

类紫杉醇脂质体体外释放的浆膜结合分析法研究

郑玉婷, 洪涛, 徐柯卉, 温明皓, 杨吉雪, 伍梦莹, 杭太俊, 宋敏*

(中国药科大学药物分析系, 南京 210009)

摘要 体外释放度是评价脂质体制剂质量的重要指标, 目前各国药典中均未收载脂质体体外释放度评价方法, 致使脂质体质量评价缺乏统一标准和无法提供安全性保障。本研究以自制类紫杉醇脂质体为例, 通过优化外部释放条件建立的浆膜结合法模拟了在生理条件下类紫杉醇药物 12 h 的释放情况, 结果表明以 0.5% SDS-HEPES 作为释放介质, 采用截留分子量为 1 000 kD 的透析袋对脂质体水溶液进行释放的结果满足要求, 且具有区分能力, 为载药脂质体体外释放方法开发提供参考。

关键词 脂质体体外释放; 透析法; 类紫杉醇脂质体; 浆膜结合法

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2023)06-0743-06

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023041803

引用本文 郑玉婷, 洪涛, 徐柯卉, 等. 类紫杉醇脂质体体外释放的浆膜结合分析法研究[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(6): 743 - 748.

Cite this article as: ZHENG Yuting, HONG Tao, XU Kehui, et al. *In vitro* release of paclitaxel derivative liposome by paddle membrane binding assay[J]. *J China Pharm Univ*, 2023, 54(6): 743 - 748.

In vitro release of paclitaxel derivative liposome by paddle membrane binding assay

ZHENG Yuting, HONG Tao, XU Kehui, WEN Minghao, YANG Jixue, WU Mengying, HANG Taijun, SONG Min*
Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The *in vitro* release is an important index to evaluate the quality of liposome formulation. Currently, there is no evaluation method for the *in vitro* release of liposome in pharmacopoeia of various countries, which leads to the lack of unified standard and safety guarantee for the quality evaluation of liposome formulation. Taking the self-made paclitaxel derivative liposomes as an example, the paddle membrane binding method established by optimizing external release conditions was used to simulate the complete release of paclitaxel derivative drugs in 12 hours under physiological conditions. The results showed that using 0.5% SDS-HEPES as the release medium and a dialysis bag with a molecular weight cutoff of 1 000 kD to release the liposome solution met the requirements and had discrimination ability, providing a reference for the development of drug-loaded liposomes release methods *in vitro*.

Key words *in vitro* release of liposome; dialysis method; paclitaxel derivative liposome; paddle membrane binding assay

脂质体是由一个或多个磷脂双分子层包裹核心水相组成的球形囊泡, 它们独特的两亲性使其能够装载各种疏水或亲水的生物活性物质, 具有靶向性、生物利用度高、提高药物稳定性、降低药物毒性等优势。由于药物临床试验的成本高、风险大, 通过体外释放来预测体内行为, 可以降低脂

质体药物临床失败的风险。1997年, 美国食品药品监督管理局发布的《口服缓释剂型: 体外/体内相关性的开发、评价和应用》(*Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In vitro/In vivo Correlations*) 指南中揭示了体外溶出度检测的重要意义: (1) 提供过程控制和质

量保证;(2)确定产品随时间的稳定释放特性;(3)利于监管决定^[1]。释放度不仅能区别不同处方或组成的制剂,还在一定程度上反映了药物的安全性有效性,故体外释放是脂质体药物的关键质量控制项目之一^[2]。

本研究针对创新药物类紫杉醇脂质体冻干粉制剂进行研究。类紫杉醇新药化学结构与紫杉醇和多西他赛相似,均具有相同的10-脱乙酰基巴卡丁Ⅲ母核,且三者抗肿瘤机制相同,均主要作用于微管和微管蛋白系统从而起到抗肿瘤的作用。由于类紫杉醇的疏水特征,将其包裹在由磷脂、胆固醇合成的膜层结构中制成脂质体,可有效降低增溶剂导致的不良反应。本品预期体内释放时间为12 h。在分析现有体外释放方法的优缺点基础上,结合本品的特点,进行了分析测定方法的开发。

离心超滤法效率高、设备成本低、操作快速;固相萃取法对脂质体和游离药物的分离度较高,可有效去除干扰物质,灵敏度高^[3],在体外释放研究中的应用^[4-5]。因此本研究分别采用了离心超滤法、固相萃取法以及透析袋与溶出浆法结合的方法对类紫杉醇脂质体制剂进行释放度考察。最终发现将透析袋与溶出浆法结合效果最佳,简称为浆膜结合法,并对该方法进行了条件优化。

