

脂质体冻干因素研究概况

王立华¹, 王永利¹, 黄慧婷¹, 张江伟², 张丹参^{3*}
(1. 河北北方学院应用化学研究所, 河北 张家口 075000;
2. 中国石油大学(北京)提高采收率研究院, 北京 102249;
3. 河北北方学院基础医学院, 河北 张家口 075000)

[摘要] 对制备冻干脂质体过程中的影响因素方面研究进行了文献整理和分析。以冻干脂质体为主题词, 在中国学术文献总库(CNKI)中收集冻干脂质体制备方面的文献, 根据其相关性引用了 35 篇文献, 对冻干脂质体制备过程中的影响因素进行了归纳和总结。结果显示冻干脂质体制备过程中冻干保护剂及用量、预冻方式及速度、冻干真空度、干燥时间、水化介质等因素影响冻干脂质体质量。综上制备冻干脂质体过程中必须考虑好各种因素才能制备出包封率高、稳定性好、粒径变化小的药物脂质体。应用冻干技术可防止药物氧化、延长药物脂质体保质期, 为脂质体药物的推广应用奠定了基础。

[关键词] 冷冻干燥法; 冻干脂质体; 制备; 稳定性

[中图分类号] R283.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0371-04

Progress in Influence Factors of Freeze-dried Liposomes Preparation

WANG Li-hua¹, WANG Yong-li¹, HUANG Hui-ting¹, ZHANG Jiang-wei², ZHANG Dan-shen^{3*}
(1. Institute of Applied Chemistry of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;
2. Research Institute of Enhanced Oil Recovery, China University of Petroleum (Beijing), Beijing 102249, China;
3. Basic Medical College of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

[Abstract] To conduct a literature review and analysis on the influencing factors in the process of the

[收稿日期] 20120327(018)
[基金项目] 河北省科学技术研究与发展计划项目(12276104D-94);河北北方学院自然科学基金项目(Q201112)
[第一作者] 王立华, 硕士, 讲师, 从事应用化学相关研究, E-mail:fangyuanguiju@163.com
[通讯作者] * 张丹参, 博士, 教授, 从事神经药理学及新型药物制剂研究, E-mail:dszhang-cn@yahoo.com.cn

[15] 开金龙, 刘慧, 夏小军, 等. 复方紫草液治疗静脉炎临床研究[J]. 甘肃中医, 2009, 22(3): 33.

[16] 杨小红, 薛桂花, 边怡超, 等. 紫草膏治疗化疗性静脉炎疗效观察[J]. 河北医药, 2010, 32(22): 3236.

[17] 杨丽华. 紫草油治疗输液性静脉炎的探讨[J]. 吉林医学, 2009, 30(12): 1095.

[18] 宋艳茹, 贾雄杰, 杨小红, 等. 紫草膏外敷联合硫酸镁湿敷治疗 PICC 所致静脉炎[J]. 护理学杂志, 2011, 26(1): 34.

[19] 王姝, 李小红, 王泽华. 紫草联合 MTX 治疗宫外孕的疗效观察[J]. 浙江预防医学, 2010, 22(12): 68.

[20] 刘海梅. 米非司酮联用紫草根治疗异位妊娠的体会[J]. 中外医学研究, 2010, 28(8): 143.

[21] 王文英, 徐文荣. 复方紫草油治疗宫颈糜烂 93 例[J]. 中国医院药学杂志, 2000, 20(7): 426.

[22] 孙清珍, 李云娣. 紫草油局部涂抹治疗宫颈糜烂 200 例[J]. 新中医, 2009, 41(8): 92.

[23] 张春艳. 甲氨蝶呤配伍紫草治疗胎盘植入临床分析

[J]. 临床误诊误治, 2009, 22(2): 41.

[24] 李俊, 李传吉, 金少华, 等. 肛肠病术后应用紫草油纱的临床疗效观察[J]. 宁夏医科大学学报, 2009, 31(5): 647.

[25] 胡志海, 胡俊富. 紫草生肌膏纱条在肛肠手术后的应用[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2009, 15(5): 523.

