

• 综述 • 脂质体包封率测定方法研究进展

陈召红, 刘皈阳, 魏亚超

[摘要] 包封率是脂质体研究的重点, 脂质体作为药物载体只有对药物的有效包载, 才可能较好地发挥临床治疗作用。本文主要介绍脂质体包封率的各种测定方法并对其适用范围、优越性和局限性进行归纳总结, 以期为载体脂质体的研发和应用提供参考。

[关键词] 脂质体; 包封率; 测定方法

[中图分类号] R 943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9926(2011)01-079-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2011.01.028

脂质体由脂质双分子组成, 内部为水相的闭合囊泡, 其内水相和膜内均可以包裹多种物质如亲水性物质、疏水性物质和两性物质。包封率是评价脂质体制剂的制备工艺和质量评价的重要指标, 也是较普通制剂发挥高效、低毒特点并提高药物治疗指数、降低药物不良反应并减小药物剂量的关键^[1-3]。因此, 包封率是脂质体研究的重要考察项目。本文主要介绍脂质体包封率测定方法及其新进展, 以期促进新型载药脂质体的研究与开发。

1 包封率的计算

《中国药典》2005年版(二部)附录 X K E“微囊、微球及脂质体制剂指导原则”中质量检查项目下规定: 若得到的是分散在液体介质中的微囊、微球、脂质体, 应通过适当方法(如凝胶柱色谱法、离心法或透析法)进行分离后测定, 按下式计算包封率。

包封率(%) = $\frac{\text{系统中包封的药量}}{\text{系统中包封与未包封的总药量}} \times 100\% = \frac{\text{系统中包封与未包封的总药量} - \text{液体介质中未包封的药量}}{\text{系统中包封与未包封的总药量}} \times 100\%$

包封率不得小于 80%。此包封率通常称为重量包封率。此外, 还可用容积包封率和药脂包封比或磁脂包封比^[4-6]表示。

2 包封率测定方法

脂质体包封率测定可以将游离药物与脂质体分离后进行分析测定与不进行游离药物与脂质体分离直接分析测定的两种方法。前者经过凝胶柱层析

法、微柱离心法或透析法等分离纯化步骤进行测定, 然后根据总投药量计算得出包封率; 后者如荧光淬灭反应法、电子自旋共振光谱法等测定计算得出包封率。

2.1 凝胶色谱法 凝胶色谱法是利用脂质体与游离药物分子质量和粒径大小的差异进行分离, 脂质体粒径较大先被洗脱, 游离的药物粒径较小后被洗脱从而达到分离效果, 常用的分离介质是葡聚糖凝胶和琼脂糖凝胶。基本方法是先将溶胀好的凝胶装入柱子中, 用洗脱液冲洗柱子至平衡后, 将脂质体上柱, 洗脱。

吴骏和朱家壁^[7]用葡聚糖凝胶柱色谱法分离含药脂质体和游离药物, 用蒸馏水洗脱, 分段收集, 用紫外分光光度计于 252 nm 处测定脂质体和游离药物吸光度并作洗脱曲线, 可见两者较好分离; 通过高、中、低 3 种不同浓度空白脂质体对照液进行回收率试验, 药物回收率为 99.46%, 加样回收率为 99.86%, 药物含量测定方法的回收率为 100.8%, 显示脂质体载体的不同浓度对药物的含量测定没有影响, 该方法能准确的测定游离药物的量; 计算得到样品平均包封率为 (64.3 ± 2.5)%。高晓黎和季兴梅^[8]考察 3 种不同型号的葡聚糖凝胶 Sephadex G-50(粒度 100~300 μm)、Sephadex G-50(粒度 50~100 μm) 和 Sephadex LH-20 的分离能力, 后两者小粒径对水溶性药物分离能力较差, 而前者较大粒径表现出良好的分离效果; 同时采用正交设计法对测定水溶性药物脂质体包封率条件进行筛选, 可知葡聚糖凝胶柱的径高比、洗脱流速、上样量都影响脂质体与游离药物的分离效果, 实验中宜选择能使脂质体达到最大分离程度的洗脱条件, 才能保证测得准确的包封率; 脂质体平均包封率为 (63.77 ± 4.95)%, RSD 为 7.76%, 平均回收率为 (95.37 ±

