

脂质体制备方法的研究进展

王琳(苏州卫生职业技术学院, 江苏 苏州 215009)

摘要:目的 论述脂质体制备方法的研究进展。方法 检索近年来有关制备脂质体的文献,主要介绍了几种常用的脂质体制备方法,并比较制备出的脂质体的结构及包封性能和各自的优缺点。结果 以脂质体作药物载体,可以提高药物的溶出度和稳定性,增加药物对靶区的指向性,降低对正常细胞的毒性,提高药物的生物利用度。结论 这几种方法制备的脂质体都不能完全满足药用脂质体要求,因此通常将这些方法联合起来应用。

关键词: 脂质体; 载药特性; 制备方法

doi: 10.3969/j.issn.1004-2407.2010.05.042

中图分类号: R944 文献标志码: A

文章编号: 1004-2407(2010)05-封2-03

脂质体(Liposome)或称类脂小球、液晶微囊,是将药物包封于类脂质双分子层形成的薄膜中间所制成的超微型球状载体制剂^[1]。1965年,英国 Banghan 等^[2]将磷脂悬浮于水中首次制得了脂质体。20世纪70年代初, Rahman 等^[3]将脂质体作为药物载体应用。至此,脂质体引起了世界各国医药学者的关注。

1 脂质体的载药特性

由于脂质体结构的多功能性,其可传递多种药物,包括化疗药物、免疫调节剂、螯合剂、色素和基因药物等。脂质体作为药物载体具有如下优点^[4-6]:

(1) 靶向作用: 脂质体有药物“导弹”的美称^[7]。

①可被动靶向网状内皮系统 (reticuloendothelial system RES); ②增加药物对淋巴系统的指向性; ③对肿瘤细胞有较好的亲和力; ④改变脂质体膜组成和对膜进行修饰。

(2) 增效减毒作用: 对脂质体表面性质进行改变,如粒径大小、表面电荷、组织特异性抗体等,使脂质体能选择性地分布于某些组织和器官,提高药物在靶部位的治疗浓度,从而也缩小了用药剂量,降低了毒性,减少了不良反应。

(3) 长效作用: 可延缓或控制药物在组织中的扩散,延长药物有效作用时间。

(4) 避免耐药作用: 脂质体与细胞膜有较强的亲和性,改变了药物与细胞作用机制,增加了药物透过细胞膜的能力。

2 脂质体的制备方法

2.1 机械分散法 机械分散法制备脂质体的一般步骤为: 将类脂及脂溶性药物混合溶于有机溶剂中, 通入氮气或减压去除有机溶剂, 在容器壁上形成脂质薄

膜, 然后加入溶有药物的水溶液, 室温下放置 30 min 使脂质水化, 然后在高于类脂相变温度下振荡分散脂质薄膜, 碎片吸水膨胀形成脂质体。

该法操作简单^[8]。制备的脂质体类型为多层脂质体(MLV), 其粒径分布与类脂膜的厚度和振荡强度有关。此法包封水溶性药物包封率很低, 而且不稳定, 重复性差。如果脂溶性药物的量不超过膜的结构成分则包封率较高。

通过水化脂质制备的多层脂质体(MLVs)太大或太不均匀。为了修饰脂质体的大小和其它特性, 尤其是将 MLVs 转成大单层脂质体(LUVs), 人们设计了许多可以重新使其粒径匀化的技术。

2.1.1 薄膜法 是脂质体制备方法中最原始、最基本和现今仍广泛应用的方法^[9]。

为了形成非常薄的膜和增加包封容量, 最好用大容量的圆形玻璃容器。脂质薄膜加入水溶液后, 在高温或干燥脂质形成较厚膜的情况下, 通过手摇, 脂质难以从玻璃壁上脱落, 形成的大块固态脂质也不易分散。在水溶液中加直径在 0.5~3 mm 之间的玻璃珠或玻璃珠与脂质一起干燥, 有助于悬浮脂质。加入玻璃珠后, 将容器重新与旋转蒸发器连接, 旋转容器 30 min 以使脂质悬浮, 大量制备时, 在机械振荡器上剧烈振荡几个小时以使悬浮脂质完全均匀地分散。

