



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106345542 A

(43)申请公布日 2017.01.25

(21)申请号 201610784470.0

(22)申请日 2016.08.30

(71)申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

(72)发明人 成玉莹 陈剑 徐宇虹 李真珍

(74)专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 李艳 许亦琳

(51)Int.Cl.

B01L 3/00(2006.01)

A61K 9/127(2006.01)

B82Y 40/00(2011.01)

权利要求书2页 说明书16页 附图1页

(54)发明名称

一种用于复乳法制备脂质体的微流控芯片及其制作方法

(57)摘要

本发明属于生物医学技术领域,具体涉及一种用于复乳法制备脂质体的微流控芯片及其制作方法。本发明的复乳制备芯片,包括:用于内水相与中间相混合的第一混合部和W/O乳剂形成腔道,所述W/O乳剂形成腔道的高度大于第一混合部的高度,不用再特别控制中间相和内水相的流速,而直接控制第一混合部和W/O乳剂形成腔道的高度,即可获得不同粒径大小的脂质体,当将第一混合部和W/O乳剂形成腔道的高度控制在合适的范围内时,即可获得粒径大小在纳米级别的脂质体。并且,采用所述复乳制备芯片能够得到粒径均匀,包封率高的脂质体的同时,又便于加工制备,具有较好的经济性和实用性。

1. 一种复乳制备芯片,包括:用于内水相与中间相混合的第一混合部,所述第一混合部的进液口通过内水相管道与内水相进样部的出液口连通,所述第一混合部的进液口还通过中间相管道与中间相进样部的出液口连通;所述复乳制备芯片还包括:用于W/O乳剂与外水相混合的第二混合部,所述第二混合部的进液口通过W/O乳剂形成腔道与第一混合部2的出液口连通,所述第二混合部的进液口还通过外水相通道与外水相进样部的出液口连通;所述第二混合部的出液口通过W/O/W乳剂形成腔道与复乳收集部连通;所述W/O乳剂形成腔道的高度大于所述第一混合部的高度。

2. 根据权利要求1所述的复乳制备芯片,其特征在于,所述W/O乳剂形成腔道与所述第一混合部的高度比值大于等于8。

3. 根据权利要求1所述的复乳制备芯片,其特征在于,所述W/O乳剂形成腔道与所述第一混合部的宽度比值大于等于8。

4. 根据权利要求1所述的复乳制备芯片,其特征在于,所述第一混合部的宽度与高度比值大于等于8。

5. 根据权利要求1所述的复乳制备芯片,其特征在于,所述第一混合部和第二混合部呈十字结构。

6. 根据权利要求1所述的复乳制备芯片,其特征在于,所述中间相管道可包括第一分管道、第二分管道和第三分管道,第二分管道和第三分管道并联形成并联分管道,所述第一分管道的进液口与中间相进液部的出液口连通,所述第一分管道的出液口与所述并联分管道的进液口连通,所述并联分管道的出液口与第一混合部的进液口连通。

7. 根据权利要求1所述的复乳制备芯片,其特征在于,所述外水相管道可包括第一分管道、第二分管道和第三分管道,第二分管道和第三分管道并联形成并联分管道,所述第一分管道的进液口与外水相进液部的出液口连通,所述第一分管道的出液口与所述并联分管道的进液口连通,所述并联分管道的出液口与第二混合部的进液口连通。

8. 根据权利要求1所述的复乳制备芯片,其特征在于,所述复乳制备芯片还设有用于过滤杂质的过滤结构。

9. 根据权利要求8所述的复乳制备芯片,其特征在于,所述过滤结构包括多个呈微阵列排布的矩形微柱。

10. 根据权利要求8所述的复乳制备芯片,其特征在于,所述内水相进样部的出液口通过所述过滤结构与内水相管道的进液口连通;所述中间相进样部的出液口通过所述过滤结构与中间相管道的进液口连通;所述外水相进样部的出液口通过所述过滤结构与外水相管道的进液口连通。

11. 如权利要求1~10任一项所述复乳制备芯片的制备方法,包括:

(1) 将所述复乳制备芯片的微通道结构转移到菲林掩膜版上,分为第一层掩膜版和第二层掩膜版;其中,第一层包括过滤结构和第一混合部;第二层包括外水相管道、中间相管道、内水相管道、W/O乳剂形成腔道、外水相进样部、中间相进样部、内水相进样部、第二混合部、W/O/W乳剂形成腔道、复乳收集部;

(2) 进行第一层光刻,控制第一层的高度,得第一层光刻后的模板;

(3) 将经过第一层光刻后的模板,进行第二层光刻,控制第二层的高度,得第二层光刻后的模板;

- (4)以经第二层光刻后的模板作为浇筑模具,制备PDMS芯片;
- (5)将PDMS芯片和载波片键合,并进行亲水处理,获得用于制备W/O/W复乳的微流控芯片。
- 12.如权利要求1~10任一项所述复乳制备芯片用于制备脂质体的用途。
- 13.采用如权利要求1~10任一项所述复乳制备芯片制备脂质体的方法,包括:
- (1)配置三相溶液:将脂质材料溶解于油相中,形成中间相;并分别配置内水相和外水相;
- (2)分别将外水相、中间相、内水相液体泵入前述复乳制备芯片的外水相进样部、中间相进样部和内水相进样部,在复乳收集部收集W/O/W复乳;
- (3)将收集的W/O/W复乳去除有机溶剂,即得到脂质体。
- 14.根据权利要求13所述的方法,其特征在于,所述内水相的流速范围是0.01纳升每秒到100纳升每秒。
- 15.根据权利要求13所述的方法,其特征在于,所述中间相的流速范围是0.01纳升每秒到1微升每秒。
- 16.根据权利要求13所述的方法,其特征在于,所述外水相的流速范围是0.1纳升每秒到10微升每秒。

一种用于复乳法制备脂质体的微流控芯片及其制作方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,具体涉及一种用于复乳法制备脂质体的微流控芯片及其制作方法。

背景技术

[0002] 脂质体(liposome)是一种类似生物膜结构的人工载体。磷脂分子具有油水两亲性,在水中以亲水端向外,疏水端向内,形成具有双分子层膜的球形囊泡,直径从几十纳米到几十微米不等。脂质体可用于药物载体,装载包括化学药物、基因药物和蛋白质等,实现缓释、靶向或者提高药物稳定性的目的。传统脂质体制备方法例如薄膜分散法、乙醇注入法等对水溶性药物包封率非常低,复乳法、逆相蒸发法等虽然能够提高包封率,

[0003] 但可控性差,难以重复,例如:得到的脂质体粒径不均匀,形态难以控制,且重复制备的结果偏差较大,并且传统方法制备脂质体所需的反应物或者试剂用量比较多,这会造成原材料的浪费,尤其是当材料比较昂贵时会增加实验的成本,给脂质体的实际应用带来许多困难。

[0004] 如何通过新的制备方法提高脂质体对水溶性药物的包封率是发展脂质体制剂亟待解决的问题。

[0005] 微流控芯片的问世为脂质体的制备提供了新的途径。微流控芯片技术(Microfluidics)是把生物、化学、医学分析过程的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成到一块微米尺度的芯片上,自动完成分析全过程。由于它在生物、化学、医学等领域的巨大潜力,已经发展成为一个生物、化学、医学、流体、电子、材料、机械等学科交叉的崭新研究领域。

[0006] 现有的芯片设计局限于制备微米尺度的颗粒,尚不能满足纳米药物载体的尺寸要求。因此在保证通过复乳法制备脂质体得到W/O/W乳剂的前提下,为了得到小粒径的脂质体,需要对现有的微流控结构进行创新设计,使之能够得到制备出纳米级别脂质体的同时,又便于加工制备,具有较好的经济性和实用性。

发明内容

[0007] 为了克服现有技术中所存在的问题,本发明的目的在于提供一种用于复乳法制备脂质体的微流控芯片及其制作方法。

[0008] 为了实现上述目的以及其他相关目的,本发明采用如下技术方案:

