

鲜鹿茸全成分口腔崩解片制备工艺研究

魏宝霞, 戴俊东, 賡迪, 靳梦亚, 朱美玲, 董玲*

北京中医药大学, 北京 100102

摘要: 目的 考察影响冻干法制备鲜鹿茸全成分口腔崩解片的关键工艺因素, 确定最佳制备工艺。方法 以冻干赋形技术制备鲜鹿茸全成分口腔崩解片, 采用单因素试验法, 以促细胞增殖活性、含水量、崩解时间和外观性状为考察指标, 研究关键工艺参数, 确定最佳处方及制备工艺。结果 优选出的最佳制备工艺条件: 鲜鹿茸冻存温度-40℃, 以醋酸缓冲液为稀释液, 按1:2的比例与鲜鹿茸细粉混匀, 10%海藻糖为冻干保护剂, 低温匀浆时间为10 min, 匀浆分装后按优选工艺进行真空冷冻干燥制备鲜鹿茸全成分口腔崩解片, 所得口腔崩解片能在30 s完全崩解, 含水量低于5%, 促细胞增殖活性与鲜鹿茸无差异。结论 制备的鲜鹿茸全成分口腔崩解片具有生物活性高、服用方便的优点, 最佳制备工艺稳定可行, 适合工业化生产。

关键词: 鲜鹿茸; 匀浆; 冻干; 口腔崩解片; 制备工艺

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)12-1709-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.12.010

Preparation technology for orally disintegrating tablets of fresh antler with all ingredients

WEI Bao-xia, DAI Jun-dong, GENG Di, JIN Meng-ya, ZHU Mei-ling, DONG Ling

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To study the critical influence factors in the preparation of orally disintegrating tablets of fresh antler with all ingredients (ODT-FA) by lyophilized method and to optimize the preparation technology. **Methods** The lyophilized molding technology was used to prepare the ODT-FA and the optimal formulation and preparation were obtained by means of single factor test with promoting cell proliferation activity, moisture content, disintegration time, and appearance as evaluation criterion. **Results** The optimal preparation conditions of ODT-FA were as follows: The frozen storage temperature of fresh antler was -40℃, acetate buffer was used as diluent to mix with the fresh antler powder according to ratio of 1:2, then to homogenize for 10 min under liquid nitrogen protection with 10% trehalose as lyoprotectant, and the homogenate was lyophilized in vacuum after poured into the mold to prepare the ODT-FA. The tablets could disintegrate within 30 s completely and its moisture content was less than 5%. In addition, there was no difference in promoting cell proliferation compared with fresh antler. **Conclusion** The ODT-FA prepared by optimal technology has highly biological activity and is easy to take. The optimal preparation process is stable and suitable for industrial production.

Key words: fresh antler; homogenate; lyophilized; orally disintegrating tablets; preparation technology

鹿茸 *Cervi Cornu Pantotrichum* 是鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon Temminck* 或马鹿 *Cervus elaphus Linnaeus* 的雄鹿未骨化密生茸毛的幼角, 是一种传统名贵中药。其具有壮肾阳、益精血、强筋骨、调冲任、托疮毒的功效^[1]。近年来, 国内外大量研究表明鹿茸中含蛋白质类、多肽类、活性因子、活性酶类等^[2]多种活性物质, 具有增强免疫力、提高性功能、抗氧化和抗衰老等多种作用^[3-4]。相关研究已表明, 蛋白质类成分是鹿茸的主要活性成分, 占总

成分的50%以上, 然而鹿茸经过传统水煮和热炸等加工方法使得鹿茸中的活性成分量和药效均有不同程度的损失^[5]。而冷冻干燥是将药品在低温下冻结, 然后在真空条件下升华干燥去除冰晶, 待升华结束后再进行解吸干燥除去部分结合水的干燥方法^[6]。与其他干燥方法相比, 其优势在于能够更好地保持不耐热、易氧化及蛋白类药物的生物活性; 能够维持药物原有的形、色; 使冻干制品具有疏松多孔结构, 复水性佳; 制品含水量低, 能长期保存^[7]。

收稿日期: 2013-11-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81073056/H2806); 北京中医药大学创新团队发展计划资助项目(2011-CXTD-13)

