

# 高浓度的脂质体和胶束悬浮液： 用动态光散射测量

作者: *Philip E. Plantz, PhD*

应用论文

SL-AN-07 RevA

Microtrac, Inc. 公司粒度测量自动化



### 生物化合物的可溶性

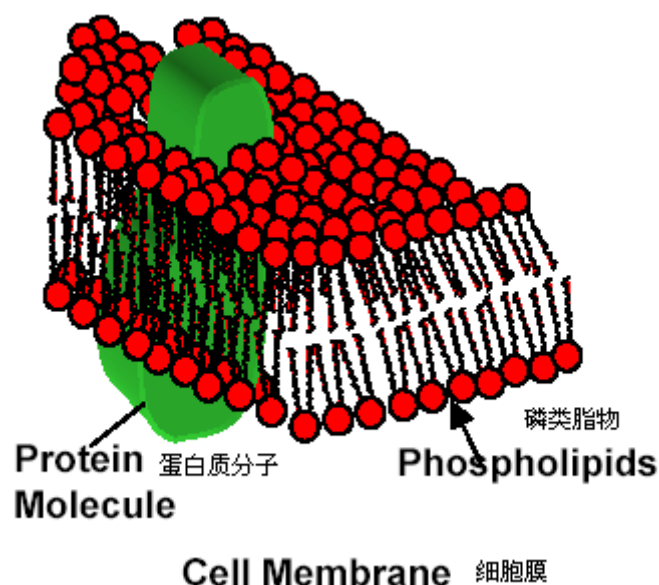
水可以分散和溶解许多种化合物。有一种可溶解于水中的离子种是氯化钠，由于水的电解性质的特点氯化钠可以容易地将它分成单个带电的原子（离子），它就成为水合物（溶剂化物）。电解常数(D)是反比于离子之间的距离此时离子之间的吸引力是正比于离子电荷的。因而水(电解常数 $D=80$ )就容易溶解氯化钠而盐是不溶解在苯中的(苯的电解常数 $D=2.3$ )。

另外一种类型的分散是包括在糖和酒精的化学结构中水分子的氢键被极化成的功能组。要改变水的结构通常用表面活性剂或用盐去“溶解”各种蛋白质，例如抗体，骨胶原（成胶质），一些荷尔蒙激素，血红蛋白和肌浆球蛋白。各种蛋白质的分散一般取决于蛋白质的结构成分。结构成分支配着哪种化学试剂必须要用从而降低防止溶解的吸引力。

最后一种类型的分散是包括了各种生物化学剂。类脂(化合物)一类，取决于他们的结构，它将溶解于带极性的有机溶剂或无极性的有机溶剂，但总的来说，这类成分是不溶于水的。不可溶解于水的性能允许类脂物进入特殊的化学键，这种特殊化学键产生像血脂蛋白，细胞膜，胶束(胶态分子团)和脂质体。本论文着重描写脂肪蛋白质和胶束在或是稀释或是浓缩液体环境中的脂质体粒子的测量。

