专论 Perspectives

脂质体体外释放方法的研究进展

高冬旭，赵 源*，陆伟根*，何 军，胡清源
（中国医药工业研究总院医药先进制造国家工程研究中心，上海 201203）

摘要：近年来，脂质体产品陆续上市。然而，各国药典中并未收录脂质体药物体外释放度检测的标准化方法，给脂质体药物的开发和监管带来了极大的挑战。体外释放度是评估药物制剂产品质量的重要技术指标，在产品开发、质量研究以及产品放行等方面具有关键作用。文章介绍了国内外报道的脂质体产品体外释放方法及检测装置，并阐述了已上市产品体外释放方法的选择依据，期望促进和完善脂质体体外释放度检测方法的发展，为脂质体产品的研发和监管提供更科学、准确的数据支持。

关键词：脂质体；体外释放；评价方法；质量评价
中图分类号：R944.9 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2024)04-0445-11
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.04.001

Research Progress of Release Testing Methods *in vitro* for Liposomes

GAO Dongxu, ZHAO Yuan*, LU Weigen*, HE Jun, HU Qingyuan
(*National Advanced Medical Engineering Research Center, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: In recent years, liposome products have been successively launched. However, standardized testing methods for *in vitro* release of liposomal products have not been incorporated in various pharmacopoeias, which poses great challenges for the development and regulation of liposomal products. *In vitro* release is an important technical indicator for evaluating the quality of pharmaceutical preparations, and plays an important role in product development, quality research, and product release. This review introduces the *in vitro* release methods and detection apparatuses of liposomal products reported both domestically and internationally, and elaborates on the selection basis of *in vitro* release methods suitable for approval products. It is hoped that this review will promote and improve the development of *in vitro* release methods for liposomes, and provide more scientific and accurate data support for the research and regulation of liposome products.

Key Words: liposome; *in vitro* release; evaluation method; quality control



【专家介绍】陆伟根，男，博士，研究员，博士研究生导师。现任中国医药工业研究总院副院长、院学位评定委员会主任委员；中国药学会工业药剂学专业委员会副主任委员，中国药学会药剂专业委员会委员，上海市药学会药剂专业委员会委员，上海市药学会抗生素专业委员会主任委员；《中国医药工业杂志》《中成药》和《世界临床药物》等药学专业期刊编委。一直从事药物新制剂研究，曾承担国家“八五”攻关课题、“十二五”“十三五”“重大新药创制”国家科技重大专项课题以及多项上海市科委重点课题研究，获得授权专利29项，发表论文70余篇；获得省部级二等和三等奖各1次；曾获上海市新长征突击手、上海市“三学”状元等多项荣誉。目前研究方向为新型注射给药系统研究、生物大分子药物给药策略及新制剂研究。

脂质体是由磷脂双分子层组成的球形囊泡，最早由 Bangham 在 20 世纪 60 年代发现 [1]。近年来，脂质体作为一种药物传递载体得到了广泛关注和研究，有越来越多的脂质体产品被开发上市，并有更多的脂质体产品处于临床前或临床试验阶段 [2]。为了规范脂质体产品的开发和监管，FDA、EMA、日本厚生劳动省（MHLW）和 NMPA 纷纷发布了一系列关于脂质体的指导性原则（表 1）。

在这些指导原则中，体外释放度被认为是脂质体的关键质量属性，并对体外释放方法的开发提出了要求：①释放平台期需达到 80%以上；②体外释放方法的释放介质、释放条件、仪器设备需具有合理性；③体外释放方法需具有良好的重复性、可靠性和区分力 [11]。但截至目前，各国的药典仍缺少脂质体产品的规范化体外释放试验方法。因此，研究人员往往需要自行开发体外释放方法来评价脂质体的释放行为。这些自行开发的方法可能存在重复性差、针对性不强、规范性不佳等问题。

本综述总结和归纳了目前已报道的脂质体体外释放方法，阐述这些方法的释放机制、释放条件、实验设计和仪器设备等，并分析了代表性上市品种的体外释放方法，期望能帮助脂质体研究人员更好地选择合适的体外释放评价方法，从而促进和完善脂质体体外释放方法的开发，为脂质体产品的研发和监管提供更科学、准确的数据支持。

1　脂质体体外释放试验的研究目标

对于脂质体药物来说，体外释放试验（*in vitro* release test，IVRT）是表征脂质体药物中药物释放行为和预测脂质体临床治疗效果的重要手段。实施 IVRT 的意义在于：①在产品开发阶段评估剂型设计的合理性 [12]；②区分工艺、处方、辅料以及形态结构对产品的影响，指导工艺开发 [13]；③建立产品的体内外相关性（*in vitro-in vivo* correlation，IVIVC），确定可能影响药物生物利用度的关键因素 [14]；④作为生产批质量控制指标的放行检测方法，提供必要的过程控制和质量保证，确定产品相关释放特性的稳定性 [4]。

体外释放方法往往会因为研究目的不一致而有所区别，评估剂型设计的 IVRT 侧重于验证剂型设计达成的可行性；工艺开发过程中的 IVRT 则需对制剂过程中处方、工艺等因素的变动具有良好的区分度，以此来指导工艺开发；当 IVRT 作为生产批的放行检测方法时，则要求试验方法具有一定的耐用性和适宜的敏感性 [15—16]。

2　脂质体的体外释放方法

脂质体体外释放测定方法的要素一般包括释放介质、温度、装置和药物测定方法等内容。ChP 2020 年版四部通则《9013 缓释、控释和迟释制剂指导原则》中指出，脂质体的体外释放介质一般采用与生理环境 pH 值相当的缓冲盐体系，如磷酸盐或乙酸盐缓冲液；对于难溶性药物，可添加适量的表面活性剂（如 SDS 等）；必要时可考虑加入酶等添加物。由于不同 pH 值条件下药物的溶解度、辅料的性质（如水化、溶胀、溶蚀速度等）可能不同，建议对不同 pH 值条件下的释放行为进行考察；释放介质的体积一般应满足漏槽条件。

