

AN-CN-17 DLS 动态光散射和 SPOS 技术激光粒度仪在脂质体检测方面的应用

磷脂脂质体是由磷脂制成的球形颗粒，用于制药和化妆品工业。脂质体的大小和表面电荷是两项重要特征需要检测和监控。动态光散射(DLS)是用于测量亚微米脂质体的大小最常见的分析技术，而单颗粒光学传感(SPOS)技术用来测量大于1 μm 的脂质体，不仅可以检测脂质体的大小还可以进行颗粒计数。美国 PSS 粒度仪公司的 Nicomp 380 系列和 AccuSizer 780 系列在世界各地被用于实验室检测测量的脂质体大小和电位(电动电势)。

脂质体是双分子层的囊泡，通常用于医药领域作为药物释放系统，将化疗药物运送到肿瘤位置。他们由磷脂组成，分子的疏水尾部倾向于聚集在一起，避开水相，而亲水头部暴露在水相，形成具有双分子层结构的封闭囊泡。在制药应用中活性药物成分(API)通常是包覆于在脂质体到亲水的腔内或夹在双分子层之间，这主要取决于 API 的亲水性，如图 1 所示。

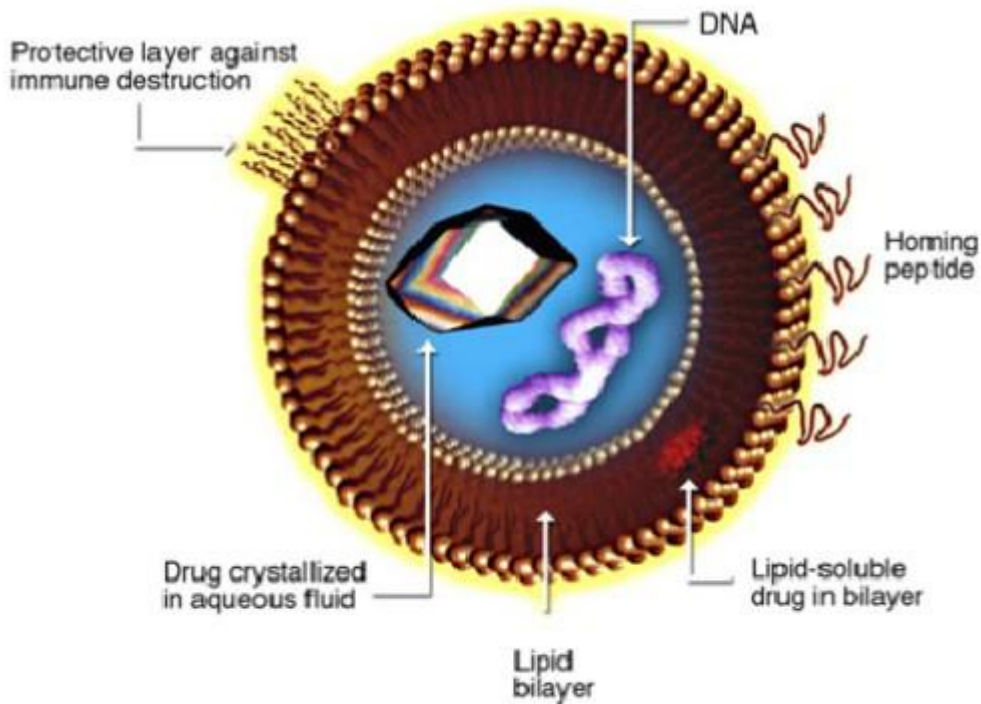


Figure 1: Liposome for drug delivery

第一个被批准用脂质体传递的药物是阿霉素脂质体，通过改进多柔比星脂质体而制得。多柔比星是将药物包覆于聚己二醇包衣的脂质体内，可以防止免疫系统的排异，增加稳定性，处长半衰期。另外脂质体还可以应用于生物技术与美容领域。

