

文章编号:1673-1689(2007)03-0041-05

脂质体空气微泡的制备

朱斌, 许时婴, 夏书芹

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 采用薄膜水化法, 以卵磷脂、胆固醇以及聚乙二醇作为膜材制备包封空气的脂质体微泡, 微泡平均直径 $2.54\mu\text{m}$, 99% 微泡大小分布在 $1\sim 5\mu\text{m}$, 微泡浓度为 2×10^8 个/mL, 脂质体包封空气含量为 $7.01\mu\text{L/mL}$ 。实验研究了超声功率与超声时间, 磷酸盐缓冲溶液 pH 值, 以及糖溶液和聚乙二醇对微泡体系的影响。

关键词: 卵磷脂; 微泡; 聚乙二醇

中图分类号: Q 545.1

文献标识码: A

The Preparation of Liposome-Based Air-Filling Micro-Bubbles

ZHU Bin, XU Shi-ying, XIA Shu-qin

(School of Food Science and Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: An air-filling micro-bubble with lecithin, cholesterol and PEG as shell materials was prepared by thin-film rehydration method. The average diameter was $2.54\mu\text{m}$, size of the 99% microbubbles remained $1\sim 5\mu\text{m}$, and the concentration was $10^8/\text{mL}$. The air content was $7.01\mu\text{L/mL}$. The parameters in the process such as the selection of ultrasound power and time, the effect of the buffer pH value, sugar and PEG on the micro-bubble were investigated in detail.

Key words: lecithin; microbubble; PEG

脂质体可以包封许多生物活性物质, 如辅酶 Q_{10} 、红景天苷、抗癌药、酶, 以及激素等, 脂质体还可以包封气体, 如 SF_6 、空气等^[1], 制备得到包封 SF_6 的脂质体, 或包封空气的脂质体, 这是一种超声造影剂 (Ultrasound contrast agent, UCA), 造影医学上称为“微泡”。它是一类能够显著增强医学超声检测信号的诊断药剂, 在人体微小血管和组织灌注检测与成像方面, 与其他检测方法如 CT (计算机 X 线体层摄影术), MRI (核磁共振成像技术) 等比较, 具有无法比拟的优点^[2]。超声成像基于回波信号的反射强度, 微泡有较强的回波反射性能, 目前

被认为是最好的人体微管内的造影材料。

按膜材料的不同, 微泡造影剂可分为白蛋白类、非离子表面活性剂类、脂质体类和多聚体类^[1]。按包封的气体不同, 可分为空气、氟碳气体、氧气和二氧化碳等。不同类型成膜材料和气体形成的微泡造影剂具有不同的特性和应用价值。目前, 从研究现状来看^[2], 由白蛋白制备的微泡具有无毒、易制备等优点, 但缺点是稳定性较差, 而脂质体作为膜材制备的微泡就能克服这个缺点; 国内外主要研究氟碳气体类微泡, 但氟碳类气体的生物降解性及环境相容性一直没有得到公众的认可, 所以那些易

收稿日期: 2006-05-09.

作者简介: 朱斌 (1982-), 男, 江苏苏州人, 食品科学硕士研究生. Email: michael19820220@sina.com

扩散、但人体完全能够接受的相对分子质量较小的空气仍是可选择的一种气体材料。另外已面市的国外产品声诺维(SonoVue)价格十分昂贵,因此研制包封空气微泡造影剂具有非常重要的理论意义和实用价值,不仅降低成本,而且大大增加人体的安全性。

本文确定了评价微泡性质的主要指标(平均粒径、浓度和半衰期),并在此基础上对微泡制备的工艺参数进行了评价。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

卵磷脂:华东师范大学化工厂生产;生化试剂:NaCl,磷酸氢二钠,磷酸二氢钾,胆固醇,无水乙醚,葡萄糖:国药集团化学试剂有限公司产品;聚乙二醇系列表面活性剂:宜兴胜天精细化工厂产品;六氟化硫气体:空气化工产品上海有限公司产品。

ZX98-1型旋转蒸发器:上海仪表电机厂生产;光学显微镜:BT1600颗粒分析仪,丹东市百特仪器有限公司生产,VCX50型超声处理器:Sonics & Materials, Inc. 产品;血球计数板;气相色谱质谱联用仪 TRACE MS;美国 Finnigan 色谱公司生产。

