

文章编号 :1673-2383(2016)05-0118-07

网络出版网址 <http://www.cnki.net/kcms/detail/41.1378.N.20161025.1327.042.html>

网络出版时间 2016-10-25 13:27:46

不同制剂脂质体制备方法的研究进展

侯丽芬^{1,2},谷克仁^{1*},吴永辉³

(1.河南工业大学 化学化工学院,河南 郑州 450001;2.郑州旅游职业学院
烹饪食品系,河南 郑州 450009;3.广州依德生物科技有限公司,广东 广州 510290)

摘要:脂质体制备方法是影响脂质体结构和粒径的重要因素,不同性质的制剂对脂质体的结构和粒径有着不同的要求。介绍了传统脂质体制备方法(如薄膜分散法、逆相蒸发法和溶剂注入法等)和现代脂质体制备方法(如超临界流体逆相蒸发法、复乳-冻干法和膜接触器法)的原理、过程和特点,对如何根据制剂性质和用途来选择适当的脂质体制备方法而得到理想的脂质体进行了综述,以期为相关研究者提供参考。

关键词:脂质体;结构;粒径;制备方法

中图分类号:TS201.2 **文献标志码**:A

DOI:10.16433/j.cnki.issn1673-2383.2016.05.021

0 前言

自从 Bangham 革命性地发现磷脂在水相中自发形成闭合的囊泡状结构以来,脂质体作为人工生物膜和活性物质载体得到了广泛的研究和应用。脂质体的多功能性和非凡的生物相容性,使其广泛应用于许多学科领域^[1-4],特别是在医学方面,近几十年取得了较大的突破。

脂质体不仅制备工艺简单,而且具有亲油或亲水性,可以包裹不同性质的制剂,因此作为活性物质的载体应用广泛。理想的脂质体不仅包封率高、粒径大小合适及分布范围窄,而且稳定性好。类脂的选择,脂质体结构的选择和脂质体的粒径是影响脂质体性能的主要因素。脂质体制备方法的不同得到的脂质体结构和粒径也不同,因此,包封不同物质脂质体的制备除了考虑载体膜材料之外,制备方法是首要考虑的因素。作者综述了传统和现代脂质体制备方法对脂质体结构和粒径的影响,为获得包封率高、稳定性好的不同制剂脂质体提供理论基础;同时,为脂质体技术在各领域中的进一步研究与应用提供有价值的参考。

1 脂质体的结构类型及粒径选择

作为物质载体的脂质体具有亲水亲油的两性性质,既可以将水溶性制剂包裹在囊泡的水相,又可将脂溶性制剂分散于囊泡的脂质双分子层,还可以包封两性制剂于水相与膜内部的交界磷脂。

1.1 脂质体的结构类型和粒径

脂质体按结构可以分为以下几种类型^[5]:(1) 单层脂质体(unilamellar vesicles):单层脂质体是由一层双分子脂质膜形成的囊泡,又分为小单层脂质体(small unilamellar vesicles, SUV)和大单层脂质体(large unilamellar vesicles, LUV)。(2) 多层脂质体(multilamellar vesicles, MLV):多层脂质体是双分子脂质膜与水交替形成的多层结构的囊泡,一般由 5 层或更多层的同心板(concentric lamellae)组成,仅仅由较少层数的同心板组成的囊泡(2~4 层的多层脂质体)又称为寡层脂质体(oligo-lamellar vesicles, OLVs)。(3) 多囊脂质体(multi-vesicular liposomes, MVL):多囊脂质体由许多非同心囊泡构成,每个囊泡中包裹着装载制剂的水溶液。

脂质体的粒径大小可以从几十纳米到几十微米,膜厚度大约为 5 nm。脂质体囊泡的大小是确定脂质体循环半衰期的一种敏感参数,同时粒径大小和双层的数量影响脂质体中制剂的包封量。不同类型的脂质体有不同的特点,见表 1。

1.2 脂质体的结构类型及粒径选择依据

脂质体的包封率、载药量和稳定性受制剂在脂

收稿日期 2016-04-05

基金项目 河南省高等学校重点科研项目(16A550007)