1 材料

1.1 试药与试剂

自制类紫杉醇原料药(批号:191104,定量核磁标定纯度97.75%);自制类紫杉醇脂质体冻干粉(批号:210302、210303、210304,每支20 mg)。

乙腈、甲酸、硫酸、甲酸铵(分析纯,南京化学试剂股份有限公司);4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、十二烷基硫酸钠(SDS)(分析纯,美国Sigma-Aldrich公司);吐温-80(化学纯,南京化学试剂股份有限公司);三乙胺(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);牛血清白蛋白(上海碧云天生物技术有限公司,批号:ST023-50 g);Amicon® Ultra-0.5超滤离心管(美国Millipore公司,规格:30 K);Oasis HLB 30 $\mu\text{mol/L}$ 固相萃取柱(美国Waters公司,规格:60 mg/3 cc);普通型透析袋3.5 kD(批号:MD3525),普通型透析袋8~14 kD(批号:MD1425),纤维素透析袋100 kD(批号:SP131414),以上透析袋均购自上海源叶生物科技

有限公司;即用型透析袋1 000 kD(美国光谱医学公司,批号:131492);0.45 μm 水系滤膜(天津津腾试验设备有限公司);0.22 μm 水系滤膜(上海新亚净化器件厂)。

1.2 仪器

LC-2010C HT高效液相色谱仪(日本岛津公司);BS 110S型电子分析天平、BS 21S型电子分析天平,PB-10普及型pH计(德国Sartorius公司);ZRS-8G智能溶出试验仪(天津大学无线电厂);MZY-UR30VF实验室超纯水机(南京妙之仪电子科技有限公司);KH-250DB型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);Zetasizer Nano ZS90激光粒度分析仪(英国Malvern Instruments公司)。

2 方法与结果

2.1 释放方法的选择

将类紫杉醇脂质体均匀分散于HEPES缓冲液中,加入三乙胺硫酸盐后置37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中振荡。在适当时间点吸取溶液0.5 mL,置于超滤离心管,以14 500 r/min转速离心30 min或加在预处理的Oasis固相柱上分离脂质体与游离药物。

离心超滤法在48 h释放度仅为 $(22.48 \pm 7.45)\%$ ($n=6$),考虑可能是脂质体释放的游离药物不溶于HEPES释放介质,导致离心时无法透过滤膜孔径,而留在了膜内,使释放度测量不准。故取适量原料药用含0.5%吐温80的HEPES释放介质溶解后按上述超滤离心法处理,测得结果发现超滤膜对游离药物存在着显著吸附。游离药物留在了膜内,而未滤过膜外。即使采用游离药物对超滤膜进行预饱和,也不能有效消除其吸附作用,使得数据测定无法客观准确。

固相萃取法48 h释放率为 $(24.5 \pm 5.42)\%$ ($n=6$),分析原因可能是游离药物与SPE小柱在预处理过程中引入的牛血清白蛋白结合,导致在淋洗步骤时以药物-蛋白结合形式被洗脱下来造成损失。实验发现三乙胺硫酸盐作为释放剂,主要是增大内水相渗透压使内水相中的药物释放,而对于分布在脂质双分子层中的类紫杉醇药物,是否加入三乙胺硫酸盐对其释放无影响。

2.2 透析袋截留相对分子质量的选择

裁取6 cm左右透析袋,两端以配套的透析夹

夹紧并用牛皮筋固定于溶出浆上,照高效液相色谱法(《中华人民共和国药典》2020 版四部通则 0512 项下高效液相色谱法)测定。由表 1 可知透析袋内脂质体水溶液上样体积为 0.5 mL 和 1 mL 释放最好,更换表面活性剂后 24 h 释放量明显变

大,表明 SDS 比吐温 80 更能增大脂质体表面磷脂双分子层的流动性。同时也反映了透析袋截留相对分子质量太小导致药物不能透过的问题,使用 1 000 kD 的透析袋为最佳。

Table 1 *In vitro* release results of liposomes with dialysis bag in different molecular weight cut-off at 24 h