作者简介: 魏宝霞(1990—), 女, 硕士在读。E-mail: baoxiaw@163.com

*通信作者 董玲 Tel: (010)84738602 E-mail: dongling@bucm.edu.cn

近年来,冷冻干燥技术也逐渐用于鹿茸的加工处理,如鹿茸冻干粉、冻干片、冻全茸以及“活性茸”。同时相关研究表明采用冷冻干燥技术加工后的鹿茸,在活性成分量和药效保持方面均优于传统加工处理^[8-9]。冻干赋形技术作为冷冻干燥技术的一个创新,也逐渐应用于生物样品及其他医药制剂的干燥处理。冻干赋形技术是指在可流动的液体、半固体或固体中加入黏结剂、骨架支持剂(如多羟基化合物、糖类、氨基酸、蛋白质、聚合物等^[10]),然后将其灌装于成型模具中,通过冷冻干燥工艺得以成型的技术^[11]。该技术不仅具有冷冻干燥技术的优势,而且具有剂量准确、崩解迅速、服用方便和促进吸收等优势,继而被广泛应用于口腔崩解片、速释片、咀嚼片的制备。然而冻干赋形技术在鹿茸加工方面的应用尚未见报道,董玲^[12-13]首次创新性地提出利用冻干赋形技术制备全成分鹿茸口腔崩解片并申请专利,旨在保存鹿茸的活性,促进药物吸收。因此,本研究以鲜鹿茸匀浆为原料,采用冻干赋形技术制备活性较高、在口腔内崩解迅速、服用方便的鲜鹿茸全成分口腔崩解片,旨在最大限度保护鲜鹿茸活性因子和蛋白的活性,并促进其吸收。

1 仪器与材料

PG—300型破骨机、WLF—520型低温粉碎机,廊坊市冠通机械有限公司;BS110S型电子分析天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;JMS—50型胶体磨,廊坊正瑞机械有限公司;高速台式冷冻离心机,力康发展有限公司;Lyo—5型真空冷冻干燥机冻,上海东富龙科技有限公司;DF—206型电热鼓风干燥箱,北京医疗二厂;MH—1型微量振荡器,北京京辉凯业科技有限公司;SpectraMax M2酶标仪,美国分子仪器公司;96孔板,NUNC公司。

梅花鹿二杠鲜鹿茸,北京伟博海泰生物技术有限公司;乙醇(AR)、无水乙酸钠(AR)、醋酸(AR),北京化工厂;甘露醇(AR)、海藻糖(AR),天津市光复精细化工研究所;甘氨酸(AR),天津市福晨化学试剂厂;NIH/3T3细胞,北京协和细胞中心;牛血清白蛋白、胰酶、二甲基亚砜(DMSO),Sigma公司;噻唑蓝,北京拜尔迪生物技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 样品制备

2.1.1 缓冲液配制 等渗磷酸缓冲液配制:称取氯化钠8g、磷酸二氢钾0.2g、磷酸氢二钠2.9g、氯化钾0.2g,加适量蒸馏水溶解,调pH值至7.4,然

后加蒸馏水稀释至1000mL,摇匀,保存于4℃冰箱中备用。0.2mol/L醋酸缓冲液配制:称取醋酸钠16.4g,加适量蒸馏水溶解,调pH值至7.4,然后加蒸馏水稀释至1000mL,摇匀,保存于4℃冰箱中备用。

2.1.2 鲜鹿茸前处理 鲜茸清洗:取冷冻鲜鹿茸,75%乙醇涂擦消毒;然后解冻鹿茸,用火燎去茸毛;锯口朝上,用柔软的毛刷蘸温碱水反复刷洗鹿茸表皮,之后用清水洗净,再用75%乙醇消毒,然后置于-40℃冰箱冷冻保存。鲜茸粉碎:取处理后的冷冻鲜鹿茸用电锯切段,破骨机粉碎成粗粉,然后采用低温粉碎机在液氮保护下粉碎成细粉,置于-40℃保存。灭菌:粉碎后的鲜鹿茸细粉在冷冻状态下采用20kGy⁶⁰Co辐照灭菌。

2.1.3 鲜鹿茸匀浆的制备 称取灭菌后的鲜鹿茸细粉适量,按比例加入适量0~4℃的醋酸钠缓冲液,搅拌均匀,用胶体磨匀浆一定时间,制备鲜鹿茸匀浆,备用。

2.1.4 鲜鹿茸口腔崩解片的制备 取鲜鹿茸细粉450g,加入醋酸钠缓冲液900mL,按匀浆液体积的10%加入140g海藻糖为冻干保护剂,混合均匀后制备鲜鹿茸匀浆液,然后按剂量(1.5mL)精确灌装于片剂模具中,按冻干工艺(图1)进行冷冻干燥,得到鲜鹿茸口腔崩解片(orally disintegrating tablets of fresh antler, ODT-FA),共制备1012片,密封包装,置于-40℃冰箱保存。