[0009] 本发明的第一方面,提供了一种复乳制备芯片,包括:用于内水相与中间相混合的第一混合部,所述第一混合部的进液口通过内水相管道与内水相进样部的出液口连通,所述第一混合部的进液口还通过中间相管道与中间相进样部的出液口连通;所述复乳制备芯片还包括:用于W/O乳剂与外水相混合的第二混合部,所述第二混合部的进液口通过W/O乳剂形成腔道与第一混合部2的出液口连通,所述第二混合部的进液口还通过外水相通道与外水相进样部的出液口连通;所述第二混合部的出液口通过W/O/W乳剂形成腔道与复乳收

集部连通;所述W/O乳剂形成腔道的高度大于所述第一混合部的高度。

[0010] 优选地,所述W/O乳剂形成腔道与所述第一混合部的高度比值大于等于8。进一步地,所述W/O乳剂形成腔道与所述第一混合部的高度比值大于等于10。进一步地,所述W/O乳剂形成腔道与所述第一混合部的高度比值小于等于20。

[0011] 优选地,所述W/O乳剂形成腔道与所述第一混合部的宽度比值大于等于8。进一步地,所述W/O乳剂形成腔道与所述第一混合部的宽度比值大于等于10。进一步地,所述W/O乳剂形成腔道与所述第一混合部的宽度比值小于等于20。

[0012] 优选地,所述第一混合部的宽度与高度比值大于等于8。所述第一混合部的宽度与高度比值大于等于10。所述第一混合部的宽度与高度比值小于等于20。

[0013] 优选地,所述第一混合部和第二混合部可呈十字结构。

[0014] 优选地,所述中间相管道可包括第一分通道、第二分管道和第三分管道,第二分管道和第三分管道并联形成并联分管道,所述第一分管道的进液口与中间相进液部的出液口连通,所述第一分管道的出液口与所述并联分管道的进液口连通,所述并联分管道的出液口与第一混合部的进液口连通。

[0015] 优选地,所述外水相管道可包括第一分通道、第二分管道和第三分管道,第二分管道和第三分管道并联形成并联分管道,所述第一分管道的进液口与外水相进液部的出液口连通,所述第一分管道的出液口与所述并联分管道的进液口连通,所述并联分管道的出液口与第二混合部的进液口连通。

[0016] 优选地,所述复乳制备芯片还设有用于过滤杂质的过滤结构。

[0017] 所述过滤结构可以包括多个呈微阵列排布的矩形微柱。

[0018] 所述内水相进样部的出液口通过所述过滤结构与内水相管道的进液口连通。

[0019] 所述中间相进样部的出液口通过所述过滤结构与中间相管道的进液口连通。

[0020] 所述外水相进样部的出液口通过所述过滤结构与外水相管道的进液口连通。

[0021] 本发明的第二方面,提供前述复乳制备芯片的制备方法,可包括如下步骤:

[0022] (1)将所述复乳制备芯片的微通道结构转移到菲林掩膜版上,分为第一层掩膜版和第二层掩膜版;其中,第一层包括过滤结构和第一混合部;第二层包括外水相管道、中间相管道、内水相管道、W/O乳剂形成腔道、外水相进样部、中间相进样部、内水相进样部、第二混合部、W/O/W乳剂形成腔道、复乳收集部;

[0023] (2)进行第一层光刻,控制第一层的高度,得第一层光刻后的模板;

[0024] (3)将经过第一层光刻后的模板,进行第二层光刻,控制第二层的高度,得第二层光刻后的模板;

[0025] (4)以经第二层光刻后的模板作为浇筑模具,制备PDMS芯片;

[0026] (5)将PDMS芯片和载波片键合,并进行亲水处理,获得用于制备W/O/W复乳的微流控芯片。

[0027] 优选地,步骤(2)中,可包括步骤:在硅基片表面涂正性光刻胶,使用第一层掩膜版,光刻机曝光处理,对经过曝光后的正性光刻胶显影,得所需的光刻胶图形;将第一层光刻后的硅片通过干法刻蚀,控制第一层的高度,去胶,得第一层光刻后的模板。

[0028] 优选地,步骤(3)中,可包括步骤:在经过第一层光刻后的模板的硅基片表面涂负胶SU-8,控制第二层的高度,使用第二层掩膜版,光刻机曝光处理,对经过曝光后的负胶SU-

8进行显影,得所需最终光刻胶图形,得第二层光刻后的模板。

[0029] 优选地,步骤(5)中,亲水处理时,在内水相管道和中间相管道中注入水,在外水相管道中注入PVA水溶液,使三相溶液在管道中流通30min~1h后,烘干。

[0030] 优选地,所述PVA水溶液的浓度可以是50mg/ml。

[0031] 本发明的第三方面,提供了前述复乳制备芯片用于制备脂质体的用途。

[0032] 本发明的第四方面,提供了采用前述复乳制备芯片制备脂质体的方法,包括:

[0033] (1)配置三相溶液:将脂质材料溶解于油相中,形成中间相;并分别配置内水相和外水相;

[0034] (2)分别将外水相、中间相、内水相液体泵入前述复乳制备芯片的外水相进样部、中间相进样部和内水相进样部,在复乳收集部收集W/O/W复乳;

[0035] (3)将收集的W/O/W复乳去除有机溶剂,即得到脂质体。

[0036] 优选地,所述内水相的流速范围是0.01纳升每秒到100纳升每秒。

[0037] 优选地,所述中间相的流速范围是0.01纳升每秒到1微升每秒。

[0038] 优选地,所述外水相的流速范围是0.1纳升每秒到10微升每秒。

[0039] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0040] 本发明的复乳制备芯片,W/O乳剂形成腔道的高度大于第一混合部的高度,不用再特别控制中间相和内水相的流速,而直接控制第一混合部和W/O乳剂形成腔道的高度,即可获得不同粒径大小的脂质体,当将第一混合部和W/O乳剂形成腔道的高度控制在合适的范围内时,即可获得粒径大小在纳米级别的脂质体。并且,使之能够得到制备出粒径均匀,封装率高的脂质体的同时,又便于加工制备,具有较好的经济性和实用性。

附图说明

[0041] 图1:本发明所提供的用于制备W/O/W复乳的微流控芯片结构示意图。

具体实施方式

[0042] 复乳制备芯片

[0043] 现有技术中,制备脂质体时所采用的微流控芯片,是基于两步flow-focusing(流动聚集)原理并且通过控制微流控芯片的管道宽度得到理想大小的脂质体。但是芯片的制作工艺受微通道结构和尺寸的限制,宽度过小,对微流控芯片配套的微细加工技术提出了新的严峻挑战,因此基于此种原理的芯片设计局限于制备微米尺度的颗粒,尚不能满足纳米药物载体的尺寸要求。

[0044] 因此,本发明设计了一种复乳制备芯片,为用于制备W/O/W复乳的微流控芯片,采用限定所述芯片的高度而不是宽度的方法就能够控制所制得复乳的粒径。

[0045] 具体地,所述复乳制备芯片,包括:用于内水相与中间相混合的第一混合部2,所述第一混合部2的进液口通过内水相管道5与内水相进样部9的出液口连通,所述第一混合部2的进液口还通过中间相管道4与中间相进样部8的出液口连通;所述复乳制备芯片还包括:用于W/O乳剂与外水相混合的第二混合部10,所述第二混合部10的进液口通过W/O乳剂形成腔道6与第一混合部2的出液口连通,所述第二混合部10的进液口还通过外水相通道3与外水相进样部7的出液口连通;所述第二混合部10的出液口通过W/O/W乳剂形成腔道11与复乳