脂质体可以根据磷脂层数，粒度，及制备方法进行分类。最常见的种类有单层小囊泡(SUV)，多层小囊泡(SMV)，多层囊泡(MLV)，单层大囊泡(LUV)和巨大的囊泡(GMV)。脂质体的大小跟载药数量是影响对药物代谢和药物药效的重要指标。因此对脂质体粒度进行准确快速的检测对药物递送至关重要。

大多数的脂质体是亚微米级的（20-250nm），最适合的分析方法就是采用动态光散射，例如PSS的Nicomp系列。图2所示，一些较大的脂质体（GMV）（ $>5\ \mu\text{m}$ ）用动态光散射法分析可能不适合，此时就可以选用PSS AccuSizer系列。图3。



Figure 2: The Nicomp N3000 DLS system



Figure 3: The AccuSizer SPOS system with SIS sampler

制程中的粒径检测：

PSS Nicomp 系列和 AccuSizer 系列都可用于脂质体生产过程中粒径的测量，例如微孔滤膜挤出的过程。图 4-6 显示了，脂质体在经过滤孔逐渐减小的滤膜后的粒径。

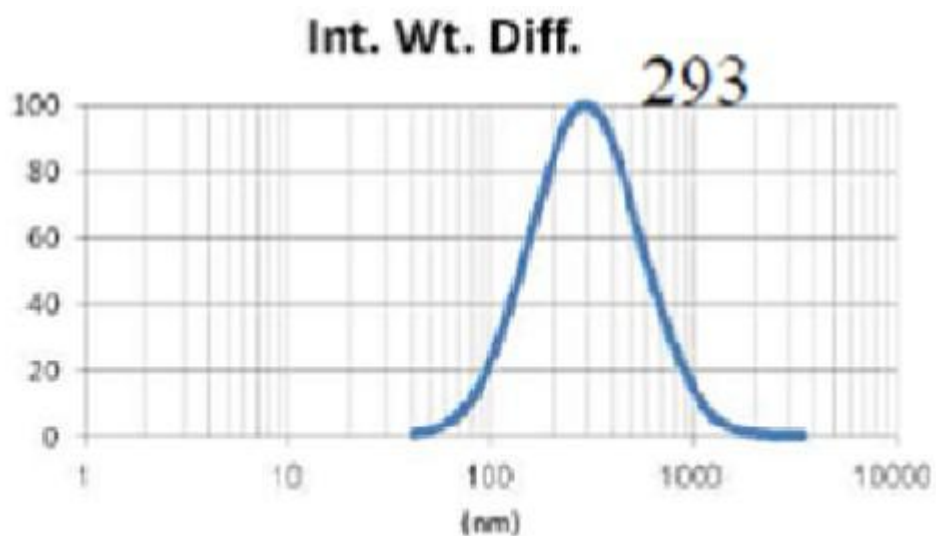


Figure 4: Liposome size before extrusion

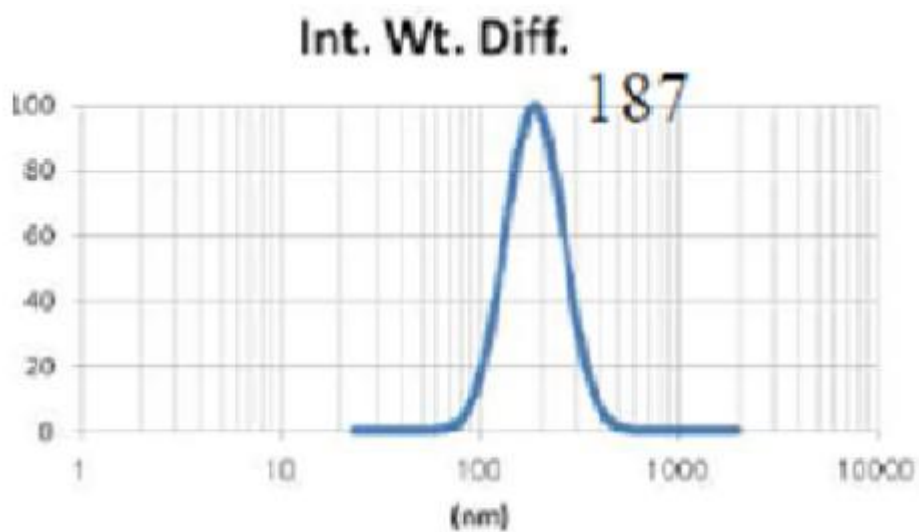


Figure 5: Liposome size after extrusion through 0.4 μm membrane three times

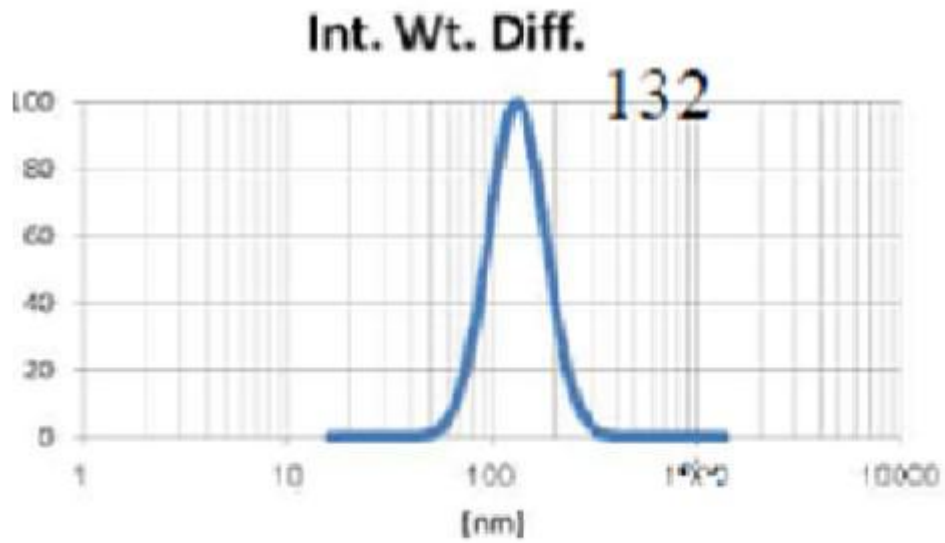


Figure 6: Liposome size after extrusion through 0.1 μm membrane three times

巨大的囊泡 (GMV) 脂质体制造使用 sugar-doped 脂膜水化过程。通过离心和膜过滤器超挤压过滤来减小粒子粒径。脂质体粒径大小的变化是使用 AccuSizer 单颗粒传感技术监控，如图 7 到 10。