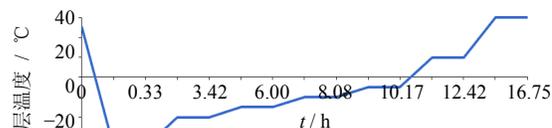


图1 鲜鹿茸口腔崩解片冻干曲线

Fig. 1 Lyophilized curve of ODT-FA

2.2 评价指标

2.2.1 促细胞增殖活性测定 取复苏后传代3~4次,处于对数生长期的NIH/3T3细胞1瓶,PBS清洗2次,0.25%胰酶消化后,收集细胞悬液,800r/min离心5min。加适量培养基反复吹打至细胞分散,在细胞计数板上计数,加培养基调整细胞浓度为 1.5×10^4 个/mL,均匀接种于96孔培养板。继续培养约10h,待细胞完全贴壁后,取鲜鹿茸全成分口腔崩解片12片置于研钵,加入18mL蒸馏水,充分研磨5min,置于10mL离心管离心(12000r/min,10min,4℃),然后取适量鹿茸离心上清液按生药

量稀释不同倍数,加药,平行 3 份空白对照,每份 6 个复孔,继续培养,24 h 后每孔加 5 mg/mL MTT 15 μ L,继续培养。4 h 后吸去孔内上清液,每孔加 150 μ L DMSO,在微量振荡器上振摇 10 min 使沉淀完全溶解。用酶标仪进行全波长扫描,测定最大吸收波长 490 nm 处的吸光度(A)值。

$$\text{增殖率} = A_{\text{加药组}} / A_{\text{空白对照}} - 1$$

2.2.2 含水量测定 取鲜鹿茸全成分崩解片适量,按照《中国药典》2010 年版一部附录 IX H 项下烘干法测定含水量。

2.2.3 崩解时间 取鲜鹿茸全成分口腔崩解片 1 片,加 1.5 mL 纯水,轻轻振摇,使其崩解,记录冻干片剂完全崩解时的时间,以 30 s 内完全崩解、均匀分散为佳^[14]。

2.2.4 外观性状 取鲜鹿茸全成分口腔崩解片适量,观察其颜色、饱满度、多孔性和疏松程度。

2.2.5 统计分析 应用 SPSS 17.0 软件包进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本比较采用单因素方差分析。

2.3 匀浆工艺考察

2.3.1 冻融温度考察 称取灭菌后的鲜鹿茸细粉适量,按 1:2 的比例加入 0~4 $^{\circ}$ C 的水,搅拌均匀,胶体磨低温匀浆 10 min,取匀浆分别于 -20、-40、-80 $^{\circ}$ C 温度下反复冻融 5 次,离心,取上清液按“2.2.1”项下方法测定促细胞增殖活性,结果见表 1。结果表明,冻融温度对鲜鹿茸匀浆的促细胞增殖活性具有显著影响,其中 -40 $^{\circ}$ C 时促细胞增殖活性最大,增殖率为 78.18%。故优选鲜鹿茸的冻存温度为 -40 $^{\circ}$ C。

2.3.2 匀浆时间考察 称取灭菌后的鲜鹿茸细粉适量,按 1:2 的比例加入 0~4 $^{\circ}$ C 的水,搅拌均匀,分别采用胶体磨低温匀浆 5、10、15 min,离心,取上清液按“2.2.1”项下方法测定促细胞增殖活性,结果见表 2。结果表明,低温匀浆时间对鲜鹿茸匀

表 1 冻融温度考察 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Investigation on frozen storage temperature ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

冻融温度 / $^{\circ}$ C	增殖率 / %
-20	40.96 \pm 12.76
-40	78.18 \pm 14.56**
-80	60.67 \pm 16.70**

与 -20 $^{\circ}$ C 比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs -20 $^{\circ}$ C group

表 2 匀浆时间的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Investigation on homogenate time ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

