维生素 K_1 混合胶束包封率测定方法的适用性研究

郭丽珊[1]，李晰月[1,2]，姚成丽[1]，奚　泉[1*]
（1. 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院，上海 201203；2. 中国药科大学，江苏南京 211198）

摘要：维生素 K_1（VK_1）混合胶束（VK_1-MM）注射液中游离的 VK_1 会导致安全性风险，包封率可评价混合胶束中游离 VK_1 的量以及胶束的载药性能。该研究比较了萃取法、离心法和过滤法用于测量 VK_1-MM 包封率的适用性，并讨论了不同方法中影响包封率测定准确性的主要因素。结果表明，萃取法中使用的萃取剂会影响 VK_1-MM 的结构；游离 VK_1 与水的密度差异较小，导致离心法不能彻底分离游离 VK_1 和 VK_1-MM；过滤法选用合适的滤膜孔径及材质时，可有效分离游离 VK_1 和 VK_1-MM，且方法回收率为 100.40%（RSD 0.80%，n=3），适用于测定 VK_1-MM 的包封率。该研究对不同包封率测定方法的原理及待测样品特性的适用性分析结果为其他胶束制剂建立科学、合理、适用的包封率评价方法提供了参考。

关键词：维生素 K_1；混合胶束；包封率；适用性
中图分类号：R917；R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)09-1367-07
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.09.013

Applicability Study of Determination Methods for Encapsulation Efficiency of Vitamin K_1-loaded Mixed Micelles

GUO Lishan[1], LI Xiyue[1,2], YAO Chengli[1], XI Quan[1*]
(*1. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203;*
2. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

ABSTRACT: Free vitamin K_1 (VK_1) in VK_1-loaded mixed micelles (VK_1-MM) injection leads to security risks. The encapsulation efficiency is one of the indexes to evaluate the content of free VK_1 in mixed micelles and their drug-loading performance, while the applicability of various determination methods is different. This study compared the applicability of extraction, centrifugation, and filtration methods in evaluating the encapsulation efficiency of VK_1-MM. The study of the main factor affecting the accuracy of each method showed that the extractant altered the structure of VK_1-MM during extraction. In addition, the free VK_1 and VK_1-MM could not be completely separated by centrifugation, which was related to the tiny density difference between free VK_1 and water. However, filtration could effectively separate free VK_1 and VK_1-MM with the appropriate pore size and material of the filter membrane. The recovery of filtration was 100.40% (with RSD of 0.80%, n=3), which showed filtration was suitable for determining the encapsulation efficiency of VK_1-MM. Simultaneously, the applicability of different encapsulation efficiency determination methods and the characteristics of formulations were analyzed, which provided a reference for establishing a suitable encapsulation efficiency determination method for other micellar preparations.

Key Words: vitamin K_1; mixed micelles; encapsulation efficiency; applicability

维生素 K_1 (vitamin K_1，VK_1) 为脂溶性维生素，是肝脏中凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ和Ⅹ合成凝血酶原所必须的辅助因子[1]，用于治疗低凝血酶原血症、维生素 K 缺乏症，以及预防和治疗新生儿出血性疾病

收稿日期：2023-02-20
作者简介：郭丽珊(1997—)，女，硕士研究生，专业方向：复杂注射剂研究。
通信作者：奚　泉(1979—)，男，研究员，博士生导师，从事口服缓控释制剂、吸入制剂和复杂注射剂的研究。
E-mail：xqsipi@163.com

等[2]，临床应用时有口服、肌内注射、皮下注射及静脉注射等给药途径。其中，注射给药的剂型不可或缺，在紧急情况，如术中华法林抗凝引起颅内出血时，需要尽快静脉注射给药[2]，新生儿也需要肌内注射给药以预防晚期低凝血酶原血症[3]。20 世纪 60 年代，VK_1 静脉注射剂以聚氧乙烯蓖麻油作乳化剂，以增加 VK_1 的溶解度，但成人静脉注射时可能会发生严重的过敏反应[3]。因此，VK_1 注射给药的安全性受到广泛关注。