沈央等^[10]以薄膜分散法制备三七总皂苷脂质体, 所得物为大单室脂质体, 平均粒径为 $(1.546 \pm 0.321) \mu\text{m}$, 包封率为 $(78.5 \pm 2.15)\%$ 。

2.1.2 超声波法 MLVs 的混悬液经超声波处理, 再通过 Sepharose 2B 或 4B 柱色谱仪可去除较大的脂质体和 MLVs。常用的方法有探针型和水浴型。少量脂质悬液(高浓度脂质或黏性水溶液)需要高能量时用探针型。水浴型更适于大量的稀释脂质。郑宁等^[11]采用薄膜-超声分散法制备依托泊苷脂质体, 按均匀设计的最优组合制备脂质体的平均包封率为 $(61.58 \pm 0.83)\%$, 粒径均小于 $2 \mu\text{m}$, 体外释药达到了长效缓释的作用,⁶⁰Co 灭菌后脂质体较稳定。李维凤等^[12]以薄膜-超声法和乙醚注入法制备硝苯地平脂质体, 结果表明薄膜蒸发法和超声法综合使用, 所得脂质体粒径均匀, 粒度小, 且多为单室。

超声法可将 MLVs 变成小单层脂质体(SUVs)^[13], 但生物材料易遭受超声辐射, 不仅脂质变性, 而且包裹的大分子和其它敏感化合物也发生变性。

2.1.3 挤压法 采用挤压使脂质体混悬液数次通过固定孔径的滤膜, 脂质体粒径变得相对(下转封3)

(上接封2)均匀^[14],其粒径等于或略大于膜的孔径。

过滤膜分两类。一类是用于过滤消毒的膜,其孔径由基质中纤维密度决定。由于通道的卷曲性质,大于膜孔径的脂质体很容易堵塞;另一类是聚碳酸酯膜。该膜的通道直且大小相同,即使脂质体直径略大于孔径也能通过。

王九成等^[15]采用薄膜分散-挤压法制备阿霉素纳米脂质体,将制得的多层脂质体在55℃反复多次挤压通过双层100nm孔径的聚碳酸盐滤膜即得到大单室脂质体。王昭等^[16]也采用薄膜分散-挤压法制备了甲氧基聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺长循环脂质体。

2.1.4 French压力法^[17] 将大脂质体放入French压力室,在很高的压力下挤压,产生30~80nm单层或多层的脂质体。

张小宁等^[18]采用微射流技术在射流直径50μm和压力120MPa条件下制备莪术油纳米脂质体制剂,所得输液(新制)、输液(6个月后)平均包封率(%)分别为98.3±0.6,95.2±2.1;粉针(新制)、粉针(6个月后)平均包封率(%)分别为95.7±0.8,92.1±1.5;有效平均粒度为88.1nm,粒度分布为67.7~114.7nm。

该法操作简单,几分钟内可使90%的多层脂质体转变成单层脂质体,重复性好,制备条件温和,适于作为敏感大分子载体。另外,高压挤压对于重组稳定的膜蛋白也是非常有用的方法。其缺点是仪器昂贵,制备温度不易控制。

2.1.5 冷冻干燥法 将制得的空白SUVs进行冷冻干燥形成SUVs薄膜,加入含药的水溶液,使SUVs膜水化,融合,再闭合形成高包封率的脂质体。

阎家麒等^[19]采用薄膜蒸发-超声-冷冻干燥法制备的紫杉醇脂质体,其平均包封率达97.13%,在室温下放置8天,紫杉醇基本无渗漏,稳定性好。

这种制备方法可以获得高浓度的脂质体混悬液。

2.2 有机溶剂分散法 将脂质体膜成分溶解于有机溶剂中,加入含药的水溶液,混合后出现两相,在界面磷脂排列成单层,这是形成脂质体膜的基础。

2.2.1 乙醇注入法 Batzri和Korn报道了乙醇注入法^[20]。脂质乙醇混合液通过细针头快速注入到大量缓冲液中,形成SUVs。通常注射的压力足以达到完全混合,乙醇在水中很快稀释,磷脂分子均匀分散到整个基质液中。