作者简介 侯丽芬(1978—),女,河北石家庄人,博士研究生,研究方向为磷脂深加工及应用。

*通信作者

表1 脂质体的结构类型和特点

Table 1 Structural types and characteristics of liposomes

类型	单层脂质体		多层脂质体(MLV)	多囊脂质体(MVL)
	小单层脂质体(SUV)	大单层脂质体(LUV)		
粒径	20~80 nm	100~1 000 nm	100 nm~5 μm	5~50 μm
特点	内水相体积小; 不稳定,易发生脂质体的融合	内水相体积大; 稳定性好	双分子层多; 稳定性好	内水相总体积较大; 稳定性好

脂质体中位置的影响很大。研究表明制剂包封于双分子层的脂质体比包封于内水相的包封率高,而且稳定性好。因此,根据制剂的亲水亲油性以及其被包封的位置,可以选择相应结构类型的脂质体,进而确定合适的脂质体制备方法,以确保得到理想脂质体制剂。

粒径大小和分布均匀程度是影响脂质体体内运行的主要因素。粒径越大越易为被体内吞噬性细胞所摄取,大单室脂质体和多室脂质体均易被吞噬性细胞所摄取,粒径小于50~100 nm的脂质体则可以避免网状内皮系统的吞噬作用。因此,依据不同的应用需求可选择适宜的脂质体粒径,可根据不同的目的和应用要求制备适宜粒径的脂质体。

2 脂质体的制备方法

几十年来,研究人员对脂质体的制备方法进行了大量的研究。目前,脂质体的制备方法较多,但是所有制备脂质体的方法涉及3~4个基本阶段:(1)有机溶剂的干燥。(2)脂质在水介质中的分散。使脂质分散在含有需要包裹的水溶性物质的水溶液中形成脂质体。(3)纯化形成的脂质体。(4)分析最终产品。

2.1 传统脂质体制备方法

传统的脂质体制备方法包括薄膜分散法、超声分散法、逆相蒸发法、溶剂注入法和冻融法等。

2.1.1 薄膜分散法(thin-film hydration)

此法是最基本和应用最广泛的制备脂质体的方法^[6]。首先,将磷脂和胆固醇等类脂及脂溶性药物溶于有机溶剂,然后将溶液置于大的圆底烧瓶中,旋转减压蒸干,磷脂在烧瓶内壁上会形成一层很薄的膜,然后加入一定量的缓冲溶液,充分振荡烧瓶使脂质膜水化脱落,得到脂质体。薄膜分散法制备的脂质体为MLV,粒径较大(1~5 μm)而且不均匀。为了降低其粒径大小使MLV转变成LUV或SUV,可以通过不同的分散方法处理^[7-9],如超声分散法、挤压法等^[10-14]。

(1)超声分散法(sonication):薄膜分散法制备

的样品经超声波处理,分离得到脂质体。超声法包括两种:一是探头型超声。超声探头直接浸入脂质体中进行超声分散,可以释放相当强的能量而导致局部产热,因此被超声的溶液的容器需要浸没于冰水浴中。此法处理时间较短(一般为几分钟),如超声处理1 h,超过5%的脂质发生去酯化。同时,随着超声,探头中的钛会脱落而污染脂质体。二是水浴型超声。与探头型超声相比,该方法更容易控制脂质溶液的温度。超声材料可以在无菌容器中或者在惰性气体条件下得到保护^[15]。然而水浴型超声比较费时,均匀性有待高^[16-20]。Yan等^[21]采用薄膜-超声法制备复合药物(LMX)脂质体,其平均粒径为210 nm左右,药物包封率90%。此法对水溶性药物包封率较高。

(2)薄膜-挤压法(membrane extrusion):使脂质体挤压通过固定孔径的滤膜,脂质体的粒径变小和均匀的方法称薄膜-挤压法。当把薄膜法制备的大小不一的MLV连续通过孔径1.0~0.1 μm的聚碳酸酯膜后,得到粒径大小均匀的脂质体。近年来,有研究表明在适度挤压压力下,MLV只通过单一的聚碳酸酯膜可足够获得单分散脂质体,同时其包封率明显得到提高^[22-23]。

2.1.2 逆相蒸发法(reverse phase evaporation method, REV)