胆盐和磷脂组成的混合胶束（mixed micelles，MM）作为新型载药体系，生物安全性较高，能提高难溶性药物的溶解度[4]。MM 可代替聚氧乙烯蓖麻油、聚山梨酯 80 及丙二醇等增溶剂[3,5]，用于递送 VK_1 时可增加 VK_1 溶解度，同时显著降低产生过敏反应的风险。然而，有研究[2]报道临床应用 VK_1 混合胶束溶液（vitamin K_1 loaded mixed micelles solution，VK_1-MMs）仍存在不良反应，可能是由注射液中的游离 VK_1 引发。例如，VK_1 可通过一氧化氮途径激活血管扩张剂的释放，并阻断主要离子电流，对心脏动作电位产生直接影响，静脉注射时可导致血流动力学变化，引起心血管衰竭等不良反应[6]。因此，VK_1-MM 的包封率是影响生物安全性的重要评价指标。

有研究[7]采用高速离心法测定 VK_1 纳米脂质载体的包封率，另有研究[8]采用萃取法测定 VK_1 固体脂质纳米粒的包封率，但尚未见适用于 VK_1-MM 的包封率测定方法和方法准确性的研究报道。因此，本研究比较了萃取法、离心法和过滤法检测 VK_1-MM 包封率的适用性，并探究了影响包封率检测准确性的主要因素，以期建立可准确检测 VK_1-MM 包封率的方法、为辅助评估其安全性提供数据参考。

1　仪器与试药

UV-2550 型紫外 - 可见分光光度计、IRTracer-100 型傅里叶变换红外光谱仪（日本岛津公司）；Ultimate 3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo Fisher 公司）；H-1650 型高速离心机（湖南湘仪离心机仪器有限公司）；有机相尼龙针式滤器（13 mm×0.45 μm）、疏水性聚四氟乙烯（PTFE）针式滤器（13 mm×0.45 μm）（上海安谱实验科技股份有限公司）。

VK_1（日本 SANYO FINE 株式会社，含量 100%，批号 KY212171）；甘氨胆酸（glycocholic acid，GC，上海毕得医药科技股份有限公司，含量 97%，批号 BD121116-25g）；大豆卵磷脂［soybean lecithin，SL，艾伟拓（上海）医药科技有限公司，含量 98.6%，批号 SY-SO-211003］；无水乙醇为色谱纯，水为超滤纯水，其余试剂为分析纯。

2　方法及结果

2.1　VK_1-MM 的制备

采用直接混合法制备 VK_1-MMs。照表 1 所示处方，称取 GC 适量，分散于纯水中，调至 pH 5.5 使溶解，加入 SL，加热，400 r/min 搅拌至溶解后，加入 VK_1，混合至体系均一，加入适量纯水，搅拌至室温，调至 pH 5.0，定容至 10 mL，得 VK_1-MMs，于 4 ℃避光保存。

F1 ～ F6 制备了不同处方的 VK_1-MM、空白 MM，用于萃取法测定 VK_1-MM 包封率的适用性研究；F7 ～ F9 调整处方辅料用量组成，以获得不同包封效果的 VK_1-MM，用于离心法测定 VK_1-MM 包封率的适用性研究；F10 ～ F13 调整处方中 VK_1 用量，以获得不同 VK_1 载药量的处方，用于过滤法测定 VK_1-MM 包封率的适用性研究；F15 ～ F18、F9 制得样品用于对比过滤法与离心法测定不同包封效果处方的差异。

2.2　VK_1 的含量测定

离心法与过滤法采用 HPLC 法测定 VK_1 含量；萃取法中，由于引入了与水、乙醇均不混溶的有机相，因此采用 UV 法测定萃取剂中的游离 VK_1 含量。

2.2.1　HPLC 法

样品配制：取 VK_1-MMs 200 μL，置 25 mL 棕色量瓶中，加入无水乙醇 10 mL，超声溶解后用 90%乙醇定容，经 0.45 μm 尼龙滤膜过滤，弃去初滤液 4 mL，取续滤液作为样品溶液。