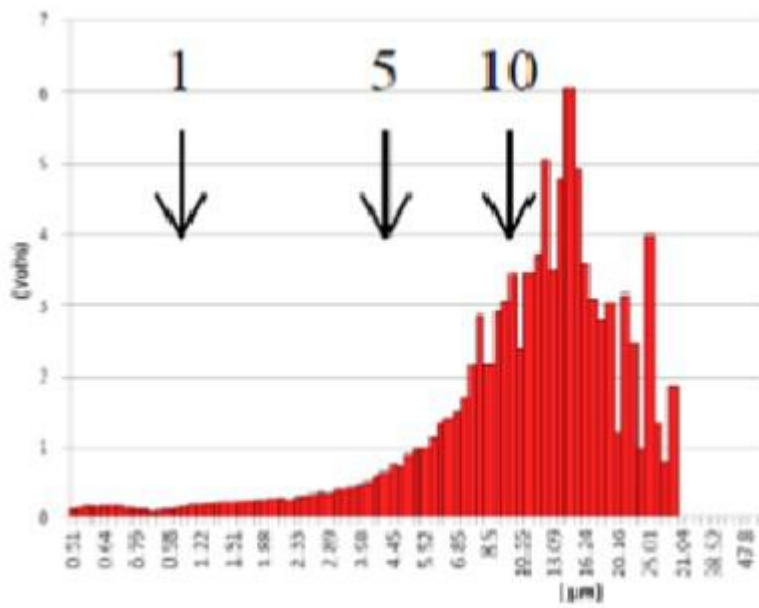


Figure 7: GMV liposome before centrifugation

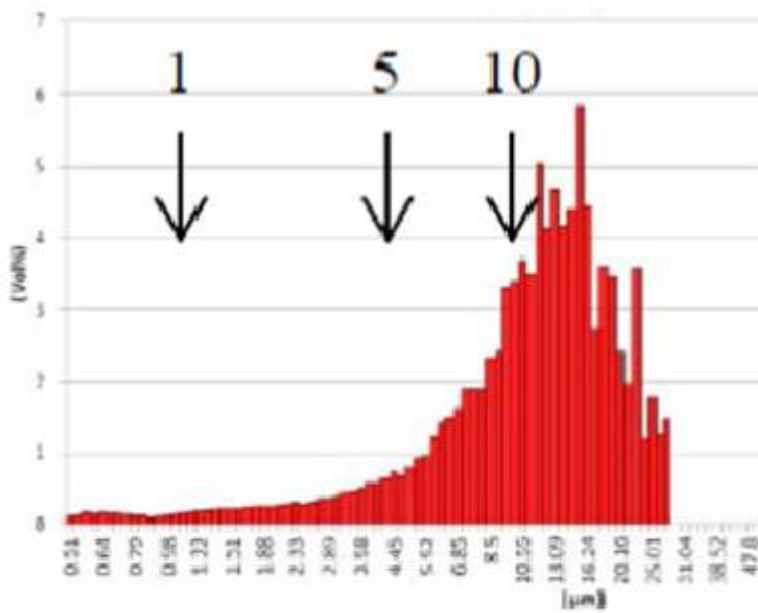


Figure 8: GMV liposome after centrifugation

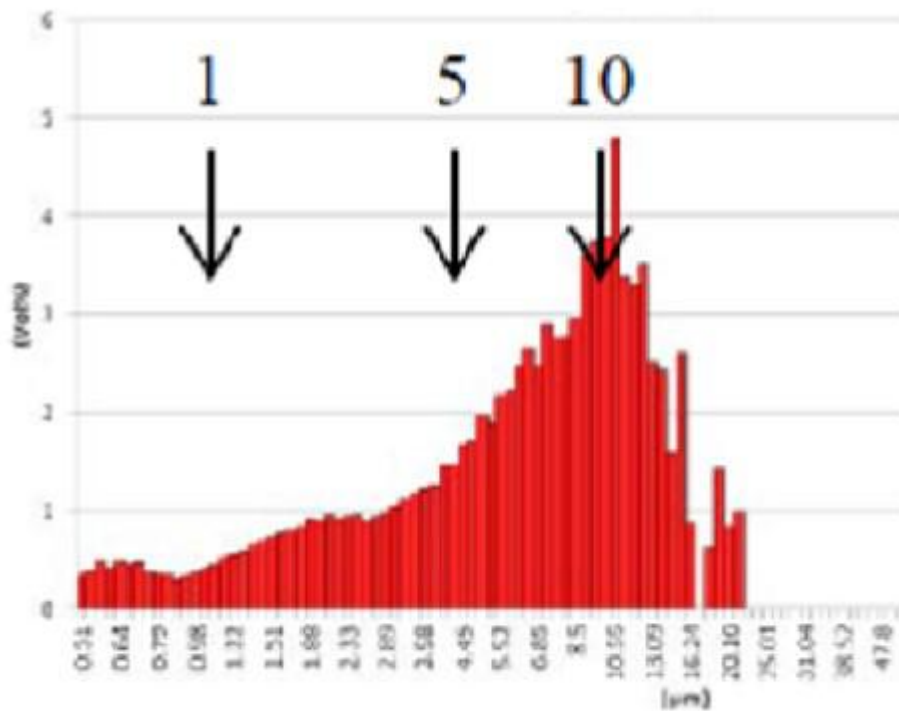


Figure 9: GMV liposome after extrusion through 5 µm filter

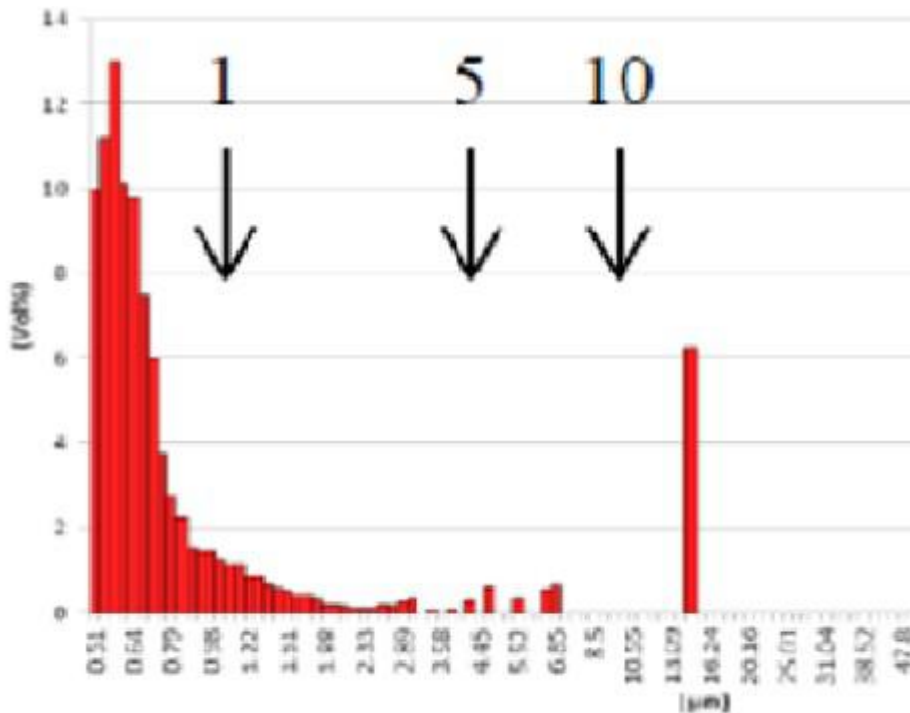


Figure 10: GMV liposome after extrusion through 10 µm filter

阳离子包膜脂质体:

阳离子脂质组成的脂质体 DOTAP (N-[1-(2, 3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-methyl-sulfate) 已被证明是一种阴离子 RNA 和 DNA 核苷酸有效的载体。阳离子脂质体提供优势, 包括高封装核苷酸和高细胞吸收效率对整个阳离子脂质静电电荷影响, 防止诱导血清聚合, 阳离子脂质体与聚乙二醇聚合增加使用寿命和允许在肿瘤组织中积累。

阳离子脂质体于加州大学戴维斯分校 (2) 被创造并研究, 包含的阳离子脂质 DOTAP 封装微小的 RNA。脂质体的大小是至关重要的, 因为这些最终被注入老鼠静脉。因此, 最终的粒径应该不大于 100 纳米左右。阳离子包覆脂质体大小如图 11 所示。