REV是脂质体制备技术的一个突破,因为它首次考虑到制备具有高内水相体积-脂质比特性的脂质体,且能够包封现有的大部分水溶性物质。逆相蒸发是在反胶束的基础上形成的。这种反胶束是由缓冲水相和有机相的混合物经超声形成的,其中缓冲水相含有待包封入脂质体的水溶性分子,而有机相溶有两亲性磷脂。缓慢除去有机相使反胶束转变成黏稠凝胶状。在此过程的临界点,凝胶塌陷,部分反胶束破裂。反胶束破裂而产生的过量磷脂,反过来在余下的胶束周围形成完整的双分子层,形成囊泡。REV脂质体可由各种脂质和脂质混合物(包括胆固醇)制得,其内水相体积-脂质比手摇法制得的脂质体或多层脂质体高4倍^[15,24]。

REV脂质体在低离子强度缓冲液(1 μmol/L NaCl)条件下,可得到水相包封率65%,离子强度

增高时,包封率会降低。该方法可用于包封小分子、大分子和高分子物质,如抗生素、胰岛素、免疫球蛋白、碱性磷脂酶、核酸等。该法的主要缺点是包封物质接触有机溶剂和短时超声,会导致核酸链断裂或蛋白质变性^[25]。Handa 等^[26]改良了逆相蒸发方法,制备的脂质体具有较高的包封率(约 80%)。

2.1.3 溶剂注入法(solvent-injection techniques)

(1) 乙醚注入法(Ether injection):将乙醚或乙醚甲醇脂质溶液通过细孔针头慢慢注入 55~65 °C 或减压的缓冲溶液中,在真空下乙醚蒸发形成单层脂质体。这个方法的主要缺点是脂质体粒径不均匀(70~200 nm),包封物质暴露于高温有机溶剂中^[27-28]。如果所包封的材料在 65 °C 被破坏,可以用氯化氢代替乙醚。氯化氢在较低温度下易蒸发。有机溶剂对某些溶质有害,不适合将蛋白质掺入脂质体。

(2) 乙醇注入法(Ethanol injection):脂质乙醇混合液通过细针头快速注入到大量的缓冲溶液中,SUVs 立即形成。此方法的缺点也是脂质体粒径不均匀(30~110 nm);脂质体悬浮液浓度很低;如果包封材料溶于水相,包封率极低;由于乙醇与水形成共沸物而导致难以从磷脂膜中去除;同时各种生物活性大分子在少量乙醇中的灭活概率很高^[29]。Laouini 等^[30]通过纳米镍膜控制乙醇注入法制备的脂质体粒径,得到了粒径均匀,大小适当的脂质体。

2.1.4 冻融法(Freezing thawing method)

将预先制备好的脂质体悬浊液进行反复几次冷冻-融解操作获得脂质体溶液。在冻融技术中,脂质膜是在缓冲溶液中水化,并进行反复冻结/解冻循环,在冷冻过程中,磷脂双分子层由于冰晶的形成造成物理破坏从而增加内水相体积-脂质比,从而提高包封率。此法制备的脂质体的包封率最高,但是粒径大。反复冻融可以提高脂质体的包封率。该制备方法适于较大量的生产,尤其对不稳定的药物最适合。

2.1.5 French 压力法(French)

French 压力通过一个小孔挤压 MLVs 形成单层脂质体。French 压力制备脂质体的重要特征是蛋白质等热敏性物质不会像用超声处理那样发生明显的变性。French 压力制备的脂质体包封物质保留时间比超声和表面活性剂去除法长^[31-32]。

该方法一般适合处理不稳定的材料。French 压力制备脂质体优于超声处理:如此法制备的脂质体大于超声的 SUVs,适合包封敏感大分子脂质体的制备,其稳定性比超声脂质体更好。其缺点是制备温度难以控制,且制备量较小(50 mL 左右为最

大)^[33]。

2.1.6 复乳法(multiple emulsion method)

复乳法是指将少量水相与较多的磷脂油相进行乳化(第 1 次)形成 W/O 的反相胶团,减压除去部分溶剂(或不除去也可),然后加大量的水相进行(第 2 次)乳化,形成 W/O/W 型复乳,减压蒸发除去有机溶剂,即得脂质体。此法包封率为 20%~90%。复乳法制备的脂质体为非同心多囊结构,更适合包封水溶性药物而增加包封率,并具有缓释效果。

传统方法制备的脂质体类型与粒径见表 2。

表 2 传统方法制备的脂质体类型和粒径
Table 2 The types and sizes of liposomes prepared by traditional methods

