

剤ワーキンググループに提案し、本研究班の検討を終了した。

## 添付文書 1 皮膚適用製剤の放出試験法 (案)

### (2) 坐剤の放出試験に関わる基礎検討

研究協力者

保立 仁美(国立医薬品食品衛生研究所薬品部)

伊豆津建一(国立医薬品食品衛生研究所薬品部)

#### A. 研究目的

第16改正日本薬局方の製剤総則の改訂に伴い、坐剤に放出試験の設定が望ましいとされた。その後、我が国の承認申請書の規格試験法の調査では、放出試験を設定している製剤は1品目のみであり、水溶性基剤による製剤をパドル法により試験したものであった。現在のところ、坐剤で設定されている特別な規格は、溶融温度試験のみであり、融点測定法第2法で測定するとき0~10℃で溶融すると規定されている。

現時点で、承認申請時に放出試験が設定されていないこと、USP においても坐剤の放出試験の規定がないこと、EP においては、一般試験法として 2.9.2. Disintegration of suppositories and pessaries(坐剤の崩壊試験法)、2.9.22. Softening time determination of lipophilic suppositories(脂溶性坐剤の軟化時間の測定法)、2.9.42. Dissolution test for lipophilic solid dosage forms(脂溶性固形製剤の溶出試験)が設定されており、EP では坐剤の放出試験は、放出制御製剤に限るという記載がある。

ただし、FDA の溶出試験データベースにも、数製剤の放出試験が、パドル法とバスケット法で設定されており、バスケットとしては、坐剤用に開発されたかご状のものを用いている。

本研究では、昨年度に、座剤放出試験の検討を目的として、フロースルーセル法及び回転セル法による試験を試み、36℃の試験液温度では製剤間で放出速度に大きな差が見られたため、各放出挙動と示差走査熱量計による各製剤の熱的挙動との比較を試み、かなりの相関が見られることを示した。本年度は、同製剤につき、従来より規格が設

定されている溶融温度の測定を試み、融点と放出性を比較検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. 使用製剤

市販のジクロフェナク坐剤 9 製剤を用いた。

##### 2. 坐剤の放出試験方法と装置

回転セル法では、Pharma test 社製の坐剤放出試験用の回転セルを用い、富山産業製溶出試験器 NTR8000-AC のベッセルに設置し、50 回転で試験を行った。試験液には pH7.4 リン酸緩衝液 900mL を用い、放出量は 282nm における UV 測定により求めた。

##### 3. 坐剤の溶融温度試験

日局融点測定法第2法に従い、座剤の融点を測定した。

##### 4. 座剤の示差走査熱量測定

TA Instruments 社 示差走査熱量計 Q10 を使用し、室温から毎分 5℃で-20℃まで冷却し、-20℃に1分平衡化させた後、毎分 2℃で 50℃まで昇温した。再加熱では、引き続き-20℃へ冷却し、同様に再昇温した。機器測定ソフトでピークトップ温度を測定した。

#### C. 研究結果と考察

##### 1. 溶融温度測定結果

9 種ジクロフェナクナトリウム坐剤の溶融温度測定を 3 回ずつ試み、得られた融点の平均値を、DSC におけるピークトップの値とあわせて表 1 に示した。3 回測定の標準偏差はそれほど大きくなく、再現性の良い測定であった。

さらに、図 1 に融点と DSC ピークトップ温度を棒グラフで比較した。製剤 No.3、4、8 では、若干融点測定の方が値が大きくなった。

##### 2. 坐剤の放出性と融点の関係

これらの坐剤の 36℃における回転セル法による放出挙動は、図 2 に示すように、製剤間で大きく異なった、ただし、37℃における放出挙動では製剤間の差は小さくなった。そこで、放出率と融点、あるいは放出率と DSC 曲線のピークトップ温度の関係を図 3 に示した。融点の方が製剤 No.3 や No.8 ではやや高めに得られていたため、図中の相関係数は、DSC 測定によるピークトップ温度の方が若干相関係数が高かった。

#### D. 結論

油性基剤からなるジクロフェナク坐剤の放出試験を回転セル法で検討し、承認申請書で規定されている溶融温度を日局融点測定法で測定したところ、放出性は融点やDSCによる吸熱ピークの温度と相関性が認められた。

以上の結果から、基剤の熱的性質をコントロールすることで、放出性の制御が可能であることが示唆された。基剤の特性はDSC測定の方が放出率との相関性はやや高く、その曲線から得られる情報も多いが、融点(溶融温度)と放出性でもかなり良好な相関が認められ、坐剤の溶融温度測定は、坐剤の品質管理に有用と思われた。

#### E. 健康危険情報

該当する情報なし

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 知的所有権の取得状況  
2. 実用新案登録  
なし

表1 ジクロフェナク坐剤の融点とDSCピークトップの温度

製剤№	融点 (°C)					DSC(°C) ピークトップ温度
	測定データ		平均	標準偏差		
1	33.7	33.7	34.0	33.8	0.17	34.12
2	34.0	34.2	34.0	34.1	0.12	33.80
3	35.2	35.2	35.2	35.2	0.00	34.50
4	35.0	35.0	35.0	35.0	0.00	34.56
5	35.0	35.0	34.8	34.9	0.12	34.80
6	34.8	35.0	34.7	34.8	0.15	34.50
7	35.2	35.2	35.3	35.2	0.06	35.26
8	35.4	35.6	35.4	35.5	0.12	34.63
9	35.2	35.0	35.2	35.1	0.12	35.35