匀浆时间 / min	增殖率 / %
5	0
10	9.16 \pm 4.12
15	8.94 \pm 2.97

浆的促细胞增殖活性具有显著影响,其中匀浆 10 min 时的促细胞活性最高,匀浆 5 min 则未表现出促细胞增殖活性;匀浆 10 min 与 15 min 相比,促细胞增殖活性无显著性差异 ($P > 0.05$),故确定鲜鹿茸的匀浆时间为 10 min。

2.3.3 稀释液种类考察 称取灭菌后的鲜鹿茸细粉适量,按 1:2 的比例分别加入 0~4 $^{\circ}$ C 的水、磷酸缓冲液和醋酸缓冲液作稀释液,搅拌均匀,胶体磨低温匀浆 10 min,离心,取上清液按“2.2.1”项下方法测定促细胞增殖活性,结果见表 3。结果表明,不同稀释液对鲜鹿茸匀浆的促细胞增殖活性具有显著影响,其中醋酸缓冲液 > 磷酸缓冲液 > 水,故优选醋酸缓冲液为鲜鹿茸匀浆稀释液。

表 3 稀释液种类的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Investigation on various diluents ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

稀释液种类	增殖率 / %
水	16.50 \pm 8.33
磷酸缓冲液	22.61 \pm 6.46
醋酸缓冲液	31.28 \pm 15.97*

与水比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs water group

2.3.4 稀释液用量考察 称取灭菌后的鲜鹿茸细粉适量,分别按 1:1、1:2、1:3 的比例加入 0~4 $^{\circ}$ C 的醋酸钠缓冲液,搅拌均匀,胶体磨低温匀浆 10 min,离心,取上清液按“2.2.1”项下方法测定促细胞增殖活性,结果见表 4。结果表明,稀释液用量对鲜鹿茸匀浆的促细胞增殖活性具有显著影响,按 1:2 比例稀释时所得鲜鹿茸匀浆具有较强的促细胞增殖活性,增殖率为 66.28%。故优选匀浆工艺中鲜鹿茸与醋酸钠缓冲液的比例为 1:2。

2.4 冻干工艺考察

2.4.1 冻干保护剂筛选 取鲜鹿茸匀浆适量,分别加入 15% 的甘露醇、甘氨酸和海藻糖作冻干保护剂,按“2.1.4”项方法制备鲜鹿茸全成分口腔崩解片,以鲜鹿茸匀浆和不加冻干保护剂的口腔崩解片为对照,照“2.2”项下方法进行检测,结果见表 5。结果

表 4 稀释液用量的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Investigation on diluent dosages ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

稀释液用量 / (g·mL ⁻¹)	增殖率 / %
1 : 1	49.50 ± 12.24
1 : 2	66.28 ± 17.26**
1 : 3	51.86 ± 16.13

与 1 : 1 组比较: **P < 0.01

**P < 0.01 vs 1 : 1 group

表 5 冻干保护剂种类考察 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Investigation on various cryoprotectants ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

冻干保护剂种类	增殖率 / %	外观	含水量 / %	崩解时间 / s
鲜鹿茸匀浆	19.93 ± 6.47	—	—	—
鲜鹿茸匀浆冻干 (未加保护剂)	12.32 ± 7.09	红色, 饱满	10.03	180
15%甘露醇	8.53 ± 4.12**	白色, 饱满	3.81	90
15%甘氨酸	4.94 ± 8.04**	白色, 饱满	4.92	60
15%海藻糖	11.64 ± 4.56*	白色, 饱满	5.48	30

与鲜鹿茸匀浆比较: *P < 0.05 **P < 0.01

*P < 0.05 **P < 0.01 vs homogenate of fresh antler group

分别加入 10%、15%、20% 的海藻糖作冻干保护剂, 按“2.1.4”项方法制备鲜鹿茸全成分口腔崩解片, 以鲜鹿茸匀浆和不加冻干保护剂的口腔崩解片为对照, 照“2.2”项下方法进行检测, 结果见表 6。结果表明, 冻干保护剂用量对鲜鹿茸口腔崩解片的促细胞增殖活性具有显著影响, 海藻糖用量为 10% 时鲜鹿茸口腔崩解片具有较强的增殖活性, 增殖率为 50.13%。此外, 片剂的含水量和崩解时间均符合要求, 故确定冻干工艺中海藻糖的用量为 10%。

表明, 冻干保护剂种类对鲜鹿茸口腔崩解片的促细胞增殖活性具有显著影响, 其中海藻糖 > 甘露醇 > 甘氨酸。此外, 冻干保护剂的加入还有利于降低鲜鹿茸口腔崩解片的含水量, 改善其崩解。根据实验结果, 优选海藻糖为鲜鹿茸全成分口腔崩解片的冻干保护剂。