作者简介: 陈召红, 硕士研究生。研究方向: 抗肿瘤药物研究。Tel (010) 66936674; E-mail zhcher927@ sina.com

作者单位: 100048 北京, 解放军总医院第一附属医院药剂药理科

通讯作者: 刘皈阳, Tel (010) 66867006 E-mail liuguai@gmail.com

4 13)% , 结果表明该方法和条件使脂质体洗脱完全, 其中药物的回收率高, 可准确测定药物包封率。

葡聚糖凝胶色谱法分离条件较稳定, 凝胶柱可重复利用, 所需注意事项是上样前先用空白脂质体饱和凝胶, 目的是为消除凝胶对脂质体的吸附作用, 本法可分离脂质体与未被包封的低分子质量化合物(如药物、细胞因子、酶抑制剂、底物等)或分离蛋白质脂质体与残留的游离蛋白质; 但是凝胶柱分离所用时间长, 对样品的稀释性大, 会造成脂质体内药物渗漏, 对粒径小的脂质体, 不易使脂质体与游离药物分离, 一些极难溶于水的药物, 在介质中以晶体形式存在, 不适用于该方法, 如泼尼松龙等肾上腺糖皮质激素类药物^[9]。

2 2 微柱离心法 微柱离心法可快速、简便分离脂质体内外相药物, 所需样品量小且几乎不影响原来样品性质与状态的脂质体包封率测定, 尤其适用于一些中间过程检测, 如药物释放过程、主动载药过程^[10], 其优点是在最初的离心中已除去增加脂质体体积的过量空白溶液, 因此不经稀释即可重新得到脂质体, 需注意该法是建立于脂质体不被填充物物理滞留的假设之上, 应事先检验该假设。

洪慧等^[11]以洗脱液的紫外吸收值为指标($A < 0.003$ 脂质体完全洗脱条件), 比较葡聚糖微型凝胶柱中的水分、离心机转速、离心时间对包封及未包封药物洗脱速度的影响, 葡聚糖微柱采用 1000 r/min 离心 6 s 除去 3 ml 的水后, 加入的脂质体 2000 r/min 离心 5 min 一次可将包封的辣椒碱完全洗脱, 而游离辣椒碱不被洗脱, 在脂质体洗脱过程中, 药物辣椒碱及葡聚糖柱本身均无紫外吸收, 应用离心机的加速作用, 可使脂质体的洗脱速度大大加速, 洗脱时间从 $1 \sim 2 \text{ h}$ 缩短至 6 min , 不仅速度快且葡聚糖用量小约 0.5 g 而常规葡聚糖色谱柱用量为 $5 \sim 8 \text{ g}$ ^[12]; 通过紫外分光光度法在 281 nm 分别测定脂质体中辣椒碱的总含量及葡聚糖微柱洗脱后被包封的辣椒碱的含量, 脂质体平均包封率为 $(95.25 \pm 0.523)\%$, RSD 为 0.55% , 柱回收率为 99.5% , RSD 为 1.08% 。此外, 作者还用本文的条件测定了双氯芬酸钠柔性脂质体的包封率, 结果与原文一致, 说明本实验条件具有较大的适应性。王汀等^[13]考查 3 种性质不同药物(亲水性盐酸拓扑替康、亲脂性氟吡咯芬、亲水亲脂性酮洛)、相同磷脂组成的脂质体中药物的分离作用和影响因素, 实验证明不同的药物性质可能造成脂质体与游离药物分离不完全, 离心条件不同洗脱程度不同, 所以使用前必须考查使用条件, 以高效液相色谱法测定药物含量, 以定磷法测

定磷脂含量, 最后采用测定药脂比计算包封率, 需要注意的是此法无需将脂质体完全洗脱, 只要完全分离了游离药物, 测定结果不受脂质体洗脱程度影响, 只要达到药物或脂质体检测需要量即可。