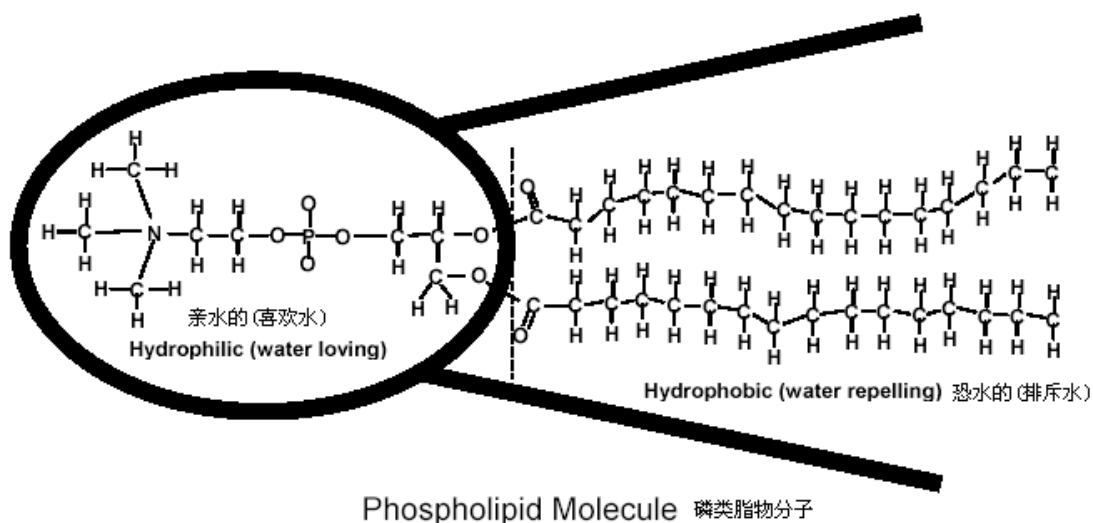
### 各种细胞膜

生物组织是由各种细胞组成，细胞的任务是执行生化反应，供给活的生物体能量，组织的修复，呼吸，免疫等等功能。每个细胞是有许多不同的功能单位称作“**有机细胞**”组成的。这些有机细胞中的每一个提供就地的特殊类型的生物反应。这些有机细胞都处在小室的结构中，小室的术语称为**细胞膜**，它的作用是维持对有机细胞的保护作用，允许有机细胞在化学反应时有一个高度的控制环境，而且细胞膜起到对进出细胞的所有物质提供了一个“门”的作用。有各种各样的细胞膜提供着的作用要在这里描写那是很复杂的。细胞膜的结构已经被研究了许多年了。从简单到复杂的模式，任何生物膜的结构不被完全限制及确切地给出定义，而是保留着一块生物技术兴趣者的研究领域，但是很明显研究包含着类脂物和蛋白质。这些成分相互作用形成细胞膜和其它各种细胞的结构成分。所有的成分进入细胞是通过蛋白质-类脂物合成物，用几种途径中的一种例如扩散，包括机械手段，在那里细胞优先地“打开”而且与其它的各种膜相互作用允许各种成分的进入。(相反 reverse pinocytosis ?)