1.2 方法

1.2.1 微泡的制备 采用薄膜-水化法^[3]制备超声微泡。将卵磷脂与胆固醇(4:1)放入30 mL广口瓶中,逐滴加入乙醚直至完全溶解,用旋转蒸发器挥发溶剂乙醚,使在烧瓶内壁形成一层透明的脂质体薄膜。残余的乙醚置于干燥器中挥发完毕。在烧瓶中加入20 mL pH 7.4的磷酸盐缓冲液(聚乙二醇(10:1)溶于其中),在45℃水化1~2 h,形成白色乳状液。用探头式超声仪进行超声处理,然后放置在室温的水浴中冷却3 min,最终形成乳状液。

1.2.2 图象采集和分析 采用BT1600图像颗粒分析仪采集由显微镜传进计算机的显微图像;采用BT1600图像颗粒分析软件对大量微泡进行分析,得到微泡的平均直径和粒径分布。

1.2.3 微泡浓度的测定 制成的微泡溶液用pH 7.4的磷酸盐缓冲液稀释100倍,在光学显微镜下用血球计数板测定得到每mL溶液中微泡数量。

1.2.4 微泡半衰期的测定 微泡半衰期可用下列公式计算^[4]:

$$t_{1/2} = \frac{t \ln 2}{\ln(N_1/N_2)}$$

式中 t 表示检测间隔时间,实验中取 $t=6-1=5$ h;

N_1 及 N_2 分别为微泡制备后静置1 h及6 h后测定的微泡浓度。

1.2.5 微泡中气体含量的测定 将六氟化硫代替空气,制备六氟化硫微泡,用气相色谱质谱联用法^[5]测定气体含量。用微量注射器分别吸取5、10、20、30 μ L六氟化硫气体进样,用气相色谱质谱联用仪检测,得到相应的响应面积,绘制六氟化硫标准曲线。量取5 mL包封六氟化硫微泡溶液注入15 mL的顶空进样瓶中,置于80℃水浴中加热10 min,用微量注射器吸取1 mL气体进样,测定响应值,由标准曲线得到脂质体所包封的六氟化硫气体含量。

2 结果与讨论

2.1 微泡的颗粒大小及其分布

微泡溶液是一种泡沫体系,在静置一段时间后,微泡会发生聚集,导致分层。需要剧烈振摇一下,仍然能形成均一的乳状液,微泡的大小和浓度均不会发生变化。图1为用薄膜水化法制备的空气微泡,图2为稀释100倍后的空气微泡。

目前用各种方法制备出的微泡均有一定的大小分布,微泡大小分布对于实现其造影功能来说是至关重要的。超声回波信号的反射强度与微泡直径的 $1/6$ 成正比^[6],因此直径小于微米级的微泡也不适宜作为UCA,此外直径超过 $6 \mu\text{m}$ 的微泡由于不能通过肺部微循环系统,不能用于左心室造影,也不能用于人体微管的造影;在微泡尺寸大小符合要求后,浓度也需要在 10^7 个/mL以上,才能达到很好的造影效果。如图3所示,微泡的平均直径为 $2.54 \mu\text{m}$,99%直径分布在 $1\sim 5 \mu\text{m}$,微泡的数量浓度为 2×10^8 个/mL,半衰期为1 h左右,可以满足人体微管造影的要求。

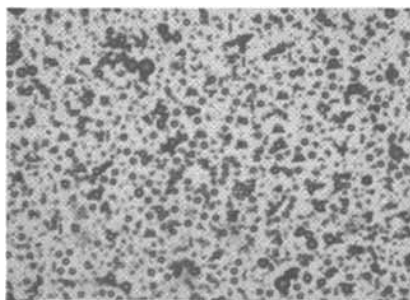


图1 未经稀释的微泡体系(400×)

Fig. 1 Micrograph of microbubbles without dilution (400×)

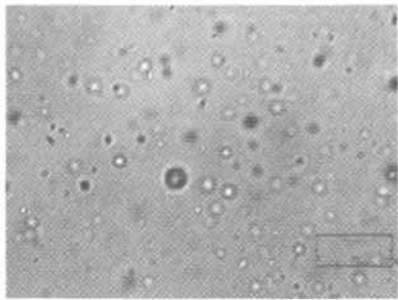


图 2 稀释 100 倍后的微泡体系($\times 400$)
Fig. 2 Micrograph of diluted microbubbles($\times 400$)