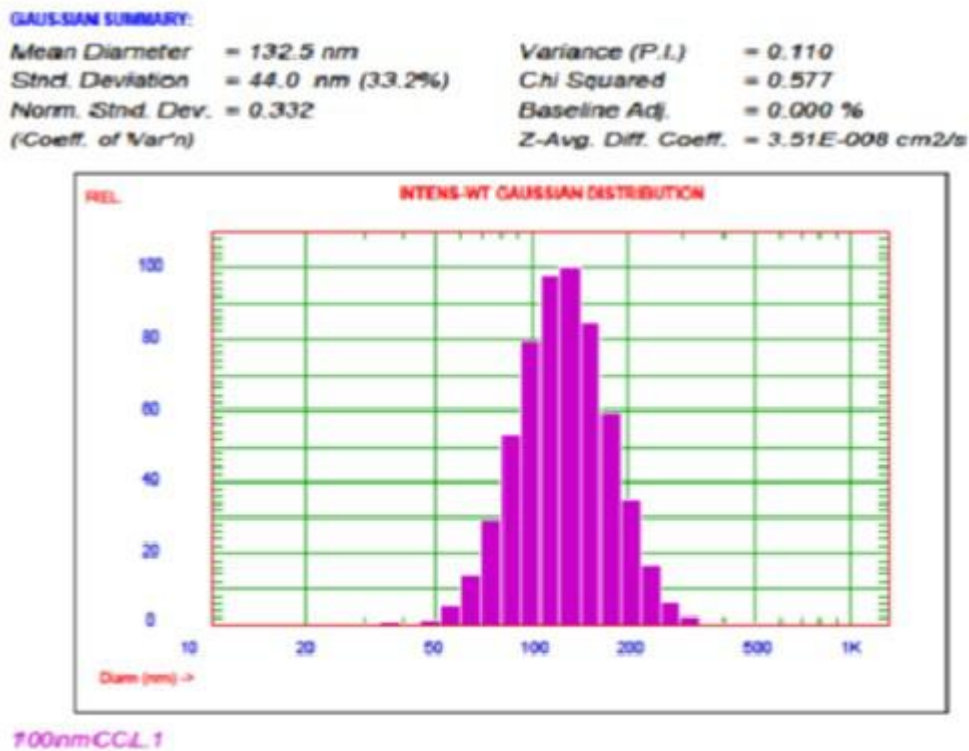


Figure 11: Cationic coated liposome size result

长循环脂质体:

另一个在加州大学戴维斯分校的费拉拉实验室研究的脂质体用 ⁶⁴Cu 标记追踪, 通过正电子断层扫描 (PET), 用于改善头部和颈部肿瘤的可视化。这种脂质体是一个特殊的构成, 一个标准化的 HSPC/cholesterol/DSPE-PEG2K 组合, 创造出一种高稳定, 长期脂质体, 有利于诸多不同的应用程序。在这个配方中 HSPC/cholesterol/DSPEPEG2K 的摩尔比 55.5:39:5.0, 然后使用携带 ⁶⁴Cu 的 6-BATPEG 作为放射标记。⁶⁴Cu 脂质体会在各种癌症中积累, 就可以提供一个敏感追踪和纳米疗法生物分布。