宁晓闽等^[21]采用乙醇注入法制备雷公藤内酯酮

多相脂质体,粒径在40~50nm者,占60%,80~100nm者占30%,10nm者占10%;脂质体在室温下放置2周,分散度无明显改变。全东琴等^[22]将粗蝎毒中分离纯化的多肽类物质制成脂质体,包封率可达54.0%。

这种方法制备的SUVs(粒径25nm)比例较高,敏感成分变性的可能性小,对于脂质和包裹的材料比较温和;其缺点是脂质在乙醇中溶解度低(Pc为40mmol/L),并且乙醇在基质中的体积分数最高限为7.5%,这也限制了分散脂质的量;另外乙醇难以从磷脂膜中去除。

2.2.2 乙醚注入法^[23] 将脂质乙醚混合液通过细针头慢慢注入55~60℃的缓冲液中,乙醚蒸发形成单层脂质体(粒径50~200nm)。

张学农等^[24]采用醚滴注-超声法制备去氢骆驼蓬碱脂质体,其包封率为(29.42±0.74)%,粒径为(0.10±0.03)μm,在4℃储存,3个月内电镜下未见其分散度和形态有异常改变。

乙醚注入法对敏感脂质非常温和,水相包封率高。缺点是需要机械输入泵精确控制注入脂质的浓度,不适合蛋白质等物质掺入脂质体。

2.3 逆相蒸发法 此法系将脂质溶于有机溶剂,通过减压蒸发去除溶剂,再加入不同有机溶剂溶解脂质,然后加入水相,以超声波处理直至混合物形成W/O型乳剂,最后减压蒸发去有机溶剂,形成反相蒸发脂质体。

余旭亚等^[25]采用逆相蒸发法制备仙人掌超氧化物歧化酶(SOD)脂质体,确定最佳工艺为:卵磷脂与胆固醇的质量比为2:1,乙醚与SOD酶液的比为3:1,经超声乳化和旋转蒸发可制得包封率为56%的脂质体。董平等^[26]采用此法制备鬼臼毒素脂质体混悬聚糖作为涂膜剂的成膜材料,制备的单层脂质体粒度200~800nm,平均粒度为350nm,平均包封率76.3%。

该方法适于各种脂质和脂质混合液及小分子物质,可包裹基因和耐受有机溶剂的药物^[27],是包封水溶性物质的有效方法。缺点是制备过程超声和减压蒸发有机溶剂所需的温度可使一些物质变性。

2.4 钙融合法 利用由酸性磷脂组成的小囊泡,在钙存在条件下聚集、相继融合成脂质体。

石丽萍等^[28]采用多种方法制备125I-IL-8酸敏脂质体。结果显示:机械分散法、钙融合法制备的脂质体粒径大小、密度分布不均;反相蒸发法、反相蒸发法和钙融合法联合制备的脂质体粒径大小、密度分布

相对较均匀。机械分散法制备的酸敏脂质体的包封率为 10.3%，钙融合法的包封率为 20.0%，反相蒸发法的包封率为 28.6%，反相蒸发法与钙融合法联合法的包封率为 50.9%。

钙融合法的优点是脂质和所包裹的材料不直接与有害的化学物质或物理条件接触。主要缺点是需要酸性磷脂，脂质体内不可避免存在微量钙。

3 小结

作为药用脂质体，制备方法应该符合以下几点要求：①制备过程简单、时间短；②避免使用超声、有机溶剂和去污剂；③药物包封率达到 90% 以上，未包封的物质不需要去除；④药脂比例高。

上述制备方法都不能满足这些要求，因此通常把几种方法联合起来应用。

参考文献：

[1] 董方言. 现代实用中药新剂型新技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 363.

