

星点设计-效应面法优化积雪草苷脂质体镶囊的制备工艺

陈静怡¹, 郭贤源², 任翔³, 谢文利⁴, 彭倩¹, 刘福端¹, 张莉^{1*}

1. 武警后勤学院 救援医学系 生药与药剂学教研室, 天津 300309

2. 武警上海市总队医院 药剂科, 上海 201103

3. 武警四川省总队成都医院 药械科, 四川 成都 610041

4. 武警后勤学院 救援医学系 药理学教研室, 天津 300309

摘要: **目的** 建立镶囊包封率的测定方法, 以包封率为指标, 对积雪草苷脂质体镶囊的处方和工艺进行考察。**方法** 建立 HPLC 法测定积雪草苷, 用薄膜分散法制备脂质体, 采用层层自组合法制备镶囊。采用低速离心法测定积雪草苷镶囊的包封率, 并对方法进行验证。通过单因素实验, 考察一系列处方及制备工艺对镶囊包封率的影响, 选择影响较大的 3 个因素进一步采用星点设计-效应面法优化处方工艺。**结果** 低速离心法测定镶囊包封率准确、可靠。通过单因素实验, 确定十八胺用量为磷脂量的 4%, 海藻酸钠 (ALG) 和壳聚糖 (CS) 溶液的质量浓度为 1 mg/mL, 脂质体混悬液的 pH 值为 7.9, 前体层为 2 层, 包埋层为 1 层。星点设计-效应面法优化得到的最优处方为 ALG 和 CS 溶液 pH 值 7.00, 反应转速 450 r/min, 反应时间 0.30 h, 通过拟合方程计算得到的最优处方的包封率为 81.21%。激光共聚焦显微镜显示脂质体成功地包埋在聚电解质微囊的囊壁中。**结论** 所得积雪草苷镶囊的包封率较高, 粒径均匀, 激光共聚焦显微镜下形态良好。

关键词: 积雪草苷; 镶囊; 包封率; 星点设计-效应面法; 脂质体; 层层自组合法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)03-0569-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.010

Formulation optimization of asiaticoside loaded capsosomes by central composite design-response surface method

CHEN Jing-yi¹, GUO Xian-yuan², REN Xiang³, XIE Wen-li⁴, PENG Qian¹, LIU Fu-duan¹, ZHANG Li¹

1. Research Section of Pharmacognosics and Pharmacy, Department of Rescue Medicine, Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China

2. Shanghai Municipal Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Shanghai 201103, China

3. Chengdu Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Chengdu 610041, China

4. Department of Pharmacology, Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China

Abstract: **Objective** To fabricate the asiaticoside loaded capsosomes with CaCO₃ as core (CASI) and establish the method for determination of entrapment efficiency, then the prescription of formulation and preparation process were screened with the entrapment efficiency as index. **Methods** An HPLC method was established to determine the contents of asiaticoside. CASI were prepared by co-precipitation method and layer-by-layer assembly technique. The encapsulation efficiency was determined by a proved centrifugation. In this study, the effect of concentrations of capsule material, pH and rotating speed on encapsulation efficiency was investigated. **Results** The encapsulation efficiency obtained by centrifugation was accurate and reliable. The optimized prescription was concentrations of 1 mg/mL capsule material with pH value 12, pH 7.9 of liposomes, two precursor layers, one liposome layer, rotating speed 500 r/min, and 15 min of reaction time. The CLSM images confirmed the structural integrity of the CASI. **Conclusion** This formulation endowed with high encapsulation efficiency, and the CASI observed by CLSM turned out to be globular shapes and was narrow in size distribution.