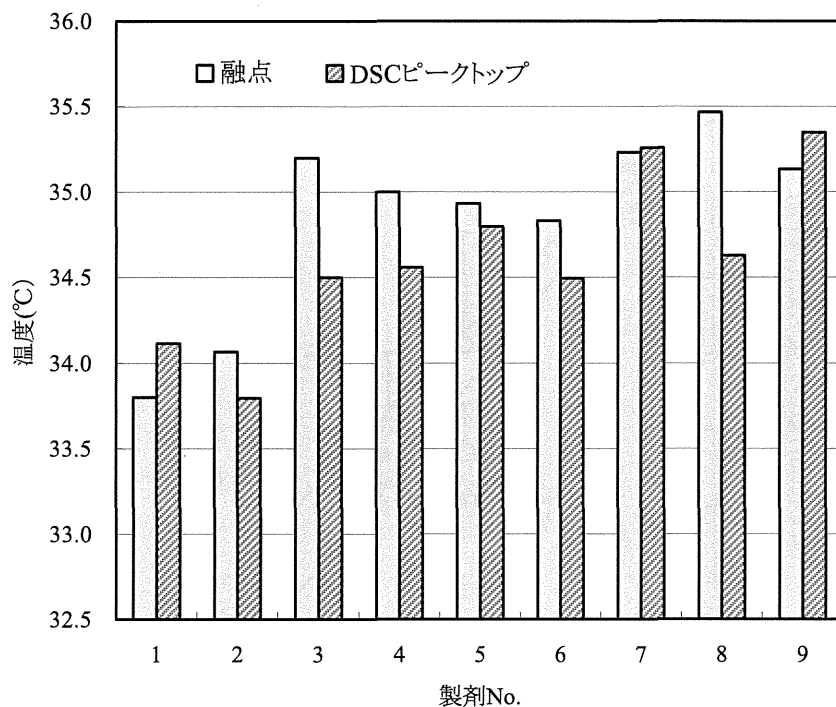


図1 ジクロフェナク坐剤の融点と DSC カーブのピークトップ温度

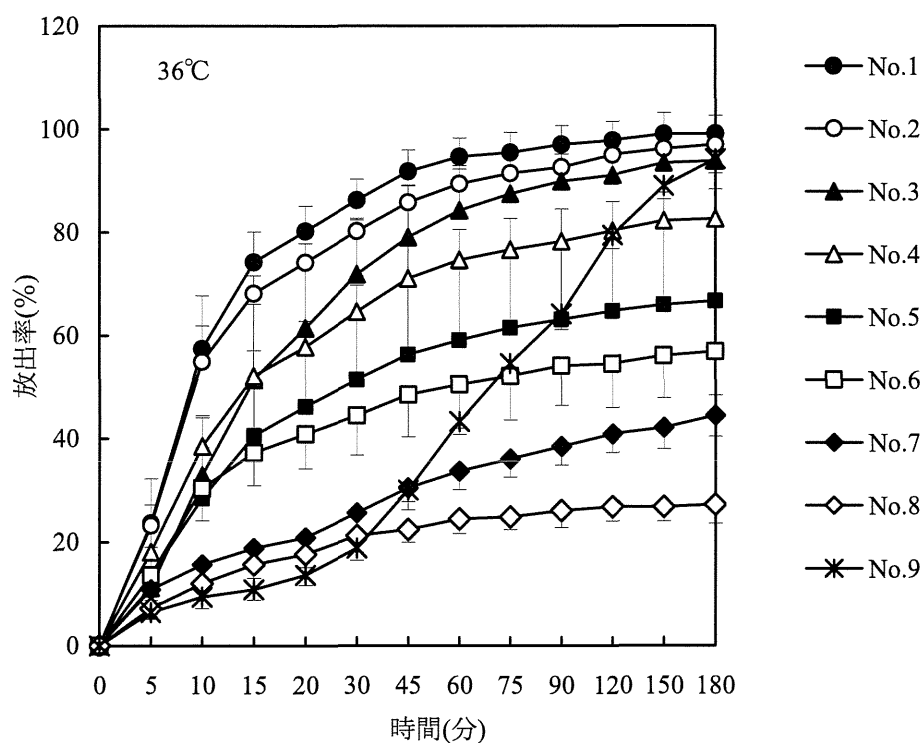


図2 9種のジクロフェナク坐剤の36°Cにおける放出挙動

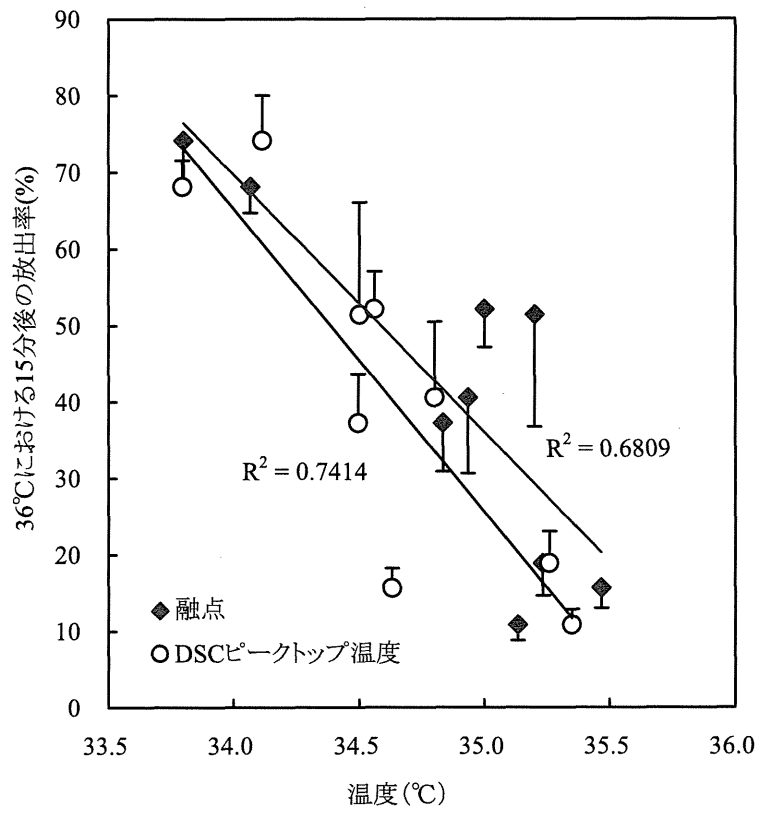


図3 36°Cにおける15分後の放出率と融点あるいはDSCピークトップ温度の関係

## 6. 皮膚に適用する製剤の放出試験法(案)

本試験法は、それぞれの製剤からの医薬品の放出性を測定する方法を示し、放出試験規格に適合しているかどうかを判定するために使われるものである。これらの製剤では、医薬品の有効性と放出性の関係は個々の製剤特性に依存するため、製剤ごとの品質管理に有効な試験法である。特に、経皮吸収型製剤等では、有効成分の放出挙動の適切な維持管理が必要である。

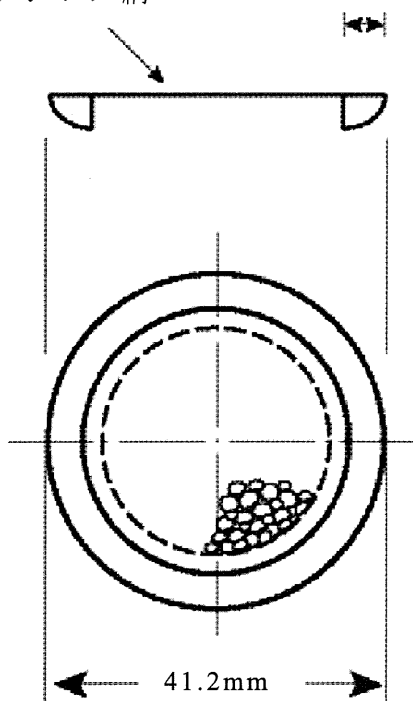
### 1. パドルオーバーディスク法

#### 1.1 パドルオーバーディスク法の装置

装置は、溶出試験法<6.10>のパドル法の装置を用い、パドルとベッセルの他に、試料をベッセルの底に沈めるために、通例、図1に示すようなステンレス製の125 $\mu$ mの目開きの網でできたディスクを使用する。必要に応じて、図1に類似の異なるサイズのものや、その他の形状のものも使用することができる。披験物質を吸着したり、反応したり、分析を妨害しないものであれば、ディスクの代わりに、その他の適切な部品を用いてもよい。試料は、広げて放出面を上にしてディスクに貼り付け、パ

125 $\mu$ m メッシュ  
のステンレス網

4.5mm



ドル翼の底部と平行に設置する。パドル翼の底部とディスクの表面の距離は、別に規定するほか、 $25 \pm 2$  mmとする(図2)。

その他、装置の適合性や試験液の取り扱い等に関しては、原則として溶出試験法<6.10>の指示に従う。

#### 1.2 パドルオーバーディスク法の操作

(i)操作 ディスクを入れない状態で、規定された量の試験液をベッセルに入れ、規定の温度になるまで待つ。製剤をできるだけ平らになるように、適切な両面テープ等の固定法で放出面を上になるようにディスクに貼り付ける。製剤は、切ることにより製剤の機能が損なわれない場合には、適切な大きさに正確に計って切ったものを、放出試験に使用してもよい。

図1 パドルオーバーディスク

必要に応じて、試験液と製剤を隔てるために多孔性の膜を放出面に貼り付けることができる。使用した膜については、試験法に、疎水性、親水性の別や孔径等を明記する必要がある。膜を使用する場合には、膜と放出面の間に気泡がはいらないように注意する。

ベッセルの底部に、ディスクを製剤の放出面が上になるように、パドル翼の底部

や試験液面と平行に設置する。設置後、すみやかに規定された回転数でパドルを回し、規定されたサンプリング時間に、パドルの回転翼の上面から試験液面の中間付近で、壁面から 1cm 以上離れたところから試験液を採取する。

規定された分析法で、溶出した有効成分量を測定する。

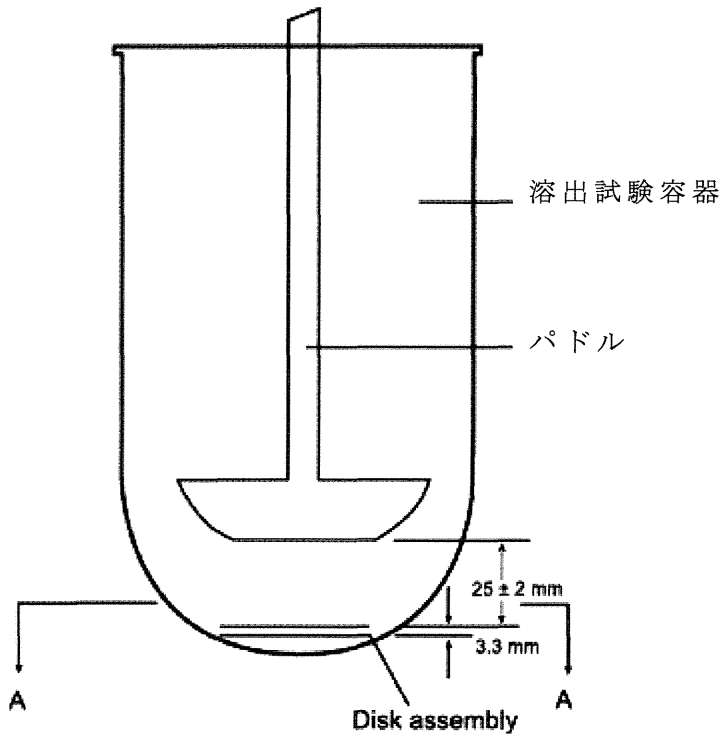


図 2 パドルとベッセルの状態

試験液の温度は  $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$  の一定とする。ベッセルはできるだけ試験液の蒸発を防ぐように蓋をする。

試料を沈めるための部品の形状や素材が図 2 と異なるものを使用してほぼ同様の操作を行う場合には、パドルオーバーディスク法と見なせるが、使用する部品に関する情報を明記する。

(ii)試験液 試験液には、通常、pH5~7 の範囲における任意の緩衝液（イオン強度 0.05 程度）を用いるが、放出が遅い場合には、界面活性剤の添加、pH の変更、イオン強度の変更を行っても良い。製剤の形状に影響を及ぼさなければ、水-アルコール混液、有機溶媒等を用いることができる。

## 2. シリンダー法

### 2.1 シリンダー法の装置

装置は、溶出試験法<6.10>のパドル法の装置のうち、ベッセルはそのまま使用し、パドルは図 3 に示すシリンダー回転部品に置き換えて試験を行う。製剤は、試験の開始時にシリンダー側面に貼り付ける。ベッセル底部とシリンダー下部の距離は、試験の間、 $25 \pm 2 \text{ mm}$  とする。その他、装置の適合性や試験液の取り扱い等に関しては、溶出試験法<6.10>の指示に従う。

### 2.2 シリンダー法の操作

(i)操作 規定された量の試験液をベッセルに入れ、規定の温度になるまで待つ。製剤から保護シートを取り除き、シリンダーに適切な両面テープ等の接着法で、放出面が外側を向くように製剤を貼り付ける。必要に応じて、試験液と製剤を隔てるために多孔性の膜を放出面に付けることができる。使用した膜に関しては、試験法に疎水性、親水性の別や孔径等を明記する必要がある。

シリンダーを溶出試験装置に取り付け、すみやかに規定された回転数でシリンダーを回転させる。規定された時間間隔あるいは規定された時間に、試験液面とシリンダーの低部の間で、壁面から1cm以上離れたところから試験液を採取する。

規定された分析法で、溶出した有効成分量を測定する。その他の試料についても同様の操作を行う。

(ii)試験液 試験液には、通常、pH5~7の範囲における任意の緩衝液（イオン強度0.05程度）を用いるが、溶出が遅い場合には、界面活性剤の添加、pHの変更、イオン強度の変更を行っても良い。製剤の形状に影響を及ぼさなければ、水-アルコール混液、有機溶媒等を用いることができる。試験液の温度は  $32 \pm 0.5$  °Cの一定に保つ。ベッセルはできるだけ試験液の蒸発を防ぐように蓋をする。

