

# 混悬型多相脂质体 139 静脉输注液 粒径及异物检查方法

邓英杰 史淑芬 余永铭\* 李焕秋 韩贵成 顾学裘

(沈阳药学院; \*辽宁省药品检验所, 沈阳)

脂质体 (liposome) 60 年代末问世以来, 一直引起国内外研究者极大的兴趣, 许多学者<sup>(1)</sup>对脂质体药物的靶向性特征及治疗学上的意义进行了大量研究。

多相脂质体 139 (油酸多相脂质体) 在物理化学稳定性<sup>(2~4)</sup>上都达到静滴标准, 我们又进一步研究了静脉输注液的质量检查方法, 使多相脂质体 139 大量用于临床取得较好效果并转入工业生产。我们使用生物显微镜和电子扫描显微镜对脂质体的人工细胞结构进行了观察, 参考美国药典<sup>(6)</sup>和日本药局方<sup>(7)</sup>中大输液的异物检查法并加以改进, 检查了多相脂质体 139 注射液中的异物, 控制了质量。

## 一. 仪器和药品

TAII 型 Coulter 计数仪 (Coulter counter) (英国 Coulter 电子公司产); Zeiss 生物显微镜附带照像装置 (德国产); 显微镜测微器 (日本产); SZK-202 型净化工作台; 微孔滤膜滤器 ( $\phi$  30 mm, 接注射器用) 附带微孔滤膜 ( $\phi$  25 mm, 孔径 3  $\mu$ m) (上海医药工业研究院产品)。

多相脂质体 139 注射液样品 (沈阳药学院药厂生产)。

## 二. 实验方法和结果

### (一) 脂质体形态观察和多相体系的组成

1. 按生物细胞检查法于放大 400 倍以上的生物显微镜下观察, 139 注射液中脂质体呈双同心球体满视野 (图 1), 可见脂质体的双层磷脂膜 (A-2), 双层膜中间包封油相药物 (A-4), 球体中央为水相药物 (A-3); 还可见到少数略带黄绿色发亮的油球 (A-1), 这是极少量未被包封的油酸形成的 O/W 乳滴; 放置二年的样品 (图-B) 可见到少数多室脂质体 (B-5) 为单室脂质体的聚集体。

2. 将脂质体的油相膜材以苏丹 III 染色, 水相膜材以亚甲蓝染色后按成膜法制备脂质体 (图 2)。图中可清楚地看到由成膜法制得多室脂质体的多层结构, 并确证了脂质体油水相分布。

3. 定量称取多相脂质体 139 注射液, 通过 Sephadex G-50 凝胶柱分离, 磷酸盐缓冲液洗脱, 分别测定包封在脂质体中油酸量  $Q_1$  和原注射液中总油酸量  $Q_0$ , 包封率 =  $\frac{Q_1}{Q_0}$ 。20 批样品包封率平均为 94.7%, 此结果与我们从近百张 139 注射液显微照片和扫描电子显微镜上计数脂质体和乳滴数的统计结果一致。