Release medium	Molecular weight cut-off / kD	Sample volume of liposome aqueous solution/%					
		0.5 mL	1 mL	2.5 mL	3 mL	5 mL	8 mL
0.5% Tween 80 PBS	3.5	10.90	12.20	2.19	2.37	6.19	3.39
	8-14	14.71	10.72	3.74	7.16	1.62	1.10
	100	15.23	6.13	3.84	3.38	2.91	2.06
0.5% SDS PBS	100	60.71	44.19	20.16	40.41	10.77	16.22
	1 000	98.57	92.31	70.74	56.44	36.11	8.01

2.3 释放介质的选择

在透析袋内脂质体水溶液的上样体积为 1 mL 时,如图 1 所示,分别比较了 0.1%、0.3%、0.5% SDS 的 PBS 缓冲液和 0.1%、0.3%、0.5% SDS 的 HEPES 缓冲液作为介质的释放情况,由于 0.5% SDS 相较于更低浓度的 SDS,HEPES 缓冲液相较于 PBS 缓冲液更能满足预期时间的体内释放要求,因此选定 SDS 浓度为 0.5%、释放介质为 HEPES 缓冲液。

2.4 透析袋内脂质体水溶液上样体积考察

由表 2 可知在 0.5 mL 上样时累积释放度的 RSD 整体小一些,而且释放更快。考虑到当上样体积过小时可能会导致移取溶液的误差变大,重复性变差,从而使 RSD 增大,故选定脂质体水溶液

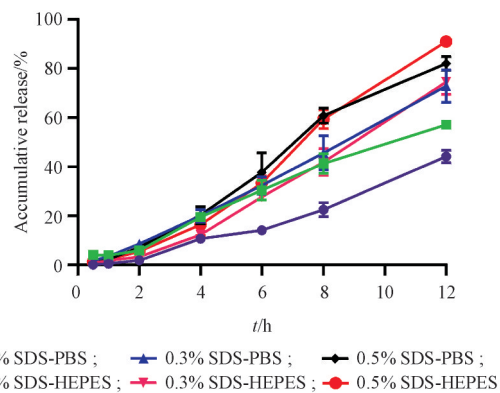


Figure 1 *In vitro* drug release curves of paclitaxel derivative liposomes in different dissolution media ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

上样体积为 0.5 mL 的条件下对溶解冻干粉的水溶液体积进行考察。

Table 2 *In vitro* release results of liposomes with 0.5 mL and 1 mL of aqueous solution in dialysis bag ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Liposome aqueous solution / mL	Accumulative release/%						
	0.5	1	2	4	6	8	12 h
0.5	1.26 ± 0.23	3.89 ± 0.47	9.91 ± 2.11	30.08 ± 6.63	57.1 ± 8.63	80.88 ± 2.76	95.47 ± 0.91
1	0.94 ± 0.47	2.38 ± 0.93	6.44 ± 0.71	16.38 ± 2.61	33.67 ± 4.24	57.4 ± 6.75	90.64 ± 4.77

2.5 脂质体冻干粉溶解体积考察

释放度考察中一般要求靠前时间点累积释放度的 RSD 可稍大一些(应在 20% 以内),其后各时间点的 RSD 应在 10% 以内,由表 3 所示,20 mL 比 30 mL 更符合规定。故最终优化条件为以 0.5%SDS 的 HEPES 作为释放介质,20 mL 纯化水溶解脂质体冻干粉,透析袋内脂质体水溶液上样 0.5 mL 进行释放。

2.6 体外释放测定结果

测定方法见“2.2”项。类紫杉醇脂质体在 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 h 的累计释放速率分别为(3.71 ± 0.68)%、(11.44 ± 1.85)%、(35.39 ± 4.62)%、(78.48 ± 2.82)%、(91.79 ± 2.65)%、(97.28 ± 3.3)%和(102.83 ± 2.96)%($n=6$)。

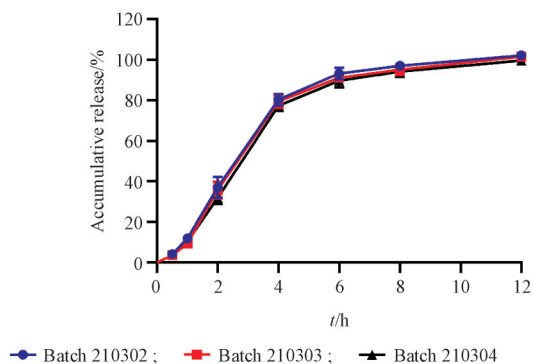
2.7 批间重复性考察

3 批脂质体制剂在 12 h 内释放稳定,批次间一

Table 3 *In vitro* release results of liposomes with 20 mL and 30 mL of purified water in penicillin bottle ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