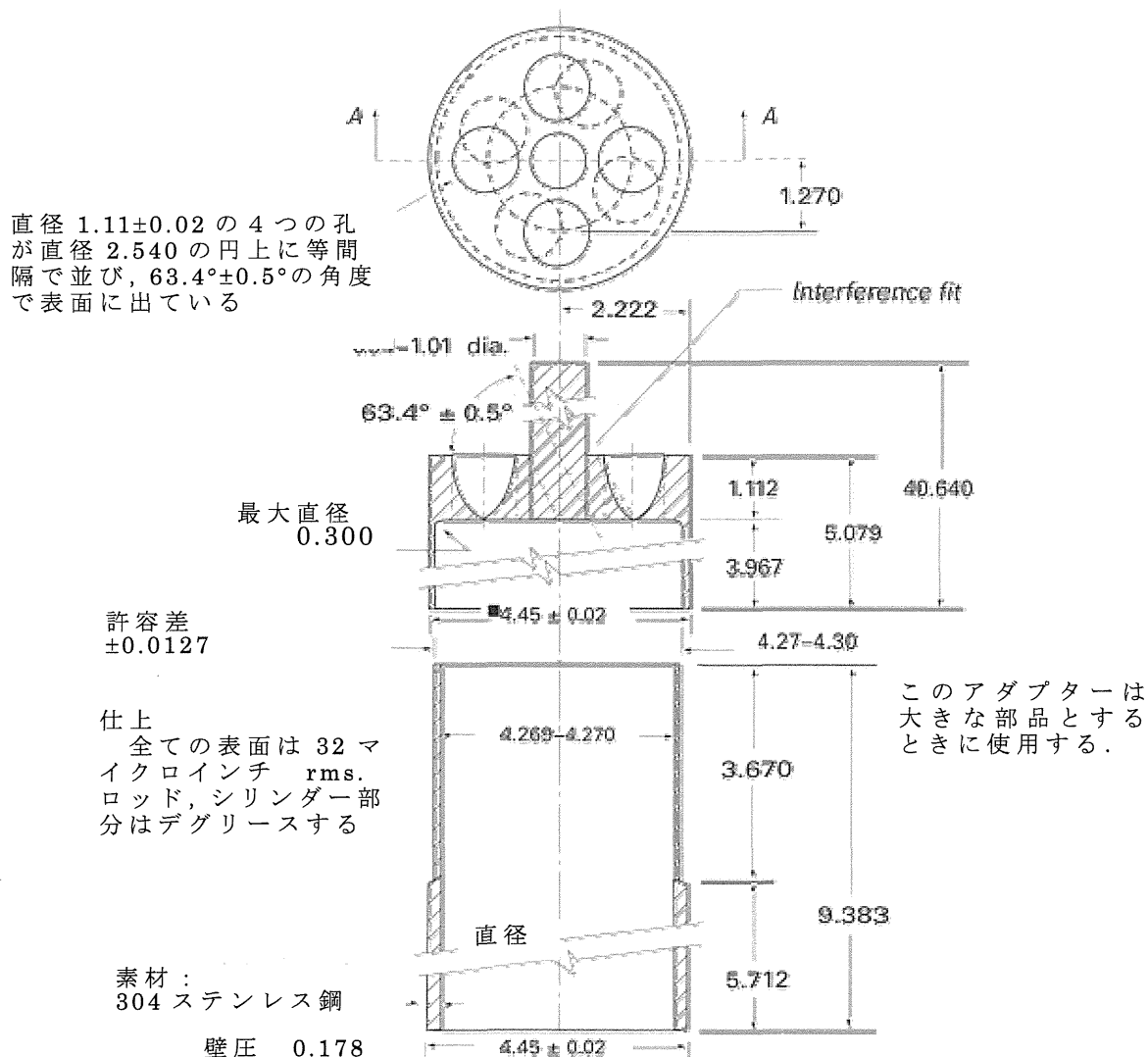


図3 シリンダ回転部品（単位は cm）

### 3. 縦型拡散セル法

#### 3.1 縦型拡散セル法の装置

装置は、図4に示す様な二つのチャンバーにわかれた縦型の拡散セルで、二つのチャンバーはクランプによって固定されている。これらのセル、はガラス、プラスチック等の、被験物質を吸着したり、反応したり、また分析を妨害しない材質を

使用する。試験液は出来るだけ蒸発を防ぐようにする。

### 3.2 縦型拡散セル法の操作

規定された量の試験液をあらかじめ回転子を入れたレシーバー側のチャンバーに入れる。試験液の温度は  $32 \pm 1.0^\circ\text{C}$  の一定に保つ。必要に応じて多孔性の膜を放出面に貼り付けることができる。使用した膜は、疎水性、親水性の別や孔径等を明記する必要がある。試験液には、通常、 $\text{pH}5\sim7$  の範囲における任意の緩衝液（イオン強度 0.05 程度）を用いるが、必要に応じて、界面活性剤の添加、 $\text{pH}$  の変更、イオン強度の変更を行っても良い。製剤の形状に影響を及ぼさなければ、水-アルコール混液、有機溶媒等を用いることができる。試料をドナー側に均一に設置し、すみやかに一定の回転数でスターラーにより回転子を回転させる。規定された時間間隔で試験液を採取、あるいは規定された時間ごとに試験液のフラクションを採取する。サンプリング時には試験液内に泡が入らないようにする。

規定された分析法で、試験液中に放出した有効成分量を測定する。その他の試料についても同様の操作を行う。試験結果から製剤部分の温度の変動が疑われる場合には、室温をできるだけ一定に保つことが望ましい。

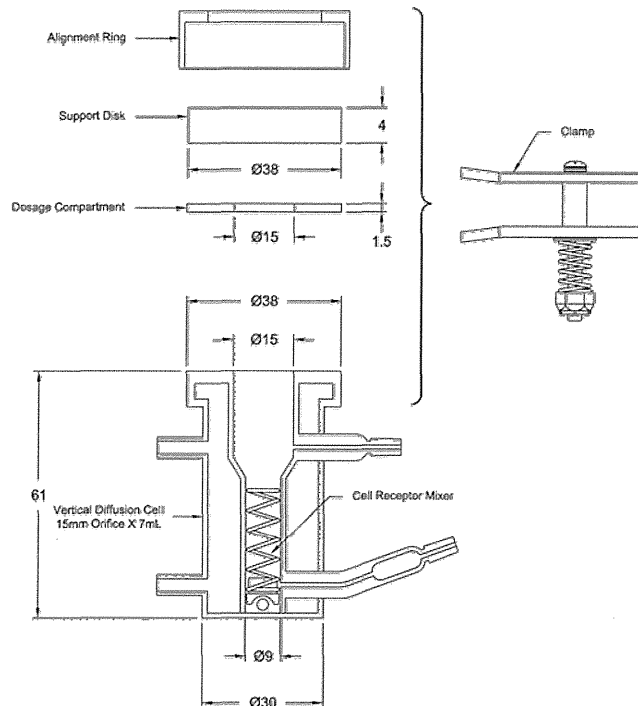


図 4 縦型拡散セル

## 4. 判定法

別に規定するもののほか、試料からの有効成分の溶出率が判定基準表 6.12-1 を満たすときに、試験液採取時間における製剤からの放出率は規格範囲内であるという規格に適合とする。L1 又は L2 を満たさない場合には、L3 まで試験を行う。各時点の溶出率の限度は、表示量に対する百分率で表されている。限度値は、規定された各試験液採取時間でのそれぞれの溶出率の値である。複数の範囲が示されている



場合は、それぞれの範囲で判定基準を適用する

判定基準表6.12-1

水準	試験個数	判定基準
L <sub>1</sub>	6	すべての個々の溶出率が、規定範囲内(限度値も含む)である。
L <sub>2</sub>	6	12個(L <sub>1</sub> +L <sub>2</sub> )の試料の平均溶出率が規定された範囲内(限度値も含む)であり、かつ、個々の試料からの溶出率は規定された範囲から規格値の±10%を超えて外れるものがない。
L <sub>3</sub>	12	24個(L <sub>1</sub> +L <sub>2</sub> +L <sub>3</sub> )の試料の平均溶出率が規定された範囲内(限度値も含む)であり、かつ、規定された範囲から規格値の±10%を超えて外れるものが、24個のうち2個以下であり、更に、規定された範囲から規格値の20%を超えて外れるものがない。

## 別紙 4

## 研究成果の刊行

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
梶村計志、川口正美、四方田千佳子	難水溶性製剤の溶出試験に界面活性剤として使用されるポリソルベート80の品質に関する研究	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	43	650-655	2012
Shibata H, Saito H, Yomota C, Kawanishi T, Okuda H.	Alterations in the Detergent-Induced Membrane Permeability and Solubilization of Saturated Phosphatidylcholine/Cholesterol Liposomes: Effects of Poly(ethylene glycol)-Conjugated Lipid.	Chem Pharm Bull (Tokyo)	60	1105-11	2012
Shibata H, Saito H, Kawanishi T, Okuda H, Yomota C.	Comparison of particle size and dispersion state among commercial cyclosporine formulations and their effects on pharmacokinetics in rats.	Chem Pharm Bull (Tokyo)	60	967-75	2012
Shibata H, Yomota C, Kawanishi T, Okuda H.	Polyethylene glycol prevents in vitro aggregation of slightly negatively-charged liposomes induced by heparin in the presence of bivalent ions.	Biol Pharm Bull	35	2081-72	2012
北山裕貴、新村航、四方田千佳子、斎藤博幸	ポストインサージョン法によって調製したPEG修飾リポソームの表面物性に関する研究	膜(MEMBRANE)	38	50-56	2013

難水溶性製剤の溶出試験に界面活性剤として使用される  
ポリソルベート 80 の品質に関する研究梶村 計志<sup>\*1, #</sup>, 川口 正美<sup>\*1</sup>, 四方田 千佳子<sup>\*2</sup>

(受付:平成24年1月17日, 受理:平成24年5月17日)

Effect of Variation in the Quality of Polysorbate80 Used in the Dissolution Test as a  
Surfactant for Poorly Water-Soluble DrugsKeiji KAJIMURA<sup>\*1, #</sup>, Masami KAWAGUCHI<sup>\*1</sup> and Chikako YOMOTA<sup>\*2</sup>

## Summary

Polysorbate 80 (PS80) is a polyoxyethylene ether of anhydrous sorbitol, partially esterified with oleic acid. It is used as a surfactant to improve solubility in dissolution tests for poorly water-soluble drugs. The purpose of this study was to examine the effect of the chemical quality of PS80 on dissolution behavior.

Ten types of commercial PS80 samples were used in this study. Each PS80 sample was colorless or orange-yellow, and the pH values of their aqueous solutions (5.0 w/v%) were within the range of 5.73-6.73. All these PS80 samples conformed to the specifications of the Japanese Pharmacopoeia, sixteenth edition (acid value, saponification value, and iodine value). However, their acid values differed.

HPLC analyses of these samples were carried out using a differential refractive index detector. Multiple peaks were observed in each chromatogram. The chromatographic behaviors of these samples were classified into three types. The absorption spectra of the PS80 samples were measured by Fourier-transform infrared spectroscopy. The spectral features were not identical among the PS80 samples.

Dissolution tests were performed using nabumetone 400 mg tablet, riboflavin butyrate 40 mg tablet and allylestrenol 25 mg tablet as drug samples. Three types of commercial PS80 of different chemical quality were used for these tests. It was found that dissolution behavior of each test tablet remained the same, irrespective of the PS80 preparation used.