脂质体的释放温度一般与生理环境的温度相同［(37±0.5) ℃］，但也会因为药物递送部位而有所差异，如透皮用脂质体的释放温度一般选用 (32±0.5) ℃ [17]。同时，释放温度与磷脂的相变温度（phase-transition temperature，T_m）也有关系。为了提高脂质体的体外释放速率，IVRT 通常在接近或高于产品的 T_m 下进行 [18]。TANG 等 [19] 采用 USP 40 的 USP 4 法测定两性霉素 B 脂质体（其中磷脂的 T_m 为 56 ℃）的体外释放行为。试验中观察到，该脂质体在 60 ℃下的稳定性比在 55 ℃下差，且释放速率加快。最终证明，55 ℃的释放温度能够区分不同工艺制得的两性霉素 B 脂质体产品的质量差异。

释放装置为体外释放方法的核心组成部分，也

收稿日期：2023-11-21

作者简介：高冬旭（2000—），男，硕士，从事新型注射给药系统的研究。

通信作者：陆伟根（1965—），男，博士生导师，研究员，从事药物新制剂及其产业化的研究。

E-mail：luweigen@sinopharm.com

赵　源（1987—），男，博士，助理研究员，从事新型注射给药系统的研究。

E-mail：ywwm@hotmail.com

表 1 脂质体相关的指导原则及其对体外释放方法的要求

Tab.1 Related Guidelines of Liposomes and Requirements for *in vitro* Release Tests

监管机构	脂质体相关的指导原则（颁布时间）	体外释放方法的要求
FDA	Guidance for Industry: Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology[3] (2014 年 6 月) Guidance for Industry: Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation[4] (2018 年 4 月) Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials Guidance for Industry[5] (2022 年 4 月)	具有良好的样品 / 工艺区分力； 有完整的释放曲线，药物释放量需达到 85%； 体外释放试验的释放介质、释放条件及释放装置的选择需具有合理性； 建立的释放方法具有重复性、可靠性； 鼓励建立体内 / 体外相关性或体内 / 体外关系
EMA	Data Requirements for Intravenous Liposomal Products Developed with Reference to an Innovator Liposomal Product[6] (2013 年 3 月)	具有良好的区分力； 释放介质应尽量与生理条件相关； 应设置不同的释放条件（pH 值、温度等）
MHLW	Guideline for the Development of Liposome Drug Products[7] (2016 年 3 月)	释放介质应尽量与生理条件相关； 根据产品递送目的可设置相应的释放条件； 具有良好的区分力（能区分产品设计目的）
NMPA	《纳米药物质量控制研究技术指导原则（试行）》[8] (2023 年 6 月) 《脂质体药物质量控制研究技术指导原则》[9] (2023 年 10 月) 《化学药品注射剂（特殊注射剂）仿制药质量和疗效一致性评价技术要求》[10] (2020 年 5 月)	有完整的释放曲线，药物释放量需达到 80%； 具有良好的区分力； 应设置不同的释放条件（pH 值、温度等）； 需重点关注游离药物和纳米药物的分离过程

是目前研究人员较关注的部分。以下将介绍目前常见的脂质体体外释放装置。

2.1 取样分离法

取样分离法是指将载药脂质体的悬浮液直接加至释放介质中，并在不同的时间间隔取样，使用超速离心[20]、离心超滤[21]、压力超滤[22]或尺寸排阻色谱法[23]等方法分离游离药物和脂质体，然后测定已释出的药物含量，计算药物的累积释放量，绘制体外释放曲线。该方法使用的装置较为简单，关键在于分离方法能否准确分离游离药物与载药脂质体，并避免分离方法、释放介质等影响因素所产生的误差[24]。

2.2 透析法

透析法是脂质体体外释药评价中较常用的方法。这一释放系统由透析膜分割成 2 个室，分别为脂质体悬浮液室和释放介质室。在试验过程中，定期取出释放介质室中的样品（同时补充同温、等量新鲜释放介质，以保持释放介质的体积不变），测定其中的药物含量[11]。根据释放装置和脂质体放置位置的不同，透析法又可细分为正向透析法、反向透析法、分级透析法。

2.2.1 正向透析法

如图 1 所示，正向透析法是将脂质体加至透析袋或透析管中，随后将透析袋或透析管密封后置释放介质中，在试验过程中定期取出释放介质室中的释放介质，并测定药物含量，绘制释放曲线。该方法有几点需要特别关注[25—26]：①透析膜的材质应不吸附药物；②透析膜的截留分子量（molecular weight cutoff，MWCO）应是原料药相对分子质量的 100 倍左右，以防止药物无法透过半透膜[24]；③全新的透析膜可能含有甘油等成分，试验前应尽量洗净，以免影响药物渗出；④释放介质室的体积应比脂质体悬浮室大 6 ～ 10 倍，以维持漏槽条件。正向透析法操作简便，无需额外仪器，但也存在一些缺陷。如，由于透析室内的液体几乎无法扰动，脂质体颗粒可能聚集或沉降并阻塞透析膜孔，导致药物释放过慢[27—28]。

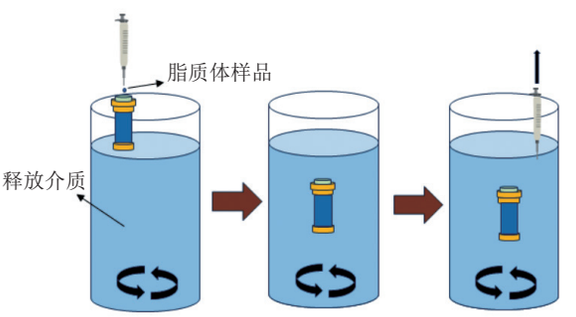


图 1 正向透析法示意图

Fig.1 Schematic Diagram of Positive Dialysis Methods

2.2.2 反向透析法

反向透析法是对正向透析法的改进。如图 2 所示，该法是将脂质体样品置大体积的释放介质中，在封闭的透析袋或透析管中进行采样。反向透析法使样品与大量释放介质直接接触，维持了漏槽条件，可以模拟脂质体进入体循环的稀释过程，更有利于阐明药物在不同环境中的释放行为[29]。但由于纳米颗粒在介质中被高度稀释，导致反向透析法对产品质量的区分能力不足[30]。