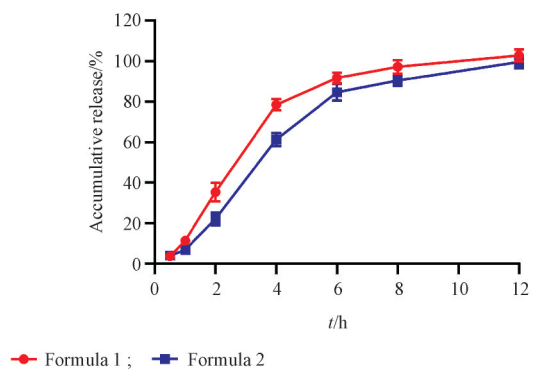
Purified water/mL	Accumulative release/%						
	0.5	1	2	4	6	8	12 h
20	3.45 ± 0.54	10.46 ± 1.33	34.97 ± 5.16	72.77 ± 5.83	89.19 ± 2.13	94.69 ± 3.69	99.99 ± 3.67
30	3.07 ± 0.21	11.3 ± 0.99	39.34 ± 2.36	66.4 ± 5.84	79.29 ± 8.57	81.74 ± 13.45	93.16 ± 12.68

致性良好,如图2所示。自制类紫杉醇脂质体整体释放缓慢,无突释现象,6 h后累计释放率逐渐达到平台。

**Figure 2** *In vitro* drug release curves of different batches of paclitaxel derivative liposome ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.8 区分能力考察

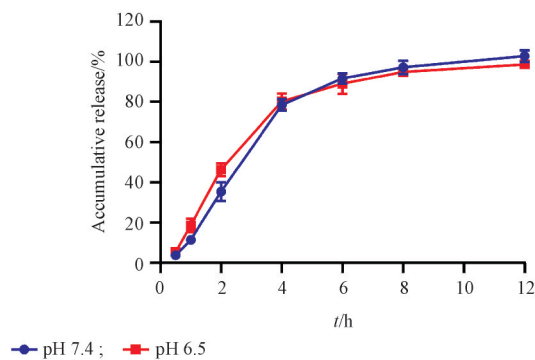
药物释放时间依赖于磷脂含量,磷脂含量越高,药物释放越慢。释药曲线差异源于两种处方中药脂比不同,由于处方1中磷脂含量比处方2约低9%,故在12 h内释放速率较高。图3表明,本方法对不同处方的脂质体体外释放具有区分能力。

**Figure 3** *In vitro* drug release curves of paclitaxel derivative liposome with different formulas ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.9 不同 pH 条件考察

由于脂质体进入体内会受到巨噬细胞和外周巨细胞的吞噬,这些细胞会产生酸性和其他物质以加速脂质体降解,使细胞与脂质体界面的 pH 小于7,故考察了释放介质在 pH 6.5 和 pH 7.4 条件

下药物释放情况。结果见图4。4 h前 pH 6.5 释放得快,4 h后 pH 7.4 释放略快于 pH 6.5,释放曲线的差异反映了介质 pH 对脂质体体外释放的影响,提示体内环境变化对脂质体体内释药可能的作用。

**Figure 4** *In vitro* drug release curves of paclitaxel derivative liposome under different pH conditions ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

本研究为建立类紫杉醇药物在12 h内从脂质体中完全释放的方法,在释放方法、透析袋截留相对分子质量、透析袋膜材和表面活性剂等多个方面进行了优化,结果表明类紫杉醇脂质体在体外具有良好的缓释作用。该方法可用于评估非水溶性药物脂质体制剂的体外扩散动力学、测试产品质量的一致性、建立体外/体内行为的相关性,为脂质体制剂评价影响药物质量的工艺变更提供有用的反馈。

3.1 透析袋截留相对分子质量的确定

Xu 等^[6]提出在脂质体不能透过的前提下,透析袋的截留相对分子质量应为药物相对分子质量的100倍,否则会使透过效率变低。然而,实验结果表明100 kD的透析袋也未达到相对分子质量约为1 000的类紫杉醇期望的释放量,为使药物尽快释放,继续考察更大孔径的透析袋。经测定类紫杉醇脂质体粒径为(93.81 ± 1.722)nm,美国光谱医学1 000 kD透析袋的孔径大约为70 nm,对于本研究中粒径分布集中在75 ~ 150 nm的类紫杉