对照溶液配制：精密称取 VK_1 25 mg，置 25 mL 棕色量瓶中，加入无水乙醇 10 mL，超声溶解后用无水乙醇定容，得母液。取母液 1 mL 于 10 mL 棕色量瓶中，用无水乙醇定容，得到 100 μg/mL 对照品溶液，平行配制 2 份。

表 1 VK_1-MM 的处方组成

Tab.1 Formulation Compositions of VK_1-MM

处方编号	GC/(mg·mL^{-1})	SL/(mg·mL^{-1})	VK_1/(mg·mL^{-1})	处方编号	GC/(mg·mL^{-1})	SL/(mg·mL^{-1})	VK_1/(mg·mL^{-1})
F1	53.23	75.95	11.09	F10	56.99	75.08	4.87
F2	56.99	75.57	10.13	F11	56.99	75.08	5.85
F3	69.91	75.51	9.10	F12	56.99	75.08	9.74
F4	114.07	75.93	10.41	F13	56.99	75.08	11.69
F5	95.62	36.02	5.21	F14	57.11	75.71	15.68
F6	97.30	36.18	0	F15	84.14	67.50	6.08
F7	59.73	60.10	5.91	F16	25.23	20.02	5.98
F8	62.59	50.12	6.01	F17	41.91	33.85	6.31
F9	0	0	6.17	F18	67.20	53.84	6.14

色谱条件：色谱柱 SHIMADZU-GL C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相 乙醇和水（体积比 90 ∶ 10）；检测波长 254 nm；柱温 30 ℃；流速 1.0 mL/min；进样量 20 μL。

方法学验证结果显示，VK_1 乙醇溶液为 0.2 ～ 120 μg/mL 时，峰面积（A）与浓度（c）线性关系良好，回归方程为 A=0.676c+0.167 5（R^2=0.999 9）。高、中、低浓度（120.0、100.0、80.0 μg/mL）的 VK_1 乙醇溶液回收率分别为 98.31%、99.02%、99.20%，RSD 分别为 0.45%、0.36%、0.30%。取 VK_1 对照品溶液连续进样 6 次测定系统精密度，结果峰面积的 RSD 为 0.19%。将 VK_1 乙醇溶液过 0.45 μm 尼龙滤膜，弃去不同体积初滤液，检测续滤液中的 VK_1 含量，结果显示过滤后的检测结果较过滤前变化 <2%。本法的线性、回收率、系统精密度均符合要求，且滤膜对药物无显著吸附。

2.2.2 UV 法

样品配制：不同处方的 VK_1-MMs 包封效果不同，萃取获得的游离 VK_1 含量也不相同，需要将萃取液中的药物含量稀释至合适浓度。取 VK_1-MMs 适量，置离心管中，加入石油醚适量，涡旋振荡使混匀，离心（1 738×g）后取上清液适量，用石油醚稀释至适当体积（根据不同处方的包封率计算上清液的稀释倍数），使 VK_1 质量浓度约为 10 μg/mL，检测样品溶液中游离 VK_1 的含量。取 VK_1-MMs 适量于离心管中，加入 9 倍体积的无水乙醇稀释样品，超声 10 min 破坏 MM，加入石油醚适量，涡旋振荡使混匀，离心（1 738×g）后取上清液适量，用石油醚稀释至适当体积，使 VK_1 质量浓度约为 10 μg/mL，得 VK_1 总含量样品溶液。

对照品配制：精密称取 VK_1 25 mg 于 25 mL 棕色量瓶中，加入石油醚 10 mL，超声溶解后用石油醚定容，作为母液。精密移取母液 0.2 mL 于 10 mL 棕色量瓶中，用石油醚定容，得到 20 μg/mL 对照品溶液，平行配制 2 份。

以 190 ～ 800 nm 的激发光扫描专属性样品，结果表明样品在 250 nm 波长下有最大吸收峰，辅料无干扰。因此，以石油醚为空白对照，测定 250 nm 处的样品吸光度。方法学验证结果显示，VK_1 石油醚溶液在质量浓度为 0.2 ～ 20 μg/mL 时吸光度（D）和质量浓度（c）线性良好，回归方程为 D=0.032 8c－0.001（R^2=0.999 1）；取 VK_1 对照品溶液连续测定 6 次吸光度，测定系统精密度，计算得 RSD 为 0.049%。本法的专属性、线性、系统精密度均符合要求。