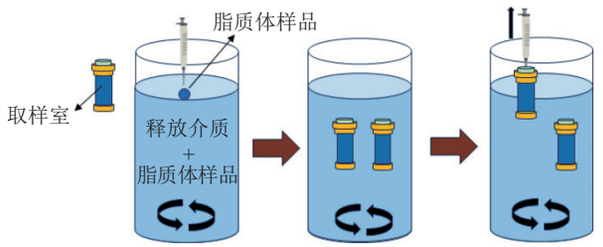


图 2　反向透析示意图

Fig.2　Schematic Diagram of Reverse Dialysis Methods

2.2.3 分级透析法

HENRIKSEN 等[31]开发了一种分级透析法用于鉴别由不同脂质组成的脂质体的释药能力（快速释放还是缓慢释放）。该方法是一种改进的透析法。如图 3 所示，将脂质体样品置含释放介质的半室（样品室）中循环；将含有释放介质的另一个取样半室（透析室）与注射器连接，通过添加恒定体积的释放介质，以定量及间隔适当的时间移除恒定体积的透析液，以分析脂质体样品中释放出的药物。这种方法可使脂质体释放药物不受取样过程的影响，但可靠性方面还有待进一步验证[11]。

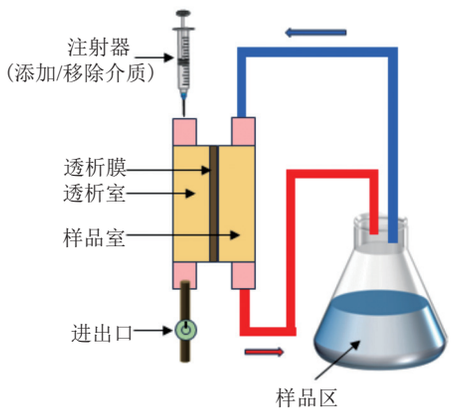


图 3　分级透析示意图

Fig.3　Schematic Diagram of Fractional Dialysis Methods

2.3 切向流法

中空纤维柱切向流过滤法是近年发展起来的用于纳米载体药物或蛋白类药物浓缩和纯化的方法，原理是以中空纤维柱为过滤工具，快速分离药物载体和游离药物（图 4）。这种方法有效改善了透析法的二次透过问题。乔新茹等[32]使用该方法研究了盐酸多柔比星脂质体的体外释放行为。在相同条件下，该方法较透析法更早地到达释放平台期，说明切向流过滤法能实时测定脂质体中的药物释放情况。

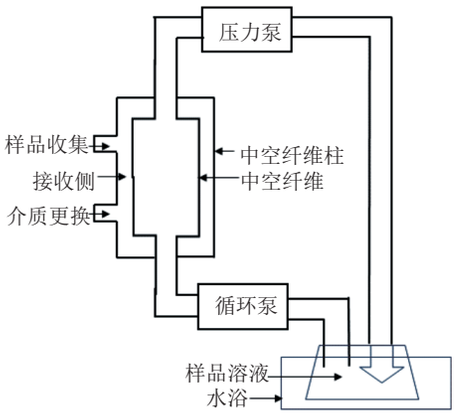


图 4　中空纤维切向流过滤装置示意图

Fig.4　Illustration for the Device of Hollow Fiber Tangential Flow Filtration System

2.4 原位法

该法直接将脂质体投放到大体积释放介质中，在漏槽条件下测定释放的药物，而不将其与载体分离。这种方法只有当药物可以用极谱法[33]或紫外 - 可见分光光度法[34]分析时才可使用。采用光谱法检测需要药物中有生色基团，极谱法需要药物有可接受的氧化还原电位，并且检测方法不能受到溶液中脂质体的干扰。这些方法不会影响药物的释放、造成微粒的损失，可直接测定药物的体外释放度，

但其局限性为药物释放的变化可能不会与响应值一一对应，响应灵敏度偏低[35]。

2.5 其他方法

虽然目前已上市的脂质体产品主要为注射剂，但针对非注射用的脂质体还有一些特殊的体外释放方法，如 Ussing chamber 法和 Franz 扩散池法，主要用于评价脂质体凝胶剂、局部用脂质体的体外释放[36]。这 2 种方法既可以用于评价脂质体的体外释放行为，也可以评估药物的透膜能力及组织中的药物滞留情况。Ussing chamber 法（图 5）在脂质体释放过程中能维持膜的完整性和活性，更真实地模拟体内释药环境，但方法复杂，所需药物量较多。Franz 扩散池可模拟脂质体跨过半透膜或皮肤、肠壁等屏障的扩散作用，尤其能客观反映局部用脂质体或半固体脂质体的药物释放过程，操作简单，取样后无需过滤分离，重现性好，但其搅拌效果难以保证，气泡难以去除，可能导致释放的药物在接受室内分布不均匀[37—38]。

3 基于药典收载设备的改进方法

药典收载的体外释放研究设备，目前已被广泛应用于各种制剂产品的 IVRT 中。但目前这些设备并不完全适用于脂质体的体外释放研究，因此有不少研究者对这些设备进行了适应性改进。

3.1 改良型篮法（USP 1 法）

ABDEL-MOTTALEB 等[39]改进了标准 USP 1 法的转篮，即用内径 2.2 cm、长 3.5 cm、下端包被透析膜的玻璃管代替 USP 1 法中的转篮（图 6），将脂质体制剂加至固定在仪器转轴上的玻璃管中，再浸入含有释放介质的溶出杯中。加入制剂的玻璃