收集部12连通;所述W/O乳剂形成腔道6的高度大于所述第一混合部2的高度。

[0046] 当所述W/O乳剂形成腔道6的高度大于所述第一混合部2的高度时,能够使得内水相与中间相在第一混合部2混合时,并不形成W/O乳剂,而是在第一混合部2和W/O乳剂形成腔道6的边界处才开始形成W/O乳剂。内水相与中间相混合相由浅的第一混合部2突然进入深的W/O乳剂形成腔道6,基于step-emulsification原理被剪切为W/O乳剂。此外,所形成的W/O乳剂液滴的大小可以直接由第一混合部2的高度控制,不用再特别控制中间相和内水相的流速。

[0047] 所述W/O乳剂形成腔道6与所述第一混合部2的高度比值可以大于等于8。所述W/O乳剂形成腔道6与所述第一混合部2的高度比值可以大于等于10。进一步地,所述W/O乳剂形成腔道6与所述第一混合部2的高度比值可以小于等于20。

[0048] 所述W/O乳剂形成腔道6与所述第一混合部2的宽度比值可以大于等于8。所述W/O乳剂形成腔道6与所述第一混合部2的宽度比值可以大于等于10。所述W/O乳剂形成腔道6与所述第一混合部2的宽度比值可以小于等于20。

[0049] 所述第一混合部2的宽度与高度比值可以大于等于8。所述第一混合部2的宽度与高度比值可以大于等于10。所述第一混合部的宽度与高度比值可以小于等于20。

[0050] 所述第一混合部2和第二混合部10可呈十字结构。

[0051] 优选地,所述中间相管道4可包括第一分通道、第二分管道和第三分管道,第二分管道和第三分管道并联形成并联分管道,所述第一分管道的进液口与中间相进液部8的出液口连通,所述第一分管道的出液口与所述并联分管道的进液口连通,所述并联分管道的出液口与第一混合部2的进液口连通。

[0052] 优选地,所述外水相管道3可包括第一分通道、第二分管道和第三分管道,第二分管道和第三分管道并联形成并联分管道,所述第一分管道的进液口与外水相进液部7的出液口连通,所述第一分管道的出液口与所述并联分管道的进液口连通,所述并联分管道的出液口与第二混合部10的进液口连通。

[0053] 进一步地,所述复乳制备芯片还设有用于过滤杂质的过滤结构1。所述过滤结构1可以包括呈微阵列排布的矩形微柱。当进样液体中的杂质尺寸大于微柱间隔时,即可被过滤掉。

[0054] 所述内水相进样部9的出液口通过所述过滤结构1与内水相管道5的进液口连通。

[0055] 所述中间相进样部8的出液口通过所述过滤结构1与中间相管道4的进液口连通。

[0056] 所述外水相进样部7的出液口通过所述过滤结构1与外水相管道3的进液口连通。

[0057] 复乳制备芯片的制备方法

[0058] 本发明所述复乳制备芯片的制备方法,可包括如下步骤:

[0059] (1)将所述复乳制备芯片的微通道结构转移到菲林掩膜版上,分为第一层掩膜版和第二层掩膜版;其中,第一层包括过滤结构1和第一混合部2;第二层包括外水相管道3、中间相管道4、内水相管道5、W/O乳剂形成腔道6、外水相进样部7、中间相进样部8、内水相进样部9、第二混合部10、W/O/W乳剂形成腔道11、复乳收集部12;

[0060] (2)进行第一层光刻,控制第一层的高度,得第一层光刻后的模板;

[0061] (3)将经过第一层光刻后的模板,进行第二层光刻,控制第二层的高度,得第二层光刻后的模板;

- [0062] (4)以经第二层光刻后的模板作为浇筑模具,制备PDMS芯片;
- [0063] (5)将PDMS芯片和载波片键合,并进行亲水处理,获得用于制备W/O/W复乳的微流控芯片。
- [0064] 步骤(2)中,可包括步骤:在硅基片表面涂正性光刻胶,使用第一层掩膜版,光刻机曝光处理,对经过曝光后的正性光刻胶显影,得所需的光刻胶图形;将第一层光刻后的硅片通过干法刻蚀,控制第一层的高度,去胶,得第一层光刻后的模板。
- [0065] 步骤(3)中,可包括步骤:在经过第一层光刻后的模板的硅基片表面涂负胶SU-8,控制第二层的高度,使用第二层掩膜版,光刻机曝光处理,对经过曝光后的负胶SU-8进行显影,得所需最终光刻胶图形,得第二层光刻后的模板。
- [0066] 步骤(5)中,亲水处理时,在内水相管道5和中间相管道4中注入水,在外水相管道3中注入PVA水溶液,使三相溶液在管道中流通30min~1h后,烘干。
- [0067] 所述PVA水溶液的浓度可以是50mg/ml。
- [0068] 通过测量接触角变化发现采用此种方法对芯片亲水处理效果较好且简单易行。
- [0069] PDMS
- [0070] PDMS是聚二甲基硅氧烷的英文缩写。聚二甲基硅氧烷属于固化型聚合物,固化型聚合物与固化剂混合后,经过一段时间可固化变硬得到一定结构的微流控芯片。聚二甲基硅氧烷表面疏水性很强,难以形成W/O/W复乳。因此,需要对其进行亲水化处理。
- [0071] 根据微流控芯片的加工过程,控制高度比控制宽度有以下优点:
- [0072] (1)用正胶刻蚀的方法或者用负胶SU8的方法做出的高度,精度可以控制在10%以内。例如:高度是5微米的管道,高度精度可以达到0.5微米及以下。如果将高度控制转为宽度控制,宽度的精度主要由掩膜的精度决定。菲林掩膜精度一般最小可达20微米;Chrome掩膜最小可达1微米左右,但价格较高。所以在管道的制作上,控制高度比控制宽度要简单并且成本低。
- [0073] (2)控制管道高度的Step emulsification的方法可以将液滴粒径控制在管道高度的三倍左右,调节两相流体的流量比不会明显改变液滴粒径,技术上容易控制。与管道的高度和宽度同时相关的flow focusing及其他方法,粒径受两相流体的流量比的影响较大。
- [0074] 复乳制备芯片的用途
- [0075] 本发明的复乳制备芯片,亦即,用于制备W/O/W复乳的微流控芯片,可用于制备脂质体。
- [0076] 制备脂质体的方法
- [0077] 本发明制备脂质体的方法,包括:
- [0078] (1)配置三相溶液:将脂质材料溶解于油相中,形成中间相;并分别配置内水相和外水相;
- [0079] (2)分别将外水相、中间相、内水相液体泵入前述复乳制备芯片的外水相进样部7、中间相进样部8和内水相进样部9,在复乳收集部12收集W/O/W复乳;
- [0080] (3)将收集的W/O/W复乳去除有机溶剂,即得到脂质体。
- [0081] 所述内水相的流速范围可以是0.01纳升每秒到100纳升每秒。
- [0082] 所述中间相的流速范围可以是0.01纳升每秒到1微升每秒。
- [0083] 所述外水相的流速范围可以是0.1纳升每秒到10微升每秒。

[0084] 采用所述复乳制备芯片制备的脂质体具有形状可控、大小均匀、包封率高,适用材料多样性等优点。

[0085] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围。下列实施例中未注明具体条件的试验方法,通常按照常规条件,或者按照各制造商所建议的条件。

[0086] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0087] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见 Sambrook 等 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001; Ausubel 等, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 and periodic updates; the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, Chromatin (P.M. Wassarman and A.P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; 和 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, Chromatin Protocols (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999 等。

[0088] 实施例1复乳制备芯片及其获得方法

[0089] 1-1: 本发明的复乳制备芯片,结构示意图可参见图1。

[0090] 1-2: 所述复乳制备芯片的制备方法,可包括如下步骤:

[0091] (1) 将所述微流控芯片的微通道结构转移到菲林掩膜版上,分为第一层掩膜版和第二层掩膜版;其中,第一层包括过滤结构1和第一混合部2;第二层包括外水相管道3、中间相管道4、内水相管道5、W/O乳剂形成腔道6、外水相进样部7、中间相进样部8、内水相进样部9、第二混合部10、W/O/W乳剂形成腔道11、复乳收集部12;