2.4.2 冻干保护剂用量考察 取鲜鹿茸匀浆适量,

2.5 验证试验

按照上述单因素实验考察的工艺制备 3 批鲜鹿茸全成分口腔崩解片, 进行体外促细胞增殖、含水量、崩解时间和外观性状的测定, 结果见表 7。结果表明该工艺条件下制备的鲜鹿茸全成分口腔崩解片, 其平均促细胞增殖活性为 19.62%, 与鲜鹿茸匀浆组和匀浆冻干 (未加保护剂) 组相比无统计学差异 (P > 0.05); 平均含水量为 4.12%, 均能在 30 s 内崩解完全, 3 次实验结果基本一致, 说明优选工

表 6 冻干保护剂用量考察 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Investigation on cryoprotectants dosages ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

冻干保护剂用量	增殖率 / %	外观	含水量 / %	崩解时间 / s
鲜鹿茸匀浆	42.31 ± 11.20	—	—	—
鲜鹿茸匀浆冻干 (未加保护剂)	50.52 ± 13.38	白色, 饱满	7.46	180
10%海藻糖	50.13 ± 27.32	白色, 饱满	4.55	10
15%海藻糖	20.76 ± 12.08** $\Delta\Delta$	白色, 饱满	4.72	8
20%海藻糖	9.76 ± 16.23** $\Delta\Delta$	白色, 饱满	5.01	5

与鲜鹿茸匀浆组比较: **P < 0.01; 与鲜鹿茸匀浆冻干 (未加保护剂) 组比较: $\Delta\Delta$ P < 0.01

**P < 0.01 vs homogenate of fresh antler group; $\Delta\Delta$ P < 0.01 vs lyophilized fresh antler homogenate group

表 7 验证试验 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 Results of verification tests ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

批号	增殖率 / %		含水量 / %		崩解时间 / s		外观性状		
	鲜鹿茸匀浆	冻干 (匀浆)	冻干 (10% 海藻糖)	冻干 (10% 匀浆)	冻干 (10% 海藻糖)	冻干 (10% 匀浆)	冻干 (10% 海藻糖)	冻干 (10% 海藻糖)	
20131225	12.81 ± 7.69	26.23 ± 12.33	12.93 ± 3.15	4.42	3.32	160	23	白色, 饱满	白色, 饱满
20131226	20.79 ± 9.09	24.05 ± 12.07	29.55 ± 12.05	5.83	4.72	175	18	白色, 饱满	白色, 饱满
20131227	24.53 ± 7.37	8.17 ± 4.62	11.55 ± 5.98	8.17	4.33	147	18	白色, 饱满	白色, 饱满

艺合理可行, 稳定可靠, 具有良好的重现性。

本实验采用单因素试验考察影响冻干法制备鲜鹿茸全成分口腔崩解片的关键工艺因素, 确定最佳的鲜鹿茸全成分口腔崩解片制备工艺。考察结果显示, 制备鲜鹿茸全成分口腔崩解片的最佳工艺及参数为: 取-40℃冰箱冷冻保存的鲜鹿茸, 清洗消毒后用电锯切段, 破骨机粉碎成粗粉, 用低温粉碎机在液氮保护下粉碎成细粉, 然后在冷冻状态下 20 kGy ⁶⁰Co 辐照灭菌。称取灭菌后的鲜鹿茸细粉适量, 以 1:2 的醋酸钠缓冲液为稀释液, 采用胶体磨低温匀浆 10 min, 制备鲜鹿茸匀浆液, 加入 10% 的海藻糖为冻干保护剂溶解后, 按剂量分装于片剂模具中进行冻干。该工艺条件下鲜鹿茸全成分口腔崩解片的外观、含水量、崩解时限均符合要求, 同时其促细胞增殖活性较高, 与鲜鹿茸匀浆液相比无统计学差异。

3 讨论

国内外学者研究发现鹿茸是一个天然的细胞生长因子库, 含有多种生长因子, 如胰岛素生长因子(IGF)、神经生长因子(NGF)、表皮生长因子(EGF)以及促进成骨细胞、软骨细胞增殖的多肽, 它们与鹿茸的再生和快速生长密切相关^[15]。相关研究表明煮炸等传统加工方法能明显降低这些活性因子的量和生物活性, 因此本研究采用冻干赋形技术制备全成分鲜鹿茸口腔崩解片, 旨在最大限度维持鹿茸中活性因子的活性。