2.3 包封率测定方法

根据 VK_1 的脂溶特性以及常用的包封率测定原理，对比萃取法、离心法及过滤法分离游离药物和 MM 的效果。以各方法对游离药物的分离效果以及对胶束结构完整性的影响为主要指标，评价 VK_1-MMs 包封率的测定方法，并探讨不同方法准确测定 VK_1-MMs 包封率的主要影响因素。根据不同的分离原理，包封率的计算方法可分为 2 种：萃取法通过测定游离 VK_1 含量、样品中 VK_1 总含量而间接获得由载体包载的 VK_1 含量，按式①计算包封率；离心法及过滤法可分离游离 VK_1 和 VK_1-MM，直接计算由载体包载的 VK_1 含量，因此按式②计算包封率。

$$包封率=1-\frac{游离\ VK_1\ 含量}{样品中\ VK_1\ 总含量}\times 100\% \qquad 式①$$

$$包封率=\frac{载药\ MM\ 中\ VK_1\ 含量}{样品中\ VK_1\ 总含量}\times 100\% \qquad 式②$$

2.3.1 萃取法

以与水不互溶的石油醚作萃取剂，采用萃取法检测脂溶性药物 VK_1 的包封率。取 VK_1-MMs 1 mL，加入石油醚适量，涡旋振荡至充分混合，取上清液约 2 mL，按“**2.2.2**”项下方法测定有机相中游离 VK_1 的吸光度。用乙醇破坏 VK_1-MM 后，加入石油醚，同“**2.2.2**”项下方法提取 VK_1，测定石油醚中 VK_1 的吸光度，获得样品中 VK_1 总含量，按式①计算包封率。

结果表明，加入石油醚萃取 VK_1-MMs 中游离的 VK_1 时，水相和有机相界面上会出现凝胶状物质（gelatinous substance，GS），降低有机相澄明度，且离心操作无法除去，导致有机相中游离 VK_1 的含量测定受到干扰。

此外，试验结果显示，固定 SL 用量不变、增加 GC 的用量时，GS 的形成量随之增加，如图 1 所示，表明 GS 的形成与 GC 有关。为了验证 GS 的组成是否与 GC 有关，取空白 MM（F6）以及 VK_1-MM（F5），分别加入石油醚，混合后均可见产生了 GS，收集 GS 并避光自然晾干，获得待测样品。采用红外光谱法分析上述所得的待测样品、SL、GC 和 VK_1，所得红外光谱图如图 2 所示。对比图 2 中的谱线 A、B、C，可确证 3 500 ～ 3 100、1 655 ～ 1 590 和 769 ～ 659 cm^{-1}（由蓝色虚线框标记）处的吸收峰分别为 GC 特征官能团酰胺基中 N-H 伸缩振动、N-H 弯曲振动的吸收谱带，以及特征官能团羟基形成分子间氢键时 O-H 面外弯曲振动产生的吸收谱带，表明 GS 中含有 GC；对比谱线 A、B、E，可确证 1 750 ～ 1 735、1 280 ～ 1 220 和 1 120 ～ 940 cm^{-1}（由绿色实线框标记）处的吸收峰分别为 SL 主要成分磷脂酰胆碱（phosphatidylcholine，PC）特征官能团酯基中 C=O 伸缩振动、铵基中 C-N 伸缩振动、磷酸基团产生的吸收谱带，表明 GS 中也含有 PC。上述结果证明 GS 中的主要成分为 GC、SL，提示萃取时部分 GC 与 SL 由水相中转到了有机相中。对比谱线 A、B、D，可确证 1 640 ～ 1 670 cm^{-1}（由红色虚线框标记）处的吸收峰，为 VK_1 官能团之一，萘醌，即六元环状共轭不饱和二酮中 C=C 伸缩振动产生的吸收谱带。因此，推断 GS 中含有 VK_1，萃取法无法有效分离游离 VK_1 与 VK_1-MM。