[0092] (2) 第一层光刻:

[0093] 1) 对硅基片进行产生清洗;

[0094] 2) 将清洗后的硅基片在热板上200℃烘5分钟以去除表面水分子;

[0095] 3) 通过甩胶工艺在烘干的硅基片表面涂上1.5微米厚度的AZ 50XT正性光刻胶;

[0096] 4) 在热板上65℃前烘3分钟,95℃前烘9分钟以去除多余的溶剂,在热板上缓慢冷却;

[0097] 5) 第一层光刻使用白色菲林掩膜版,通过光刻机曝光处理;

[0098] 6) 对经过曝光后的正性光刻胶通过四甲基氢氧化铵显影,将经过曝光的光刻胶溶于显影液中,从而得到所需的光刻胶图形;

- [0099] 7)去除表面多余的显影液,烘干,密封保存;
- [0100] (3)第一层刻蚀:
- [0101] 将第一层光刻后的硅片通过干法刻蚀,刻蚀气体为SF₆,CCF₈做保护剂,SF₆中,包括中性粒子,电子(e),活性自由基(F),带正电的粒子(SF₅⁺)和带负电的离子(F⁻);正电离子在电场的作用下实现对硅片表面的物理轰击,而活性自由基则吸附在硅片表面发生化学反应生成挥发性产物,物理轰击能够与化学反应同时进行,并通过溅射去除沉积在表面的副产物;通过刻蚀机器向下刻一定深度(例如:0.1~5微米)的硅片;
- [0102] (4)去胶:
- [0103] 将经过刻蚀后的硅片浸泡在丙酮中30min后超声处理5分钟,得到第一层光刻后的模板;第一层中通道结构的高度可以为0.1~5微米;
- [0104] (5)第二层光刻
- [0105] 1)通过甩胶工艺在基片表面涂上一定厚度(例如:1~50微米)的SU-8胶;
- [0106] 2)在热板上65℃前烘3分钟,95℃前烘9分钟以去除多余的溶剂,在热板上缓慢冷却;
- [0107] 3)光刻机曝光处理,在第二层光刻中采用黄色菲林掩膜版;
- [0108] 4)曝光后对SU-8胶进行后烘处理,增加光刻胶的硬度,防止刻蚀时脱落;
- [0109] 5)显影,得到最终光刻胶图形;
- [0110] 6)去除表面多余的显影液,烘干,密封保存;
- [0111] (6)PDMS薄层的制作
- [0112] 1)用铝箔纸将所获得的模板围起来形成一个浇筑模具;
- [0113] 2)将22.5g预聚体Sylgard184与固化剂按质量比9:1均匀混合,充分搅拌,浇筑到模板;
- [0114] 3)室温静置去除所有气泡后,于烘箱中75℃进行固化1小时;
- [0115] 4)固化后将整片PDMS盖片揭下来,按需要的形状切割,使用空心针钻孔作为流体进出口;制备出的PDMS盖片很好地复制了微通道形状;
- [0116] (7)键合工艺
- [0117] 1)将PDMS芯片与载玻片清洗干净并吹干,利用氧等离子体对PDMS芯片和载玻片的贴合表面进行处理,最后将两者贴合在一起;
- [0118] 2)将贴合后的芯片置于烘箱中80℃烘24后取出及得到最终的芯片;
- [0119] (8)芯片的亲水处理
- [0120] PDMS疏水性很强,外水相通道如果保持疏水,外水相溶液在通道的润湿效果差,导致剪切力差,不足以形成W/O/W复乳。因此键合后,需要对芯片做亲水处理。
- [0121] 具体方法包括:
- [0122] 在内水相管道5和中间相管道4中注入水,在外水相管道3中注入浓度为50mg/ml的PVA水溶液,使三相溶液在管道中流至30min~1h后,110℃烘干15min,重复三次处理。通过测量接触角变化我们发现采用此种方法对芯片亲水处理效果较好且简单易行。
- [0123] 实施例2脂质体的制备
- [0124] 2-1:参照实施例1中的方法制备复乳制备芯片,第一层中的各通道结构的高度为5微米,因此,第一混合部2的高度为5微米,第一混合部2的宽度为40微米。第二层中各通道的

高度为50微米,因此,W/O乳剂形成腔道6的高度为50微米。

[0125] 2-2:三相溶液的配置:

[0126] (1)内水相:2mM钙黄绿素,50mg/ml泊洛沙姆(分子量8350)溶于PBS缓冲液中;

[0127] (2)中间相:将EPC和胆固醇按照摩尔比2:1的比例溶于氯仿,氮气吹干,室温下干燥至少2h;将磷脂溶于乙醇制备50mg/ml储备液,置于-20℃中储存,需要做实验时,将储备液溶于正辛醇中来形成浓度为2mg/ml的溶液;

[0128] (3)外水相:

[0129] 50mg/ml泊洛沙姆,15v%无水乙醇,15v%甘油溶于蒸馏水中。

[0130] 2-3:制备脂质体:

[0131] 分别将外水相、中间相、内水相液体用1ml注射器固定在泵上,设定内水相流速为100nl/s,总体积为360μl,中间相的流速为1μl/s,总体积为3600μl,外水相的流速为10μl/s,总体积为36000μl,在外界注射泵的压力推动作用下,三相流体分别从进样部7、8、9处流入,在流经过滤结构1中时,尺寸大于微柱间隔的杂质被过滤掉,过滤后的液体分别流入外水相管道3、内水相管道5、中间相管道4,待三相液体流满整个各自管道时,内水相与中间相在第一混合部2处混合,随后由第一混合部2流入W/O乳剂形成腔道6,由于混合流体由浅的管道突然进入深的管道,基于step-emulsification原理被剪切为W/O初乳,W/O乳剂在第二混合部10处与外水相混合,基于flow-focusing原理在W/O/W乳剂形成腔道11被外水相剪切为W/O/W复乳,经复乳收集部12流出,即可收集所制备的W/O/W复乳。将收集的W/O/W复乳透析去除有机溶剂,即得到脂质体。通过光学显微镜对其粒径进行测量,得到粒径为15~30微米大小的脂质体,并且粒径均一。

[0132] 2-4:包封率的测定:

[0133] 取钙黄绿素脂质体5.0ml,置于超滤装置中,利用1万截留分子量的超滤膜进行超滤,取续滤液稀释至标准曲线线性范围内的浓度后于528nm处测定吸光度,代入标准曲线即得脂质体溶液中游离钙黄绿素的浓度(C_f),取钙黄绿素脂质体0.2ml以10%Triton X-100破坏后稀释至一定浓度测定其吸光度,代入标准曲线得到脂质体溶液中钙黄绿素的总浓度(C_t),按下式计算包封率 $EE\% = (C_t - C_f) / C_t \times 100\%$ 。测得钙黄绿素的平均包封率为84.2%。

[0134] 实施例3脂质体的制备

[0135] 3-1:参照实施例1中的方法制备复乳制备芯片,第一层中的各通道结构的高度为3微米,因此,第一混合部2的高度为3微米,第一混合部2的宽度为24微米。第二层中各通道的高度为30微米,因此,W/O乳剂形成腔道6的高度为30微米。

[0136] 3-2:三相溶液的配置:

[0137] (1)内水相:2mM钙黄绿素,50mg/ml泊洛沙姆(分子量8350)溶于PBS缓冲液中;

[0138] (2)中间相:将EPC和胆固醇按照摩尔比2:1的比例溶于氯仿,氮气吹干,室温下干燥至少2h;将磷脂溶于乙醇制备50mg/ml储备液,置于-20℃中储存,需要做实验时,将储备液溶于正辛醇中来形成浓度为2mg/ml的溶液;

[0139] (3)外水相:

[0140] 50mg/ml泊洛沙姆,15v%无水乙醇,15v%甘油溶于蒸馏水中。

[0141] 3-3:制备脂质体:

[0142] 分别将外水相、中间相、内水相液体用1ml注射器固定在泵上,设定内水相流速为

50nl/s,总体积为180 μ l,中间相的流速为0.5 μ l/s,总体积为1800 μ l,外水相的流速为7 μ l/s,总体积为25200 μ l,在外界注射泵的压力推动作用下,三相流体分别从进样部7、8、9处流入,在流经过滤结构1中时,尺寸大于微柱间隔的杂质被过滤掉,过滤后的液体分别流入外水相管道3、内水相管道5、中间相管道4,待三相液体流满整个各自管道时,内水相与中间相在第一混合部2处混合,随后由第一混合部2流入W/O乳剂形成腔道6,由于混合流体由浅的管道突然进入深的管道,基于step-emulsification原理被剪切为W/O初乳,W/O乳剂在第二混合部10处与外水相混合,基于flow-focusing原理在W/O/W乳剂形成腔道11被外水相剪切为W/O/W复乳,经复乳收集部12流出,即可收集所制备的W/O/W乳剂。将收集的W/O/W复乳透析去除有机溶剂,即得到脂质体。通过光学显微镜对其粒径进行测量,得到粒径为15~25微米大小的脂质体,并且粒径均一。

[0143] 3-4:包封率的测定:

[0144] 取钙黄绿素脂质体5.0ml,置于超滤装置中,利用1万截留分子量的超滤膜进行超滤,取续滤液稀释至标准曲线线性范围内的浓度后于528nm处测定吸光度,代入标准曲线即得脂质体溶液中游离钙黄绿素的浓度(C_f),取钙黄绿素脂质体0.2ml以10% Triton X-100破坏后稀释至一定浓度测定其吸光度,代入标准曲线得到脂质体溶液中钙黄绿素的总浓度(C_t),按下式计算包封率 $EE\% = (C_t - C_f) / C_t \times 100\%$ 。测得钙黄绿素的平均包封率为83.9%。

[0145] 实施例4

[0146] 4-1:参照实施例1中的方法制备复乳制备芯片,第一层中的各通道结构的高度为1微米,因此,第一混合部2的高度为1微米,第一混合部2的宽度为10微米。第二层中各通道的高度为15微米,因此,W/O乳剂形成腔道6的高度为15微米。

[0147] 4-2:三相溶液的配置:

[0148] (1)内水相:2mM钙黄绿素溶于PBS缓冲液中;

[0149] (2)中间相:将EPC和胆固醇按照摩尔比2:1的比例溶于氯仿,氮气吹干,室温下干燥至少2h;将磷脂溶于乙醇制备50mg/ml储备液,置于-20 $^{\circ}$ C中储存,需要做实验时,将储备液溶于油酸中来形成浓度为2mg/ml的溶液;

[0150] (3)外水相:

[0151] 50mg/ml泊洛沙姆,15v%无水乙醇,15v%甘油溶于蒸馏水中。

[0152] 4-3:制备脂质体:

[0153] 分别将外水相、中间相、内水相液体用1ml注射器固定在泵上,设定内水相流速为20nl/s,总体积为72 μ l,中间相的流速为0.3 μ l/s,总体积为1080 μ l,外水相的流速为5 μ l/s,总体积为18000 μ l,在外界注射泵的压力推动作用下,三相流体分别从进样部7、8、9处流入,在流经过滤结构1中时,尺寸大于微柱间隔的杂质被过滤掉,过滤后的液体分别流入外水相管道3、内水相管道5、中间相管道4,待三相液体流满整个各自管道时,内水相与中间相在第一混合部2处混合,随后由第一混合部2流入W/O乳剂形成腔道6,由于混合流体由浅的管道突然进入深的管道,基于step-emulsification原理被剪切为W/O初乳,W/O乳剂在第二混合部10处与外水相混合,基于flow-focusing原理在W/O/W乳剂形成腔道11被外水相剪切为W/O/W复乳,经复乳收集部12流出,即可收集所制备的W/O/W乳剂。将收集的W/O/W复乳透析去除有机溶剂,即得到脂质体。通过光学显微镜对其粒径进行测量,得到粒径为5~18微米大小的脂质体,并且粒径均一。

[0154] 4-4:包封率的测定:

[0155] 取钙黄绿素脂质体5.0ml,置于超滤装置中,利用1万截留分子量的超滤膜进行超滤,取续滤液稀释至标准曲线线性范围内的浓度后于528nm处测定吸光度,代入标准曲线即得脂质体溶液中游离钙黄绿素的浓度(C_f),取钙黄绿素脂质体0.2ml以10% Triton X-100破坏后稀释至一定浓度测定其吸光度,代入标准曲线得到脂质体溶液中钙黄绿素的总浓度(C_t),按下式计算包封率 $EE\% = (C_t - C_f) / C_t \times 100\%$ 。测得钙黄绿素的平均包封率为83.1%。

[0156] 实施例5脂质体的制备

[0157] 5-1:参照实施例1中的方法制备复乳制备芯片,第一层中的各通道结构的高度为0.5微米,因此,第一混合部2的高度为0.5微米,第一混合部2的宽度为6微米,。第二层中各通道的高度为10微米,因此,W/O乳剂形成腔道6的高度为10微米。

[0158] 5-2:三相溶液的配置:

[0159] (1)内水相:2mM钙黄绿素溶于PBS缓冲液中;

[0160] (2)中间相:将DOPC和胆固醇按照摩尔比2:1的比例溶于氯仿,氮气吹干,室温下干燥至少2h;将磷脂溶于乙醇制备50mg/ml储备液,置于-20℃中储存,需要做实验时,将储备液溶于正辛醇中来形成浓度为2mg/ml的溶液;

[0161] (3)外水相:

[0162] 50mg/ml泊洛沙姆,15v%无水乙醇,15v%甘油溶于蒸馏水中。

[0163] 5-3:制备脂质体:

[0164] 分别将外水相、中间相、内水相液体用1ml注射器固定在泵上,设定内水相流速为5nl/s,总体积为18 μ l,中间相的流速为0.1 μ l/s,总体积为360 μ l,外水相的流速为1 μ l/s,总体积为3600 μ l,在外界注射泵的压力推动作用下,三相流体分别从进样部7、8、9处流入,在流经过滤结构1中时,尺寸大于微柱间隔的杂质被过滤掉,过滤后的液体分别流入外水相管道3、内水相管道5、中间相管道4,待三相液体流满整个各自管道时,内水相与中间相在第一混合部2处混合,随后由第一混合部2流入W/O乳剂形成腔道6,由于混合流体由浅的管道突然进入深的管道,基于step-emulsification原理被剪切为W/O初乳,W/O乳剂在第二混合部10处与外水相混合,基于flow-focusing原理在W/O/W乳剂形成腔道11被外水相剪切为W/O/W复乳,经复乳收集部12流出,即可收集所制备的W/O/W乳剂。将收集的W/O/W复乳透析去除有机溶剂,即得到脂质体。通过光学显微镜对其粒径进行测量,得到粒径为2~4.5微米大小的脂质体,并且粒径均一。

[0165] 5-4:包封率的测定:

[0166] 取钙黄绿素脂质体5.0ml,置于超滤装置中,利用1万截留分子量的超滤膜进行超滤,取续滤液稀释至标准曲线线性范围内的浓度后于528nm处测定吸光度,代入标准曲线即得脂质体溶液中游离钙黄绿素的浓度(C_f),取钙黄绿素脂质体0.2ml以10% Triton X-100破坏后稀释至一定浓度测定其吸光度,代入标准曲线得到脂质体溶液中钙黄绿素的总浓度(C_t),按下式计算包封率 $EE\% = (C_t - C_f) / C_t \times 100\%$ 。测得钙黄绿素的平均包封率为87.5%。

[0167] 实施例6脂质体的制备

[0168] 6-1:参照实施例1中的方法制备复乳制备芯片,第一层中的各通道结构的高度为0.4微米,因此,第一混合部2的高度为0.4微米,第一混合部2的宽度为6.4微米。第二层中各通道的高度为12微米,因此,W/O乳剂形成腔道6的高度为12微米。