[26] 张义. 自拟复方紫草油纱条在痔疮手术后治疗中的应用[J]. 四川中医, 2010, 28(11): 107.

[27] 赵秀, 黎贵湘, 胡翠蓉. 紫草油外涂联合红外线照射治疗肛周红肿的疗效观察[J]. 西部医学, 2010, 22(9): 1677.

[28] 骆建红. 加用天花粉及紫草对药物流产效果的影响[J]. 中国药业, 2011, 20(2): 72.

[29] 朱其芬, 李培君. 紫草膏治疗甲床缺损 102 例[J]. 中国中医急症, 2010, 19(12): 2151.

[30] 叶绿洲, 刘蕊, 汪靖成. 益气凉血汤治疗慢性肾炎 32 例[J]. 陕西中医, 2009, 30(12): 1591.

[责任编辑 邹晓翠]

preparation of freeze-dried liposomes. Using freeze-dried liposome as the subject term to collect literature on freeze-dried liposome preparation aspects in the Chinese academic literature library (CNKI), according to its correlation cited 35 articles, and concluded and summarized the influencing factors during the preparation process. The kinds and dosage of protective agent, ways of pre-freezing and speed, the degree of vacuum, drying time, hydration medium and other factors will affect the quality of the freeze-dried liposomes. In the process of preparation of freeze-dried liposomes, a variety of factors must be taken into account to prepare liposomes of a high encapsulating rate, high stability and small particle size changes. Application of freeze-drying technology can prevent drug oxidation, prolong drug liposome guarantee period, and lay a solid foundation for the promotion and application of liposome drug.

[**Key words**] freeze-drying; freeze-dried liposomes; preparation; stability

脂质体是一种由磷脂双分子定向排列而成的双分子层囊泡,作为一种新型给药系统,可将药物包封于类脂质双分子层形成的薄膜中。脂质体具有制备方法简单,易实现药物对机体特定部位的靶向性,减少免疫原性反应,提高和延长药物疗效等优点,优势已被广泛认可^[1-2]。但是,脂质体在长期存储中会发生水解、磷脂的氧化、封装的药物泄漏、聚集等^[3],这些问题限制了它的应用。

真空冷冻干燥、喷雾干燥、超临界流体技术^[4-6]等都可以提高脂质体的稳定性。其中,采用真空冷冻干燥法制备冻干脂质体提高脂质体稳定性的主要途径,将脂质体制成冻干粉针剂,不仅能大大延长其在体外的保存时间,同时也能避免药物产生变性,使药物中易氧化的物质得到保护,且微生物的生长几乎无法进行。许多研究都已证明^[7-9],冷冻干燥法是解决水态脂质体不稳定性难题的一种有效方法。

1 国内外研究概况

1913 年,冷冻干燥技术被英国人 Wallastno 发明。20 世纪 50 年代,冻干食品的发展促进了冻干技术和设备的进步。80 年代以来,随着人们生活水平提高,对食品的品质、营养、天然无公害的观念转变,再次推动了冻干技术的发展。国外对脂质体的研究比较深入,但是液态脂质体的长期保存还有很大难度,应用冷冻干燥技术将液态脂质体制备成冻干脂质体可以很好的解决此问题。Crow J H 等^[10]、Ewoud C A 等^[11]对冷冻干燥法制备的脂质体进行较深入的研究。另外,S. Ohtake and C. Schebor 等^[12]、Nicolaas J. Zuidam and Stephen S. L. Lee 等^[13]研究了冷冻干燥中海藻糖对生物薄膜的保护作用。科研工作者已经对冷冻干燥技术应用于脂质体的探究作了相当多的尝试,促进了冷冻干燥技术在脂质体制备领域的应用。

