胞 DNA 合成的影响. 药学通报 1982; 17:631.
5. 孙毓庆, 等. 抗癌药物多相脂质体 139 的气相色谱分析. 沈阳药学院学报 1984; 1:228.
6. Fabienne D, et al. Model studies for drug entrapment and liposome stability. In: Gregoriadis G, ed. *Liposome Technology*. Vol 2. 1st ed. Florida: CRC press, 1984:1~17.
7. Rozantsev E, et al. Synthesizing new stable free radicals in the 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl series. *IZV Acad Nauk SSSR Ser Khim* 1969; 5:1191.
8. Shaw I, et al. Liposome retention of a modified anti-inflammatory steroid. *Biochem J* 1976; 158:473.
9. Fildes F, et al. Interaction of cortisol-21-palmitate with liposome examined by differential scanning calorimetry. *J Pharm Pharmacol* 1978; 30:337.
10. 邓英杰, 等. 混悬型多相脂质体 139 静脉注射液粒径及异物检查方法. 药理学报 1987; 22:145.

STUDIES ON METHODS OF MEASUREMENT OF PERCENTAGE OF DRUG ENTRAPPED IN INTRAVENOUS INJECTION OF POLYPHASE LIPOSOME (139) IN THE FORM OF SUSPENSION

YJ Deng, SF Shi and XQ Gu

(Shenyang College of Pharmacy, Shenyang)

ABSTRACT This paper reports the methods of measurement of percentage of drug entrapment and drug content in polyphase liposome of the intravenous injection (139). The percentage of oleic acid entrapped in polyphase liposome of the intravenous injection (139) is determined by the method of gel filtration using column of Sephadex G-50, $Q_w=94.2\%$ (mean of 7 batches).

Moreover, the percentage of drug entrapment by volume of liposome in the intravenous injection (139) is also determined by the method of microscopic photography and Coulter counter(TAII), $Q_v=97.1\%$ (mean of 10 batches). The main influence factors for percentage of drug entrapped in liposome are discussed.

Key words Intravenous injection of polyphase liposome (139); Measurement method for percentage of drug entrapped in liposome