综上所述，应用萃取法测定 VK_1-MMs 包封率时，GC、SL 可进入有机相中，形成 GS。GS 的生成不仅影响有机相中 VK_1 的吸光度测定，还表明有机相可能直接破坏 VK_1-MM 的结构，导致 VK_1 泄露，或者提示 VK_1-MM 可由水相转移至有机相，因此萃取法无法准确测得 VK_1-MM 的包封率。

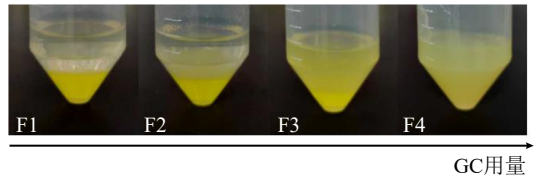


图 1　F1 ～ F4 组 VK_1-MM 萃取静置后的外观

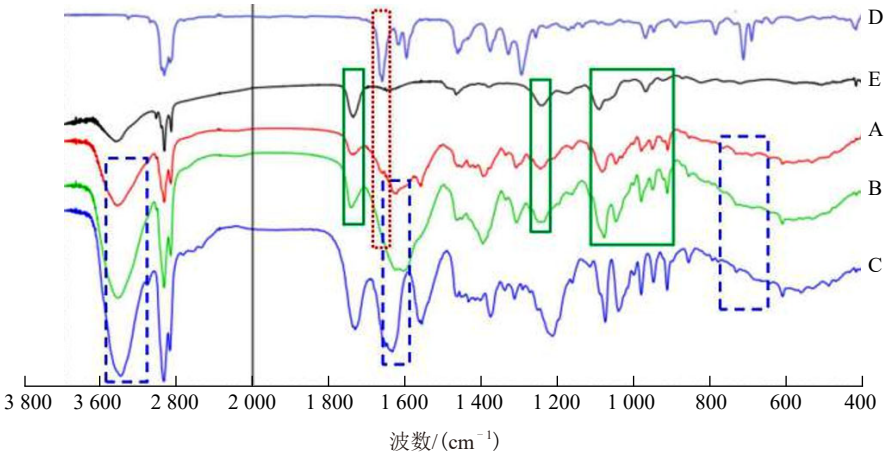
Fig.1　Appearances of VK_1-MM of Group F1 – F4 after Extraction and Standing

2.3.2 离心法

VK_1 不溶于水且密度小于水，游离 VK_1 在水相分散介质中聚集呈油滴状，分布在上层，而由 MM 包载的 VK_1 可稳定、均匀地存在于水相中。因此，通过离心可实现游离 VK_1 和 MM 包载 VK_1 的分离。如图 3 所示，离心后游离 VK_1 聚集在 VK_1-MMs 液面上层并黏附于管壁。

取照处方 F7 ～ F9 制得的 VK_1-MMs 约 1 mL 于 2 mL 离心管中，分别以 5 000 r/min（1 738×*g*）、10 000 r/min（6 953×*g*）、15 000 r/min（15 645×*g*）离心 10 min。用注射器吸取下层液体和离心前样品作为待测样品，按“**2.2.1**”项下方法测定样品中 VK_1 含量，按式②计算包封率。