自 20 世纪 90 年代开始,国内研究者陆续展开对冻干脂质体的相关研究。曾科等^[14]在研究冻干脂质体以便长期保存时,发现海藻糖对聚乙二醇融合脂质体有良好的防护作用。刘占杰等^[15]研究了冷却方式对冻干脂质体的粒径和包封率的影响。李学涛等^[16]制备了异长春花碱脂质体,并考察其体外释放特性。刘娟等^[17]采用响应面法优化了牛血清蛋白冻干脂质体的处方工艺。洪怡等^[18]制备了黄芩苷脂质体,考察其在体外对肝癌 HepG2 凋亡的影响。国内虽然在冻干脂质体制备技术方面有了一定的研究基础,但与国外相

比仍有差距。

2 冻干脂质体制备的影响因素

在冻干脂质体制备过程中,冷冻干燥步骤对脂质体的结构和功能产生了一定的影响,破坏了脂质体的稳定性。要制备出包封率高、稳定性好、粒径变化小的冻干脂质体,就必须考虑冻干脂质体制备过程中的冻干保护剂及用量、预冻方式及速度、冻干真空度、干燥时间、水化介质等影响因素,以获得最优制备工艺。

2.1 冻干保护剂 冻干保护剂不仅能在囊泡之间形成无定形骨架,防止膜的融合和形成的晶体破坏双分子,而且在干燥状态下,冻干保护剂分子的羟基与磷脂头基的磷酸部分形成氢键,从而取代水,防止磷脂水解。此外,加入冻干保护剂还可避免脂质体粒径增大、粒子融合、破裂和包封药物泄漏等现象发生。因此,在冻干过程中,需要添加冻干保护剂。

2.1.1 冻干保护剂的特性及种类 冻干保护剂应具备的特性:①玻璃化转变温度高;②吸水性差;③结晶率低;④本身无味,与蛋白质、脂质体等不发生化学反应;⑤价格便宜,易于得到;⑥对于应用于人体的药品,所用的保护剂必须对人体无害,并且是 SFDA 允许使用的^[19]。

不同种类和不同浓度的保护剂对冷冻干燥过程中脂质体的保护机制和效果均有所不同。常用的冻干保护剂有:①糖类:葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖等;②多元醇:甘露醇、山梨醇、丙三醇等;③表面活性剂:聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯(Tween 80)等;④氨基酸类:甘氨酸、谷氨酸、精氨酸等;⑤其他类保护剂:抗氧化剂、缓冲剂等。张晓云等^[20]研究了具有抗病毒、抗肿瘤作用的鬼臼毒素冻干脂质体,考察了甘露醇、葡萄糖、蔗糖的保护作用,发现甘露醇的保护效果较好。蒋桂秀等^[21]分别考察了乳糖、甘露醇、山梨醇、葡萄糖、蔗糖及其不同浓度时对脂质体的影响,结果是 1.5%甘露醇作为保护剂可较好阻止脂质体的聚集。李茗等^[22]分别考察了乳糖、蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、甘露醇 5 种保护剂单用及合用对尼莫地平冻干脂质体的保护作用。结果表明冻干保护剂处方为甘露醇-蔗糖-磷脂(3:2:1),所得冻干品有良好的外观、粒子形态和稳定性,药物泄漏明显减少。不同类冻干保护剂的联合运用,可以对冻干脂质体起到更好的保护作用。

2.1.2 冻干保护剂的加入方式 冻干保护剂的加入方式分

内加和外加。内加是在脂质体制备过程中将保护剂加入水相介质;外加是将保护剂溶液加到已制备好的脂质体混悬液里。冻干保护剂加入方式的不同,使得其在脂质体的内外膜的浓度不同,起到的保护作用也是不同的。外加的方式使得脂质体膜内外都有一定的浓度,保护效果较好。曾昭武等^[23]考察了添加保护剂的两种方式对替加氟冻干脂质体的影响。研究发现:内加和外加两种方式对冻干产品的外观影响不大,但外加方式的包封率较高。周存款等^[24]考察了内加和外加对多西他赛冻干制品的包封率、外观、再分散性、形态、粒径分布等指标的影响,得出外加方式较好。