## Key words

Polysorbate 80, Tween 80, Chemical quality, Dissolution test, pH value, Infrared absorption spectra, HPLC chromatographic pattern, Fat and fatty oils test, Nabumetone tablet, Riboflavin butyrate tablet, Allylestrenol tablet

## 緒言

非イオン性の界面活性剤であるポリソルベート 80 (PS80) は、難水溶性製剤の溶出試験に使用される (Fig. 1)<sup>1)</sup>。工業的には、無水ソルビトールの水酸基の一部をオレイン酸でエステル化した後、酸化エチレンと反応さ

せ合成されるが、乳化剤や可溶化剤の用途で製剤原料としても用いられる<sup>2)</sup>。

著者らはこれまで、溶出試験に使用される界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 試薬の品質が、溶出性に及ぼす影響について検討してきた<sup>3, 4)</sup>。SDS 以外のアルキル硫酸ナトリウムが高い割合で混在する

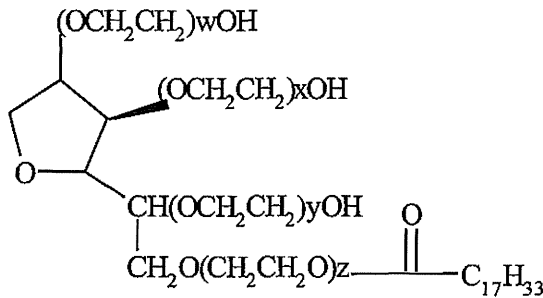
\*1 大阪府立公衆衛生研究所 大阪市東成区中道 1-3-69 (〒537-0025)

Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

\*2 国立医薬品食品衛生研究所 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

# 責任著者 Corresponding author



Where  $W+X+Y+Z=20$

Fig.1 Molecular Structure of Polysorbate80 (PS80)

SDS 試薬が市販品の中に見受けられ、溶出試験に適用した場合、溶出率を上昇させることを明らかにした<sup>3)</sup>。また、SDS 試薬を溶解したときの pH の違いが、溶出性に影響を及ぼすことも報告している<sup>4)</sup>。

本稿では、SDS と同様、溶出試験に界面活性剤として使用される PS80 試薬の品質に着目した。比較的高濃度の PS80 を使用する試験が設定されているナブメトン酸錠、リボフラビン酪酸錠及びアシルエストレノール錠を対象とし、溶出性に影響を及ぼす PS80 試薬の品質について検討を行った。

## 実験方法

### 1. 試験製剤

ナブメトン酸 400 mg 錠 (レリフェン錠 400 mg)、リボフラビン酪酸 40 mg 錠 (ハイボン錠 40 mg) 及びアシルエストレノール 25 mg 錠 (パーセリン錠 25 mg) を試験製剤として用いた。

### 2. PS80 試薬

市販の PS80 試薬 (販売メーカー：6 社、10 種類) を試験に使用した。

### 3. 標準物質

ナブメトン酸は、SIGMA-ALDRICH 社製の分析用試薬を使用した。酪酸リボフラビン (生化学用) 及びアシルエストレノール (薬理研究用) は、和光純薬工業株式会社製の試薬を使用した。

### 4. pH の測定

第 16 改正日本薬局方 (日局) に従い、PS80 試薬の 5.0 w/v% 水溶液について pH を測定した<sup>2)</sup>。pH メーターは、株式会社堀場製作所製の HORIBA F-52 を使用した。

### 5. 酸価、けん化価及びヨウ素価の測定

日局に従い<sup>2)</sup>、PS80 試薬の油脂試験 (酸価、けん化価及びヨウ素価) を行った。

### 6. HPLC による分析

HPLC による分析は、野村らの方法に従った<sup>5)</sup>。PS80 試薬約 1 g を秤量し、メタノール 4 mL を加えた後、10 分間振り混ぜ、試料溶液とした。HPLC の分析条件は以下の通りである。

装置：株式会社島津製作所製 LC-10AD<sub>vp</sub> シリズ

検出器：示差屈折率検出器 (RID-10A)

移動相：メタノール

カラム：L-column ODS (5 μm, 4.6 mm × 250 mm)

カラム温度：40°C

注入量：10 μL

流速：1.0 mL/min

### 7. フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) による分析

塩化ナトリウム板を用いた液膜法により、各 PS80 試薬の赤外吸収スペクトルを測定した。試薬約 0.1 mL を窓板 (塩化ナトリウム) にはさみ、日本分光株式会社製のフーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR/4100 型) を使用し、測定を行った。得られた PS80 試薬の赤外吸収スペクトルについて、装置付属の構造解析ソフト (Know-ItAll, BIO-RAD 社製) を使用し、部分構造の解析を行った。なお、FT-IR の測定条件は、以下の通りである。分解能：4 cm<sup>-1</sup>、積算回数：16 回、測定波長：700 cm<sup>-1</sup> ~ 4000 cm<sup>-1</sup>

### 8. 溶出試験

日本薬局方外医薬品規格第三部 (局外規第三部) に従い<sup>6~8)</sup>、溶出試験を実施した。溶出試験機は、株式会社大日本精機社製の全自動型 (RT-3std) を使用した。また、溶出挙動を比較する際の試験液採取は、品質再評価で定められた時間<sup>9)</sup>で行い、溶出率は全て n=6 の平均値とした。なお、各製剤の試験で使用される PS80 試薬の濃度は、以下の通りである。

ナブメトン酸 400 mg 錠：3.0 w/v%，

リボフラビン酪酸 40 mg 錠：1.5 w/v%，

アシルエストレノール 25 mg 錠：1.0 w/v%，

## 結果及び考察

### 1. PS80 試薬の色調

局外規第三部の溶出試験で使用される PS80 試薬には、日局「ポリソルベート 80」の規格が適用される。その

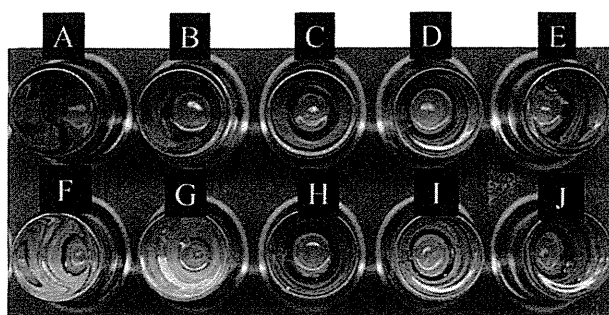


Fig. 2 Description of Commercial PS80 Sample

性状の項には、各条品の適否を示すものではないが、色調に関する記述があり、「本品は無色～だいたい黄色の粘稠性のある液」とされている<sup>2)</sup>。

本稿で使用した各 PS80 試薬の色調は全て、性状の項に記載された範囲内であった。しかし、PS80 試薬により色合いは大きく異なっていた (Fig. 2)。PS80-A は、最も「だいたい黄色」に近い色調であり、PS80-F 及び PS80-I は、ほぼ「無色」であった。

## 2. PS80 試薬の pH

PS80 試薬の 5.0 w/v% 水溶液を調製し、pH を測定した (Fig. 3)。日局「ポリソルベート 80」の性状の項には、各条品の適否を示すものではないが、5.0 w/v% 水溶液の pH が規定されている<sup>2)</sup>。PS80 試薬の pH は、5.73～6.73 の範囲であり、日局「ポリソルベート 80」の性状の項の液性 (pH 5.5～pH 7.5) を満たしていた。試薬による pH の差は、ほとんど認められなかったが、PS80-F 及び PS80-I が若干低い値を示した。

著者らは先に、SDS 試薬について、同様の検討を行っており、試薬により pH が大きく異なること、溶解した時の pH の違いが溶出性に影響を及ぼすことを明らかにしている<sup>4)</sup>。

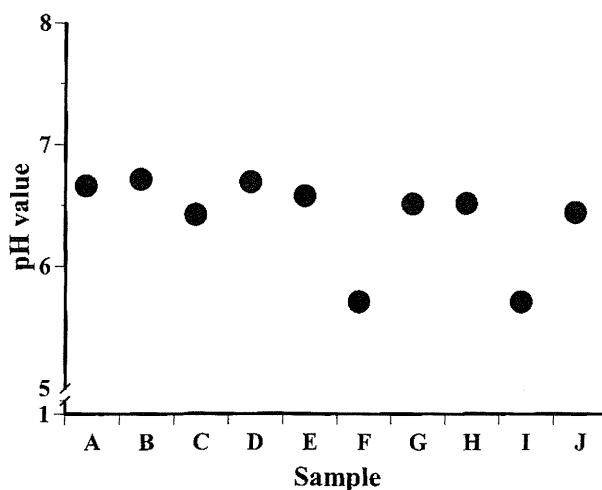


Fig. 3 The pH Value in Aqueous Solution of Commercial PS80 (5 w/v%)

## 3. 酸価、けん化価及びヨウ素価

日局「ポリソルベート 80」の規格のうち、品質への影響が大きいと考えられる酸価、けん化価及びヨウ素価を測定し、各試薬間で比較した。

各 PS80 試薬の試験結果は全て、日局の規格に適合していた (Table 1)。各 PS80 試薬のけん化価及びヨウ素価は、ほぼ同一の値を示したが、酸価は、試薬により大きく異なっていた。PS80-F の酸価は、日局の規格上限値 (2.0 以下) 付近であり、PS80-A の約 5 倍の値を示した。

酸価は、油脂中の遊離脂肪酸含量を示しており、通常、精製が進むに従い低下する<sup>10)</sup>。各 PS80 試薬の色調との関係では、目視的に精製度が高いと考えられる、ほぼ「無色」の PS80-F が最も高い値 (1.88) を示し、「だいたい黄色」に近い PS80-A が最も低い値 (0.38) を示した。

Table 1 Examination Result by the Official Method (Japanese Pharmacopoeia)

Quality Standards	Fat and Fatty Oils Test		
	Acid Value Not more than 2.0	Saponification Value 45-55	Iodine Value 19-24
A	0.38±0.01	50.0±0.6	22.8±0.1
B	0.69±0.01	50.3±0.4	20.3±0.2
C	0.83±0.02	53.0±0.6	20.0±0.1
D	0.62±0.01	53.3±0.1	20.1±0.1
E	0.74±0.01	48.0±0.9	21.3±0.3
F	1.88±0.01	50.9±0.7	21.6±0.5
G	1.30±0.02	49.2±0.9	22.2±0.2
H	1.26±0.01	50.5±0.4	21.8±0.4
I	1.41±0.02	46.5±1.2	21.8±0.1
J	1.70±0.02	45.9±0.6	23.0±0.4