### (二) 139 注射液中混悬粒子粒径检查法

1. Coulter 计数法 在 TAI 型 Coulter 计数仪上按装 100  $\mu$ m 小孔管, 测定粒径范围

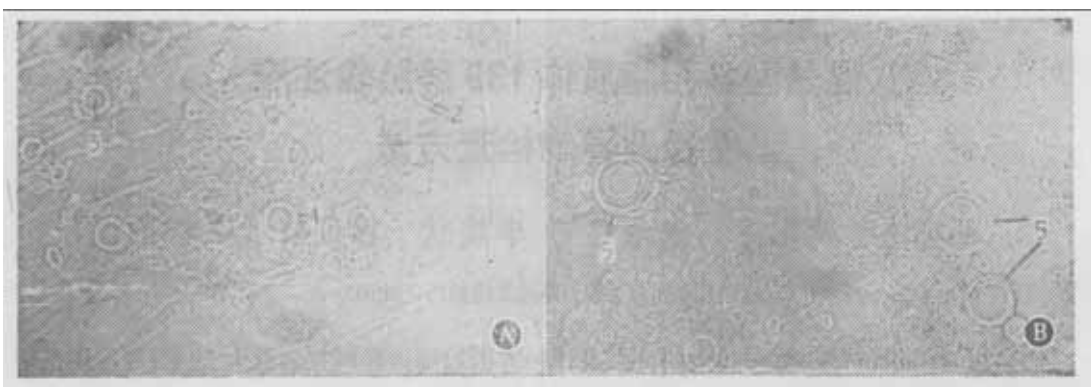


Fig 1. Microscope photographs of the injection of polyphase liposome (139). A. Fresh preparation ( $\times 8$ ); B. After 2 years storage at room temperature ( $\times 4$ ). 1. o/w Emulsion; 2. Lipids membrane; 3. Water phase; 4. Oil phase; 5. Large multimembrane liposome, microscope magnification  $\times 1350$

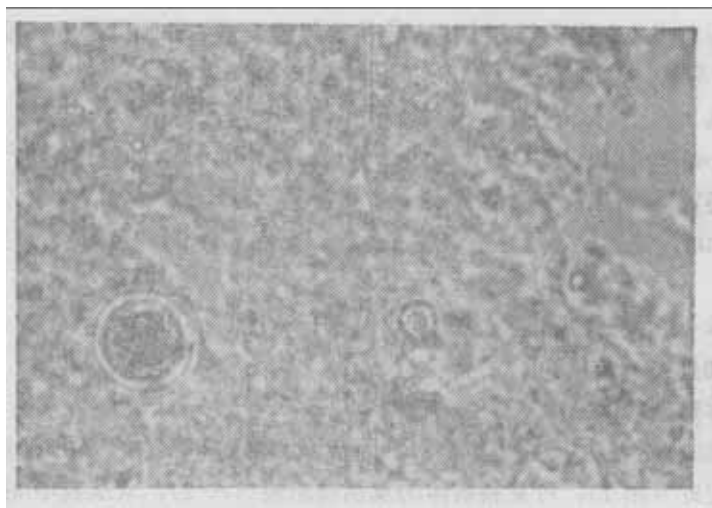


Fig 2. Microscope photograph of the liposome prepared from dyed membrane materials (before preparation of the liposome, the oil phase and water phase were dyed separately)

为  $1.26 \sim 40.3 \mu\text{m}$ , 并经标准粒径粒子校准仪器。取摇匀的 139 注射液样品 1 滴, 滴入盛有 150 ml 2% 氯化钠溶液(事先经  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜滤过至符合限度标准)的样品杯中, 混匀使电表浓度指示在 5% 以下, 采用予置总数方式, 每次随机分析五万个粒子, 重复测定三次。测定结果为: 十批样品平均值  $1 \sim 2 \mu\text{m}$  粒径粒子占 84.75%,  $5.04 \mu\text{m}$  以下粒子占 99.74%,  $5.04 \sim 10.08 \mu\text{m}$  粒子占 0.246%,  $10.08 \sim 12.7 \mu\text{m}$  粒子仅占 0.001%。将样品在室温中放置半年、一年和二年测定,  $1 \sim 2 \mu\text{m}$  粒子分别占 85.67%, 87.25% 和 62.99%;  $5.04 \mu\text{m}$  以下粒子占 99.67%, 99.78% 和 99.58%;  $5.04 \sim 10.08 \mu\text{m}$  粒子占 0.308%, 0.208% 和 0.402%;  $10.08 \sim 12.7 \mu\text{m}$  粒子分别占 0.008%, 0.004% 和 0.013%。

**2. 显微镜—测微器法** 取本品一支充分摇匀后吸取 1 ml 加 50% 纯净药用甘油(经检查无异物) 3 ml 于试管中, 摇匀静置片刻后以毛细管点样于载玻片上, 复盖玻片后安装测微器的显微镜 400 倍镜头下, 每视野可见到约千个粒子, 其中 99.5% 以上为  $5 \mu\text{m}$  以下粒径的脂质体小球, 90% 的粒径在  $1 \sim 2 \mu\text{m}$  之间; 仔细镜检全片有的视野可见到  $5 \sim 10 \mu\text{m}$  o/w