[0169] 6-2:三相溶液的配置:

[0170] (1)内水相:2mM钙黄绿素溶于PBS缓冲液中;

[0171] (2)中间相:将EPC和胆固醇按照摩尔比2:1的比例溶于氯仿,氮气吹干,室温下干燥至少2h;将磷脂溶于乙醇制备50mg/ml储备液,置于-20℃中储存,需要做实验时,将储备液溶于正辛醇中来形成浓度为2mg/ml的溶液;

[0172] (3)外水相:

[0173] 50mg/ml泊洛沙姆,15v%无水乙醇,15v%甘油溶于蒸馏水中。

[0174] 6-3:制备脂质体:

[0175] 分别将外水相、中间相、内水相液体用1ml注射器固定在泵上,,设定内水相流速为1nl/s,总体积为3.6μl,中间相的流速为80nl/s,总体积为288μl,外水相的流速为500nl/s,总体积为1800μl,在外界注射泵的压力推动作用下,三相流体分别从进样部7、8、9处流入,在流经过滤结构1中时,尺寸大于微柱间隔的杂质被过滤掉,过滤后的液体分别流入外水相管道3、内水相管道5、中间相管道4,待三相液体流满整个各自管道时,内水相与中间相在第一混合部2处混合,随后由第一混合部2流入W/O乳剂形成腔道6,由于混合流体由浅的管道突然进入深的管道,基于step-emulsification原理被剪切为W/O初乳,W/O乳剂在第二混合部10处与外水相混合,基于flow-focusing原理在W/O/W乳剂形成腔道11被外水相剪切为W/O/W复乳,经复乳收集部12流出,即可收集所制备的W/O/W乳剂。将收集的W/O/W复乳透析去除有机溶剂,即得到脂质体。通过光学显微镜对其粒径进行测量,得到粒径为0.5~3.5微米大小的脂质体,并且粒径均一。

[0176] 6-4:包封率的测定:

[0177] 取钙黄绿素脂质体5.0ml,置于超滤装置中,利用1万截留分子量的超滤膜进行超滤,取续滤液稀释至标准曲线线性范围内的浓度后于528nm处测定吸光度,代入标准曲线即得脂质体溶液中游离钙黄绿素的浓度(C_f),取钙黄绿素脂质体0.2ml以10%Triton X-100破坏后稀释至一定浓度测定其吸光度,代入标准曲线得到脂质体溶液中钙黄绿素的总浓度(C_t),按下式计算包封率 $EE\% = (C_t - C_f) / C_t \times 100\%$ 。测得钙黄绿素的平均包封率为79.4%。

[0178] 实施例7脂质体的制备

[0179] 7-1:参照实施例1中的方法制备复乳制备芯片,第一层中的各通道结构的高度为0.3微米,因此,第一混合部的高度为0.3微米,第一混合部的宽度为4.5微米。第二层中各通道的高度为15微米,因此,W/O乳剂形成腔道6的高度为15微米。

[0180] 7-2:三相溶液的配置:

[0181] (1)内水相:2mM钙黄绿素,50mg/ml泊洛沙姆(分子量8350)溶于PBS缓冲液中;

[0182] (2)中间相:将EPC和胆固醇按照摩尔比2:1的比例溶于氯仿,氮气吹干,室温下干燥至少2h;将磷脂溶于乙醇制备50mg/ml储备液,置于-20℃中储存,需要做实验时,将储备液溶于正辛醇中来形成浓度为2mg/ml的溶液;

[0183] (3)外水相:

[0184] 50mg/ml泊洛沙姆,15v%甘油溶于蒸馏水中。

[0185] 7-3:制备脂质体:

[0186] 分别将外水相、中间相、内水相液体用1ml注射器固定在泵上,设定内水相流速为0.5nl/s,总体积为1.8μl,中间相的流速为10nl/s,总体积为36μl,外水相的流速为100nl/

s, 总体积为360 μ l, 在外界注射泵的压力推动作用下, 三相流体分别从进样部7、8、9处流入, 在流经过滤结构1中时, 尺寸大于微柱间隔的杂质被过滤掉, 过滤后的液体分别流入外水相管道3、内水相管道5、中间相管道4, 待三相液体流满整个各自管道时, 内水相与中间相在第一混合部2处混合, 随后由第一混合部2流入W/O乳剂形成腔道6, 由于混合流体由浅的管道突然进入深的管道, 基于step-emulsification原理被剪切为W/O初乳, W/O乳剂在第二混合部10处与外水相混合, 基于flow-focusing原理在W/O/W乳剂形成腔道11被外水相剪切为W/O/W复乳, 经复乳收集部12流出, 即可收集所制备的W/O/W乳剂。将收集的W/O/W复乳透析去除有机溶剂, 即得到脂质体。通过光学显微镜对其粒径进行测量, 得到粒径为1~3微米大小的脂质体, 并且粒径均一。

[0187] 7-4: 包封率的测定:

[0188] 取钙黄绿素脂质体5.0ml, 置于超滤装置中, 利用1万截留分子量的超滤膜进行超滤, 取续滤液稀释至标准曲线线性范围内的浓度后于528nm处测定吸光度, 代入标准曲线即得脂质体溶液中游离钙黄绿素的浓度(C_f), 取钙黄绿素脂质体0.2ml以10% Triton X-100破坏后稀释至一定浓度测定其吸光度, 代入标准曲线得到脂质体溶液中钙黄绿素的总浓度(C_t), 按下式计算包封率 $EE\% = (C_t - C_f) / C_t \times 100\%$ 。测得钙黄绿素的平均包封率为83.3%。

[0189] 实施例8脂质体的制备

[0190] 8-1: 参照实施例1中的方法制备复乳制备芯片, 第一层中的各通道结构的高度为0.2微米, 因此, 第一混合部2的高度为0.2微米, 第一混合部2的宽度为2微米。第二层中各通道的高度为5微米, 因此, W/O乳剂形成腔道6的高度为5微米。

[0191] 8-2: 三相溶液的配置:

[0192] (1) 内水相: 35mg/mL 盐酸阿糖胞苷水溶液(浓盐酸调pH至1.0);

[0193] (2) 中间相: 将EPC和胆固醇按照摩尔比2:1的比例溶于氯仿, 氮气吹干, 室温下干燥至少2h; 将磷脂溶于乙醇制备50mg/ml储备液, 置于-20 $^{\circ}$ C中储存, 需要做实验时, 将储备液溶于正辛醇中来形成浓度为2mg/ml的溶液;

[0194] (3) 外水相:

[0195] 50mg/ml 泊洛沙姆, 15v% 无水乙醇, 15v% 甘油溶于蒸馏水中。

[0196] 8-3: 制备脂质体:

[0197] 分别将外水相、中间相、内水相液体用1ml注射器固定在泵上, 设定内水相流速为0.1nl/s, 总体积为0.36 μ l, 中间相的流速为1nl/s, 总体积为3.6 μ l, 外水相的流速为5nl/s, 总体积为18 μ l, 在外界注射泵的压力推动作用下, 三相流体分别从进样部7、8、9处流入, 在流经过滤结构1中时, 尺寸大于微柱间隔的杂质被过滤掉, 过滤后的液体分别流入外水相管道3、内水相管道5、中间相管道4, 待三相液体流满整个各自管道时, 内水相与中间相在第一混合部2处混合, 随后由第一混合部2流入W/O乳剂形成腔道6, 由于混合流体由浅的管道突然进入深的管道, 基于step-emulsification原理被剪切为W/O初乳, W/O乳剂在第二混合部10处与外水相混合, 基于flow-focusing原理在W/O/W乳剂形成腔道11被外水相剪切为W/O/W复乳, 经复乳收集部12流出, 即可收集所制备的W/O/W乳剂。将收集的W/O/W复乳透析去除有机溶剂, 即得到脂质体。通过光学显微镜对其粒径进行测量, 得到粒径为1~2.8微米大小的脂质体, 并且粒径均一。