结果如图 4 所示，按处方 F7 和 F8 所制备的 VK_1-MMs 在不同转速下测得的包封率无显著差异，表明待测样品为混合胶束时，相对离心力对结



A—GS VK_1/SL/GC；B—GS SL/GC；C—GC；D—VK_1；E—SL。

图 2 红外图谱

Fig.2 Infrared Spectra

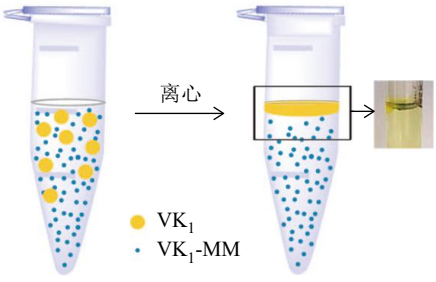


图 3 离心过程示意图

Fig.3 Schematic Diagram of Centrifugation

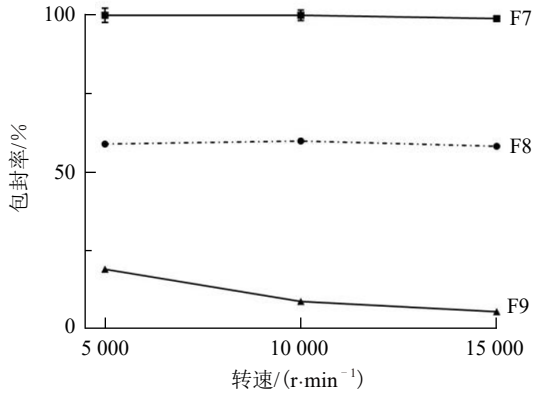


图 4 处方 F7～F9 经不同相对离心力离心后的包封率

Fig.4 Encapsulation Efficiencies of Formulations F7－F9 after Centrifuging at Different Relative Centrifugal Forces

果影响较小；处方 F9 制品中未加入 GC 和 SL，理论上包封率为 0，但实际测得包封率为 5.71%～19.24%，说明离心未能完全分离游离 VK_1，且待测样品为 VK_1 时，相对离心力对结果影响较大。

综上所述，当待测样品中存在大量游离 VK_1 时，离心无法完全去除游离 VK_1，而待测样品为混合胶束时，可能也存在类似问题，需要进一步研究确认。该法用于 VK_1 混合胶束包封率评价的适用性较差。

2.3.3 过滤法

理想的滤膜应能根据 VK_1-MM 与游离 VK_1 的粒度差异、与滤膜浸润能力的差异实现分离，其中游离 VK_1 应能被滤膜完全吸附、截留、滤除，而由 MM 包载的 VK_1 能够完全通过滤膜。

过滤法测定包封率：取 VK_1-MMs 适量经滤膜过滤，取过滤前、后的样品按“**2.2.1**”项下方法配制待测溶液，测定 VK_1 含量，按式②计算包封率。

探究滤膜材质对分离效果的影响：取处方 F9 制品（VK_1 纯水分散样品），分别采用 0.45 μm 尼龙滤膜和 0.45 μm 的 PTFE 滤膜（疏水性滤膜）过滤，滤液按“**2.2.1**”项下方法配制待测溶液，测定处方 F9 制品中 VK_1 含量以及过滤后滤液中 VK_1 含量。结果表明，采用尼龙滤膜的滤液样品中未检出 VK_1，表明尼龙滤膜能够滤除游离 VK_1；采用聚四氟乙烯滤膜的滤液中 VK_1 浓度为 1.49 μg/mL。因此，采用 0.45 μm 尼龙滤膜进行后续试验。

验证滤膜是否吸附 MM 包载的 VK_1：取不同 VK_1 浓度的 VK_1-MMs（处方 F10 ～ F13 制品），经 0.45 μm 尼龙滤膜过滤一次后收集滤液（获得载药 MM），取适量滤液经 0.45 μm 尼龙滤膜再次过滤，并收集滤液。取 2 组滤液分别按“**2.2.1**”项下方法配制待测溶液，用 HPLC 法测定 VK_1 含量，结果如表 2 所示，2 组滤液的 VK_1 含量差异均 <2%，表明滤膜不吸附由 MM 增溶的 VK_1，且过滤步骤不会造成 VK_1 从胶束中泄露。

表 2　过滤前后 VK_1-MMs 中 VK_1 的含量差异

Tab.2　Content Difference of VK_1 in VK_1-MMs before and after Filtering

处方编号	VK_1浓度/(mg·mL^{-1})			含量差异/%
	药液	第一次过滤后	第二次过滤后	
F10	3.97	3.96	3.92	－1.01
F11	4.81	4.70	4.75	1.06
F12	7.97	7.85	7.85	0
F13	9.19	9.03	9.18	1.66