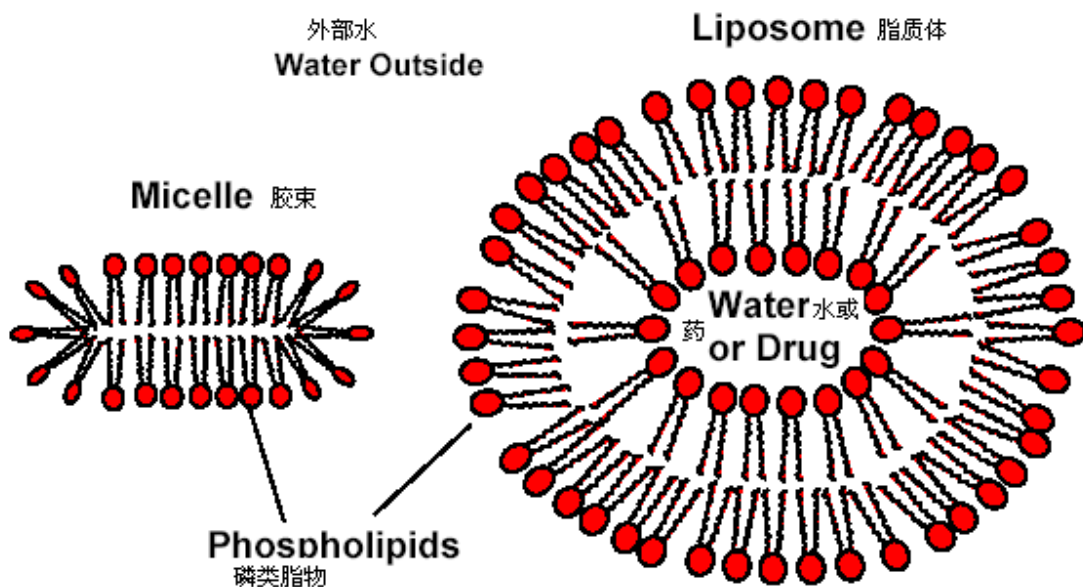


## 各种脂质体和各种胶束

关于类脂物和蛋白质的相互作用后形成结构的最早期的研究之一是用有极性的类脂物(在分子中含有亲水的部分)与水的混合而实现的. 这种类脂物在水中或有机溶剂中-例如乙醇, 可以表现出较小的溶解性. 通常为制备脂质体或胶束的一个类脂物是胆碱磷脂, 它被归类为极性类脂物. 然而, 大多数的极性类质物显示它在两种溶剂中的溶解性能是因为它们的**两栖**(双重性)的特点. (所谓两栖特征是一个分子包含高度的无极性部分和高度的极性部分两方面). 如此的一个混合物将造成一个两相系统-水在底部及油在上部. 如果用均化器或超声波探头强烈搅动这混合物, 造成类脂物和水混合物就可能发生. 在这种情况下分子的定向是允许极性部分与水相互作用同时无极性部分就离开水. 当混合表面活性剂(表面作用试剂)与水混合时也有相同的朝向发生. 表面活性剂的分子和磷类脂物相似它通常也含有亲水和恐水的部分.



磷类脂物和水混合在很高的浓度时, 分子可以形成非常严谨的称为胶束的单元. 胶束有一般结构的特点如共同的膜和脂质体, 在那里需要分子的特殊朝向才能形成胶束. 在使用磷类脂物制备成胶束的同时, 在结构的内部它们不包含水. 这些结构是用作复杂生物结构, 及标准的药物递送系统的早期模型, 结构的厚度可能是50到100A, 胶束直径的范围可以从纳米到微米级(1A=0.1nm纳米).



脂质体是通常用胆碱磷脂(以C-16表示出)这种类脂物制备成的结构. 这些结构通常接近于球形. 正如胶束那样, 分子的无极性尾巴都热驱动到朝向整个结构的里面. 整个结构的尺寸典型的范围从40纳米(药物递送系统)到像几个微米那么大的(化妆品).

### 靶向药物及递送

医药界的特别兴趣是利用上面的概念去研究开发药物的靶向和递送. 胶束的类脂物结构可以从各种极性类脂物包括胆碱磷脂和胆固醇中制得. 在药物靶向中, 胶束的形成也涉及到将一种药种制成胶囊的必要步骤. 这个结构被称为一个**脂质体**而且首先在1970七十年代早期由Sessa和Weiss首先描述的, 是他们在处理一个即使用超声波能量都不能混合的混合物时提出的. 超声能量得出十分清楚的“结论”-包含着封闭的(通常是球形)结构(泡囊或脂质体). 因为细胞膜的化学特性, 它几乎对所有其它可溶于水的成分是不可渗透的. 因为极性类脂物和尤其磷类脂物可以被正向或反向的改变, 所以制成的脂质体也有可能在其特征上随之而变化. 有多层类脂物(多个薄层)的脂质体被水-药溶液分开, 它已经被制造出来为各种将来的应用领域而使用了.

有一种情况即分子的极性磷脂部分是朝向脂质体的外部. 这个结构类似于一个血细胞它随着注射无疑可以通过血液, 肾脏和肝脏, 而且到达一个特定的生理位置又没有药物的提前释放及副作用. 在这种方式下, 就允许用较少剂量的药去达到用大的多的口服剂量药的同样生化作用. 另外的优点是它比口服药防止了肠胃道系统对它配方的影响, 因为在肠胃系统会遇到各种的酶, 抑制剂及pH效应等.