郭丹等^[14]分别采用葡聚糖柱层析法和微柱离心法分离空白脂质体与游离药物测定包封率, 每管 *Nobiliside-A* 洗脱液采用高效液相色谱-蒸发光检测法测定含量, 每管空白脂质体洗脱液用异丙醇破乳后于 278 nm 处测定吸光度, 根据每管的药物浓度或吸光度绘制洗脱曲线, 可见两者有较好的分离; 两方法测定包封率分别为 95.92% 和 96.32% , RSD 为 0.32% 和 0.48% , 药物回收率分别为 95.06% 和 98.67% , 空白脂质体回收率均为 98.50% , 测得的结果无显著性差异 ($P > 0.05$)。需要注意的是如果包载药物与脂质体膜有很迅速且很强的结合力, 在制备洗脱曲线的时候不宜将空白脂质体和药物同时加入同一个柱子中, 因此要分别测定空白脂质体和药物的洗脱曲线。

2 3 透析法 透析法是把药物放入一定截留分子量的透析袋中, 再把透析袋置于比其体积大许多倍的透析介质中, 游离药物顺浓度梯度从透析袋内渗透到透析袋外, 而脂质体由于粒径较大而不能渗透到外部介质里, 然后在不同的时间测定介质中的药物浓度, 直至外部介质中的药物浓度不变, 说明透析袋内外游离药物的浓度相同且达到平衡, 此时的时间作为游离药物透析平衡时间, 测出此时介质中的药物浓度计算游离药物的浓度, 进而计算出包封率。

周臻等^[15]利用透析法分离脂质体游离药物, 透析平衡时间为 10 h 此方法的平均游离药物回收率为 $98.5\% \sim 99.9\%$, 符合实验要求, 且高、中、低 3 种浓度的日内和日间精密度试验 RSD 均小于 1% , 透析 24 h 脂质体无药物渗漏, 重现性良好, 采用紫外分光光度法在 284 nm 处测定兰索拉唑中的药物含量, 取出透析袋内的样品计算包封的药物量, 用未透析的样品计算总的药物量, 两者之比为包封率。需要注意的是兰索拉唑为脂溶性药物, 几乎不溶于水, 故选用甲醇直接破乳同时可使药物溶解, 并且在磷酸盐缓冲液 ($\text{pH} 11.6$) 平衡介质中有一定的溶解度, 故可用透析法测定脂溶性药物脂质体包封率。张文涛等^[16]采用 0.5% 的聚山梨醇酯水溶液作为透析介质, 不仅可提高药物在透析介质中的溶解度, 同时可防止药物在透析介质中的溶解达到饱和需频繁更换透析介质而分离游离药物, 采用高效液相色谱法测定多烯紫杉醇脂质体的包封率并考察其可行性, 测

定其包封率平均值为 95.6%, 药物回收率平均值为 99.7%, 需要注意的是该脂质体处方中含有表面活性剂, 使脂质膜具有较大的流动性^[17], 在透析过程中药物可能有部分泄漏。

透析法操作简单并可以处理较大量样品, 适合体外稳定性好的脂质体制剂, 但测定过程中所用的时间较长, 需要大量透析液并且要不断更换透析液, 同时还需考虑透析膜对药物的吸附性质, 且不适合难溶于水的药物的分离; 如果选择合适的透析液, 也可对脂溶性药物进行分离, 计算得出包封率^[18]。

2.4 荧光淬灭反应法 荧光淬灭法指具有荧光的物质如钙黄绿素、羧基荧光素等水溶性荧光物质或者具有荧光的药物, 在高浓度时发生“自淬灭”, 在某一低浓度范围内, 荧光强度又和浓度成正比^[19]。高浓度时包封于脂质体内水相中, 然后高度稀释于分散介质中, 这时包封在脂质体内水相中荧光物质保持自淬灭无荧光产生, 而未包封在脂质体外水相中浓度降低荧光重现, 加入破膜液后, 脂质体的内水相中荧光物质释放, 稀释到适当浓度发出荧光, 通过荧光检测器测定荧光值, 准确测定最初脂质体包封和未包封的荧光物质浓度计算得到包封率。此方法意义在于不需要分离脂质体和游离药物直接测定药物的包封率, 快速、准确, 避免了分离带来的误差。