乳滴；仅个别批号偶而可见 1 或 2 个  $10\ \mu\text{m}$  上下不规则形状半固状物。测量所见到的  $5\ \mu\text{m}$  以上粒子粒径及视野中所见数目见表 1。

Tab 1. Results of mean particle size of injection(139) by microscope-micrometer

Batch No	Diameter ( $\mu\text{m}$ ) of larger particle and number in per field of vision	Batch No	Diameter ( $\mu\text{m}$ ) of larger particle and number in per field of vision
840405	5.2~8.1 $\mu\text{m}$ , 3 or 4	841220	6.1~8.2 $\mu\text{m}$ , 1 or 2
840406	8.1~10.2 $\mu\text{m}$ , 1 or 2, 3	841222	6.1~8.1 $\mu\text{m}$ , 1 or 2
841112	6.1~8.1 $\mu\text{m}$ , 2 or 3 or 4	841224	8.1~10.2 $\mu\text{m}$ , 2 or 3
841115	8.1~10.2 $\mu\text{m}$ , 1	841226	10.2~12.2 $\mu\text{m}$ , 0, 1 or 2
841121	8.1~10.2 $\mu\text{m}$ , 2 or 3	850105	5.2~6.1 $\mu\text{m}$ , 3 or 4
841211	8.1~10.2 $\mu\text{m}$ , 3 or 4	850107	5.2~6.1 $\mu\text{m}$ , 4 or 5

### (三) 139 注射液中异物检查法

采用改进的微孔滤膜—显微镜法。测定方法基本同我国药典 85 年版“注射液中不溶性微粒检查法”<sup>(8)</sup>，但有如下改进：

1. 将抽滤器改为接注射器用微孔滤膜滤器，由注射器抽取样品后，接滤膜滤器直接过滤后测定更方便。

2. 因本样品为混悬型多相脂质体注射液，脂质体微球粒径为  $3\ \mu\text{m}$  以下，乳滴大小不均，最大接近  $10\ \mu\text{m}$  左右，为使脂质体和乳滴通过滤膜，只将异物截留在滤膜上便于检查，需抽入等量净化水稀释样品（稀释后乳滴变小），这样在注射器压力下脂质体和乳滴可全部顺利通过滤膜，只有注射液中外界带入固体异物及半固状异物在滤膜上清晰可见。

3. 为防止异物落于颜色格条中漏检，采用全白无格栅滤膜，我们使用两种滤膜对比测定，认为全白滤膜结果可靠。多相脂质体 139 注射液中异物测定结果见表 2。

Tab 2. Results of particulate matter in the injection (139)  
(per batch tests 20 ml of the injection)

Batch No.	Number of particles of effective linear dimension $>5\ \mu\text{m}$						Batch No	Number of particles of effective linear dimension $>5\ \mu\text{m}$					
	$D_1(\mu\text{m})$	$N_1$	$D_2(\mu\text{m})$	$N_2$	$D_3(\mu\text{m})$	$N_3$		$D_1(\mu\text{m})$	$N_1$	$D_2(\mu\text{m})$	$N_2$	$D_3(\mu\text{m})$	$N_3$
840207	6.8	4	10.2	1	15.3	1	840802	6.9	4	13.8	4	20.7	6
840215	9.6	1	17.0	1	18.7	1	840803	10.5	2	13.8	3	20.7	4
840221	8.5	6	15.3	2	17.0	2	850326	6.9	6			20.8	2
840404	10.5	2	13.8	9	20.7	2	850328	6.9	8	13.8	6	16.6	2
840405	17.5	3	21.0	3	27.6	1	850329	8.3	6	12.5	6	16.6	2
840406	9.5	2	14.0	2	17.3	1	850330			10.0	2		
840801	6.9	8	13.8	4	20.7	6	850402	8.3	6	16.6	2		
850704	8.3	7					850705	8.3	23	16.6	3		
850708	8.3	21	16.6	1	24.9	1	850709	8.3	8	16.6	4	20.9	3
850711	8.3	20	13.6	2	24.9	1	850719	8.3	to	12.6	9	24.9	1