2.2 预冻的方式和速度

2.2.1 预冻方式 预冻方式包括冰箱预冻($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右)和冻干机冷阱预冻($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右)两种方式。预冻方式对脂质体稳定性的影响与膜材组成有关,预冻温度必须低于样品的低共熔温度^[25],这样才能保证样品能冻结实,抽真空干燥时不至于引起喷瓶。温度在玻璃化温度以下时,可以得到易于重建且破坏程度低的无定形产品。同时,玻璃态的脂质体结晶少,脂质体膜的破坏程度小,包封率相对高。但由于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的预冻温度高于一般脂质体溶液的玻璃化转变温度,在预冻时不能形成玻璃态,致使产生较多结晶而破坏脂质体膜,大大降低了包封率。

张阳德等^[26]对苯磺酸氨氯地平脂质体进行冻干,发现在冷阱预冻($-47\text{ }^{\circ}\text{C}$)中冻干产品质量较好。郭慧丽等^[27]在研究两性霉素B冻干脂质体时发现,只有在适宜的预冻温度下才可以保证产品完全冻结,否则在干燥的过程中可能出现喷瓶现象。郑建伟^[28]做了苦参碱冻干脂质体注射剂的制剂学研究,讨论了冷冻干燥预冻温度对脂质体的色泽、形状、复水性、稳定性、包封率的影响。发现 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻温度制得的脂质体包封率大大低于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻温度下制得的脂质体。一般蔗糖等作保护剂的脂质体悬浮液其玻璃化转变温度范围都在 $-30\sim-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。因此,选择预冻温度低于 $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,制备的冻干脂质体的包封率较高。

2.2.2 预冻速度 预冻速度有快速降温 and 慢速降温两种。慢速降温的冷却方式,使得脂质体在冻结过程中形成大的冰晶,并且引起内部溶质的迁移,在表面形成了浓缩层,使水蒸气逸出速率降低,延长了冻干时间,使脂质体粒径变大,降低了冻干脂质体的品质。快速降温的冷却方式得到了致密的多空网状冻干脂质体,脂质体中冰晶细而小,内部溶质均匀分布,不仅含水量变化快,冻干时间短,而且冻干后脂质体粒径变化小。荆娜等^[29]以包封率为指标,考察了慢速冷冻、程式冷冻、快速冷冻对氯喹脂质体稳定性的影响,结果表明快速冷冻的效果最佳,其次是程式冷冻,慢速冷冻的效果最差。张丽霞等^[30]探究了不同的预冻速度对两性霉素B长循环脂质体冻干品质量的影响。结果表明,冷冻速度的快慢直接影响冻干品的质量,其中快冻的效果最佳。刘占杰等^[31]比较了不同降温速率下的冻干脂质体的外观和冻干脂质体复水后的囊泡粒径变化。结果表明,对于液体药品快速冻结后得到的冻干品质量优于慢速冻结。

2.3 冻干真空度 冻干机的效率和真空泵的工作效率对冷冻干燥的冻干效果有很大影响。其中,冻干机的效率主要依赖于冷阱所能达到的最低温度和一定时间内冷阱的最大捕冰量,真空泵的工作效率主要依赖于排气速度和最终真空度。周臻^[32]对兰索拉唑进行了研究,考察冻干真空度对兰索拉唑冻干脂质体的质量影响。结果表明,产品外观不因冻干真空度的不同而不同,但产品的包封率却有很大影响。最终真空度设在 10 Pa 内,冻干脂质体的包封率相对较高。

2.4 干燥时间 干燥过程分为升华和解吸两个阶段。脂质体悬浮液中的水分,大部分是以分子形式存在的自由水,这部分水容易冻结,主要在升华干燥阶段以冰晶的形式通过升华而除去。少部分水分是吸附于固体物质晶格间隙中或以氢键方式结合在一些极性基团上的结合水,这部分水则较难冻结,不易除去。延长解吸阶段则可以除去一部分未冻结的结合水。俞园媛^[33]、孙丽梅等^[34]研究了冻干脂质体在低温下真空干燥的时间因素。由于少部分的结合水对固体物质的吸附能高,解吸困难,为了保证冻干产品有尽量低的含水量,提高长期稳定性,必须有足够的干燥时间,干燥达到一定时间后,含水量不会有明显的减少。