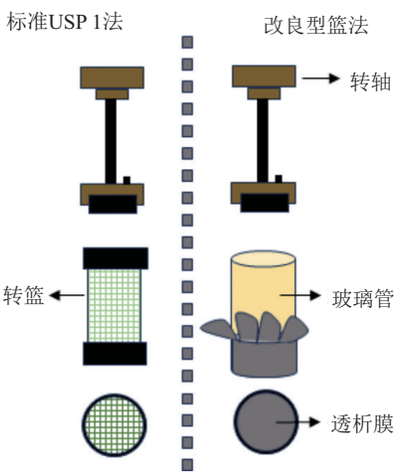


图 6 改良的 USP 1 装置示意图

Fig.6 Illustrative Figure of the Modified USP 1 Apparatus

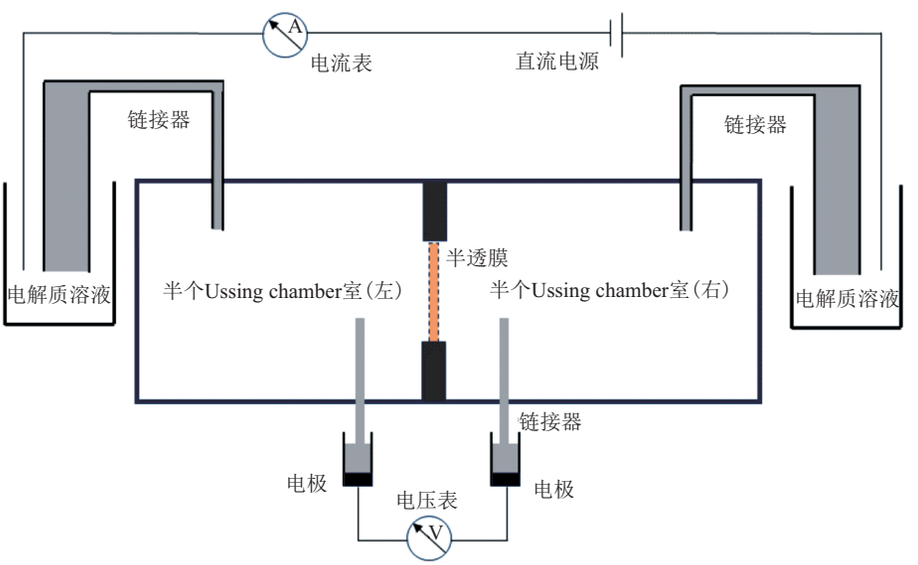


图 5 Ussing Chamber 结构示意图

Fig.5 Structural Diagram of Ussing Chamber

管和含有释放介质的溶出杯分别充当供体室和受体室。试验过程中按恒定速度旋转玻璃管，分别在规定的时间点从释放介质中取样分析。该方法简单，易于实现，但仍然存在与正向透析法相同的问题，即药物释放速率受到供体室和受体室中介质所含的药物浓度梯度差异的显著影响[11]。

3.2　改良型桨法（USP 2 法）

MANNA 等[13]在溶出杯盖上加装了一个固定的透析管，将脂质体分散在释放介质中，同时将在线紫外 - 可见（UV-Vis）探针插入透析管中实时监测透析管内的药物浓度。这种新方法能更好地控制释放条件，并允许使用原位光纤探针在整个释放过程中持续监测药物浓度。按照 UV-Vis 探针的位置，可以分为正向透析和反向透析 2 种（图 7）。前者有 2 个优点：①在溶出桨作用下，脂质体样品和释放出的药物可混合均匀；②已释出的药物在跨膜过程中，不会受到透析管上黏附的脂质体的影响。XU 等[25]采用改良型桨法（反向透析）成功区分了不同种类磷脂和不同含量磷脂所制备的脂质体产品，证明该法可作为脂质体产品质量评价的检测方法。

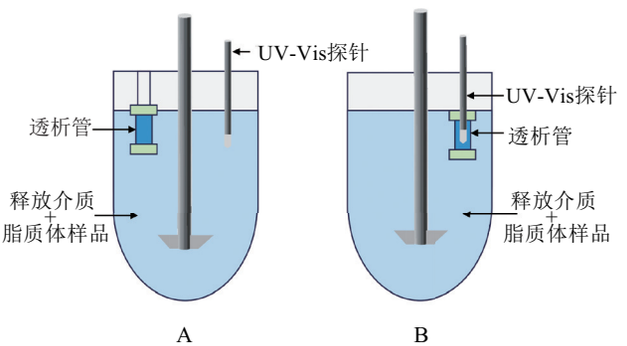


图 7　改良 USP 2 装置中探针位置［正向透析（A）和反向透析（B）］**示意图**

Fig.7　Schematic Diagrams of the Probe Position in Modified USP 2 Apparatus［Positive Dialysis（A）and Reverse Dialysis（B）］

3.3　改良流通池法（USP 4 法）

脂质体可能会阻塞 USP 4 法中装置的过滤膜，或者直接穿透滤膜。BHARDWAJ 等[30]将发明的膜适配器与 USP 4 法中的装置配合使用，将脂质体加至密封的膜适配器中，然后置 USP 4 法装置中（图 8）。研究表明，相比于透析法、反向透析法和传统 USP 4 法，改良的流通池法可区分不同工艺、不同处方地塞米松脂质体的体外释放性能差别，且重复性良好。YUAN 等[40]也应用同样改良的流通池法，通过优化释放条件，达到了区分具有不同处方及工艺多柔比星脂质体产品的目的。