[0198] 8-4: 包封率的测定:

[0199] 将制得的脂质体混悬液,用0.9%氯化钠注射液(N.S.)稀释至10mL,轻摇混匀,精密吸取1mL置入10mL量瓶,加甲醇2mL,振荡摇匀,加水2mL,超声10min,加水稀释定容至刻度,滤过,取续滤液,HPLC测含量。另取脂质体混悬液5mL,加N.S.至10mL混匀,2300r/min离心5min,弃去上清液,按此法用N.S.洗涤三次,沉淀移至2mL量瓶中,用N.S.稀释至刻度,摇匀,取1mL置10mL量瓶,加甲醇2mL,振荡摇匀,加水2mL,超声10min,加水稀释至刻度,滤过,取续滤液进HPLC检测,按下式计算包封率 $EE\% = (C_t - C_f) / C_t \times 100\%$ 。测得钙黄绿素的平均包封率为82.0%。

[0200] 实施例9脂质体的制备

[0201] 9-1:参照实施例1中的方法制备复乳制备芯片,第一层中的各通道结构的高度为0.1微米,因此,第一混合部2的高度为0.1微米,第一混合部2的宽度为2微米。第二层中各通道的高度为1.5微米,因此,W/O乳剂形成腔道6的高度为1.5微米。

[0202] 9-2:三相溶液的配置:

[0203] (1)内水相:3mM阿霉素溶于PBS缓冲液中;

[0204] (2)中间相:由卵磷脂:胆固醇(4:1)摩尔比组成,总脂浓度为100 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。精密称取以上2种脂质后加入到2mL(V(氯仿):V(甲醇)=2:1)溶液中,振荡充分使其溶解,转移1mL至一茄形瓶,使溶液刚好铺满底部,氮气吹干,使其均匀形成一层薄膜。室温下干燥至少2h,溶解于正辛醇中来形成浓度为2mg/ml的溶液;

[0205] (3)外水相:

[0206] 50mg/ml泊洛沙姆,15v%无水乙醇,15v%甘油溶于蒸馏水中。

[0207] 9-3:制备脂质体:

[0208] 分别将外水相、中间相、内水相液体用1ml注射器固定在泵上,设定内水相流速为0.08nL/s,总体积为0.288 μL ,中间相的流速为0.5nL/s,总体积为1.8 μL ,外水相的流速为3nL/s,总体积为10.8 μL ,在外界注射泵的压力推动作用下,三相流体分别从进样部7、8、9处流入,在流经过滤结构1中时,尺寸大于微柱间隔的杂质被过滤掉,过滤后的液体分别流入外水相管道3、内水相管道5、中间相管道4,待三相液体流满整个各自管道时,内水相与中间相在第一混合部2处混合,随后由第一混合部2流入W/O乳剂形成腔道6,由于混合流体由浅的管道突然进入深的管道,基于step-emulsification原理被剪切为W/O初乳,W/O乳剂在第二混合部10处与外水相混合,基于flow-focusing原理在W/O/W乳剂形成腔道11被外水相剪切为W/O/W复乳,经复乳收集部12流出,即可收集所制备的W/O/W乳剂。将收集的W/O/W复乳透析去除有机溶剂,即得到脂质体。通过光学显微镜对其粒径进行测量,得到粒径为1~2.8微米大小的脂质体,并且粒径均一。

[0209] 9-4:包封率的测定:

[0210] 分别精密配置30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的阿霉素脂质体溶液,以PBS为空白组,在721分光光度计300~800nm光区进行扫描,寻找阿霉素的吸收峰。取包封过的阿霉素脂质体1mL,用蒸馏水稀释10倍,取0.5mL稀释液滴加在Sephadex G50凝胶柱上,0.01mol/L的PBS以1mL/min的流速洗脱,每2mL收集1份,连续收集70mL。以空白脂质体为对照,测定各管480nm处脂质体中阿霉素的含量,按下式计算包封率 $EE\% = (C_t - C_f) / C_t \times 100\%$ 。测得阿霉素的平均包封率为82.0%。

[0211] 实施例10脂质体的制备

[0212] 10-1:参照实施例1中的方法制备复乳制备芯片,第一层中的各通道结构的高度为0.1微米,因此,第一混合部2的高度为0.1微米,第一混合部2的宽度为1.5微米。第二层中各通道的高度为2微米,因此,W/O乳剂形成腔道6的高度为2微米。

[0213] 10-2:三相溶液的配置:

[0214] (1)内水相:3mg/ml OVA,50mg/ml泊洛沙姆(分子量8350)溶于蒸馏水中;

[0215] (2)中间相:将DMPC和胆固醇按照摩尔比2:1的比例溶于氯仿,氮气吹干,室温下干燥至少2h;将磷脂溶于乙醇制备50mg/ml储备液,置于-20℃中储存,需要做实验时,将储备液溶于正辛醇中来形成浓度为2mg/ml的溶液;

[0216] (3)外水相:

[0217] 50mg/ml泊洛沙姆,15v%无水乙醇,15v%甘油溶于蒸馏水中。

[0218] 10-3:制备脂质体:

[0219] 分别将外水相、中间相、内水相液体用1ml注射器固定在泵上,设定内水相流速为0.03nl/s,总体积为0.108μl,中间相的流速为0.1nl/s,总体积为0.36μl,外水相的流速为1nl/s,总体积为3.6μl,在外界注射泵的压力推动作用下,三相流体分别从进样部7、8、9处流入,在流经过滤结构1中时,尺寸大于微柱间隔的杂质被过滤掉,过滤后的液体分别流入外水相管道3、内水相管道5、中间相管道4,待三相液体流满整个各自管道时,内水相与中间相在第一混合部2处混合,随后由第一混合部2流入W/O乳剂形成腔道6,由于混合流体由浅的管道突然进入深的管道,基于step-emulsification原理被剪切为W/O初乳,W/O乳剂在第二混合部10处与外水相混合,基于flow-focusing原理在W/O/W乳剂形成腔道11被外水相剪切为W/O/W复乳,经复乳收集部12流出,即可收集所制备的W/O/W乳剂。将收集的W/O/W复乳透析去除有机溶剂,即得到脂质体。通过光学显微镜对其粒径进行测量,得到粒径为0.5~3.2微米大小的脂质体,并且粒径均一。

[0220] 10-4:包封率的测定:

[0221] 吸取0.5ml脂质体于10ml锥形离心管中添加0.5ml鱼精蛋白(10mg/ml)搅匀。静置3min,加入5ml生理盐水,在室温条件下离心30min(3000r/min),取1ml上清液于9ml、0.15mol/L的盐水,加入考马斯亮蓝试剂5ml比色,从蛋白质浓度标准曲线中查得标准曲线游离药物的浓度。弃去上清液,沉淀以2.0ml、10%Triton-100溶解,并补充生理盐水至总体积为6ml。取1ml加入到9ml、0.15mol/L的盐水中,再加入考马斯亮蓝试剂5ml比色,查蛋白质浓度标准曲线并计算包封药物的浓度。根据下式计算包封率:

[0222] $EE\% = (1 - C_f / C_t) \times 100\%$

[0223] 式中: C_f :游离药物的量

[0224] C_t :脂质体悬液中药物的总量

[0225] 测得OVA的平均包封率为80.2%。

[0226] 实施例11脂质体的制备

[0227] 11-1:参照实施例1中的方法制备复乳制备芯片,第一层中的各通道结构的高度为0.1微米,因此,第一混合部2的高度为0.1微米,第一混合部2的宽度为0.8微米。第二层中各通道的高度为1微米,因此,W/O乳剂形成腔道6的高度为1微米。

[0228] 11-2:三相溶液的配置:

[0229] (1)内水相:25mg/ml盐酸吉西他滨水溶液

[0230] (2)中间相:将EPC和胆固醇按照摩尔比2:1的比例溶于氯仿,氮气吹干,室温下干燥至少2h;将磷脂溶于乙醇制备50mg/ml储备液,置于-20℃中储存,需要做实验时,将储备液溶于正辛醇中来形成浓度为2mg/ml的溶液;

[0231] (3)外水相:

[0232] 50mg/ml泊洛沙姆,15v%无水乙醇,15v%甘油溶于蒸馏水中。

[0233] 11-3:制备脂质体:

[0234] 分别将外水相、中间相、内水相液体用1ml注射器固定在泵上,设定内水相流速为0.02nl/s,总体积为0.072 μ l,中间相的流速为0.05nl/s,总体积为0.18 μ l,外水相的流速为0.5nl/s,总体积为1.8 μ l,在外界注射泵的压力推动作用下,三相流体分别从进样部7、8、9处流入,在流经过滤结构1中时,尺寸大于微柱间隔的杂质被过滤掉,过滤后的液体分别流入外水相管道3、内水相管道5、中间相管道4,待三相液体流满整个各自管道时,内水相与中间相在第一混合部2处混合,随后由第一混合部2流入W/O乳剂形成腔道6,由于混合流体由浅的管道突然进入深的管道,基于step-emulsification原理被剪切为W/O初乳,W/O乳剂在第二混合部10处与外水相混合,基于flow-focusing原理在W/O/W乳剂形成腔道11被外水相剪切为W/O/W复乳,经复乳收集部12流出,即可收集所制备的W/O/W乳剂。将收集的W/O/W复乳透析去除有机溶剂,即得到脂质体。通过光学显微镜对其粒径进行测量,得到粒径为1~2.5微米大小的脂质体,并且粒径均一。

[0235] 11-4:包封率的测定:

[0236] 取吉西他滨脂质体1ml置于已处理的透析袋中,将透析袋浸透析液100ml中,置于磁力搅拌器上搅拌,定时更换透析液,12h后将透析袋中内容物取出置10ml量瓶中,加入5%乳化剂OP的乙醇溶液1ml破乳,用水定容至刻度。另取吉西他滨脂质体1ml置于10ml量瓶中,加入5%乳化剂OP的乙醇溶液1ml破乳,用水定容至刻度。分别取上述溶液各20 μ l,进样分析,计算出吉西他滨脂质体中包裹吉西他滨的量 $W_{包}$ 和 $W_{总}$,按下式计算包封率 $EE\% = W_{包}/W_{总} \times 100\%$ 。测得吉西他滨的平均包封率为82.6%。

[0237] 实施例12脂质体的制备

[0238] 12-1:参照实施例1中的方法制备复乳制备芯片,第一层中的各通道结构的高度为0.1微米,因此,第一混合部2的高度为0.1微米,第一混合部2的高度为1微米,第二层中各通道的高度为1.2微米,因此,W/O乳剂形成腔道6的高度为1.2微米。

[0239] 11-2:三相溶液的配置:

[0240] (1)内水相:2mM钙黄绿素,30mg/ml泊洛沙姆(分子量8350)溶于PBS缓冲液中;

[0241] (2)中间相:将EPC和胆固醇按照摩尔比2:1的比例溶于氯仿,氮气吹干,室温下干燥至少2h;将磷脂溶于乙醇制备50mg/ml储备液,置于-20℃中储存,需要做实验时,将储备液溶于正辛醇中来形成浓度为2mg/ml的溶液;

[0242] (3)外水相:

[0243] 30mg/ml泊洛沙姆,15v%无水乙醇,15v%甘油溶于蒸馏水中。

[0244] 11-3:制备脂质体:

[0245] 分别将外水相、中间相、内水相液体用1ml注射器固定在泵上,设定内水相流速为0.01nl/s,总体积为0.036 μ l,中间相的流速为0.01nl/s,总体积为0.036 μ l,外水相的流速为0.1nl/s,总体积为0.36 μ l,在外界注射泵的压力推动作用下,三相流体分别从进样部7、

8、9处流入,在流经过滤结构1中时,尺寸大于微柱间隔的杂质被过滤掉,过滤后的液体分别流入外水相管道3、内水相管道5、中间相管道4,待三相液体流满整个各自管道时,内水相与中间相在第一混合部2处混合,随后由第一混合部2流入W/O乳剂形成腔道6,由于混合流体由浅的管道突然进入深的管道,基于step-emulsification原理被剪切为W/O初乳,W/O乳剂在第二混合部10处与外水相混合,基于flow-focusing原理在W/O/W乳剂形成腔道11被外水相剪切为W/O/W复乳,经复乳收集部12流出,即可收集所制备的W/O/W乳剂。将收集的W/O/W复乳透析去除有机溶剂,即得到脂质体。通过光学显微镜对其粒径进行测量,得到粒径为0.5~2微米大小的脂质体,并且粒径均一。

[0246] 11-4:包封率的测定:

[0247] 取钙黄绿素脂质体5.0ml,置于超滤装置中,利用1万截留分子量的超滤膜进行超滤,取续滤液稀释至标准曲线线性范围内的浓度后于528nm处测定吸光度,代入标准曲线即得脂质体溶液中游离钙黄绿素的浓度(C_f),取钙黄绿素脂质体0.2ml以10% Triton X-100破坏后稀释至一定浓度测定其吸光度,代入标准曲线得到脂质体溶液中钙黄绿素的总浓度(C_t),按下式计算包封率 $EE\% = (C_t - C_f) / C_t \times 100\%$ 。测得钙黄绿素的平均包封率为86.4%。

[0248] 以上所述,仅为本发明的较佳实施例,并非对本发明任何形式上和实质上的限制,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明方法的前提下,还将可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。凡熟悉本专业的技术人员,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,当可利用以上所揭示的技术内容而做出的些许更动、修饰与演变的等同变化,均为本发明的等效实施例;同时,凡依据本发明的实质技术对上述实施例所作的任何等同变化的更动、修饰与演变,均仍属于本发明的技术方案的范围。

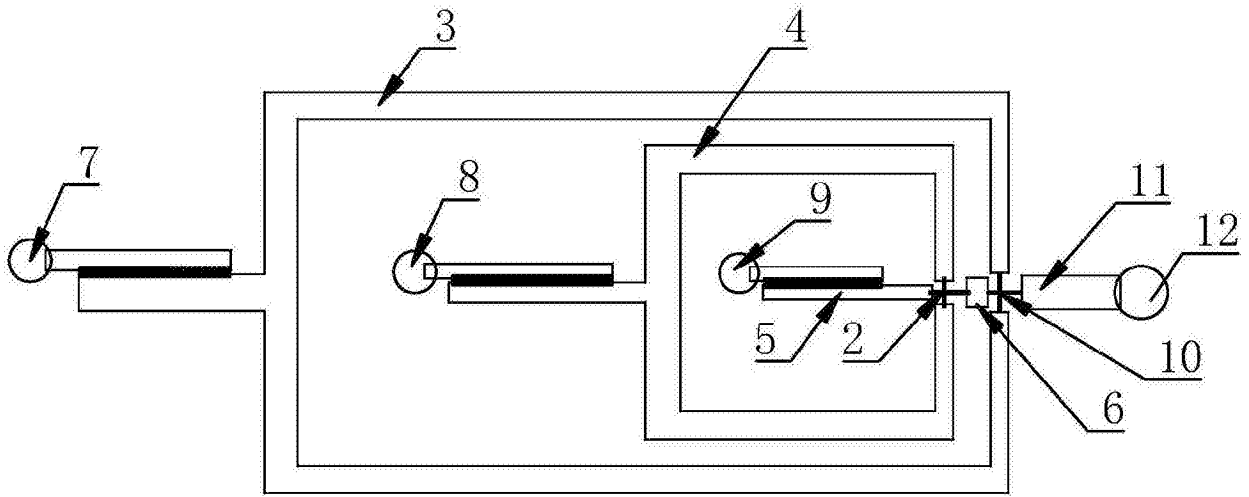


图1