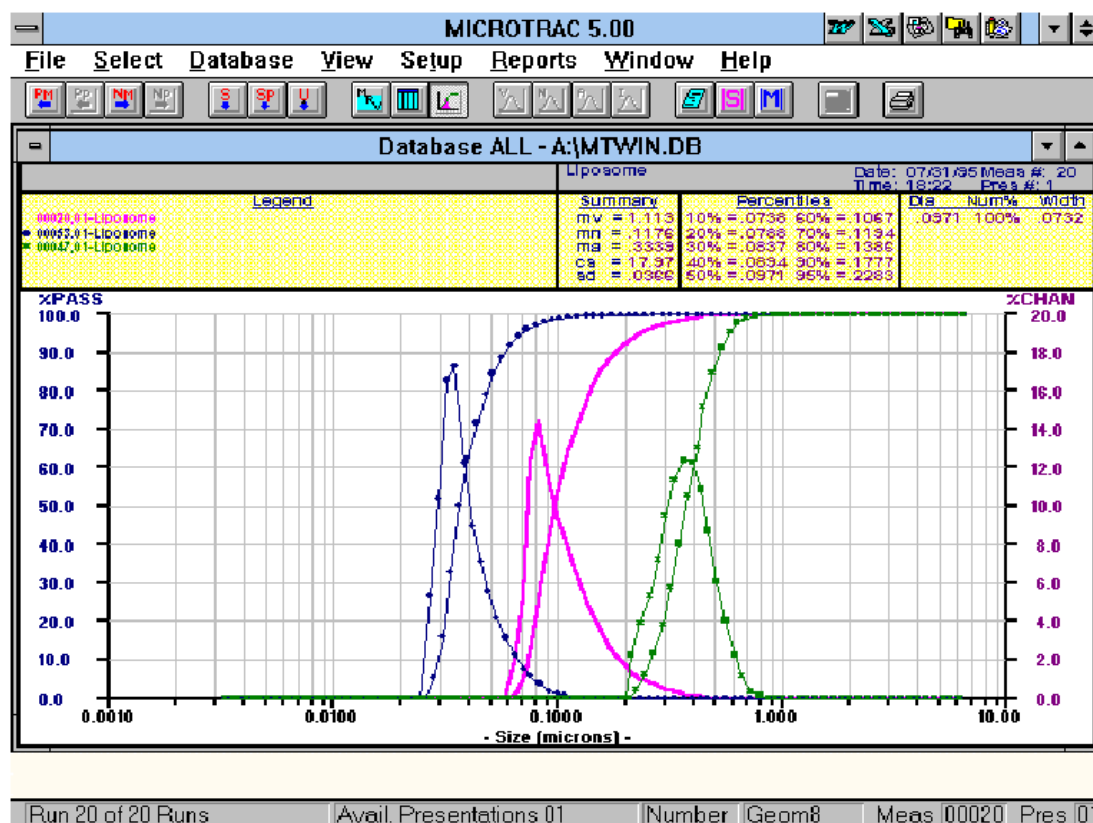
选定了类脂物的类型就决定了细胞吸收或递送的速度, 那个速度或是通过皮肤扩散或是通过细胞膜. 因而, 正如上面讨论过的情况, 组织器官的靶向细胞膜通过选择性的和脂质体外壳的相互作用或反应就起到一个大门的作用. 另外, 脂质体可以在化学组分上构成一定的方式从而提供药物的释放时间以维护药物的功效. 这个概念的讨论和一个杰出的例子是由Nema, et. Al提出的, 他描写的论文是用**胆碱磷脂**的胶囊**保护**了乳酸脱氢酶(一种酶蛋白)受到**蛋白酶**(胰酶)的消化. 这个方法的优点是泡囊是无毒的, 无免疫基因的和生物可降解的(可退化)的. 其它的保护蛋白质的手段像合成纤维, 聚合物涂层及蛋白酶抑制物的控制不必能提供这些优点. 用附着单个无性抗体或指定的受纳体/抗原到细胞膜上, 脂质体也可以被定向到非常特定的生理地点因而限制了其它组织细胞膜的识别. 脂质体还提供其它许多的好处, 如, 在单一剂量药中可以携带溶于水和溶于油的两种药, 溶解难对付的药, 蛋白质的稳定化及控制水合作用等.