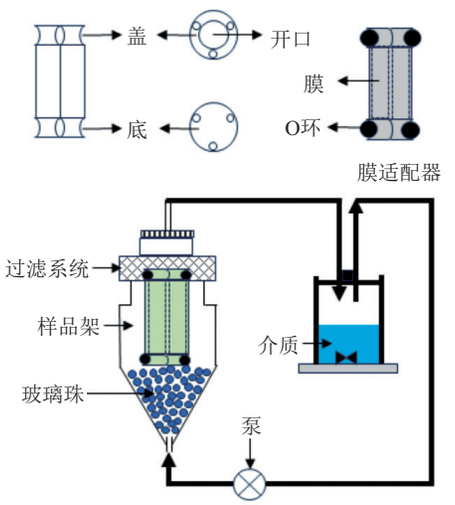


图 8　基于 USP 4 装置的改良流通池示意图

Fig.8　Schematic Diagram of the Modified Flow-through Cell Based on the USP 4 Apparatus

4　已上市脂质体产品体外释放方法的实例分析

1995 年上市的 Doxil 是首个上市的载药脂质体产品，随后国内外陆续上市了十几个不同的载药脂质体产品（表 2）。这些脂质体产品在结构上可以分为单室脂质体（unilamellar vesicles）、寡层 / 多层脂质体（oligolamellar/multilamellar vesicles）、多囊脂质体（multivesicular liposomes）；从设计目的上可以分为普通脂质体、长循环脂质体、主动靶向脂质体。具有相同结构或相同设计目的的脂质体所使用的体外释放方法应类似。

4.1　多柔比星脂质体

Doxil 是首个上市的 PEG 修饰长循环脂质体，其关键性辅料为氢化大豆磷脂、胆固醇、培化磷脂酰乙醇胺。培化磷脂酰乙醇胺为 PEG 修饰磷脂，

表 2 已上市的部分脂质体产品的分类

Tab.2 Classification of Some Approval Liposome Products

结构	商品名	包载药物	上市年份	给药方式	设计目的
小单室脂质体	Doxil[41]	多柔比星	1995	静脉注射	PEG 修饰长循环脂质体，减轻不良反应
	Onivyde[42]	伊立替康	2015	静脉注射	
	Marqibo[43]	硫酸长春新碱	2012	静脉注射	普通脂质体，减轻不良反应
	DaunoXome[44]	柔红霉素	1996	静脉注射	
	AmBisome[45]	两性霉素 B	1997	静脉注射	
	Visudyne[46]	维替泊芬	2000	静脉注射	
大单室脂质体	Lipusu[47]	紫杉醇	2003	吸入给药	
	Arikayce[48]	阿米卡星	2018	吸入给药	
多囊脂质体	EXPAREL[49]	布比卡因	2011	局部浸润	长效缓释
	DepoCyte[50]	阿糖胞苷	1999	鞘内给药	
	DepoDur[51]	硫酸吗啡	2004	硬膜外给药	
双层脂质体	Vyxeos[52]	柔红霉素、阿糖胞苷	2017	静脉注射	缓释，避免首过效应，靶向 B 类清道夫受体和低密度脂蛋白
多层脂质体	Mepact[53]	米伐木肽	2009	静脉注射	普通脂质体，提高稳定性和生物利用度

可以使多柔比星脂质体规避单核吞噬细胞系统的摄取，从而达到长循环的效果。这种长循环脂质体也被称为“隐形”脂质体（stealth liposomes）[41]。

FDA 和 NMPA 均发布了关于多柔比星脂质体的仿制药指导原则[54—55]，要求考察多柔比星脂质体在血浆生理条件、不同 pH 值、不同温度和超声条件（表 3）下的体外释放，用于模拟脂质体药物的体内行为。此外，为了对比不同批次样品之间的差异，FDA 溶出方法数据库中发布了多柔比星脂质体的体外释放试验条件：释放介质 pH 6.00±0.05，释放温度（47±0.5）℃[54]。为了加速释放，YUAN 等[40] 建立了基于 USP 4 法的多柔比星脂质体体外释放方法。根据多柔比星脂质体磷脂成分的 T_m，确定释放温度为 45 ℃，在 pH 6 的缓冲介质（包含 100 mmol/L 碳酸氢铵、75 mmol/L 乙烷磺酸、5％羟丙基 -β- 环糊精、5％蔗糖和 0.02％叠氮化钠）中评估多柔比星的体外释放行为。释放介质中加入碳酸氢铵是为了加快多柔比星的释放，加入羟丙基 -β- 环糊精是用于防止产生药物沉淀，乙烷磺酸为 pH 调节剂，叠氮化钠能抑制细菌生长，从而构建了一个可长期释药的环境。优化后的释放方法可区分不同处方及工艺的多柔比星脂质体产品。

与其他释放方法相比，使用基于 USP 4 法建立的多柔比星脂质体体外释放测定方法有如下优点：①使用标准 USP 4 法溶出装置，易于规范化；②能够方便地调整释放方法的不同参数，如温度、流速等，特别是针对 PEG 修饰长循环脂质体，可以长时间模拟体内释放环境，简单、方便。

4.2 两性霉素 B 脂质体

两性霉素 B 脂质体的商品名为 AmBisome，最早在美国上市，能显著降低两性霉素 B 注射剂的不良反应。研究[56] 表明，包裹两性霉素 B 的脂质体在经过血液和肾小管时以球形结构存在，能减少药物毒性反应；药物和磷脂的物质的量比例或二硬脂

表 3 多柔比星脂质体的体外释放条件[55]

Tab.3 *In vitro* Release Conditions of Doxorubicin Liposomes[55]

设计目的	释放条件	设计理由
模拟血液生理条件	在 37 ℃、50％血浆中释放 24 h	模拟血液情况
模拟体内 pH 环境	在 37 ℃，pH 5.5、6.5 和 7.5 的缓冲液中释放 24 h	正常组织：pH 7.3 恶性肿瘤组织：pH 6.6 恶性肿瘤细胞内部：pH 5 ～ 6
模拟体内环境温度	在 pH 6.5 的缓冲液中，于 43、47、52、57 ℃条件下释放 12 h 或直至完全释放	不同温度（低于或高于 T_m）会影响脂膜的稳定性，产生不同的体外释放速度
评价脂质体中药物的包封状态	在 37 ℃、低频（20 kHz）超声条件下释放 2 h 或直至完全释放	低频超声可破坏脂膜，使脂质体内的多柔比星硫酸盐沉淀溶解，释放多柔比星