醇脂质体不能通过,只有当类紫杉醇药物从脂质体中释放出来进入溶液中时才能进行扩散,因此本研究中选用的 1 000 kD 透析袋符合预期释放要求。

3.2 透析袋膜材比较

试验中尝试了不同品牌、不同孔径的纤维素

酯膜(cellulose ester, CE)和再生纤维素膜(regenerated cellulose, RC),如表 4 所示,再生纤维素膜作为亲水性膜不会对类紫杉醇造成吸附,然而其无法使脂质体达到 12 h 完全释放。虽然纤维素酯膜对类紫杉醇药物有吸附,但是试验表明可通过 0.5% SDS 的水溶液洗涤数次以消除药物残留。

Table 4 *In vitro* release results of paclitaxel derivative liposomes with different brands of dialysis bags($\bar{x} \pm S, n = 6$)

Brand	Product code	Molecular weight cut-off/kD	Membrane type	Average release at 12 h/%
Spectrum	131492-2111	1 000	CE	102.83 \pm 2.96
Viskase	MD34	1 000	RC	4.41 \pm 0.39
MFPI Cellu.Sep	HF-5050-34	50	RC	5.05 \pm 0.26
Thermo SnakeSkin	68100	10	RC	5.53 \pm 1.06
Solarbio	YA1031	300	CE	54.25 \pm 5.19

3.3 表面活性剂的选择

在浆膜结合法的介质选择方面,基于自制类紫杉醇药物的非亲水性特征,考虑在释放溶液中加入表面活性剂来增大磷脂膜流动性促进药物释放。拟定表面活性剂须满足 3 点要求:一是符合漏槽条件;二是要达试验预期释放量;三是表面活性剂的浓度要尽可能低以更好模拟体内生理环境。实验测得 SDS 对类紫杉醇原料药的浸润性较好,能明显增加原料药在水性介质中的溶解度,比吐温 80 更能促进类紫杉醇药物释放,故 SDS 适合作为类紫杉醇脂质体体外释放试验的表面活性剂。

4 结 语

近年来脂质体技术迎来新的突破,例如脂质体纳米粒、长循环脂质体、pH 敏感脂质体、温度敏感脂质体、磁性脂质体和免疫脂质体等^[7]。由于包载药物性质及脂质体制剂功能的不同,体外释放方法不一而足。触发释放行为、分离包封与游离药物、检测分析手段是开发释放方法需要考虑的 3 个因素。透析法^[8-14]是目前最受热衷的方法,然而对于快释制剂,药物跨越透析膜可能是限速步骤^[15]。无透析袋的取样分离法^[4,16-18]需要保证脂质体与游离药物分离完全;不使用分离手段而直接检测药物释放的电化学法^[19]、荧光法^[20-21]则要求药物具备检测特殊性。透析适配器技术^[2]和分散释放器技术^[22-23]已经被证明改善了膜渗透限速的影响,且使用了药典规定的溶出设备,为体外释放仪器的商业化生产、规范化使用、制定质量标准提供参考。

实验中发现,透析袋质量参差不齐,必要时应对透析袋进行筛选比较。透析膜的截留相对分子质量和仪器自动化程度限制了脂质体释药试验的进一步优化。药物体外扩散研究方法的选择需要结合具体药物分析,从而推动配方开发、临床治疗和结果预测。

References

- [1] U.S. Food and Drug Administration. extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of *in vitro/in vivo* correlations[EB/OL]. (1997-09-01) [2023-03-27] <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/extended-release-oral-dosage-forms-development-evaluation-and-application-vitro-in-vivo-correlations>.
- [2] Bhardwaj U, Burgess DJ. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems[J]. *Int J Pharm*, 2010, **388**(1/2): 287-294.
- [3] Liu Y, Zhang YJ, Wang ZY, et al. Research progress in bio-analysis and pharmacokinetics of liposome nanomedicine[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2023, **58**(4): 834-843.
- [4] Skoczzen SL, Snapp KS, Crist RM, et al. Distinguishing pharmacokinetics of marketed nanomedicine formulations using a stable isotope tracer assay[J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2020, **3**(3): 547-558.
- [5] Varache M, Ciancone M, Couffin AC. Optimization of a solid-phase extraction procedure for the analysis of drug-loaded lipid nanoparticles and its application to the determination of leakage and release profiles[J]. *J Pharm Sci*, 2020, **109**(8): 2527-2535.
- [6] Xu XM, Khan MA, Burgess DJ. A two-stage reverse dialysis *in vitro* dissolution testing method for passive targeted liposomes [J]. *Int J Pharm*, 2012, **426**(1/2): 211-218.