过滤法回收率的验证：选择处方 F14 制品测定过滤法的回收率。使用可换膜式滤器和 0.45 μm 尼龙滤膜组装成滤器。通过滤膜吸附法收集游离 VK_1，使用无水乙醇洗脱滤膜及滤器腔体中残留的 VK_1，滤液按“**2.2.1**”项下法配制成待测溶液，测定 VK_1 含量，计算过滤法回收率，结果如表 3 所示，该法回收率平均值为 100.40%，RSD 为 0.8%。

表 3　过滤法回收率测定结果

Tab.3　Results of Recovery Test by Filtration

VK_1含量/(mg·mL^{-1})			回收率/%	平均值/%	RSD/%
药液	滤膜及滤器腔体	滤液			
7.44	2.49	4.98	100.40		
7.44	2.89	4.64	101.21	100.40	0.80
7.44	2.38	5.03	99.60		

综上所述，过滤法能有效分离游离 VK_1 和 VK_1-MM，且不引入新的溶剂，方法准确性受待测样品的性质变化影响小，适用于 VK_1-MM 包封性能的评价。

2.3.4　过滤法与离心法包封率测定结果的对比研究

取处方 F15 ～ F18 以及 F9 制品，分别用过滤法和离心法（15 645×*g*）测定样品溶液包封率，结果如图 5 所示，过滤法所得包封率均小于离心法测定结果，表明离心法无法充分地分离游离的 VK_1，会影响测定结果准确性。

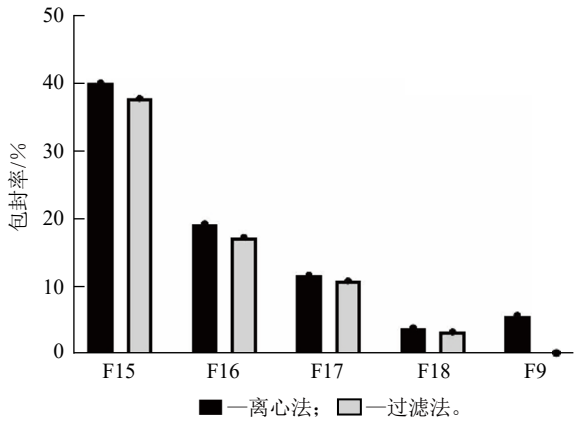


图 5　过滤法与离心法测得的包封率结果

Fig.5　Results of Encapsulation Efficiency by Filtration and Centrifugation

3　讨论

3.1　萃取法——萃取剂与载体辅料的相互作用

应用萃取法测定 VK_1-MM 的包封率时，会生成凝胶状物质。这可能和 GC 在有机相中聚集形成胶束的性质有关。在有机相中，GC 亲水面相对、疏水面朝外组成二聚体，二聚体可进一步因氢键作用组装形成长条状胶束 [9]。根据高分子凝胶的形成机制 [10]，在有机相中条状胶束之间可能呈网络状分布，使 SL、VK_1 或 VK_1-MM 被网络捕捉后稳定分布在有机相中，呈现凝胶状态。

大多数胆酸盐或脱氧胆酸盐 [9] 结构中均具有亲水面及疏水面，因此萃取法测定包封率不适用于由胆盐参与组成的胶束制剂。

因此，选择萃取法测定载体包封率时，需要充分考虑萃取剂对载体胶束结构的影响，即使载体辅料与药物在萃取剂中的溶解度有很大差异，也可能由静电作用、氢键、疏水作用等影响载体的结构完整性，从而导致载体结构的破坏，使游离药物泄露，影响包封率测定的准确性。