### 脂质物的稳定性

为了保持脂质物的稳定性和货架寿命, 几种因素必须被考虑. 像温度, 压力, 脂质体的组分, 药物稳定性, 离子的强度, 及粘度等所有这些都产生稳定及不稳定的影响(表现为不可接受的货架寿命). 用来测量不稳定性的一个重要方法是对粒子尺寸的测量. 典型的说, 为了不受阻止的通过血液系统, 脂质体的尺寸必须小于200纳米. 另外, 这个尺寸的脂质体小于细菌, 霉菌孢, 和真菌的尺寸, 这样使用一个200纳米的过滤器很容易将脂质体和微生物分开. 一个将来可能的目标是制备最大尺寸为100纳米的脂质体将大多数的病毒粒子排除在外.

## 粒子尺寸的测量

由于需要控制, 修改及稳定脂质体, 所以尺寸大小的测量就是一个关键的参数. 因而对多层薄层结构的生长, 脂质体的团聚, 膜的瓦解, 和微生物的污染都是很重要的而且可以通过粒子尺寸的测量得到研究. 对这样的测量主要归结为: 稀释的要求, 测量时间, 及仪器的自动化能力是否恰当. 稀释能造成错误的的数据是因为稀释损失了粒子和粒子之间的相互作用或者制备样品的不稳定性. 用色谱仪的手段是测量时间长, 当使用在测量中的化学试剂可能获得相反的和误导的受影响的结构尺寸时, 色谱法防止了快速的特征评估. (PCS)光子相关光谱法仪器可以被用来缩短测量时间(5-30分)而且可测量精细粒子(3-6000纳米), 脂质体是符合PCS法稀释的要求的, 就如上所述的个案.



上图中三个图形是三种尺寸的胆碱磷脂(PC)脂质体, 它们是用3克PC(胆碱磷脂)及97克DI去离子水混合制成的. 用超声波探头处理混合物时各用超声时间为30秒, 2分钟, 4分钟就形成三种不同尺寸的脂质体. 测量时全强度(全浓度), 浓缩悬浮液的测量时间是30秒, 用的是Microtrac的Nanotracs Wave测量. Nanotracs Wave是用的“控制参比法”去克服上述那些测量的缺点. NPA测量时间是30秒到2分钟, 它比色谱法或电泳的过程所需要30-360分钟的时间是大大缩短了测量时间. 测量范围从0.8纳米到6000纳米其包括非常小的胶束和蛋白质的粒子, 及到较大的脂质体. 测量与浓度无关因而可以允许测量高浓度(典型的达20%-40%)且无须使用其它化学试剂或稀释, 那些试剂能改变脂质体-乳剂的成分并在测试结果上引起怀疑. NANOTRAC WAVE纳米跟踪仪能放置在生产区域的环境中测量, 这样生产线技术员可以在距离过程系统很近的地方完成测量工作. 对测量需要特殊的培训及技巧只需要化很短的实验室时间. 因为不需要什么特别的技术或培训, 在获得精确测量的同时需要学习的时间是短的.

从生产区域来的数据都是容易获得的，而且包括工程部及质量管理部的人员都可以使用数据。纳米跟踪仪的软件包提供了容易的存储数据和数据记录的容易调出，而且通过计算机，网络可以出口传送到所有现代化的电子场合。所以数据可以以NANOTRAC WAVE的硬拷贝书面记录展示，可以存到CD光盘，可以出口到EXCEL，可以粘贴到PowerPoint-幻灯片及WORD文本上，用HTML，ASCII传送，或定制用户特殊需要的报告或用户需要的展示图。

### NANOTRAC WAVE功能特点

- 像做一次pH那么容易的方法。
- 获得专利的“控制参比法”
- 测量多种模式的分布无须假设模型或“fitting”。
- 真正背景的测量省去了高纯度稀释的需要。
- 经得住恶劣的工厂环境中的使用。
- 全面数据库管理的功能，使用HTML，ASCII，pdf. 文件格式可以出口传送到所有的数据库及各种格式的硬拷贝。
- 高浓度测量可达40%的粒子浓度。
- 使用方便，体积小便于携带。
- 操作简单。
- 无须大量的，广泛的样品制备。
- 无须选择特殊的分布模式。
- 和大多数的通常有机溶剂及水溶液相兼容。