^{64}Cu 长循环脂质体的大小如图 12 所示。

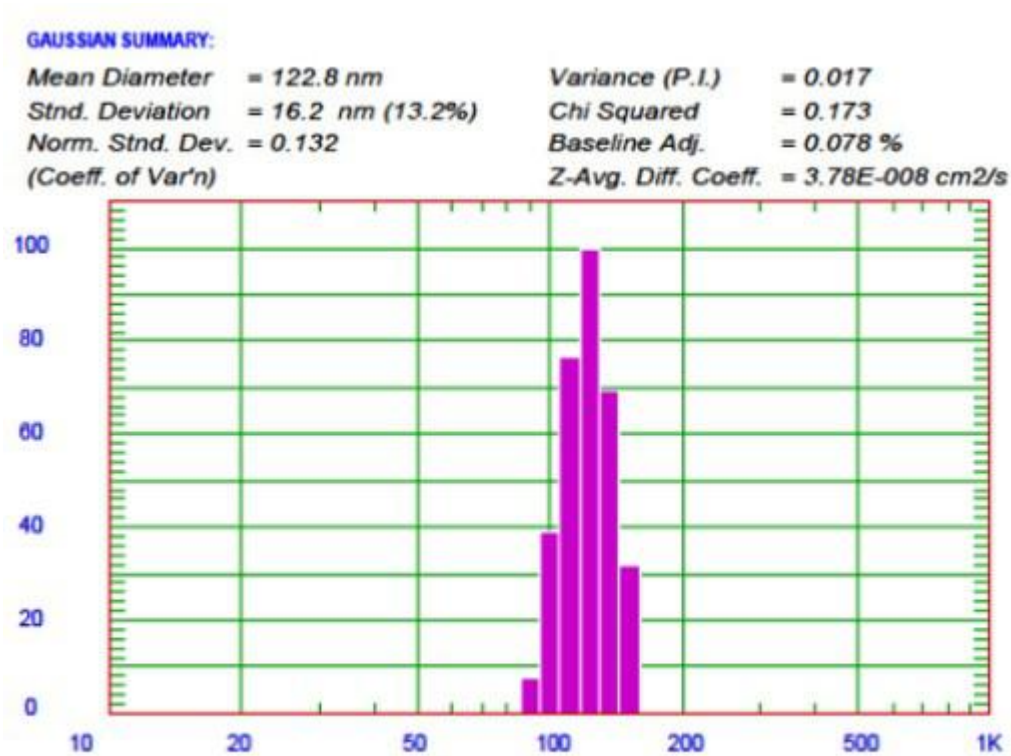


Figure 12: ^{64}Cu labeled LCL liposome size result

热敏脂质体:

此外，热敏脂质体的研究加强了载体在目标处热诱导释放的能力。在一个研究 pH-sensitive 之间复杂的阿霉素(阿霉素)和铜(CuDox) lysolipid-containing 的核心热敏脂质体(LTSLs)成立(4)。这些 DPPC 脂质体是由:DSPE-PEG2k:MPPC(86:4:10 摩尔比), DPPC 是 1, 2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPE-PEG2k 是 1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-Methoxy polyethyleneglycol-2000、MPPC 是 1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine。铜 TEA 茶脂质体(葡萄糖酸铜(II)、三乙醇胺(TEA))从 non-encapsulated 铜中分离了出来茶在脂质体诱导盐梯度膜。MPPC-Copper 茶脂质体的大小如图 13 所示。

GAUSSIAN SUMMARY:

Mean Diameter = 139.3 nm
Std. Deviation = 30.8 nm (22.1%)
Norm. Std. Dev. = 0.221
(Coeff. of Var'n)

Variance (P.I.) = 0.049
Chi Squared = 2.059
Baseline Adj. = 0.000 %
Z-Avg. Diff. Coeff. = 3.34E-008 cm²/s

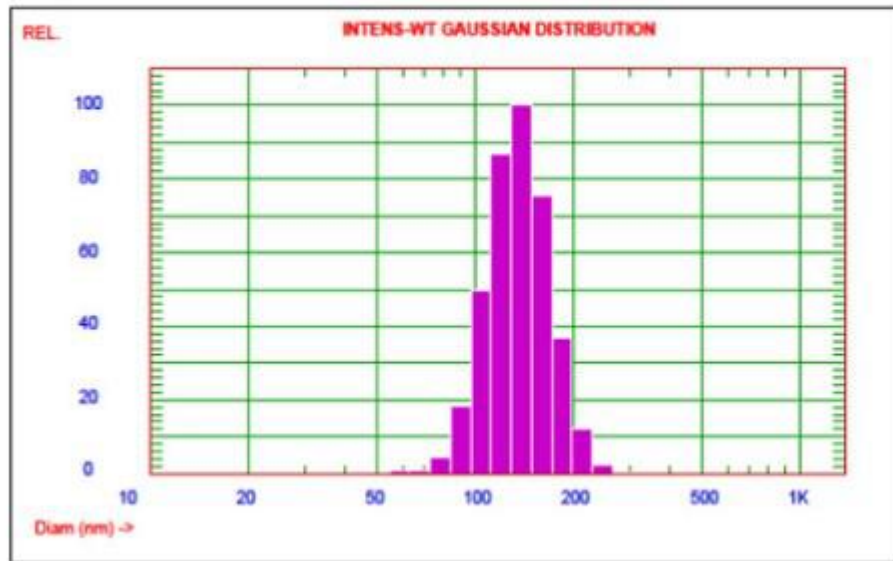


Figure 13: MPPC-Copper TEA liposomes.