酰磷脂酰甘油的脂肪酸链长度的细微改变都会影响两性霉素 B 的毒性。并且，研究者认为可能是高比例的胆固醇增加了磷脂双分子层的稳定性、减小了药物毒性。此外，超声法制成的脂质体对小鼠的毒性比均质法制备的脂质体大，这是由于不同方法制备的脂质体粒径不同。而通过体外释放试验能够区分不同粒径大小的脂质体，并评估制剂毒性[57]。

NMPA 发布了关于两性霉素 B 脂质体的生物等效性研究技术指导原则[58]，强调了需使用体外释放来评价自制样品和参比制剂。TANG 等[19]建立了基于改良 USP 4 法的两性霉素 B 脂质体体外释放方法，根据氢化大豆磷脂的 T_m 以及脂质体在高温下不稳定性的性质，最终选用温度为 55 ℃、pH 7.4 的释放介质［包含 5%的蔗糖、10 mmol/L 的 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、0.01%的叠氮化钠和 5%的 γ- 环糊精］作为体外释放环境。此方法能够区分不同制备方法、不同处方的两性霉素 B 脂质体产品。

4.3 布比卡因脂质体

EXPAREL 是由美国 Pacira 制药公司研发的布比卡因脂质体，于 2011 年被 FDA 批准上市。该品种是基于 DepoFoam 技术生产的多囊脂质体，与普通脂质体的差别在于其给药后内部囊泡可持续破裂、释放出药物，从而达到缓慢释放药物的目的；其关键辅料为二芥酰磷脂酰胆碱、二棕榈酸磷脂酰甘油、三辛酸甘油酯和胆固醇，其中的三辛酸甘油酯为维持内部“蜂窝状”结构的关键成分[49]。

FDA 发布了布比卡因脂质体生物等效性指导原则[59]，指出应用的 IVRT 方法应能够区分生产工艺或处方变化的影响。MANNA 等[13]开发了一种基于旋转器的样品分离法用于布比卡因脂质体的体外释放，在 37 ℃下，以含有人血清白蛋白的磷酸盐缓冲液 (pH 7) 作为释放介质，提高了释放效率；证明当离心管与转轮垂直或水平时有更好的释放效果。这种基于旋转器的体外释放方法依赖于机械应力来加速多囊脂质体的药物释放，并不能模拟体内生理条件，但可以区分不同批次 EXPAREL 的释放行为差异和受机械应力搅拌和冻融影响后脂质体的体外释放差异。该方法的评价周期较短 (24 h)，可用于该产品的处方研究和工艺开发[60]。

此外，MANNA 等[13]通过改良的 USP 2 装置结合反渗透膜开发了一种布比卡因脂质体的体外释放方法。该方法可以观察到布比卡因脂质体的释放具有明显的三相释放特征，即突释期、平台期、缓释期。最初 2 ～ 4 h 的突释期是游离药物和载体表面药物的释放引起的；随后的平台期，内部多囊腔室塌陷并重新排列，表现为药物的延迟释放；最后的缓释期，大部分囊泡缓慢溶蚀而释药。使用这种体外释放方法能有效模拟布比卡因脂质体在体内的释放行为，也能从侧面推测布比卡因脂质体的释放机制[13]。

5　总结与展望

脂质体作为一种安全、有效的药物递送载体，从最早上市的多柔比星脂质体到近年来在新型冠状病毒感染治疗中发挥重要作用的 mRNA 脂质纳米粒，这一递送系统还在不断更新和发展中。载药脂质体的体外释放方法作为脂质体药品的重要质量评价手段也在不断改进中。从简单的透析法到基于改良药典收载装置的释放方法，体外释放方法已经逐步向标准化、规范化靠拢。对于研究者来说，如何建立合适的载药脂质体体外释放方法，需要注意以下几点。①针对评价目的，并结合脂质体的设计目的及结构特点，灵活选择适合的体外释放装置。②对于释放方法所涉及的释放温度、释放介质及其他物理或化学因素，都需要详细考察它们对体外释放行为的影响。③也需要充分考察释放方法所涉及的其他影响因素，如透析法涉及的透析膜的材质、孔径大小，切向流法的中空纤维柱的膜面积和循环速率等因素。④所建立的脂质体体外释放方法应具有良好的重现性、可操作性和规范性。

通过开发可靠的体外释放方法，可建立脂质体的 IVIVC 模型，从而帮助研究者评估处方、衡量生产工艺参数、预测临床研究结果。因此，IVIVC 将成为脂质体体外释放方法研究的重点关注方向。随着人们对脂质体的体内外药物释放机制认识的不断加深，未来相关体外释放方法应会不断完善，并对建立其他制剂的质量评价方法具有指导意义。

参考文献：

[1] LIU P, CHEN G, ZHANG J. A review of liposomes as a drug delivery system: current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives [J]. *Molecules*, 2022, **27**(4): 1372.

[2] GIORDANI S, MARASSI V, ZATTONI A, *et al*. Liposomes characterization for market approval as pharmaceutical products: analytical methods, guidelines and standardized protocols [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, **236**: 115751.

[3] Office of the Commissioner, Office of Policy, Legislation, and International Affairs, Office of Policy. Guidance for industry: considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology [EB/OL]. (2014-06-23) [2023-05-21]. http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm.

[4] Center for Drug Evaluation and Research. Liposome drug products: chemistry, manufacturing, and controls; human pharmacokinetics and bioavailability; and labeling documentation [EB/OL]. (2018-04-05) [2023-05-21]. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/liposome-drug-products-chemistry-manufacturing-and-controls-human-pharmacokinetics-and.

[5] Center for Drug Evaluation and Research. Drug products, including biological products, that contain nanomaterials—guidance for industry [EB/OL]. (2022-04-21) [2023-05-21]. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/drug-products-including-biological-products-contain-nanomaterials-guidance-industry.