Mean±SD, N=3

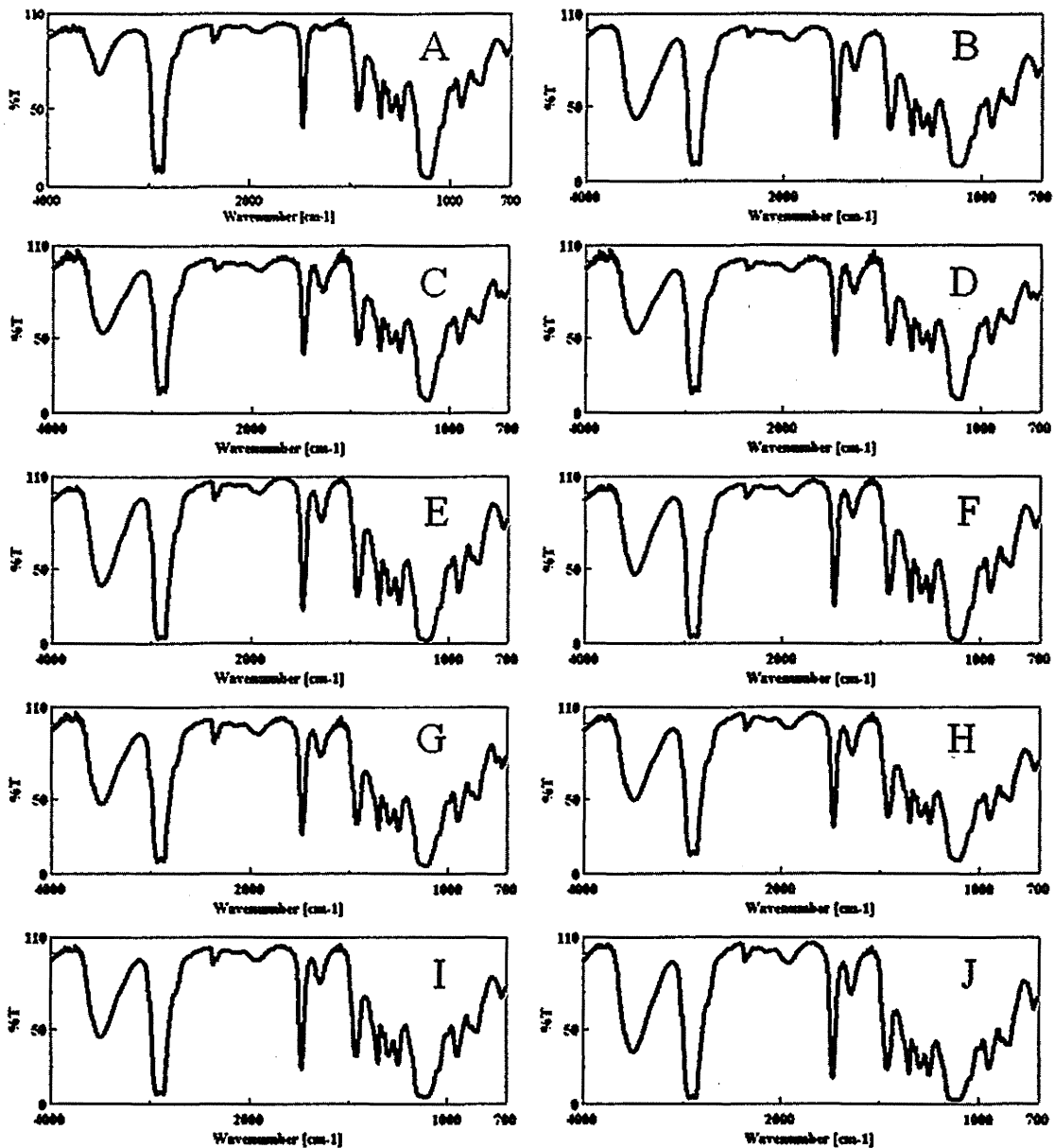


Fig. 4 Infrared Absorption Spectra of Commercial PS80 Sample

#### 4. FT-IR による分析

PS80 試薬を FT-IR により分析し、赤外吸収スペクトルを比較した (Fig. 4). 指紋領域 ( $1500\text{ cm}^{-1}$  以下) の比較では、全ての PS80 試薬のスペクトルが、同一であった。しかし、 $1500\text{ cm}^{-1} \sim 4000\text{ cm}^{-1}$  の領域では、PS80-A のスペクトルが、他とは異なっていた。PS80-A のスペクトルでは、 $1640\text{ cm}^{-1}$  付近の吸収帯がほとんど認められず、 $3400\text{ cm}^{-1}$  付近の吸収帯も弱かった。装置付属の構造解析ソフト等による解析結果から、 $3400\text{ cm}^{-1}$  付近の幅広い吸収帯は、水素結合した水酸基の伸縮振動によるものであることが推測された<sup>11, 12)</sup>。また、 $1640\text{ cm}^{-1}$  付近の吸収帯が、ほとんど認められなかった理由は、試薬間における水分含量の差によるものである可能性があ

る。すなわち、日局収載の「グリセリン」と「濃グリセリン」の参照赤外吸収スペクトルを比較してみると、水分含量が多いグリセリンのスペクトルでは、 $1650\text{ cm}^{-1}$  付近にブロードな吸収帯が認められるのに対し、濃グリセリンのスペクトルでは認められない<sup>13)</sup>。更に、水酸基の伸縮振動によるものであることが推測される  $3400\text{ cm}^{-1}$  付近の吸収帯が PS80-A のスペクトルでは弱いことを考慮すると、 $1640\text{ cm}^{-1}$  付近の吸収帯は、H-O-H の変角振動によるものであることが示唆される。

この様に、市販の PS80 試薬の赤外吸収スペクトルには、水分含量の差に基づく若干の相違が認められるものの、品質上の問題は確認できなかった。

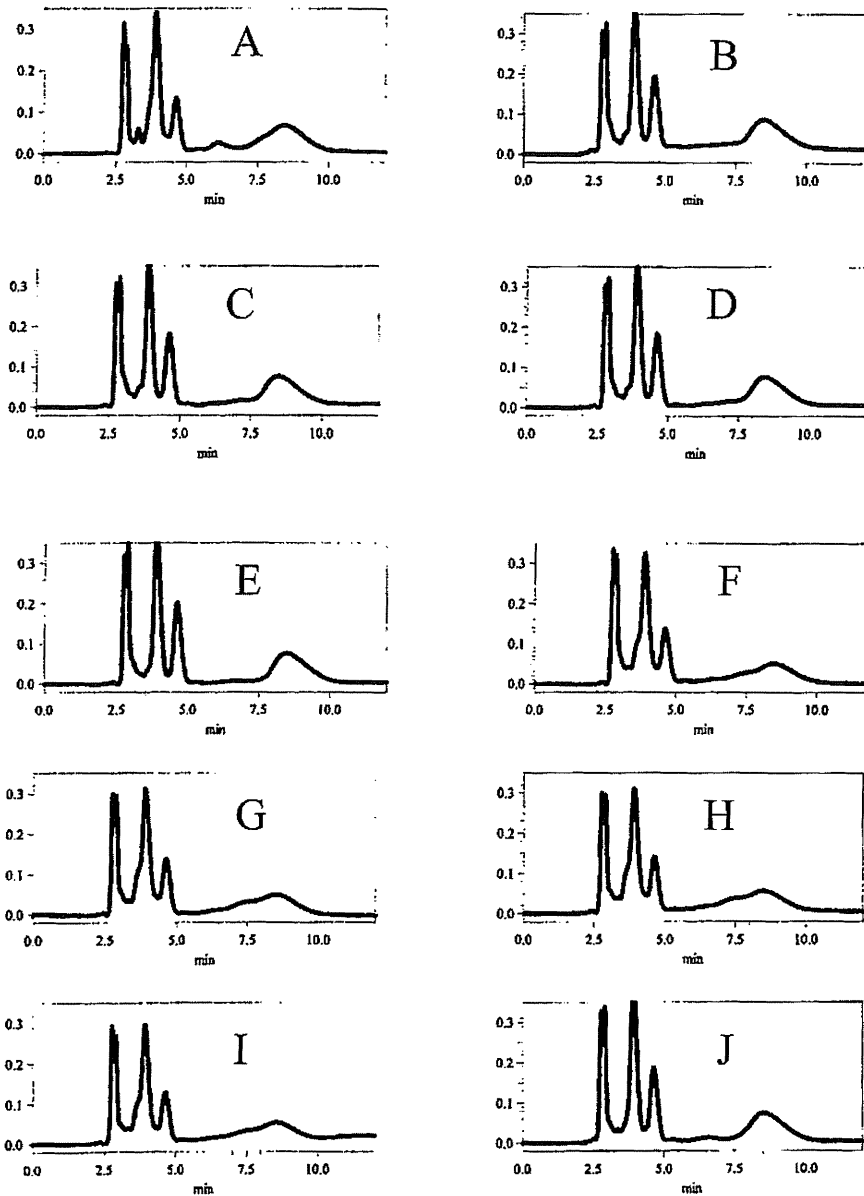


Fig. 5 Chromatographic Patterns of Commercial PS80 Sample

### 5. HPLC による分析及び品質の違いが及ぼす溶出挙動への影響

各 PS80 試薬を HPLC により分析し、クロマトグラムを比較した (Fig. 5)。全ての PS80 試薬のクロマトグラムから、複数のピークが確認された。PS80 は、ソルビタンとオレイン酸を反応させて生成するソルビタン脂肪酸エステルにオキシエチレン基を付加重合させて合成される<sup>14)</sup>。理論的には、ソルビタン 1 分子にオレイン酸が 1 分子とオキシエチレン基が 20 個付加重合した化合物とされているが (Fig. 1)、実際には様々な分子種から構成される複雑な混合物であることが報告されている<sup>15, 16)</sup>。

各 PS80 試薬のクロマトグラムは、ピーク形状等の比較から、3 種類に分類された。PS80-A のクロマトグラ

ムでは、他と比較し、より多くのピークが確認された。また、ピーク形状の比較から、PS80-B, C, D, E 及び J のクロマトグラムが類似しており、PS80-F, G, H 及び I のパターンがほぼ同一であった。