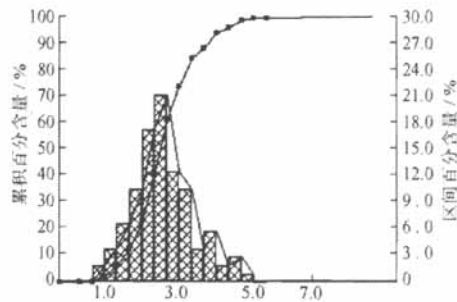


图 3 微泡粒径分布图
Fig. 3 Particle size distribution of microbubbles

2.2 稀释液对微泡计数的影响

在测定微泡浓度的时候,需要选择适当的稀释液,才能如实的反映微泡浓度。分别采用去离子水、生理盐水、5%葡萄糖溶液和 pH 7.4 磷酸缓冲液对同一微泡体系进行稀释,然后置于显微镜下测量微泡浓度。

由不同的稀释液测得微泡浓度的大小排列顺序为 pH7.4 磷酸缓冲液>5 g/dL 葡萄糖溶液>生理盐水>去离子水。这一实验结果表明,在对微泡超声造影剂进行稀释使用时,需要考虑稀释液对微泡的渗透压、溶液离子强度的影响。当直接采用去离子水作为稀释液时,由于内外压力差,微泡会发生破裂、发生聚合而使微泡数量急剧减少。生理盐水增加了溶液的离子强度,电解质作用影响微泡体系的电荷分布,减少微泡的聚合;5 g/dL 葡萄糖溶液则满足了微泡对渗透压的需要,使微泡不至于由于内部压力过大而发生破裂。而且糖溶液的黏度较大,局部限制了微泡的热运动,因此稀释效果优于生理盐水。而 pH 7.4 磷酸缓冲液既满足了溶液对离子强度的要求,也平衡了渗透压,是最有效的稀释液。因此选择 pH 7.4 磷酸缓冲液作为稀释液。

2.3 脂质体微泡中气体含量的测定

由于空气成分复杂,而且很难被检测,因此无

法直接测定微泡中包封的空气含量,采用六氟化硫气体代替空气,制备六氟化硫微泡模拟体系,通过测定微泡中六氟化硫的含量,从而推测微泡中空气含量。

图 4 为测定六氟化硫气体含量的标准曲线,由此曲线就可以确定未知样品中的气体含量。

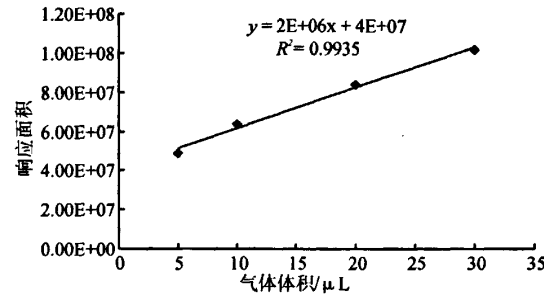


图 4 SF₆ 气体标准曲线
Fig. 4 Standard curve of SF₆

从图 5 可见,当卵磷脂与聚乙二醇之比为 10 : 1 时,微泡包封的气体含量最高,达到 7.01 μL/mL。由此推测,虽然空气的扩散率很高,很容易从微泡中向溶液扩散,但是由于形成的水化膜比较牢固,将空气包封在脂质体中,能形成较稳定的包封空气的脂质体微泡。

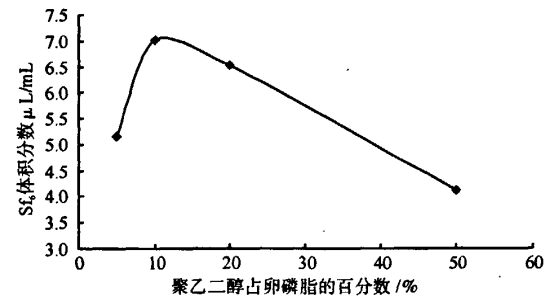


图 5 聚乙二醇对脂质体微泡中 SF₆ 含量的影响
Fig. 5 Effect of PEG content on microbubbles SF₆ level

2.4 超声功率和时间对微泡性质的影响

采用相同的膜材料(卵磷脂+胆固醇(4 : 1)+聚乙二醇(10 : 1))和溶液(20 mL),研究不同的超声功率和时间对微泡性质的影响,结果如表 1 所示。

超声的作用原理是将大颗粒的脂质体破碎,在此同时,通过超声的空化效应将空气包裹。超声功率越高,经声振处理的起泡性越好,这就使空气与脂质体能很好的接触,将空气包封。而低功率处理时形成的泡沫较少,可能只是将脂质体打碎成小颗粒,无法使脂质体与空气充分接触,将空气包封在脂质体中,因此低功率的处理,不会形成太多的包封空气的微泡,只是小颗粒的脂质体。