The 300 ml injection(139)of 20 batches contain particulate matter:  $27.6\ \mu\text{m}$  1, 20 to  $25\ \mu\text{m}$  29, 10 to  $20\ \mu\text{m}$  77, 5 to  $10\ \mu\text{m}$  130; The average number of particulate matter containing in the injection(139):  $>20\ \mu\text{m}$  1/10 ml, 10 to  $20\ \mu\text{m}$  1/3.1 ml, 5 to  $10\ \mu\text{m}$  1/2.3 ml

从表 2 的结果可以看出，在 20 个批号 139 静脉输注液中仅有一个批号含有 1 个  $27.6\ \mu\text{m}$  异物，在总量 300 ml 输注液中  $20\sim 25\ \mu\text{m}$  异物 29 个，10 至  $20\ \mu\text{m}$  异物 77 个， $5\sim 10\ \mu\text{m}$  异物 130 个。美国药典<sup>(6)</sup>中规定大输液的异物限度为每 ml 溶液含  $10\ \mu\text{m}$  微粒不超过 50 个，

25  $\mu\text{m}$  微粒少于 5 个。139 输注液中异物明显低于此限度。

## 讨 论

混悬型多相脂质体 139 静脉注射液的粒径测定方法我们考查了 Coulter 计数仪、激光散射粒度仪(美国产及国产)、园盘离心粒度分析仪(英国产)、漫反射光谱和浊度法、显微镜一测微器等几种方法。确定 Coulter 计数法和显微镜一测微器法较其它方法更适合混悬型注射液生产中的质量控制。

Coulter 计数仪为国际上先进的测定粒度分布的仪器,可根据静脉注射的粒径控制范围选择合适的小孔管和计数量程,测定混悬型注射液的粒度分布准确,此法作为静脉注射剂粒径控制方法可靠,但仪器复杂昂贵又需进口,一般生产单位购买困难。显微镜一测微器法简单方便,当然此法不同 Coulter 法可测定各种粒径粒子的分布,但此法只要根据样品中粒子大小比例,调正稀释倍数和放大倍数,便可观察样品中粒子的平均粒径和测量大粒子的粒径和数目。根据 Coulter 法测定结果,139 注射液中 5  $\mu\text{m}$  以下粒子占总粒子数的 99% 以上,大粒子比数很小,但大粒子体积大,由 Coulter 仪给出的体积比 5  $\mu\text{m}$  以上粒子几百倍增大,粒子越大比值增大越多。根据此比值显微镜法可以检查出注射液中相对静注有影响的大粒子。实际上,在显微镜视野中几个 5~10  $\mu\text{m}$  乳滴在千万个小粒子中间清晰可见,易于测量粒径和数目并比较与小粒子的比例。注射液中万分之一以下的更大粒子在异物检查中又可检出,因此只由显微镜一测微器法和异物检查控制静脉注射液的粒径也是可行的。比较表 1 和 Coulter 法测量结果说明两种方法测量大粒子粒径一致,各批比数有明显相关性。显微镜法可见 139 注射液中占万分之几的大粒子。该方法简便直观,一般生产单位即可检测,更适合于生产的质量控制。

多相脂质体 139 注射液稳定性好,本实验中样品都经过 100°C 流通蒸汽灭菌 30 min,生产批号随机抽样。由 Coulter 法测定可见样品放置二年以内,粒径 5.04  $\mu\text{m}$  以下粒子比例未改变;但放置二年后粒径在 2  $\mu\text{m}$  以下的粒子数减少,而粒径 2~5  $\mu\text{m}$  者有所增加。从显微镜观察和照片也可看到,新制备的样品中一般看不到多室脂质体,放置一年后的样品可见到少数粒径 3  $\mu\text{m}$  左右类似洋葱状结构的多室脂质体,放置后样品中 o/w 乳滴明显减少(图 2)。说明放置时多相脂质体因其处方的再分散性<sup>(2)</sup>而使未包封的油滴重排成脂质体;同时长时间静置单室脂质体可聚集成多室脂质体。