[2] Bangham A D, Standish M M, Watkins J C. Diffusion of univalent ions across the lamella of swollen phospholipids[J]. J Mol Biol, 1965, 13: 238.

[3] Rahman Y E, Cerny E A, Tollaksen S L. Liposome encapsulated actinomycin D: Potential in cancer chemotherapy[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1974, 146(4): 1173.

[4] 彭保卫, 郭祀远. 脂质体技术及其在基因传递应用中的新进展[J]. 广东医学, 2002, 23(增): 191.

[5] 邓英杰, 顾学裘. 新型药物载体——脂质体的作用特点及应用[J]. 中国药学杂志, 1990, 25(4): 195.

[6] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 108.

[7] 张灵芝. 脂质体制备及其在生物医学中的应用[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998: 18.

[8] 胡静, 封钦锋. 硫唑嘌呤脂质体制备方法的研究[J]. 西北药学杂志, 2002, 17(4): 167.

[9] Milsman MH W, Schwendener RA. The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis[J]. Biochim Biophys Acta, 1978, 512: 147.

[10] 沈央, 方晓玲. 三七总皂苷脂质体的制备及其生理适应性的初步考察[J]. 中成药, 2004, 26(5): 352.

[11] 郑宁, 张立德. 新型抗癌药依托泊苷脂质体的制备[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(3): 202.

[12] 李维凤, 牛晓峰, 张会侠, 等. 硝苯地平脂质体的研制

[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2002, 23(4): 414.

[13] Senior J H. Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors[J]. Drug Carrier Syst, 1987, 3: 123.

[14] Hope MJ, Nayar R, Mayer LD et al. Reduction of liposome size and preparation of unilamellar vesicles by extrusion techniques[J]. Lipos Technol, 1993, 1: 123.

[15] 王九成, 惠民权, 焦亚奇, 等. 三瓶装阿霉素脂质体注射液制剂研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2003, 2(4): 746.

[16] 王昭, 马稳乾, 傅经国, 等. 甲氧基聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺长循环脂质体的制备[J]. 世界最新医学信息文摘, 2003, 2(5): 817.

[17] Brandl MM, Bachmann D. Liposome preparation using high-pressure homogenizers[J]. Lipos Technol, 1993, 1(2): 49.

[18] 张小宁, 张郁, 姬海红, 等. 微射流法制备莪术油纳米脂质体的研究[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(5): 356.

[19] 阎家麒, 童岩, 王九一. 紫杉醇脂质体的制备及其抑瘤作用的研究[J]. 药物生物技术, 1996, 3(3): 154.

[20] Batzri S, Korn ED. Single bilayer liposomes prepared without sonication[J]. Biochim Biophys Acta, 1973, 298: 1015.

[21] 宁晓闽, 刘锡钧, 王宝奎, 等. 雷公藤内酯酮多相脂质体的试制[J]. 福建药学杂志, 1994, 6(1): 14.

[22] 全东琴, 苏德森, 张景海. 蝎毒脂质体前体制剂的研究[J]. 中国生化药物杂志, 1997, 18(3): 116.

[23] Deamer D, Bangham AD. Large volume liposomes by an ether vaporization method[J]. Biochim Biophys Acta, 1976, 443: 629.

[24] 张学农, 孙殿甲, 李观海. 去氢骆驼蓬碱脂质体的研究[J]. 中国医药工业杂志, 1994, 25(2): 441.

[25] 余旭亚, 赵声兰, 李涛, 等. 仙人掌 SOD 脂质体的制备研究[J]. 昆明理工大学学报, 2002, 27(1): 103.

[26] 董平, 曾抗, 李国锋, 等. 鬼臼毒素脂质体壳聚糖涂膜剂的初步研究[J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(10): 8.

[27] Szoka F, Olsson F. Preparation of liposome of intermediate size by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes[J]. Biochim Biophys Acta, 1980, 601: 559.

[28] 石丽萍, 颜光涛, 张凯, 等. 酸敏脂质体的制备及其生物学活性[J]. 中国药物与临床, 2003, 3(4): 310.

(收稿日期: 2010-03-26)