制备方法	脂质体类型	粒径 /nm
薄膜分散法	MLV	100~300
薄膜-超声法	SUV	20~50
乙醇注入法	SUV	30~110
French 压力法	SUV	30~50
乙醚注入法	LUV	100~400
冻融法	LUV	20~200
逆相蒸发法	LUV	200~1 000
复乳法	MVL	2 000~100 000

脂质体的传统制备方法涉及到与水混溶或不混溶的有机溶剂或表面活性剂分子的残留。有机溶剂残留可能导致脂质体有毒,并且降解活性成分,从而对人体健康产生潜在风险^[6,34]。因此,在传统脂质体制备方法的基础上研究开发了一些新的制备方法。

2.2 现代脂质体制备方法

2.2.1 超临界流体逆相蒸发法(the supercritical fluid reverse phase evaporation,SRPE)

超临界流体逆相蒸发法是用超临界流体代替有机溶剂制备脂质体的新方法,其特点是采用超临界流体逆相蒸发法制备的脂质体包封率高、粒径小、稳定性强。脂质体制备过程简单,无有机溶剂污染^[35-37]。

Karn 等^[38]发现,与改良的薄膜分散法和逆相蒸发法相比,SRPE 法制备的环孢菌素 A 脂质体具有较高的药物包封率(92%)。Magnan 等^[39]报道了超临界抗溶剂法(SAS),超临界流体作为抗溶剂,脂质体溶液产生过饱和而沉淀。超临界抗溶剂法可以在接近临界点的条件下操作,能控制脂质体的粒径分布,溶剂选择灵活。因此,超临界流体逆相蒸发法有望应用于脂质体的大规模生产中。

2.2.2 复乳-冻干法(Freeze drying of double emulsions)

将磷脂以及药物分散于与水互溶的有机相,与水相形成单一的溶液,加入冻干保护剂冷冻干燥即得冻干脂质体。冻干脂质体一旦遇水就自发形成的均匀分散 MLV, 然后通过挤压法降低粒径大小。该法的缺点是包封率较低。Wang 等^[40-41]提出了一个改良方法,即复乳-冻干法。所得脂质体粒径低于 200 nm, 而包封率随着包封物质的不同而不同。例如,钙黄绿素包封效率是 87%, 而 5-氟尿嘧啶是只有 19%。该法制备的脂质体具有很高的稳定性,避免了脂质体混悬液在贮存期间易发生聚集、融合、药物泄漏以及磷脂氧化等问题。制备过程在较低的温度下进行,因此尤适合于包封热敏性物质。该方法需要添加糖类(蔗糖、海藻糖),以防止包封物质的泄漏以及粒径的增加^[42]。

2.2.3 膜接触器法制备脂质体(Membrane contactor for preparation of liposomes)

Charcosset 等^[43]开发出一种改进的乙醇注入方法,将含磷脂的乙醇溶液通过超滤膜挤出到水相中获得脂质体(如图 1)。该法可以通过控制水相/有机相流速比而控制粒径的大小,药物包封率较高,同时还适合工业化的连续化生产。Jaafar-Maalej 等^[43]采用 SPG 膜,控制水相/有机相流速比由 1.6 到 2,所得脂质体粒径从 203 nm 下降到 61 nm。其药物包封率高达 90% 以上。Laouini 等^[44]采用中空的聚丙烯膜,也得到同样的结果。现代方法制备的脂质体类型和粒径见表 3。

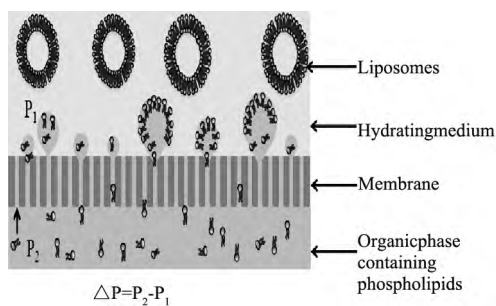


图 1 膜接触器法制备脂质体

Fig.1 Liposome prepared by membrane contactor

表 3 现代方法制备的脂质体类型和粒径

Table 3 The types and sizes of liposomes prepared by modern methods

制备方法	脂质体类型	粒径/nm
超临界流体逆相蒸发法	LUV	80~150
复乳-冻干法	SUV	<200
膜接触器法制备脂质体	SUV	100~1000

3 脂质体制备方法的选择

3.1 水溶性制剂脂质体的制备

水溶性制剂的脂质体结构中内水相体积应尽可能大,因此,最适合选择大单层或多囊脂质体。而对于多层脂质体来说,由于其各双分子层之间含有较小的水性空间,因此,理论上不适合包封水溶性制剂,但可通过一定的处理增大其水性空间而用于水溶性脂质体的制备,如在膜材中加入负电荷物质等。因此,比较适合水溶性制剂脂质体的制备方法有逆相蒸发法、乙醚注入法、冻融法、复乳法、超临界流体逆相蒸发法和复乳-冻干法。