Illum 等<sup>(5)</sup>研究了静脉注射粒子大小、形状和性质对用药安全、清除率和体内分布的影响,指出粒子的形状和大小同样都是重要的,球形粒子比纤维状粒子容易通过毛细血管,作为药物载体更安全,纤维状粒子由于大的挤压效应容易阻塞毛细血管,30  $\mu\text{m}$  纤维素纤维使两个实验兔子因肺泡阻塞致死,而 DEAE-纤维素微球即使直径大到 40~160  $\mu\text{m}$  直到实验结束所有兔子存活,并未发现明显副作用。说明在静注的安全上异物检查比脂质体和乳滴粒径重要得多。139 注射液粒径检查时取样中异物可能检出,但粒径检查的取样量只能一滴,可代表注射液中组成粒子的粒径和分布,不能代表外界带入异物的分布。异物检查中取样为 20 ml,并先滤出不能灯检的乳白色注射液,只有异物留在滤膜上,可检出 20 ml 样品中全部异物大小及数目。为保证静注安全和减轻副作用异物检查项十分必要。目前国际药典输液中异物检查多采用微孔滤膜-显微镜法,我们改进的方法较美国药典<sup>(6)</sup>和日本药局方<sup>(7)</sup>的方法有很多方便之处:本实验使用注射器接微孔滤膜过滤器过滤,不需真空抽滤,仪器极简单便于操作和清洗;并将操作改在净化台上进行,避免空白实验的干扰;使用全白滤膜等保证了

结果的准确可靠。本法可用于其它不能灯检的注射液,用于粘度较大的针剂只增大稀释倍数即可,用于不同粒径的混悬剂只需改换合适孔径的滤膜即可,适合于生产中间体及成品检查。此法较美国药典、日本药局方的方法及英国、加拿大等国药典的仪器方法都简便可行。

关键词 多相脂质体 139

### 参 考 文 献

1. Foste G, et al. The challenge of liposome targeting *in vivo*. In: Gregoriadis G, ed. *Liposome Technology*. Vol 3. 1st ed. Florida: CRC press, 1984: 1~28.
2. 邓英杰, 等. 多相脂质体 139 注射液物理稳定性的研究. 药学报 1984; 19: 282.
3. 邓英杰, 等. 相转移温度法测定多相分散系物理稳定性的研究. 同上 1985; 20: 548.
4. 邓英杰, 等. 多相脂质体 139 注射液化学稳定性的研究. 沈阳药学院学报 1985; (3): 190.
5. Illum L, et al. Blood clearance and organ deposition of intravenously administered colloidal particles. *Int J pharm* 1984; 12: 135.
6. US Pharmacopeia National Formulary XX. United States Pharmacopeial Convention, 1980: 863.
7. 日本药局方第十改正版. 制剂总则. 1981: 16.
8. 中华人民共和国药典. 1985 年版. 二部. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 附录 44.

## THE DETERMINATION METHODS ON SIZE AND DISTRIBUTION OF PARTICLES AND PARTICULATE MATTER IN INTRAVENOUS INJECTION OF POLYPHASE LIPOSOME (139) IN THE FORM OF SUSPENSION

DENG Ying-Jie, SHI Shu-Fen, YU Yong-Ming, LI Huan-Qiu, HAN Gui-Cheng and GU Xue-Qiu

(Shenyang College of Pharmacy, Shenyang)

**ABSTRACT** The methods on observation of the pattern of polyphase liposome and on determination of size and distribution of particles and particulate matter of intravenous injection of polyphase liposome (139) in the form of suspension are presented in this paper. Microscopic photographs of the injection of polyphase liposome (139) demonstrated the structure of artificial cell of polyphase liposome. With Coulter counter (TAII) and microscope-micrometer the size and distribution of particles in the injection of polyphase liposome (139) in the form of suspension is shown. The results of measurement by the two methods are the same, especially the results on size of the large particles in the injection (139). Moreover, the membrane filter-microscope method described in USP XX for measuring the particulate matter in large-volume injection for single dose infusion was improved. The improved method was used in the determination of particulate matter in the intravenous injection of polyphase liposome (139) in the form of suspension. This method is not only more accurate but also more simple and convenient than the original USP XX method.

**Key words** Polyphase liposome (139)