沈雁等^[20]建立基因 sRNA 脂质体含量和包封率测定方法, 利用荧光染料 SYBR Gold 和 Ribogreen 与 sRNA 结合后能发出强烈荧光的原理, 分别采用电泳法和荧光分光光度法测定脂质体中的 sRNA 含量, 计算包封率, SYBR Gold 电泳法和 Ribogreen 荧光分光光度法高、中、低 3 个浓度回收率分别为 96.35%、96.92% 和 100.74% 与 98.22%、99.88% 和 99.64%, RSD 均小于

5%, 脂质体中 sRNA 平均含量和平均包封率分别为 98.52%、99.20% 与 97.83%、96.45%。经 *t* 检验, 两方法无显著性差异 ($P > 0.05$)。两方法准确可靠、稳定性高, 均可用于阳离子脂质体中基因 sRNA 的含量和包封率测定。

需要注意的是被包封基因物质与荧光染料结合需一定的时间, 其混合液应在室温下, 避光 3~5 min 后才能进行荧光测定^[21]; 同时鉴于样品稳定性试验, 被包封基因物质与荧光染料结合后发射的荧光随着时间的延长会有一定程度的衰减, 所以荧光测试液必须临用现配。

2.5 电子自旋共振光谱法 电子自旋共振光谱法也被用于包封率的测定, 当添加顺磁性试剂如铁氢氧化物时, 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。

Cianil 等^[22]采用电子自旋共振光谱法测定脂质体的包封体积, 通过加入电子自旋共振标记物 dsAT (可自由渗透到脂质体的内部) 和谱线展宽试剂草酸铬盐 (不能渗透到脂质体的内部) 来实现测定游离和包封的 dsAT, 当加入草酸铬盐时, 包入脂质体内部的 dsAT 自旋共振谱线没有变化, 而游离的 dsAT 谱线发生显著的展宽现象, 从而可以测定包封和未包封的 dsAT, 计算包封率。目前测定脂质体包封率的方法归纳为表 1。

3 结论与展望

脂质体研究领域的发展日新月异, 高效、靶向、低毒的脂质体的出现给疾病特别是恶性肿瘤的治疗带来了一场新的革命, 而这有赖于高包封率的载药

表 1 测定脂质体包封率的不同方法比较

测定方法	特点与适用范围	缺点与不足
凝胶柱层析法	适用于脂溶性药物, 较大脂质体粒径 (> 200nm)	所需样品量大, 操作繁琐, 洗脱用时长 (1~数小时), 对药物稀释大易造成渗漏
微柱离心法	所需样品量小, 适用于水溶性药物和脂溶性药物, 分离过程时间短, 可用于中间过程检测	离心转速高易引起微柱断裂, 需选择合适的转速
透析法	可处理大量样品, 水溶性药物, 适合小粒径、体外稳定性好的脂质体, 无药物渗漏	需用大量透析液且透析平衡耗时 (1~数天)
荧光淬灭反应法	可处理大量样品, 检测物需有荧光性或者可生成荧光性物质, 直接测定	需注意荧光物质的酸碱溶解性, 荧光物浓度不可过高, 否则无法检测 (荧光强度在一定浓度范围呈正比关系)
电子自旋共振光谱法	所需样品量小, 不需分离脂质体和游离药物, 准确、稳定, 可避免分离带来的误差	需加入顺磁性试剂 (铁分析波长 248.3nm, 此波长被检测物不能有吸收) 或分子标记物

脂质体。目前脂质体包封率的测定方法较多,但不是每一种方法适合所有的脂质体,故在考察脂质体的包封率时,只有通过理论和试验相结合才可选择出合适的测定方法,测出的包封率才更有实际应用意义。随着科研工作者对脂质体包封率新理论及新方法的不断深入探索,相信会有更多有效的方法涌现出来并投入到实际应用当中。

[参考文献]