3.2 脂溶性制剂脂质体的制备

由于脂溶性制剂可嵌入脂质双分子膜,其包封量与膜材量成正比。因此,大体上脂溶性制剂适宜用任何制备方法。但是,根据脂溶性制剂脂质体靶向性的不同需选择粒径大小不同的脂质体。如制备被动靶向性脂质体,则可选择薄膜分散法;其他靶向性脂质体,则可选择薄膜-超声法、乙醇注入法、French 压力法和复乳-冻干法。

3.3 两性物质脂质体的制备

两性制剂脂质体由于容易泄露或不宜包封,理论上不适宜制备成脂质体。但是,可以通过一些特殊的方法获得两性制剂脂质体,如主动载药法。主动载药法有 pH 梯度法、硫酸铵梯度法、醋酸钙梯度法等。主动载药法的原理,利用两亲性的药物能以电中性的形式跨越脂质双层,而其电离形式却不能跨越来实现的。对于两亲性药物,选择主动载药法可以提高脂质体的包封率和稳定性。Li 等^[45]采用不同主动载药方式制备放射性 (^{99m}Tc)-BME-DA 的脂质体,结果表明柠檬酸盐梯度法载药的阴离子脂质体稳定性较好。

4 展望

脂质体最初用作人工生物膜模型的生物研究,而脂质体的细胞膜结构使其成为运载进入人体的有效分子工具。在过去的几十年里,脂质体作为一个科学研究的新载体系统,在化妆品、药品、食品和农业方面得到了广泛而深入的研究和开发^[6,29,46]。目前,脂质体仍然存在着包封率低、粒径不均匀、稳定性差等问题。由于脂质体的制备方法不仅影响其结构和粒径,还间接影响脂质体的靶向性,因此,根据制剂的性质选择恰当的制备方法将显得非常重要。随着科技的发展及脂质体研究工作的不断深入,脂质体制备工艺将会不断完善和成熟,作为不同制剂载体的脂质体会有着更广阔的应用

前景。

参考文献:

- [1] MALEKAR S A , SARODE A L , II A C B , et al. Radio frequency-activated nanoliposomes for controlled combination drug delivery [J]. *Aaps Pharmscitech* , 2015 , 16(6):1-9.
- [2] YUAN Z , MIAOMIAO W , JIAJIA Z , et al. Improved oral bioavailability of capsaicin via liposomal nanoformulation: preparation , in vitro drug release and pharmacokinetics in rats [J]. *Archives of Pharmacal Research* , 2014 , 38(4):512-521.
- [3] PENTAK D. In vitro spectroscopic study of piperine-encapsulated nanosize liposomes [J]. *Biophysics of Structure & Mechanism* , 2015 , 45(2):1-12.
- [4] GUO F , LIN M , GU Y , et al. Preparation of PEG-modified proanthocyanidin liposome and its application in cosmetics[J]. *European Food Research & Technology* , 2015 , 240(5):1013-1021.
- [5] SHARMA A , SHARMA U S. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations [J]. *International Journal of Pharmaceutics* , 1997 , 154(2):123-140.
- [6] PATIL Y P , JADHAV S. Novel methods for liposome preparation [J]. *Chem Phys Lipids* , 2014 , 177:8-18.
- [7] ZAWADA Z. A single-step method of liposome preparation [J]. *Cellular & Molecular Biology Letters* , 2004 , 9(4A):603-615.
- [8] AKBARZADEH A , REZAEI-SADABADY R , DAVARAN S , et al. Liposome: classification , preparation , and applications [J]. *Nanoscale Research Letters* , 2013 , 8(1):1-9.
- [9] ELOY J O , SOUZA M C D , PETRILLI R , et al. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery [J]. *Colloids & Surfaces B Biointerfaces* , 2014 , 123:345-363.
- [10] CAMOLEZI F L , DAGHASTANLI K R P , MAGALHÃES P P , et al. Construction of an alkaline phosphatase liposome system: a tool for biomineralization study [J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* , 2002 , 34(9):1091-1101.
- [11] IERARDI D F , PIZAURO J M , CIANCAGLINI P. Erythrocyte ghost cell alkaline phosphatase: construction and characterization of a vesicular system for use in biomineralization studies [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta* , 2002 , 1567(1-2):183-192.
- [12] DAGHASTANLI K R P , FERREIRA R B , THEDEI G , et al. Lipid composition-dependent incorporation of multiple membrane proteins into liposomes[J]. *Colloids & Surfaces B Biointerfaces* , 2004 , 36(3-4):127-137.
- [13] RIGOS C F , NOBRE T M , WARD R J , et al. The association of Na , K-ATPase subunits studied by circular dichroism , surface tension and dilatational elasticity [J]. *Journal of Colloid & Interface Science* , 2008 , 325(2):478-484.
- [14] SANTOS L E , COLHONE M C , DAGHASTANLI K R , et al. Lipid microspheres loaded with antigenic membrane proteins of the *Leishmania amazonensis* as a potential biotechnology application [J]. *Journal of Colloid & Interface Science* , 2009 , 340(1):112-118.
- [15] KATARIA S , SANDHU P , BILANDI A , et al. Stealth liposomes: a review [J]. *IJRAP* , 2011 , 2(5):1534-1538.
- [16] BOLEAN M , SIMÃOAMS , FAVARIN B Z , et al. The effect of cholesterol on the reconstitution of alkaline phosphatase into liposomes[J]. *Biophys Chem* , 2010 , 152:74-79.
- [17] BOLEAN M , SIMÃO A M S , FAVARIN B Z , et al. Thermodynamic properties and characterization of proteoliposomes rich in microdomains carrying alkaline phosphatase [J]. *Biophys Chem* , 2011 , 158:111-118.
- [18] SIMÃO A M S , CIANCAGLINI P , YADAV M C , et al. Proteoliposomes harboring alkaline phosphatase and nucleotide pyrophosphatase as matrix vesicles' biomimetics [J]. *Biol Chem* , 2010 , 285:7598-7609.
- [19] SIMÃO A M S , YADAV M C , CIANCAGLINI P , et al. Proteoliposomes as matrix vesicles' biomimetics to study the initiation of skeletal mineralization[J]. *Braz J Med Biol Res* , 2010 , 43:234-241.