一旦脂质体准备好那么它的粒径大小就已经确定，使用阶梯式的茶来装治疗药物阿霉素，阿霉素将进入脂质体作为 TEA 出来。

Zr-89 标记的脂质体的 Zeta 电势电位：

另一个关于 Zr-89 标记脂质体被用于评估长周期脂质体的药物动力学研究已经有段时间（5）。这些放射性的元素隐藏在亲水室内腔，在脂质体的双质分子层或者表面。在这个研究里的脂质体通过使用 Nicomp 系统测量其粒径分布曲线，粒径的范围是在 114-120nm。Nicom 系统同时用相位分析法原理和沉入式样品池进行 Zeta 电位的测量。测量设置包括一个使用一个 12V 的电场通过在电极 0.4 厘米的一个缺口。这些多元的测量结果如图 14 所示。从图中可以看出，测量结果的重复性是非常好的。

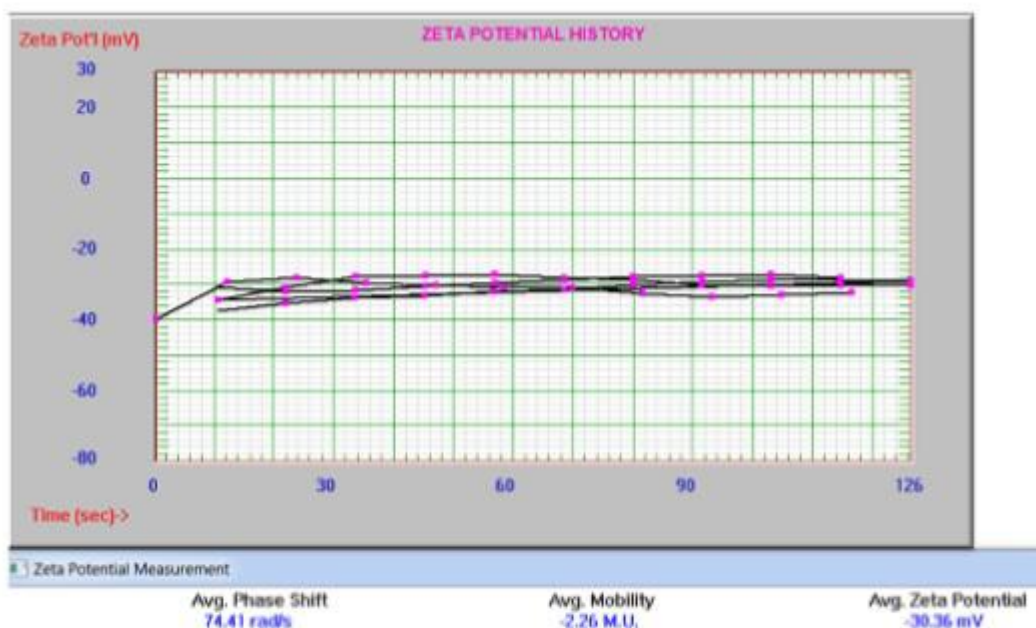


Figure 14: Zeta potential results for NH2-Peg2K liposomes

参考文献:

1. Aoki, N. & Hashimoto, M., Hashimoto Electronic Industry CO. and Yoshimura, T. Liposome Engineering Laboratory, “Measurement of Liposome Size Distribution Using Nicomp 380 and AccuSizer780 AD, presentation, July 2013
2. Thanks to Elizabeth Ingham, Azadeh Kheiolomoom and Jai Seo from the Dr. Katherine Ferrara Lab in the Department of Biomedical Engineering at UC Davis for sharing these data and helping to create this document.
3. Mahakian, L. et.al., Comparison of PET Imaging with ^{64}Cu -Liposomes and ^{18}F -FDG in the 7,12-Dimethylbenz[a] anthracene (DMBA)-Induced Hamster Buccal Pouch Model of Oral Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma, *Mol. Imaging Biol.* (2013)
4. Kheiolomoom, A. et.al., Complete regression of local cancer using temperature-sensitive liposomes combined with ultrasound-mediated hyperthermia, *Journal of Controlled Release*, 172 (2013).
5. Seo, J. et.al., The pharmacokinetics of Zr-89 labeled liposomes over extended periods in a murine tumor model, *Nuclear Medicine and Biology* 42 (2015)