[6] EMA. Data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product—scientific guideline [EB/OL]. (2013-03-21) [2023-06-01]. https://www.ema.europa.eu/en/data-requirements-intravenous-liposomal-products-developed-reference-innovator-liposomal-product-scientific-guideline-0.

[7] Ministry of Health, Labour and Welfare. Guideline for the Development of Liposome Drug Products [EB/OL]. (2016-03-28) [2023-06-02]. https://www.nihs.go.jp/drug/section4/160328_MHLW_liposome_guideline.pdf.

[8] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《纳米药物质量控制研究技术指导原则（试行）》《纳米药物非临床药代动力学研究技术指导原则（试行）》《纳米药物非临床安全性评价研究技术指导原则（试行）》的通告 (2021年第35号) [EB/OL]. (2021-08-27) [2023-06-05]. https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/95945bb17a7dcde7b68638525ed38f66.

[9] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《脂质体药物质量控制研究技术指导原则》《脂质体药物非临床药代动力学研究技术指导原则》的通告 (2023年第54号) [EB/OL]. (2023-10-19) [2023-06-05]. https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/e0ebfc0e2363f4cf4293c2acde947360.

[10] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学药品注射剂（特殊注射剂）仿制药质量和疗效一致性评价技术要求 [EB/OL]. (2020-05-14) [2023-06-05]. https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=bd48d9ea178b60d-6d100848ca5a87b35.

[11] SOLOMON D, GUPTA N, MULLA N S, *et al*. Role of *in vitro* release methods in liposomal formulation development: challenges and regulatory perspective [J]. *AAPS J*, 2017, **19**(6): 1669-1681.

[12] YUBA E. Development of functional liposomes by modification of stimuli-responsive materials and their biomedical applications [J]. *J Mater Chem B*, 2020, **8**(6): 1093-1107.

[13] MANNA S, WU Y, WANG Y, *et al*. Probing the mechanism of bupivacaine drug release from multivesicular liposomes [J]. *J Control Release*, 2019, **294**: 279-287.

[14] SHARMA R, YADAV S, YADAV V, *et al*. Recent advances in lipid-based long-acting injectable depot formulations [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2023, **199**: 114901.

[15] HÜHN E, BUCHHOLZ H G, SHAZLY G, *et al*. Predicting the *in vivo* release from a liposomal formulation by IVIVC and non-invasive positron emission tomography imaging [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2010, **41**(1): 71-77.

[16] LIU G, HOU S, TONG P, *et al*. Liposomes: preparation, characteristics, and application strategies in analytical chemistry [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2020, **52**(2): 392-412.

[17] ZHANG Q, MURAWSKY M, LACOUNT T D, *et al*. Evaluation of heat effects on fentanyl transdermal delivery systems using *in vitro* permeation and *in vitro* release methods [J]. *J Pharm Sci*, 2020, **109**(10): 3095-3104.

[18] ALAWAK M, DAYYIH A A, AWAK I, *et al*. Magnetic thermosensitive liposomes loaded with doxorubicin [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, **2622**: 103-119.

[19] TANG J, SRINIVASAN S, YUAN W, *et al*. Development of a flow-through USP 4 apparatus drug release assay for the evaluation of amphotericin B liposome [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, **134**: 107-116.

[20] HAN L, ZHAN H, SUN X, *et al*. A density-changing centrifugation method for efficient separation of free drugs from drug-loaded particulate delivery systems [J]. *AAPS J*, 2019, **21**(3): 33.

[21] PAN C X, YANG Y, DUAN X Y, *et al*. Remotely rutin-loaded into liposomes for efficient encapsulation and enhancement of bioavailability and brain targeting *in vivo* [J]. *Int J Pharmacol*, 2023, **19**(3): 367-380.

[22] YUE P F, ZHENG Q, LIAO M X, *et al*. Process optimization, characterization, and release study *in vitro* of an intravenous puerarin lipid micropheres loaded with the phospholipid complex [J]. *J Disper Sci Technol*, 2010, **32**(1): 1-10.

[23] BOHSEN M S, TYCHSEN S T, KADHIM A A H, *et al*. Interaction of liposomes with bile salts investigated by asymmetric flow field-flow fractionation (AF4): a novel approach for stability assessment of oral drug carriers [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2023, **182**: 106384.

[24] SHEN J, BURGESS D J. *In vitro* dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: recent developments and challenges [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2013, **3**(5): 409-415.

[25] XU X, KHAN M A, BURGESS D J. A two-stage reverse dialysis *in vitro* dissolution testing method for passive targeted liposomes [J]. *Int J Pharm*, 2012, **426**(1/2): 211-218.

[26] D'SOUZA S S, DELUCA P P. Methods to assess *in vitro* drug release from injectable polymeric particulate systems [J]. *Pharm Res*, 2006, **23**(3): 460-474.

[27] MAST M P, MODH H, KNOLL J, *et al*. An update to dialysis-based drug release testing-data analysis and validation using the pharma test dispersion releaser [J]. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(12): 2007.

[28] YU M, YUAN W, LI D, *et al*. Predicting drug release kinetics from nanocarriers inside dialysis bags [J]. *J Control Release*, 2019, **315**: 23-30.

[29] FERRONATO K, BRUXEL F, ARAÚJO F A, *et al*. Use of the dialysis bag method to evaluate the *in vitro* release of drugs from submicrometric carriers [J]. *Lat Am J Pharm*, 2010, **29**(2): 313-320.

[30] BHARDWAJ U, BURGESS D J. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems [J]. *Int J Pharm*, 2010, **388**(1/2): 287-294.

[31] HENRIKSEN I, SANDE S A, SMISTAD G, *et al*. *In vitro* evaluation of drug release kinetics from liposomes by fractional dialysis [J]. *Int J Pharm*, 1995, **119**(2): 231-238.