- [20] CIANCAGLINI P, SIMÃO A M S, BOLEAN M, et al. Proteoliposomes in nanobiotechnology [J]. *Biophys Rev*, 2012, 4:67-81.
- [21] YAN Z, JING W, YAO W, et al. Preparation and evaluation of liposome-encapsulated co-drug LMX [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 438(1-2):240-248.
- [22] PATIL Y P, AHLUWALIA A K, JADHAV S. Isolation of giant unilamellar vesicles from electroformed vesicle suspensions and their extrusion through nano-pores [J]. *Chemistry & Physics of Lipids*, 2013(2):1-8.
- [23] PATIL Y P, KUMBHALKAR M D, JADHAV S. Extrusion of electroformed giant unilamellar vesicles through track-etched membranes [J]. *Chemistry & Physics of Lipids*, 2011, 165(4):475-481.
- [24] HIMANSHU A, SITASHARAN P, SINGHAI AK. Liposomes as drug carriers [J]. *IJPLS*, 2011, 2(7):945-951.
- [25] SZOKA F JR, PAPAHAJDOPOULOS D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75(9):4194-4198.
- [26] HANDA T, NAITO S, HIRAMATSU M, et al. Thermal SiO and H¹³CO⁺ line observations of the dense molecular cloud G0.11-0.11 in the Galactic Center Region [J]. *Astrophys J*, 2006, 636:261-266.
- [27] DEAMER D, BANGHAM A D. Large volume liposomes by an ether vaporization method [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 443(3):629-634.
- [28] SCHIEREN H, RUDOLPH S, FINDELSTEIN M, et al. Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles: ESR, diffusion and entrapment analyses [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1978, 542(1):137-153.
- [29] MADNI A, SARFRAZ M, REHMAN M, et al. Liposomal drug delivery: a versatile platform for challenging clinical applications [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2014, 17:401-426.
- [30] LAOUINI A, FESSI H, HOLDICH R G, et al. Preparation of liposomes: A novel application of microengineered membranes from laboratory scale to large scale [J]. *Colloids & Surfaces B Biointerfaces*, 2013, 112(12):272-278.
- [31] SONG H, GENG H Q, RUAN J, et al. Development of polysorbate 80/phospholipid mixed micellar formation for docetaxel and assessment of its in vivo distribution in animal models [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2011, 6:354.
- [32] ZHANG Y. Relations between size and function of substance particles [J]. *Nano Biomed Eng*, 2011, 3(1):1-16.
- [33] HAMILTON R L, GUO L S S. Liposomes preparation methods [J]. *J Clin Biochem Nut*, 1984, 7:175.
- [34] WAGNER A, VORAUER-UHL K. Liposome technology for industrial purposes [J]. *Drug Deliv*, 2011:591325.
- [35] KATSUTO O, TOMOHIRO I. Development of a new preparation method of liposomes using supercritical carbon dioxide [J]. *Langmuir*, 2001, 17: 3898-3901.
- [36] TOMOHIRO I, KATSUTO O. Preparation and physicochemical properties of various soybean lecithin liposomes using supercritical reverse phase evaporation method [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, 27: 133-140.
- [37] KATSUTO O, TAKESHI S. Preparation of liposomes using an improved supercritical reverse phase evaporation method [J]. *Langmuir*, 2006, 22: 2543-2550.
- [38] KARN P R, CHO W, PARK H J, et al. Characterization and stability studies of a novel liposomal cyclosporin A prepared using the supercritical fluid method: comparison with the modified conventional Bangham method [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2013, 8(10):365-377.
- [39] MAGNAN C, BADENS E, COMMENGES N, et al. Soy lecithin micronization by precipitation with a compressed fluid antisolvent influence of process parameters [J]. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2000, 19: 69-77.
- [40] WANG T, DENG Y, GENG Y, et al. Preparation of submicron unilamellar liposomes by freeze-drying double emulsions [J]. *Biochimica*

- Et Biophysica Acta , 2006 , 1758 (2):222 – 231.
- [41] TING W , NING W , TONGYAN W , et al. Preparation of submicron liposomes exhibiting efficient entrapment of drugs by freeze-drying water-in-oil emulsions [J]. Chemistry & Physics of Lipids ,2011 ,164(2):151–157.
- [42] STARK B ,PABST G ,PRASSL R. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences ,2010 ,41(3–4):546–555.
- [43] JAAFARMAALEJ C ,CHARCOSSET C ,FESSI H. A new method for liposome preparation using a membrane contactor [J]. Journal of Liposome Research ,2011 ,21(3):213–220.
- [44] LAOUINI A. Preparation of liposomes: a novel application of microengineered membranes – investigation of the process parameters and application to the encapsulation of vitamin E [J]. American Journal of Botany ,2013 ,3 (15): 4985–4994.
- [45] LI S ,GOINS B ,PHILLIPS W T ,et al. Remote-loading labeling of liposomes with (^{99m}Tc)-BMEDA and its stability evaluation: effects of lipid formulation and pH/chemical gradient [J]. Journal of Liposome Research ,2011 ,21 (1):17–27.
- [46] SCHWENDENER R A. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances [J]. Ther Adv Vaccines ,2014 ,2:159–182.

RESEARCH PROGRESS OF THE PREPARATION METHODS OF LIPOSOME ABOUT DIFFERENT FORMULATIONS

HOU Lifen^{1,2}, GU Keren¹, WU Yonghui³

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China; 2. Department of Cooking and Food, Zhengzhou Tourism College, Zhengzhou 450009, China; 3. Guangzhou Yide Biological Technology Co., Ltd., Guangzhou 510290, China)

Abstract: Liposome preparation method is an important factor affecting structure and particle size of liposomes, and formulations with different properties have different demands for structure and particle size of liposomes. This paper described the preparation theory, process and characteristics of conventional liposome preparation methods (such as film dispersion method, reverse phase evaporation method and solve injection method) and modern liposome preparation method (such as supercritical fluid reverse phase evaporation, multiple emulsion lyophilization method and membrane contactor method), and reviewed the determination of the proper liposome preparation method according to the property and application of formulations, thereby providing references for researchers.

Key words: liposome; structure; particle size; preparation method