以上の検討結果を踏まえ、理化学的な品質が異なる PS80-A, E, F を使用した溶出試験を実施し、溶出挙動を比較した (Fig. 6)。試験製剤として、ナブメトン酸錠、リボフラビン酪酸錠及びアリルエストレノール錠を対象とした。これらの製剤は全て、局外規第三部に溶出試験が記載されており、比較的高濃度の PS80 試薬を使用する製剤である。

PS80-A, E, F を用いた場合の溶出挙動は類似しており、3 種類の試験製剤とも、使用する試薬による溶出

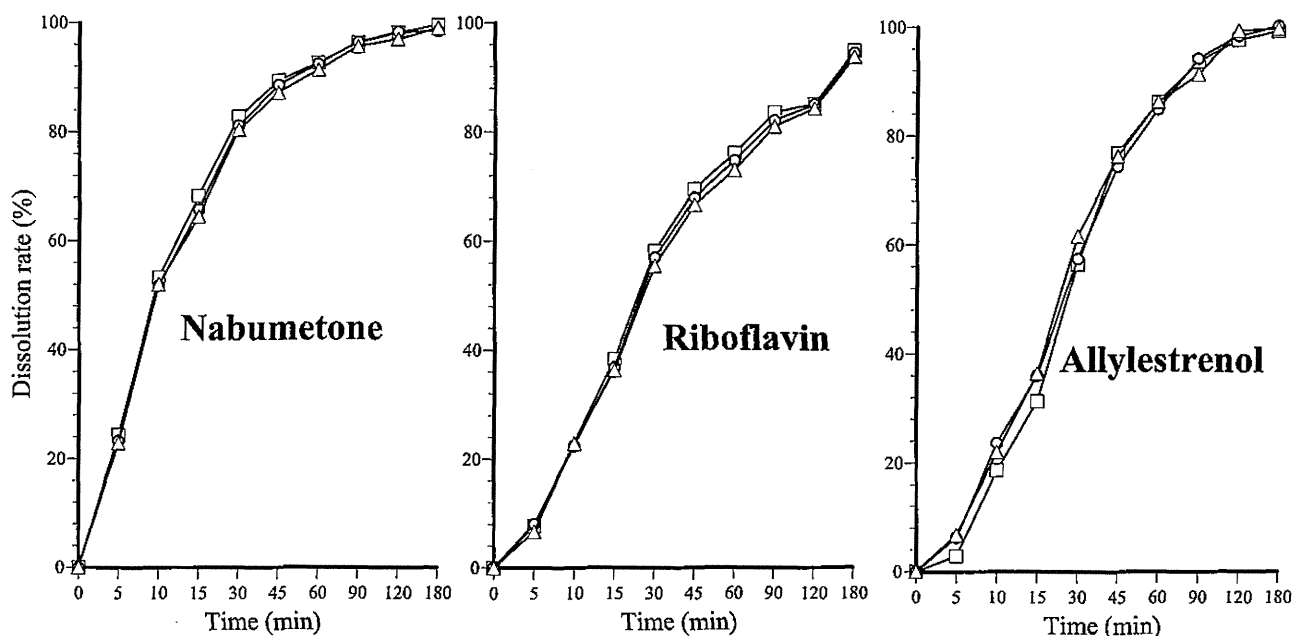


Fig. 6 Dissolution Behavior of Nabumetone, Riboflavin and Allylestrenol Tablet

□; Polysorbate80 (PS80)-A, ○;PS80-E, △;PS80-F

性の差は確認できなかった。この様に、本稿において確認された PS80 試薬の品質の相違は、溶出挙動に影響を及ぼすものではなかった。

## 結 論

本稿では、溶出性に影響を及ぼす PS80 試薬の理化学的品質について検討を行った。市販の PS80 試薬は、色調、油脂試験、HPLC のクロマトグラム及び赤外吸収スペクトル等が同一ではなかった。しかし、ナブメトン酸錠、リボフラビン酪酸錠及びアリルエストレノール錠を対象とした試験では、試薬による溶出挙動の差は特に認められず、品質上問題となるものではなかった。

## 謝 辞

本研究は平成 22～24 年度厚生労働科学研究「後発医薬品の同等性ガイドラインにおける試験条件の最適化に関する研究」の助成を受けたものである。

## 文 献

- 1) 近澤正敏, 田嶋和夫: 界面化学, 東京, 丸善, 2010, p.163.
- 2) 第 16 改正日本薬局方解説書, 東京, 廣川書店, 2011, P.C-4645-4647, B-84-91, B-339.
- 3) 梶村計志, 川口正美, 四方田千佳子: 医薬品医療機器レ

- ギュラトリーサイエンス, 42 (9), 626-632 (2011).
- 4) 梶村計志, 川口正美, 四方田千佳子: 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 43 (2), 194-199 (2012).
- 5) 野村千枝, 北川幹也, 吉田政晴, 田中之雄: 食衛誌, 48 (3), 64-68 (2007).
- 6) 厚生労働省医薬食品局審査管理課, 医療用医薬品品質情報集, 平成 14 年 7 月版, P.144-146.
- 7) 厚生労働省医薬食品局審査管理課, 医療用医薬品品質情報集, 平成 15 年 10 月版, P.223.
- 8) 厚生労働省医薬食品局審査管理課, 医療用医薬品品質情報集, 平成 15 年 10 月版, P.168.
- 9) 厚生省医薬安全局審査管理課長: 医療用医薬品の品質に係る再評価の予試験について, 医薬審第 599 号, 平成 10 年 7 月 15 日.
- 10) 第 16 改正日本薬局方解説書, 東京, 廣川書店, 2011, P.B-84-91.
- 11) 川崎潤: ビギナーズ有機構造解析, 京都, 化学同人, 2008.
- 12) 宇野英満, 築部浩: はじめての有機スペクトル解析-IR, NMR, MS データを読む-の併用-, 東京, 丸善, 2006.
- 13) 第 16 改正日本薬局方解説書, 東京, 廣川書店, 2011, P.E-216.
- 14) 建部千絵, 河崎裕美, 杉本直樹, 佐藤恭子, 棚元憲一: 日本食品化学学会誌, 15 (3), 129-134, 2008.
- 15) Frison-Norrie, S., Sporns, P.: *J.Agric. Food Chem.*, 49, 3335-3340 (2001).
- 16) Dang, H.V., Gray, A.I., Watson, D., Bates, C.D., Scholes, P., and Eccleston, G.M.: *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 40, 1155-1165 (2006).



## Alterations in the Detergent-Induced Membrane Permeability and Solubilization of Saturated Phosphatidylcholine/Cholesterol Liposomes: Effects of Poly(ethylene glycol)-Conjugated Lipid

Hiroko Shibata,\* Haruna Saito, Chikako Yomota, Toru Kawanishi, and Haruhiro Okuda

National Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.

Received February 14, 2012; accepted June 6, 2012

We have investigated the effects of two bile salts, chenodeoxycholate (CDC) and ursodeoxycholate (UDC), and a widely used detergent, Triton X-100 ( $T_{X-100}$ ), on normal and poly(ethylene glycol)-modified liposomes (PEGylated liposomes). We tested various lipid compositions, including hydrogenated soybean phosphatidylcholine/cholesterol/PEG-conjugated lipid (HSPC/PEG-lipid). Alterations in permeability were determined by the rate of drug release from the liposomes and solubilization was assessed by measuring the particle size of liposomes. In addition, we attempted to observe interactions between the detergents and lipid bilayers by using surface plasmon resonance (SPR). CDC induced drug release from liposomes in a dose-dependent manner, and the PEGylated liposomes tended to be susceptible to CDC. While UDC did not strongly induce drug release from liposomes, UDC exhibited a similar tendency with CDC. In case of  $T_{X-100}$ , there were significant differences in the percentage of released drug between normal and PEGylated liposomes, and the percentage of  $T_{X-100}$ -induced drug release further increased with an increased ratio of PEG-lipid. SPR analysis revealed that the lipid bilayer including PEG-lipid was selectively solubilized by  $T_{X-100}$ , correlating with the drug release data. These results suggest that the effect of detergents on the lipid bilayer of liposomes depends on both the kind of detergent and the lipid composition, including the presence or absence of PEG-lipid. Moreover, the effects of  $T_{X-100}$  on the lipid bilayers of the PEGylated liposomes significantly differed from those on the lipid bilayers of the normal liposomes.

**Key words** liposome; release; detergent

Many commercial liposomal products have been developed,<sup>1)</sup> and DOXIL<sup>®</sup>, which is the antitumor agent doxorubicin (DXR) encapsulated in a poly(ethylene glycol)-modified (PEGylated) or so-called “stealth” liposome,<sup>2)</sup> has been approved in Japan. Drug release is one of the most important formulation properties for quality assessment of liposomal products.<sup>3)</sup> *In vitro* drug-release tests would be very useful for assessing lot-to-lot variability.<sup>4,5)</sup> However, it is difficult to develop the *in vitro* release testing which can completely mimic *in vivo* release profile of liposomal products, since the *in vivo* behavior of the liposomal product is quite complicated.<sup>6,7)</sup> Additionally, it takes some dozens of days to obtain sufficient drug-release under normal conditions, such as suspension in buffered saline or human serum/plasma at 37°C. On another front, the property of lipid bilayer such as a physical state will be one of critical parameters related to drug release from liposomes. Therefore, the investigation of *in vitro* release under multiple conditions has been proposed.<sup>8)</sup> For examples, one is under physiological conditions, and the other is under physical/chemical stress conditions to evaluate the property of lipid bilayers. Thus, by using detergent as a chemical stress, the measurement of drug release associated with detergent-induced destabilization of lipid membranes is one potential method to evaluate the property of liposome membranes and to shorten the testing time.

The solubilization and reconstitution of lipid bilayers induced by the addition of detergents has attracted attention from a biological and physicochemical point of view. As a result, many studies have examined the corresponding mechanisms and intermediate processes involved in the process by using liposomes as artificial lipid bilayers.<sup>9–13)</sup> The effects of

bile salts on cell membranes and liposomes have also been studied because bile salts are typical intravital detergents. In particular, deoxycholate, chenodeoxycholate (CDC), and ursodeoxycholate (UDC), which are common in bile and serum, have been compared for their abilities to permeabilize and solubilize membranes of egg phosphatidylcholine (EPC) liposomes.<sup>10,13)</sup> Triton X-100 ( $T_{X-100}$ ) is another commonly used detergent. While the membrane solubilization by  $T_{X-100}$  and its mechanism have already been examined physicochemically,<sup>9,11)</sup> additional studies have recently investigated the effects of temperature and variable carbon chain length on membrane solubilization.<sup>14,15)</sup> In the above studies, the liposomes were mainly composed of a single phosphatidylcholine.