- [1] 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
- [2] 郑宁, 张立德. 脂质体质量控制方法的研究概况 [J]. *中国新药杂志*, 2004, 13(12): 1282-1286
- [3] 杨彤. 新型脂质体研究进展 [J]. *医药导报*, 2009, 28(3): 336-338
- [4] 李唐禄, 郝丽梅, 梅兴国, 等. 脂质体包封率的研究进展 [J]. *国外医学药学分册*, 2006, 33(3): 224-227
- [5] Sabaé R, Bamadas-Rodríguez R, Callejas-Fernández J *et al.* Preparation and characterization of extruded magnetoliposomes [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 347(1-2): 156-162
- [6] Mura P, Maestrelli F, González-Rodríguez ML, *et al.* Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007, 67(1): 86-95
- [7] 吴骏, 朱家壁. 阿昔洛韦脂质体包封率的测定 [J]. *药物分析杂志*, 2003, 23(3): 213-216
- [8] 高晓黎, 季兴梅. 葡聚糖凝胶柱色谱法测定脂质体包封率的条件筛选 [J]. *中国药学杂志*, 2003, 38(7): 515-517
- [9] Teshima M, Kavakami S, Nishida K, *et al.* Prednisolone retention in integrated liposomes by chemical approach and pharmaceutical approach [J]. *J Control Release*, 2004, 97(2): 211-218
- [10] Torchilin VP, Weissig V. *Liposomes: A Practical Approach*, Second Edition [M]. Beijing: *Chemical Industry Press*, 2007. 41-42
- [11] 洪慧, 龙晓英, 李力任, 等. 葡聚糖微型凝胶柱测定辣椒碱柔性脂质体包封率的条件探讨 [J]. *广东药学院学报*, 2005, 21(2): 120-123
- [12] EIM aghaby GM, Williams AC, Bany BW. Skin delivery of fluorouracil from ultra-deformable and standard liposomes in vitro [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53(8): 1069-1077
- [13] 王汀, 李文秀, 邓英杰. 微柱离心-药脂比测定脂质体药物包封率 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2008, 25(1): 10-14
- [14] 郭丹, 熊阳, 孙鹏. Nobiliside-A 脂质体包封率测定方法的研究 [J]. *中成药*, 2009, 31(2): 208-212
- [15] 周臻, 邓英杰, 杨静文. 兰索拉唑脂质体包封率的测定 [J]. *药物分析杂志*, 2007, 27(9): 1459-1461
- [16] 张文涛, 黄庆柏, 林丽峰, 等. 多烯紫杉醇脂质体包封率的测定 [J]. *中国医药工业杂志*, 2008, 39(7): 514-516
- [17] Marcelino J, Lima JL, Reis S *et al.* Assessing the effects of surfactants on the physical properties of liposomes membranes [J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2007, 146(2): 94-103
- [18] 曾小耘, 郑若纯, 庄静波. 兰索拉唑肠溶片及肠溶胶囊溶出度的比较 [J]. *中国药房*, 2001, 12(3): 171-172
- [19] Chen G, Jiang Z, Yoshimoto M, *et al.* Electric impedance method for evaluation of the release property of calcin-encapsulated liposomes [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, 74(1): 32-36
- [20] 沈雁, 涂家生, 朱家壁, 等. 凝胶电泳法及荧光光度法测定 sRNA 阳离子脂质体的含量和包封率 [J]. *药科学报*, 2009, 44(4): 430-435
- [21] Junghans M, Kreuter J, Zimmer A. Phosphodiester and phosphorothioate oligonucleotide condensation and preparation of antisense nanoparticles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1544(1-2): 177-188
- [22] Ciani L, Ristori S, Bonechi C, *et al.* Effect of the preparation procedure on the structural properties of oligonucleotide/cationic liposome complexes (lipoplexes) studied by electron spin resonance and Zeta potential [J]. *Biophysical Chemistry*, 2007, 131(1-3): 80-87

(收稿日期: 2010-07-02; 修回日期: 2010-09-06)

(本文编辑 金杨红)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊参考文献的著录格式要求 (II)

电子文献 著录格式: 主要责任者. 题名: 其它题名信息 [文献类型标志/文献载体标志]. 出版地: 出版者, 出版年 (更新或修改日期) [引用日期]. 获取和访问路径.

- [1] HOPKINSON A. UNMARC and metadata Dublin Core [EB/OL]. [1999-12-08]. <http://www.ifla.org/IV/ifla64/138-161e.htm>.

专利 著录格式: 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号 [文献类型标志]. 公告日期或公开日期 [引用日期]. 获取和访问路径.

- [1] 姜锡洲. 一种温热外敷药制备方案: 中国, 88105607.3 [P]. 1989-07-26

另: 除会议消息报道等简讯外, 本刊要求所用文章均应附参考文献。

(本刊编辑部)