[32] 乔新茹, 董美阳, 孙葭北, 等. 中空纤维切向流过滤法测定盐酸多柔比星脂质体释放度 [J]. 中国药学杂志, 2021, **56**(4): 308-313.

[33] THEODORIDIS I, LAMBROU G I. Voltammetry and monoamines determination: an old acquaintance revisited [J]. *Front Biosci* (Landmark Ed), **24**(2): 231-244.

[34] TZANOVA M M, MORETTI F, GRASSI G, *et al*. Modelling drug diffusion through unstirred water layers allows real-time quantification of free/loaded drug fractions and release kinetics from colloidal-based formulations [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2022, **178**: 168-178.

[35] 刘元芬, 王亚晶, 周咏梅, 等. 纳米给药系统中药物体外释放度测定方法及体内外相关性评价研究进展 [J]. 中国药房, 2019, **30**(4): 548-553.

[36] 宋　波, 黄　莺, 郭盈杉. 脂质体体外释放行为评价方法研究进展 [J]. 医药导报, 2023, **42**(3): 384-389.

[37] AGUANNO D, POSTAL B G, CARRIÈRE V, *et al*. Use of Ussing chambers to measure paracellular permeability to macromolecules in mouse intestine [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, **2367**: 1-11.

[38] KUMAR M, SHARMA A, MAHMOOD S, *et al*. Franz diffusion cell and its implication in skin permeation studies [J/OL]. *J Disper Sci Technol*, 2023 [2023-11-21]. DOI: 10.1080/01932691.2023.2188923.

[39] ABDEL-MOTTALEB M M, LAMPRECHT A. Standardized *in vitro* drug release test for colloidal drug carriers using modified USP dissolution apparatus Ⅰ [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2011, **37**(2): 178-184.

[40] YUAN W, KUAI R, DAI Z, *et al*. Development of a flow-through USP-4 apparatus drug release assay to evaluate doxorubicin liposomes [J]. *AAPS J*, 2017, **19**(1): 150-160.

[41] CABANES A, EVEN-CHEN S, ZIMBEROFF J, *et al*. Enhancement of antitumor activity of polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin with soluble and liposomal interleukin 2 [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, **5**(3): 687-693.

[42] PAPI M, CAPUTO D, PALMIERI V, *et al*. Clinically approved PEGylated nanoparticles are covered by a protein

corona that boosts the uptake by cancer cells [J]. *Nanoscale*, 2017, **9**(29): 10327-10334.

[43] SILVERMAN J A, DEITCHER S R. Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, **71**(3): 555-564.

[44] FORSSEN E A. The design and development of DaunoXome® for solid tumor targeting *in vivo* [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 1997, **24**(2/3): 133-150.

[45] FRÉZARD F, AGUIAR M M G, FERREIRA L A M, *et al*. Liposomal amphotericin B for treatment of leishmaniasis: from the identification of critical physicochemical attributes to the design of effective topical and oral formulations [J]. *Pharmaceutics*, 2022, **15**(1): 99.

[46] CHANG H I, YEH M K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy [J]. *Int J Nanomed*, 2012, **7**: 49-60.

[47] KOUDELKA S, TURÁNEK J. Liposomal paclitaxel formulations [J]. *J Control Release*, 2012, **163**(3): 322-334.

[48] SHIRLEY M. Amikacin liposome inhalation suspension: a review in mycobacterium avium complex lung disease [J]. *Drugs*, 2019, **79**(5): 555-562.

[49] MCALVIN J B, PADERA R F, SHANKARAPPA S A, *et al*. Multivesicular liposomal bupivacaine at the sciatic nerve [J]. *Biomaterials*, 2014, **35**(15): 4557-4564.

[50] MURRY D J, BLANEY S M. Clinical pharmacology of encapsulated sustained-release cytarabine [J]. *Ann Pharmacother*, 2000, **34**(10): 1173-1178.

[51] ANGST M S, DROVER D R. Pharmacology of drugs formulated with DepoFoam: a sustained release drug delivery system for parenteral administration using multivesicular liposome technology [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2006, **45**(12): 1153-1176.

[52] ALFAYEZ M, KANTARJIAN H, KADIA T, *et al*. CPX-351 (vyxeos) in AML [J]. *Leuk Lymphoma*, 2019, **61**(2): 288-297.

[53] ALPHANDÉRY E, GRAND-DEWYSE P, LEFÈVRE R, *et al*. Cancer therapy using nanoformulated substances: scientific, regulatory and financial aspects [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2015, **15**(10): 1233-1255.

[54] FDA. Draft guidance on doxorubicin hydrochloride [EB/OL]. (2022-06-17) [2023-06-07]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/PSG_050718.pdf.

[55] 国家药品监督管理局药品审评中心. 盐酸多柔比星脂质体注射液仿制药研究技术指导原则（试行）[EB/OL]. (2020-10-22) [2023-06-07]. https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=d75de99575acb583a3a5898235ff2383.

[56] OLSON J A, ADLER-MOORE J P, JENSEN G M, *et al*. Comparison of the physicochemical, antifungal, and toxic properties of two liposomal amphotericin B products [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, **52**(1): 259-268.

[57] ADLER-MOORE J P, PROFFITT R T. Development, characterization, efficacy and mode of action of ambisome, a unilamellar liposomal formulation of amphotericin B [J]. *J Liposome Res*, 1993, **3**(3): 429-450.

[58] 国家药品监督管理局药品审评中心. 注射用两性霉素 B 脂质体生物等效性研究技术指导原则 [EB/OL]. (2022-11-25) [2023-06-07]. https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=a425c80429fae2206ac7e5f21196aad7.

[59] U. S. Food and Drug Administration. Draft Guidance on Bupivacaine [EB/OL]. (2018-02-01) [2023-06-10]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/PSG_204803.pdf.

[60] YU M, YUAN W, XIA Z, *et al*. Characterization of exparel bupivacaine multivesicular liposomes [J]. *Int J Pharm*, 2023, **639**: 122952.