3.2　离心法——密度差异及分散性能影响分离效率

采用离心法测定 VK_1-MM 的包封性能时，主

要是利用 VK_1 与水的密度差异，以及游离 VK_1 和 VK_1-MM 在水性介质中的分散性差异实现二者的分离。VK_1 纯水分散样品的理论包封率应为 0，但将相对离心力由 1 738×*g* 增加至 6 953×*g* 时，包封率由 19.24%降至 9.01%，增加至 15 645×*g* 时包封率仅降至 5.71%，表明 15 645×*g* 的离心条件仍无法完全分离游离 VK_1，且增加离心力对分离效果改善也逐渐减弱，说明很难通过增加离心力实现完全分离。可能是因为 VK_1 与水的密度差异较小，提高相对离心力可能只较小程度地增加分离作用，完全分离游离 VK_1 与 VK_1-MM 需要的离心条件较严苛，这对 VK_1-MM 结构稳定性及设备适用性均有较大挑战。因此，离心法不能分离游离的 VK_1，且取样易受浮于介质上层或黏附于离心管壁的游离 VK_1 的影响，从而导致包封率测定的准确性降低。与过滤法相比，相同处方 VK_1-MM 经离心法测得的包封率偏高，这也进一步验证了离心法的分离效率更低、离心作用无法达到分离要求的结论。

综上所述，应用离心法测定 VK_1-MM 包封率的准确性受到限制。

3.3 过滤法——滤膜材质及药物性质影响分离效率

过滤法可利用粒径差异、与滤膜浸润能力的差异分离游离 VK_1 和 VK_1-MM。滤膜材质研究结果显示，相对于 PTFE 材质的滤膜，尼龙滤膜能有效截留 VK_1。这可能与疏水性 PTFE 滤膜与游离 VK_1 形成的油滴具有更小的接触角有关，VK_1 可浸润疏水性 PTFE 滤膜，进而从滤膜孔隙中滤过。而游离 VK_1 形成的油滴与亲水尼龙滤膜之间接触角大于 90°，无法透过孔隙而被滤除。

综上所述，过滤法可更有效率地滤除游离 VK_1，且不需要使用有机溶剂，避免了载药胶束结构被破坏，可作为 VK_1-MM 包封率测定的优选方法。以过滤法测定胶束制剂包封率时，需要关注滤膜材质和孔径、药物特性、载体特性，以上因素均会影响游离药物、载体的分离效率，从而影响包封率测定结果的准确性。

4 结论

本研究确证适用于 VK_1-MM 包封率的评价方法为过滤法，该方法分离效率高且不影响胶束结构，结果准确、可靠。同时，对不同包封率评价方法的原理与待测样品特性的适用性关系开展了研究，可为其他胶束制剂建立科学合理的包封率评价方法提供参考。

参考文献：

[1] FUSARO M, GALLIENI M, RIZZO M A, *et al*. Vitamin K plasma levels determination in human health [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, **55**(6): 789-799.

[2] BRITT R B, BROWN J N. Characterizing the severe reactions of parenteral vitamin K_1 [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2018, **24**(1): 5-12.

[3] SHEARER M J, NEWMAN P. Metabolism and cell biology of vitamin K [J]. *Thromb Haemost*, 2008, **100**(4): 530-547.

[4] JIANG S S, MOU Y H, HE H Y, *et al*. Preparation and evaluation of self-assembly Soluplus® -sodium cholate-phospholipid ternary mixed micelles of docetaxel [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2019, **45**(11): 1788-1798.

[5] SOUTO E B, MEHNERT W, MÜLLER R. Polymorphic behaviour of Compritol888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC [J]. *J Microencapsul*, 2006, **23**(4): 417-433.

[6] DROLET B, EMOND A, FORTIN V, *et al*. Vitamin K modulates cardiac action potential by blocking sodium and potassium ion channels [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2000, **5**(4): 267-273.

[7] ALJAEID B M, HOSNY K M. Fabrication and evaluation of phytomenadione as a nanostructure lipid carrier for enhancement of bioavailability [J]. *Pharm Dev Technol*, 2018, **23**(4): 382-386.

[8] LIU C H, WU C T, FANG J Y. Characterization and formulation optimization of solid lipid nanoparticles in vitamin K_1 delivery [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2010, **36**(7): 751-761.

[9] PÁRTAY L B, JEDLOVSZKY P, SEGA M. Molecular aggregates in aqueous solutions of bile acid salts. Molecular dynamics simulation study [J]. *J Phys Chem B*, 2007, **111**(33): 9886-9896.

[10] 李良一. 格子自洽场理论对物理缔合高分子溶液的胶束化和相分离的研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位毕业论文, 2008.