2.5 水化介质 冻干脂质体的水化,即向冻干品中加入水化介质,经过振摇或其他方式使冻干产品与介质混匀,得到性质与冻干前相同的脂质体混悬液,应用于临床。常用的水化介质有蒸馏水、缓冲盐、生理盐水或含药水溶液(仅适合于水溶性药物)。赵若威等^[35]在研究尼莫地平脂质体冻干粉的制备工艺时,对水合介质无菌纯净水、 $\text{pH } 7.4$ 的PBS和磷酸盐缓冲溶液进行了优化,以冻干粉重建后的包封率、药物利用率、重建后 $0,10\text{ h}$ 小粒径($<0.15\text{ }\mu\text{m}$)脂质体包封药物的百分率、粒径分布、泄漏率等多个指标综合考虑,结果发现无菌蒸馏水的效果最好。

2.6 其他因素 探究冻干脂质体制备工艺,除了上述影响因素外,还有许多因素影响冻干脂质体的质量。脂质体冻干过程中,冰核依次在外水相和内水相无规则形成冰晶,双分子膜内外形成渗透压,使得脂质体膜机械破裂。冻干过程中脂质体膜的破裂,致使再次水化以后的脂质膜相互融合、连接,又重新形成脂质体结构,此时粒子尺寸可能会增大。干燥后的脂质体双分子膜的相转化温度升高,致使双分子膜在水化时经历了凝胶态到液晶态的转变。由于膜的横切面增大,双分子层厚度减少,膜的流动性增加,脂质体内包裹的药物释放速率增大,而引起药物的泄漏。因而,深入研究影响冻干脂质体制备的相关因素,减少脂质体膜的破坏以及药物渗透等问题具有重要意义。

3 应用展望

随着研究的不断深入,脂质体的靶向、低毒、高效等优点,越来越被人们所认识,而应用真空冷冻干燥技术可以有效地防止药物中活性成分的氧化,很好地解决了液态脂质体稳定性差的问题,大大地延长了脂质体的储存期。冻干产品呈海绵状粉末,复水性极好,实际应用方便,相应包装后可在常温下长时间保存和运输,有利于脂质体的推广应用。

目前,国内多家研究机构在脂质体研究领域取得了多项研究成果,推动了脂质体研究的系统化和产业化,现在已有紫杉醇脂质体(冻干)、两性霉素 B 脂质体(冻干)等多个中药或天然药物冻干脂质体制品上市,其独特的药效学优点已引起业界关注,有望在不久的将来得到很好的发展。

【参考文献】

[1] 倪晨,赖春丽,王倩,等. 氧化苦参碱微球冻干针剂器官靶向性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16):203.

[2] Sharma A, Sharma U S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations [J]. Int J Pharm, 1997, 154:123.

[3] 袁松,孙会敏,丁丽霞. 脂质体物理化学稳定性研究进展 [J]. 中国药事, 2011, 25 (4):384.

[4] 张晶晶,方芸,谈恒山,等. 中药脂质体的制备及应用 [J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(3):203.

[5] Lo Y L, Tsai J C, Kuo J H. Liposomes and disaccharides as carriers in spray-dried powder formulations of superoxide dismutase [J]. J Control Release, 2004, 94:259.

[6] Mishima K. Biodegradable particle formation for drug and gene delivery using supercritical fluid and dense gas [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60:411.

[7] 宋佳佳,刘宁. 薄膜蒸发-冷冻干燥法制备乳糖酶脂质体 [J]. 食品工业, 2011, 9: 29.

[8] 杨水兵,刘伟,刘成梅,等. 中链脂肪酸-维生素 C 冻干脂质体的制备研究 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(11):244.

[9] 林文,王志祥. 真空冷冻干燥技术及其在制药行业中的应用 [J]. 机电信息,2010(5):33.