- [7] Magar KT, Boafu GF, Li XT, *et al.* Liposome-based delivery of biological drugs[J]. *Chin Chem Lett* (中国化学快报), 2022, **33**(2): 587-596.
- [8] Wang S, Li WX, Sun KY, *et al.* Study of release kinetics and degradation thermodynamics of ferric citrate liposomes[J]. *Chem Phys Lipids*, 2019, **225**: 104811.
- [9] Alavi S, Mahjoob MA, Haeri A, *et al.* Multivesicular liposomal depot system for sustained delivery of risperidone: development, characterization, and toxicity assessment[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2021, **47**(8): 1290-1301.
- [10] Tefas LR, Toma I, Sesarman A, *et al.* Co-delivery of gemcitabine and salinomycin in PEGylated liposomes for enhanced anticancer efficacy against colorectal cancer[J]. *J Liposome Res*, 2023, **33**(3): 234-250.
- [11] Wang B, Xu QQ, Zhou CJ, *et al.* Liposomes co-loaded with ursolic acid and ginsenoside Rg3 in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Acta Biochim Pol*, 2021, **68**(4): 711-715.
- [12] Hasan MM, Hamiduzzaman M, Jahan I, *et al.* Formulation development, characterization and *In-vitro* evaluation of tamoxifen loaded liposomes[J]. *J Pharm Res Int*, 2020, **32**(6): 64-82.
- [13] Shah H, Madni A, Khan MM, *et al.* pH-responsive liposomes of dioleoyl phosphatidylethanolamine and cholesteryl hemisuccinate for the enhanced anticancer efficacy of cisplatin[J]. *Pharmaceutics*, 2022, **14**(1): 129.
- [14] Khan S, Madni A, Rahim MA, *et al.* Enhanced *in vitro* release and permeability of glibenclamide by proliposomes: development, characterization and histopathological evaluation[J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2021, **63**: 102450.
- [15] Modi S, Anderson BD. Determination of drug release kinetics from nanoparticles: overcoming pitfalls of the dynamic dialysis method[J]. *Mol Pharm*, 2013, **10**(8): 3076-3089.
- [16] Dubatouka K, Agabekov V. Preparation and characterization of tissue plasminogen activator-loaded liposomes[J]. *Soft Mater*, 2022, **20**(3): 358-363.
- [17] Wallace SJ, Li J, Nation RL, *et al.* Drug release from nanomedicines: selection of appropriate encapsulation and release methodology[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2012, **2**(4): 284-292.
- [18] Regenold M, Steigenberger J, Siniscalchi E, *et al.* Determining critical parameters that influence *in vitro* performance characteristics of a thermosensitive liposome formulation of vinorelbine[J]. *J Control Release*, 2020, **328**: 551-561.
- [19] Oğuzhan Kaya H, Karpuz M, Nur Topkaya S. Electrochemical analysis of liposome-encapsulated colistimethate sodium[J]. *Electroanalysis*, 2022, **34**(7): 1114-1120.
- [20] Yu YB, Huang YD, Feng WQ, *et al.* NIR-triggered upconversion nanoparticles@thermo-sensitive liposome hybrid theranostic nanoplatfrom for controlled drug delivery[J]. *RSC Adv*, 2021, **11**(46): 29065-29072.
- [21] Heneweer C, Peñate Medina T, Tower R, *et al.* Acid-sphingomyelinase triggered fluorescently labeled sphingomyelin containing liposomes in tumor diagnosis after radiation-induced stress[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(8): 3864.
- [22] Janas C, Mast MP, Kirsamer L, *et al.* The dispersion releaser technology is an effective method for testing drug release from nanosized drug carriers[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, **115**: 73-83.
- [23] Wallenwein CM, Nova MV, Janas C, *et al.* A dialysis-based *in vitro* drug release assay to study dynamics of the drug-protein transfer of temoporfin liposomes[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, **143**: 44-50.