In contrast, liposomal products for systemic administration are mainly composed of saturated lipids or synthetic lipids, including hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC), distearoylphosphatidylcholine (DSPC), and distearoylphosphatidylglycerol (DSPG), while unsaturated lipids are sometimes used in liposomal products for topical applications. The increased proportion of cholesterol in the lipid composition and the addition of poly(ethylene glycol)-conjugated lipid (PEG-lipid) are strategies often applied to enhance the *in vivo* stability of liposomal products.<sup>16,17)</sup> Detergents have been used as a positive control or as additives in the test medium for the *in vitro* test to evaluate drug release from liposomes consisting of the above mentioned lipid components.<sup>18)</sup> But, the solubilizing and permeabilizing effects of detergents on lipid bilayers made of saturated phospholipids and cholesterol on liposome encapsulated drug substances have yet to be fully investigated. Further, to the best of our knowledge, no previous studies have investigated the effect of detergents on PEGylated lipid bilayers.

Before applying detergents to the *in vitro* drug release

The authors declare no conflict of interest.

\*To whom correspondence should be addressed. e-mail: h-shibata@nihs.go.jp

testing of liposomal products, it is important to collect basic information on detergent-induced permeabilization, solubilization, and drug release from liposomes that are similar in lipid composition to commercially available products. In this study, we examined the detergent-induced permeabilization and solubilization of lipid bilayers by using drug-encapsulated liposomes consisting of HSPC and cholesterol, with or without PEG-lipid, to assess whether the effects of detergents are altered by PEG-lipid. In addition, we used CDC, UDC, and  $T_{X-100}$  as detergents, because they have previously been used to study lipid-detergent interactions.

## Experimental

**Materials** Two bile salts, sodium chenodeoxycholate and sodium ursodeoxycholate, were obtained from Calbiochem (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan), respectively.  $T_{X-100}$  was purchased from Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan). The phospholipids, hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC; C16:0 approx. 10%, C18:0 approx. 90%) and (*N*-(carbonylmethoxy polyethylene glycol 2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycerol-3-phosphoethanolamine (DSPE-PEG2000), were purchased from NOF Corporation (Tokyo, Japan). Cholesterol (Chol) was of analytical grade (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan). Adriacin<sup>®</sup> injection 10 (Kyowa Hakkō Kirin Co., Ltd., Tokyo, Japan), a doxorubicin hydrochloride (DXR) injection, was purchased from a general sales agency for drugs. PD-10 desalting columns were purchased from GE Healthcare Japan (Tokyo, Japan).

**Liposome Preparation** Liposomes, liposomes-entrapped DXR, and empty liposomes were prepared by modified ethanol injection method.<sup>19)</sup> DXR was encapsulated into liposomes by remote loading using an ammonium sulfate gradient.<sup>20)</sup> Briefly, all lipids (200  $\mu$ mol) were dissolved in about 5 mL of ethanol in different compositions: SL1, HSPC/Chol/DSPE-PEG2000 (79/16/5 mol/mol); SL2, HSPC/Chol/DSPE-PEG2000 (55/40/5 mol/mol); L1, HSPC/Chol (5/1 mol/mol); and L2, HSPC/Chol (6/4 mol/mol). The ethanol was removed with a rotary evaporator leaving behind about 1 mL of the ethanol solution. Next, 8 mL of 300 mM ammonium sulfate (for liposomes-entrapped DXR) or saline (for empty liposomes) was added to the ethanol solution. Liposomes formed spontaneously after further evaporation of the residual ethanol. After 5 freeze-thaw cycles, liposomes were extruded through a series of polycarbonate filters (Nucleopore, CA, U.S.A.) with pore sizes ranging from 0.4 to 0.1  $\mu$ m. The mean diameter of extruded liposomes was in the range of 100–150 nm. Following extrusion, liposomes were ultracentrifuged at 80000 rpm for 45 min at 4°C, and suspended in normal saline. Phospholipid concentration was determined by colorimetric assay using Phospholipids C Test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan). For encapsulation of DXR, DXR was added to the ammonium sulfate-containing liposomes at a DXR/liposome ratio of 0.2:1 (w/w), and the liposomes were incubated for 1 h at 55°C. The liposome-encapsulated DXR was exchanged by eluting through a PD-10 desalting column equilibrated with normal saline.

**Determination of DXR Release** The release of DXR from liposomes was studied using a fluorescence-dequenching assay, according to the method described by Ishida *et al.*<sup>21)</sup> with some modifications. CDC, UDC, and  $T_{X-100}$  were dissolved

in 10 mM *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) buffer (pH 7.5) at indicated concentrations. Liposomes were incubated in various buffer conditions at a final lipid concentration of 40 nM (DXR, 2  $\mu$ g/mL) at 42°C for 30 min; these intervals and temperature values were chosen as the minimum period of time and heating needed to achieve a constant level of DXR release. The DXR release in an aliquot of the incubation mixture was determined by the increase in sample fluorescence at 470/590 nm (emission/excitation) by using a fluorescence spectrophotometer (JASCO, Tokyo, Japan). The percentage of released DXR was calculated using the pre-incubation sample (zero release) and complete lysis sample with isopropanol (100% release). Values were normalized using the standard curve of DXR at various concentrations of CDC, UDC, or  $T_{X-100}$ .

**Dynamic Light Scattering (DLS) Measurements** The particle size distribution and mean diameter of each liposome after incubation were measured using a dynamic light scattering photometer DLS-7000 (Otsuka Electronics Co., Ltd., Osaka, Japan) equipped with a He-Ne laser source (wavelength, 632.8 nm). All DLS measurements were made at a scattering angle of 90°. Data were gathered using a counting period of 100 s. Histogram analysis was performed to calculate the average particle size and standard deviation.

**Surface Plasmon Resonance (SPR) Analysis** Experiments were performed at 25°C using L1 sensor chip on Biacore 2000 (Biacore<sup>®</sup>, Uppsala, Sweden) based on previous reports.<sup>22,23)</sup> Fifty microliters of 20 mM zwittergent 3–14 detergent, followed by 50 mM HCl in 50% v/v isopropanol, was applied at a flow rate of 100  $\mu$ L/min to precondition new sensor chips. Empty liposomes (SL1, SL2, L1, L2) were diluted in running buffer HBS-N to 10 mM and captured to saturation (2 min) across isolated flow cells at 5  $\mu$ L/min which resulted in an increase of resonance units (RU=1 pg/mm<sup>2</sup>): SL1, 6000 RU; SL2, 7000 RU; L1, 12000 RU; L2, 15000 RU. The flow rate was switched to 100  $\mu$ L/min, and fresh lipid surfaces were washed by applying two 30-s pulses of running buffer. The flow rate was then switched to 5  $\mu$ L/min, and 10  $\mu$ L of detergent at indicated concentrations was injected for 2 min to monitor the interaction of the detergent with lipid surfaces. Again, the flow rate was switched to 100  $\mu$ L/min, and 2 consecutive 30-s pulses of 50 mM HCl in 50% v/v isopropanol were applied to regenerate the sensor surface. These procedures, including liposome capture and lipid dissociation induced by detergent, are shown in Fig. 4. The sensor surface was recoated with a fresh liposome solution for the next interaction cycle. The concentration of dissociated lipid was calculated from the difference between the RU of immobilized lipid and that of equilibrium value after injection of detergent.

## Results and Discussion

Detergent-induced solubilization and drug release were assessed on 2 PEGylated and 2 normal liposomes: SL1, HSPC/Chol/DSPE-PEG2000 (79/16/5 mol/mol); SL2, HSPC/Chol/DSPE-PEG2000 (55/40/5 mol/mol); L1, HSPC/Chol (5/1 mol/mol); and L2, HSPC/Chol (6/4 mol/mol). DXR, which is encapsulated in the liposomal product DOXIL<sup>®</sup>, was encapsulated in the above mentioned liposomes.

**Alteration of Membrane Permeability and Particle Size** The effects of 2 kinds of bile salt, CDC and UDC, were examined in concentration ranges of 0.01–10 mM and 0.02–20 mM,

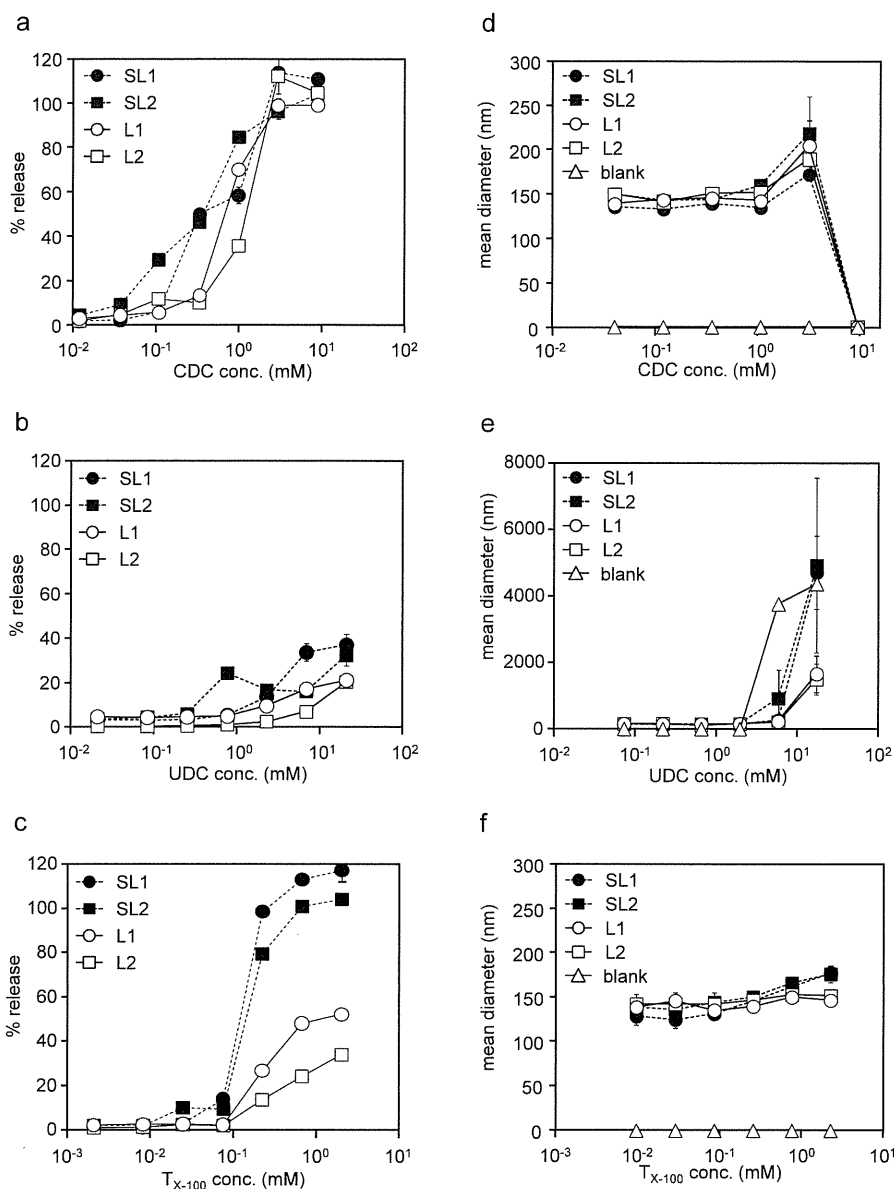


Fig. 1. DXR Release from Liposome Induced by (a) CDC, (b) UDC, or (c)  $T_{X-100}$ , and the Influence of (d) CDC, (e) UDC, or (f)  $T_{X-100}$  on the Size of Liposomes