表 1 超声功率和超声时间对微泡大小和浓度的影响

Tab.1 Effect of ultrasound exposure conditions on the size and concentration of microbubbles

时间	功率 20%		功率 50%		功率 100%	
	平均 直径/ μm	浓度/ (个/mL)	平均 直径/ μm	浓度/ (个/mL)	平均 直径/ μm	浓度/ (个/mL)
30 s	2.25	1.25×10^8	1.25	6.25×10^7	2.54	2×10^8
1 min	1.50	8.75×10^7	1.12	7×10^6	2.02	1×10^8
3 min	1.05	1.0×10^7	0.98	5×10^6	1.52	5×10^7

只有当微泡平均直径为 2~4 μm ,才能有很好的造影效果^[7],因此选择最佳的超声功率为 100%,声振时间为 30 s。此外超声功率作用时间与微泡大小成反比关系,声振时间越长,微泡直径就越小。

2.5 缓冲液 pH 值对微泡性质的影响

由图 6 可知,不同的 pH 对制备得到的微泡浓度有很大关系。当 $\text{pH}\geq 9$ 时,卵磷脂因疏水相互作用而聚集形成絮状沉淀,使得水化时不能形成均匀膜溶液,而使微泡数量急剧减少,甚至不能形成微泡。

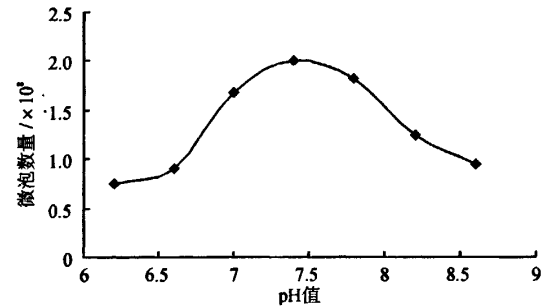


图 6 pH 值对微泡浓度的影响

Fig. 6 Effect of pH value on the concentration of microbubbles

最佳 pH 为 7.4,微泡数量最高,但 pH 值对微泡大小没有明显的影响。

2.6 葡萄糖溶液对微泡性质的影响

由表 2 可以看出,随着糖质量分数的增加,微泡大小和浓度逐渐降低,黏度和半衰期明显增加。继续提高葡萄糖质量分数时,微泡的半衰期还会继续延长。其原因可能在于糖质量分数的增加也使得体系的粘性增加,从而阻止了微泡之间的聚集、聚合。

在加入葡萄糖之后,微泡体系在静置一段时间后,依然会发生分层。可能是由于糖与卵磷脂亲水头部发生氢键结合,形成疏松的絮状聚集集体。另外,葡萄糖的增加也增大了溶液的密度,使磷脂微泡上浮。

表 2 葡萄糖质量分数对微泡性质的影响

Tab.2 Influences of glucose content on the properties of microbubbles

葡萄糖 质量分数/%	平均粒径 d/ μm	浓度/ (个/mL)	黏度 η / ($\text{mPa}\cdot\text{s}$)	半衰 期/h
0	2.54	2×10^8	0.807 7	1
5	2.46	1.85×10^8	0.890 7	1.99
10	2.32	1×10^8	0.977 1	3.17
20	2.27	9.5×10^7	1.216 5	7.16
30	2.08	8.75×10^7	1.470 5	14.88
40	1.94	8×10^7	1.824 9	24.69

2.7 聚乙二醇(PEG)对微泡性质的影响

PEG 的疏水部分有利于将分子插入或吸附至脂质体膜,而亲水性部分则伸展于脂质体膜表面,延伸到水相中,在微泡表面形成水化膜保护层,从而提高脂膜亲水性并造成空间位阻,增强稳定性,这种作用随 PEG 相对分子质量增加而增加^[8]。