[10] Crow J H, Crow L M. Persevation of liposome by freeze-drying. liposome technology [M]. Volum I. second eds. Boea Raton: CRC press, 1993:229.

[11] Ewoud C A, van Winden, Daan J, et al. Short term stability of freeze-dried, lyoprotected liposomes [J]. J Controlled Release, 1999, 58(1):69.

[12] Ohtake S, Schebor C, J J de Pablo. Phase behavior of phospholipid-cholesterol liposomes stabilized with trehalose [J]. Food Engineering Series, 2008, 383:331.

[13] Nicolaas J Zuidam, Stephen S L Lee, Daan J A Crommelin. Gamma-irradiation of non-frozen, frozen and freeze-dried liposomes [J]. Pharma Res, 1995, 12 (11):1761.

[14] 曾科,林克椿. 海藻糖对聚乙二醇融合脂质体的防护 [J]. 北京医科大学学报, 1991, 23(4):271.

[15] 刘占杰,肖洪海,苏树强,等. 冷却方式对冻干脂质体药物的粒径和包封率影响的实验研究 [J]. 工热物理学报,2002, 23(5):599.

[16] 李学涛,程岚,贾天柱. 异长春花碱脂质体的制备及体外释放度考察 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(14):15.

[17] 刘娟,卢荣,樊君,等. 响应面法优化 BSA 冻干脂质体的处方工艺 [J]. 西北大学学报:自然科学版, 2011, 41(6):1001.

[18] 洪怡,何伟,李丹,等. 黄芩苷脂质体的制备及体外抗肿瘤作用 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18 (3):29.

[19] 郑建伟. 苦参碱冻干脂质体注射剂的制剂学研究 [D]. 广州:广州中医药大学, 2005:18.

[20] 张晓云,倪京满,高菊萍,等. 鬼臼毒素冻干脂质体的制备及其稳定性考察 [J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(8): 548.

[21] 蒋桂秀,奉建芳,蒋满州. 羟基喜树碱脂质体冻干工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6):30.

[22] 李茗,毕殿洲. 尼莫地平鼻用冻干脂质体的制备及大鼠鼻黏膜吸收 [J]. 中国医药工业杂志,2006,37 (8):544.

[23] 曾昭武,胡铁辉. 替加氟复合脂质体的研究 [D]. 长沙:中南大学, 2008:26.

[24] 周存款,冯霞. 多西他赛脂质体稳定性研究 [D]. 天津:天津大学, 2008:22.

[25] 王健,李明轩. 冷冻干燥对提高脂质体稳定性的研究概况 [J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(9):577.

[26] 张阳德,曹政科,张峰. 苯磺酸氨氯地平柔性纳米脂质体冻干工艺研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(14): 2112.

[27] 郭慧丽,李高,梅兴国. 两性霉素 B 脂质体的研究 [D]. 上海:华中科技大学, 2008:23.

[28] 郑建伟,程怡. 苦参碱冻干脂质体注射剂制剂学研究 [D]. 广州:广州中医药大学, 2005:27.

[29] 荆娜,邱利焱. 氯喹脂质体的制备及评价 [D]. 杭州:浙江大学,2008: 27.

[30] 张丽霞,王会娟,孙莉. 两性霉素 B 长循环脂质体冻干剂的制备工艺研究 [J]. 药学与临床研究, 2007, 15(5):385.

[31] 刘占杰,华泽钊,陶乐仁,等. 脂质体悬浮液结晶对其冻干品质影响的研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(4): 614.

[32] 周臻,邓英杰. 兰索拉唑注射用冻干脂质体的研究 [D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2007:36

[33] 俞园媛,陈建明. 静脉注射草苔虫内酯冷冻干燥脂质体的研究 [D]. 上海:第二军医大学, 2007:29.

[34] 孙丽梅. 长春西汀冻干脂质体鼻黏膜给药的研究 [D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2004:33.

[35] 赵若威,王强,刘立恒,等. 尼莫地平纳米脂质体制备工艺及处方优化研究 [J]. 黑龙江医学,2006,11 (30):818.

[责任编辑 邹晓翠]