研究表明, 温度是影响蛋白质类活性因子稳定性最重要的因素, 温度越高, 蛋白质的稳定性越低, 绝大多数蛋白质在 0~4℃ 较为稳定^[16]。因此, 本研究在制备鲜鹿茸口腔崩解片的过程中尽可能在低温条件下进行, 以保证活性因子的高活性; 缓冲液的 pH 是蛋白质类活性因子稳定性的另一个影响因素, 若缓冲液的 pH 与目标蛋白的等电点一致, 蛋白质的溶解度会减少, 从而引起蛋白质聚集, 导致蛋白质类活性因子的不稳定、活性的降低甚至失活等现象。所以, 在鲜鹿茸匀浆制备过程中选择 pH 7.4 的醋酸钠缓冲液作为匀浆稀释液, 且药液比为 1:2 时鹿茸的活性较高。

冷冻干燥是一个复杂的过程, 其过程中可产生冻结应力(包括枝状冰晶的形成、离子浓度的增加、pH 值的改变和相分离等)和干燥应力(主要是指一处多肽分子表面单层水分子等), 均会使多肽及蛋白质类药物变性。为了防止药物变性, 通常在制剂配

方中都添加具有吸水性差、玻璃转变温度高、结晶率低和不含还原性基团等特性的保护剂, 以保证其稳定性, 常加入的保护剂种类通常为多元醇、糖类、氨基酸等^[17]。因此, 本研究发现在制备鲜鹿茸全成分口腔崩解片时以玻璃转变温度高、引湿性和还原性低的海藻糖为冻干保护剂, 加入量为药液的 10% 时鲜鹿茸全成分口腔崩解片具有较高的生物活性。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 吉静娴, 钱 碌, 黄凤杰, 等. 鹿茸的活性物质及药理作用的研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(2): 141-143.
- [3] 傅 雷, 孙艺平, 赵心宇, 等. 鹿茸的化学成分以及药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2001, 18(4): 805-806.
- [4] 桂丽萍, 郭 萍, 郭远强. 鹿茸化学成分和药理活性研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 237-240.
- [5] 郑洪新, 任艳玲, 杜 松. 活性鹿茸与热炸茸对去势大鼠骨质疏松症防治作用比较研究 [J]. 中医药学刊, 2004, 22(4): 616-618.
- [6] 詹丽茵. 冷冻干燥技术的中药应用研究 [J]. 中国医药导报, 2008, 5(22): 26-27.
- [7] 于亚云, 段姚尧, 崔 颖, 等. 蛋白类药物冷冻干燥技术的研究进展 [J]. 武警医学院学报, 2010, 19(1): 78-80.
- [8] 柯李晶, 林冬云, 黄晓南. 不同加工工艺鹿茸的蛋白成分和活性比较 [J]. 中药材, 2008, 31(1): 11-14.
- [9] 刘 军, 张世伟. 鹿茸的冻干新工艺及性质 [J]. 真空科学与技术学报, 2011, 31(2): 229-233.
- [10] 孙东坡, 胡一桥. 蛋白质冷冻干燥制品中的保护剂及其保护机制 [J]. 药学进展, 2003, 27(4): 201-205.
- [11] 董 玲. 冻干赋形制剂的制备方法: 中国, CN 201010549097. 3 [P]. 2012-05-23.
- [12] 董 玲. 一种鹿茸冻干赋形制剂及其生产方法: 中国, CN201010127732. 9 [P]. 2012-01-04.
- [13] 董 玲. 一种鹿茸冻干片及其生产方法: 中国, CN200810223579. 2 [P]. 2010-06-16.
- [14] 杨 勇, 奉建芳. 螯酥固体脂质纳米粒冻干工艺及其表征 [J]. 中南药学, 2006, 4(3): 163-166.
- [15] 吴菲菲, 金礼吉, 李晓宇, 等. 鹿茸中天然活性成分的药理学功能的研究进展 [J]. 中国鹿业进展, 2011: 272-274.
- [16] 李世崇, 昭 烈. 不稳定蛋白质的分离纯化 [J]. 药物生物技术, 2002, 9(3): 175-177.
- [17] 左 筠, 张玉方. 多肽类药物冷冻干燥制剂的稳定性研究概况 [J]. 中国药房, 2009, 20(16): 1269-1270.