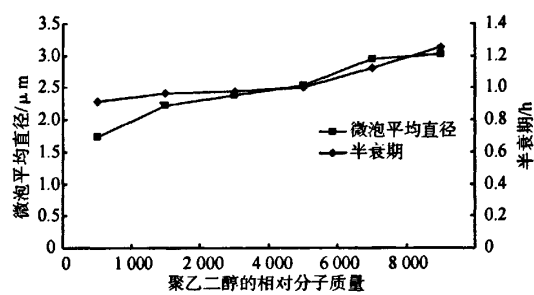


图 7 不同相对分子质量的聚乙二醇对微泡性质的影响

Fig. 7 Effect of PEG molecular weight on the properties of microbubbles

由图 7 所示,微泡大小随着 PEG 相对分子质量的增加而增大,说明水化膜变得越来越厚,形成的空间位阻也越强,半衰期也随着 PEG 相对分子质量的增加而延长,这也说明了对微泡的保护效果也越好。水化膜保护层的形成提高了微泡的亲水性,增加了微泡在极性溶剂中的稳定性。

3 结 论

采用卵磷脂、胆固醇和聚乙二醇为膜材,通过薄膜水化法制备得到的脂质体空气微泡,微泡大小分布较为集中,99%的微泡直径分布在 $1\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m}$,平均直径为 $2.54\ \mu\text{m}$,半衰期为1 h左右,包封空气含量为 $7.01\ \mu\text{L}/\text{mL}$,适合于人体微血管超声

造影。PEG的亲水性可使脂质体表面形成水化膜,同时PEG的长链起了空间稳定作用,这种作用随PEG相对分子质量增加而增加。

除了液膜之外,微泡的稳定同时受泡内气体的影响^[7,9]。空气的弥散度很大,在血液中很快扩散而使微泡变小,应该对微泡的稳定性进行进一步的研究,以期得到稳定的包封空气的脂质体微泡。

参考文献(References):

- [1] 张雪娇,程水清,王小荣,等. 包膜微泡超声造影剂的研究进展[J]. 中国医学影像技术,2005,21(5):819—891
ZHANG Xue-jiao, CHENG Yong-qing, WANG Xiao-rong. Progress of encapsulated microbubbles ultrasound contrast agent[J]. *Chin J Med Imaging Technol*, 2005, 21(5): 819—891. (in Chinese)
- [2] Goldberg BB. Ultrasound Contrast Agents[M]. London: Martin Dunitz Ltd (United Kingdom), 1997. 1—7.
- [3] Matthew J. Hasik, Dennis H. Kim, Laurens E. Howle, David Needham, Donald P. Prush. Evaluation of synthetic phospholipids ultrasound contrast agents[J]. *Ultrasound*, 2002, 40, 973—982.
- [4] Luo ZN, Huang XC, Chen YL, et al. Experiment study of left-side contrast echocardiography by peripheral venous injection of sonicated agents[J]. *Chin Ultrasound Med (in Chinese)*, 1995, 11(5): 378—379.
- [5] 刘世霆,单友亮,侯连兵,等. 全氟丙烷人血白蛋白微球中全氟丙烷的含量测定[J]. 中国药房,2003,14(5):263—264.
LIU Shi-ting, SHAN You-liang, HOU Lian-bing, et al. Determination of the Content of C3F8 in Human Albumin Microspheres Fill ing - with C3F8[J]. *China Pharmacy*, 2003, 14(5): 263—264. (in Chinese)
- [6] Alexander L, Klibanov. Targeted delivery of gas-filled microspheres, contrast agents for ultrasound imaging [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999, 37: 139—157.
- [7] Susan Mayer, Paul A. Grayburn. Myocardial Contrast Agent; Recent Advances and Future Directions[J]. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 2001, 40(1): 33—44.
- [8] 丁劲松,杨敏,陈琼. 聚乙二醇衍生化磷脂与脂质体立体稳定性[J]. 中国医药工业杂志,2004,35(1): 55—58.
DING Jing-song, YANG Min, CHEN Qiong. Polyethylene glycol-phospholipid and liposomes stereo-stability[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2004, 35(1): 55—58. (in Chinese)
- [9] Ajit Raisinghani, Anthony N, DeMaria. Physical Principles of Microbubble Ultrasound Contrast Agents[J]. *Am J Cardiol*, 2002;90(suppl):31—71.

(责任编辑:杨萌)