Liposomes were incubated with each detergent at the indicated concentration for 30 min at 42°C. Results are means of triplicate analysis ± S.D. SL1; HSPC/Chol/DSPE-PEG2000 (79/16/5 mol/mol), L1; HSPC/Chol (5/1 mol/mol), SL2; HSPC/Chol/DSPE-PEG2000 (55/40/5 mol/mol), L2; HSPC/Chol (6/4 mol/mol). The blank used was the solution of each detergent.

respectively. CDC induced DXR release from liposomes in a dose-dependent manner. DXR release was observed below the critical micelle concentration (cmc: approx.  $3 \text{ mM}^{24}$ ), and the percentage of released DXR reached almost 100% at 3.3 mM (Fig. 1a). While there were no significant differences in the permeability enhancement of CDC based on lipid composition, the percentage of released DXR from the PEGylated liposomes (SL1 and SL2) tended to be slightly higher than that from normal liposomes. From the particle size analysis of liposomes, an increase in particle size was observed in all liposomes at 3.3 mM CDC, but the intensity of all liposomes in solution was decreased at 10 mM, indicating that the lipid bilayer of each liposome was solubilized, and that they became small particles whose size was below the detection limit (10 nm) of the equipment (Fig. 1d).

In case of UDC, although the rate of release of DXR was

low at 20–40%, at even 20 mM over cmc (approx.  $12 \text{ mM}^{24}$ ), the rate of release of DXR from the PEGylated liposomes (SL1 and SL2) tended to be slightly higher than that from normal liposomes (Fig. 1b). The particle size was increased at 6.6 mM, reaching more than 1000 nm (Fig. 1e). However, the increase of particle size was observed in the solution of UDC (blank). This could be caused by the phase transition from micelle to liquid crystal phase with the increase of concentration of UDC. The value of each liposome in Fig. 1e showed the particle size of mixture of each liposome and the assembly of UDC molecule, thus we could not measure the effect of UDC on the alteration of particle size of liposome.

These data indicate that CDC altered the permeability of lipid bilayers at concentrations below the cmc and induced drug release from liposomes without complete solubilization of the bilayer. They also indicated that UDC has a small effect

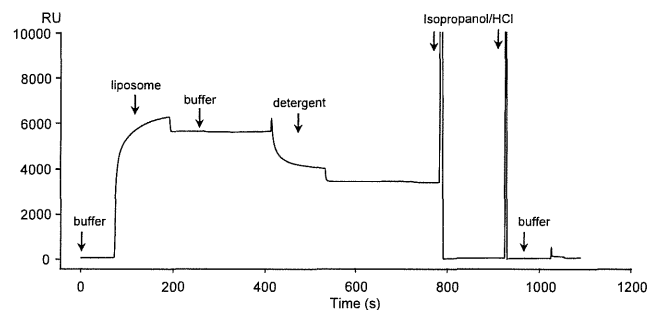
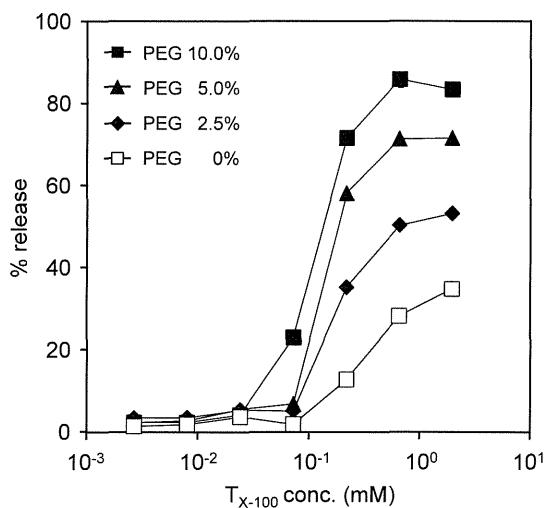


Fig. 3. Sensorgram of Complete Liposome Capture and Detergent-Induced Lipid Dissociation

Empty liposomes are immobilized, and 2 buffer injections are administered to remove any free liposomes and stabilize the surface. After washing, each detergent is injected over the liposome. Two injections of 50 mM HCl in 50% v/v isopropanol regenerate the sensor chip surface. A final injection of buffer removes any residual regeneration solution, thereby preparing the surface for the next assay cycle.

Fig. 2.  $T_{X-100}$  Specifically Induced DXR Release from PEGylated Liposomes

Results are means of triplicate analysis  $\pm$  S.D. PEG 0%; HSPC/Chol (6/4 mol/mol), PEG 2.5%; HSPC/Chol/DSPE-PEG2000 (57.5/40/2.5 mol/mol), PEG 5.0%; HSPC/Chol/DSPE-PEG2000 (55/40/5 mol/mol), PEG 10%; HSPC/Chol/DSPE-PEG2000 (55/40/5 mol/mol).

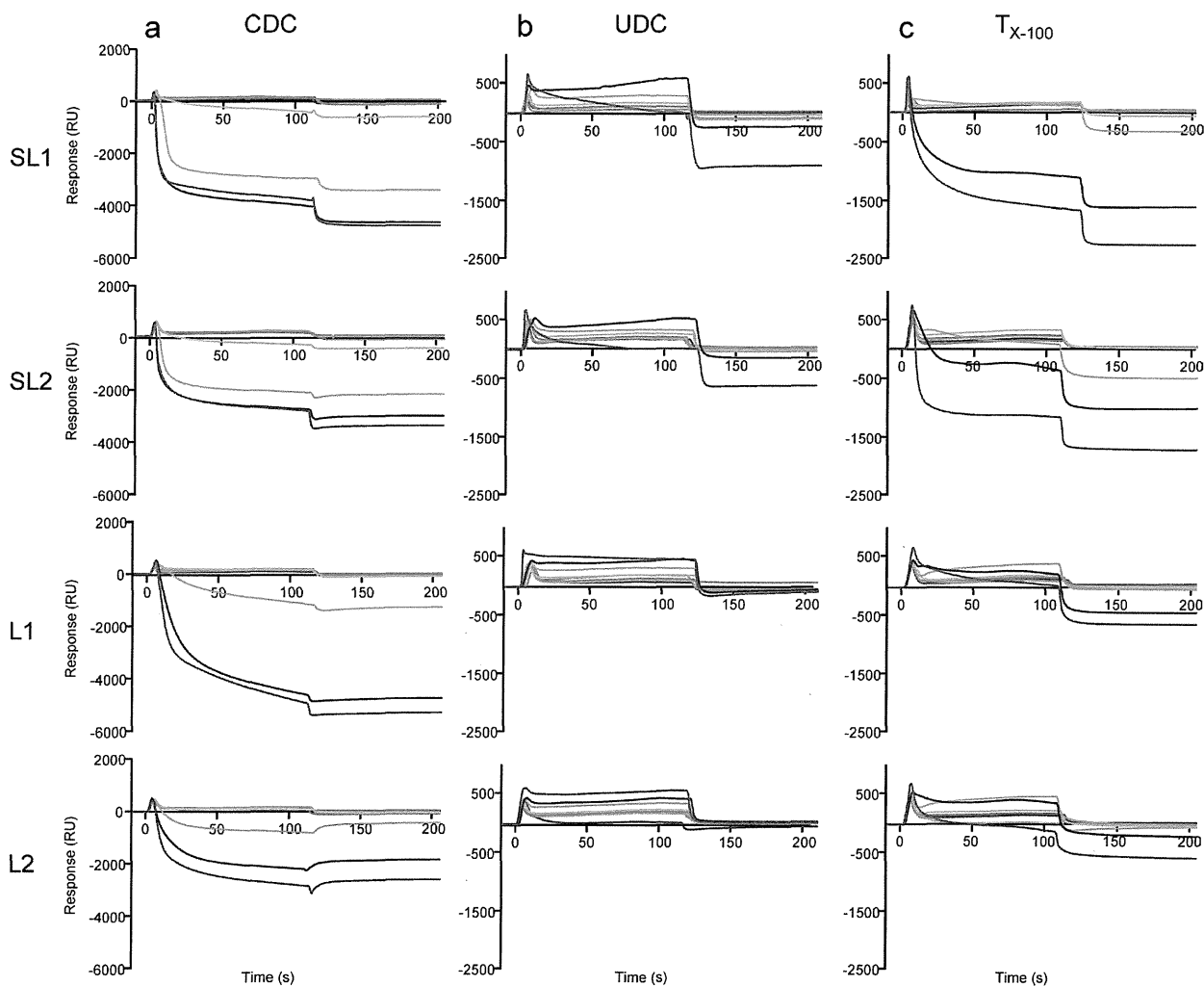


Fig. 4. Responses Obtained for Detergents Interacting with Liposome Surfaces

Each detergent was injected at 0 (—), 0.313 (—), 0.625 (—), 1.25 (—), 2.5 (—), 5.0 (—), and 10 (—) mM over a freshly prepared lipid surface. SL1: HSPC/Chol/DSPE-PEG2000 (79/16/5 mol/mol), L1: HSPC/Chol (5/1 mol/mol), SL2: HSPC/Chol/DSPE-PEG2000 (55/40/5 mol/mol), L2: HSPC/Chol (6/4 mol/mol).