Key words: asiaticoside; capsosomes; encapsulation efficiency; central composite design-response surface method; liposomes; layer-by-layer self-assembly technology

收稿日期: 2017-09-26

基金项目: 武警后勤学院基础研究项目 (WHJ2015012, WHJ201501)

作者简介: 陈静怡, 硕士, 主要研究方向为微粒给药系统。Tel: 15620960443 E-mail: 1091018382@qq.com

*通信作者 张莉, 教授, 主要研究方向为制剂新技术。Tel: (022)84876772 E-mail: zhli62tianjin@163.com

积雪草苷(asiaticoside)是我国传统中药材积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban. 中的主要有效成分, 药理活性广泛^[1-2]。新近研究显示, 积雪草苷可以抑制成纤维细胞的增殖, 从而改善肺组织的纤维化进程^[3]。虽然积雪草苷有诸多疗效, 但其理化性质存在一定的缺陷, 如水溶性差、体内半衰期短等^[4-5], 这些都限制了其在临床上的应用, 因此, 本研究拟通过制剂学的方法进行改善, 为其临床应用奠定基础。镶囊(又名脂质体镶囊, capsosome)是利用层层自组装(layer-by-layer self-assembly, LbL)技术, 将脂质体包覆于聚电解质微囊的囊壁中, 形成“夹层”式结构的囊泡, 其综合了聚电解质微囊和脂质体的优势, 并克服了脂质体稳定性较差、易降解、药物释放难以控制以及聚电解质微囊对敏感性高、易降解、药物保护性差的缺点, 是一种新型制剂^[6]。目前国内外对该制剂的研究比较少, 本研究希望以积雪草苷为模型药物, 摸索出稳定、可靠的脂质体镶囊包封率的测定方法, 同时以包封率为指标, 考察各因素对其的影响, 采用星点设计-效应面法(CCD-RSM)^[7]优化以碳酸钙为核的积雪草苷脂质体镶囊(asiaticoside loaded capsosome with CaCO_3 as core, CASI)处方和工艺, 为积雪草苷及脂质体镶囊的进一步研究提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

AT250 1/100 000 天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; R-124 旋转蒸发仪, 瑞士 Buchi 公司; LC-20AT 高效液相色谱仪、SPD-M20A 紫外可见检测器, 日本岛津公司; JA3003 1/1 000 电子天平, 上海精密科学仪器有限公司; ZNCL-GS 磁力搅拌器水浴锅, 上海越众仪器设备有限公司; TCS-SP8 超分辨率扫描共聚焦显微镜, 德国徕卡公司; BT-9300H 型激光粒度分布仪, 丹东百特仪器有限公司; JEM2010FEF

透射电镜, 日本电子株式会社; LEO1530vp 扫描电镜, 德国 LEO 公司; 3000HS_A 纳米粒度及电位分析仪, 英国马尔文仪器有限公司。

1.2 试药

积雪草苷对照品, 成都曼思特生物科技有限公司, 批号 MUST-12272102, 质量分数 $\geq 98\%$; 积雪草苷原料药, 广西昌洲天然药业有限公司, 批号 100120, 质量分数 $\geq 60\%$; 胆固醇, 天津市光复精细化工研究所, 批号 20141009, 质量分数 $\geq 97\%$; 维生素 E, 西南合成制药股份有限公司, 批号 201301003, 质量分数 $\geq 98\%$; 大豆磷脂, 上海太伟药业有限公司, 批号 20140201, 质量分数 $\geq 95\%$; 甲醇, 天津市康科德科技有限公司, 批号 140728, 色谱纯; 乙腈, Fisher Scientific, 批号 085884, 色谱纯; 壳聚糖(CS), 天津市艾都科技有限公司, 批号 20150722, 质量分数 $\geq 95\%$; 海藻酸钠(ALG), 天津市风船化学试剂科技有限公司, 批号 20160828, 质量分数 $\geq 99.5\%$; 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC), 天津希恩斯生化科技有限公司, 质量分数 $\geq 90\%$ 。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件^[8] 色谱柱为 ODS Hypersil C₁₈ 分析柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm , Thermo Scientific 公司); 流动相为乙腈-磷酸水溶液(磷酸 2 mL, 水 730 mL)(27:73); 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 220 nm; 进样量 20 μL 。

2.1.2 专属性实验 将空白脂质体镶囊上清液及 CASI 上清液分别用甲醇破乳, 采用“2.1.1”项下分析条件测定, 记录色谱图(图 1), 并与积雪草苷溶液相比较。结果表明在该液相色谱条件下, 积雪草苷分离度良好, 符合测定条件。

2.1.3 标准曲线的制备 精密称取积雪草苷对照品

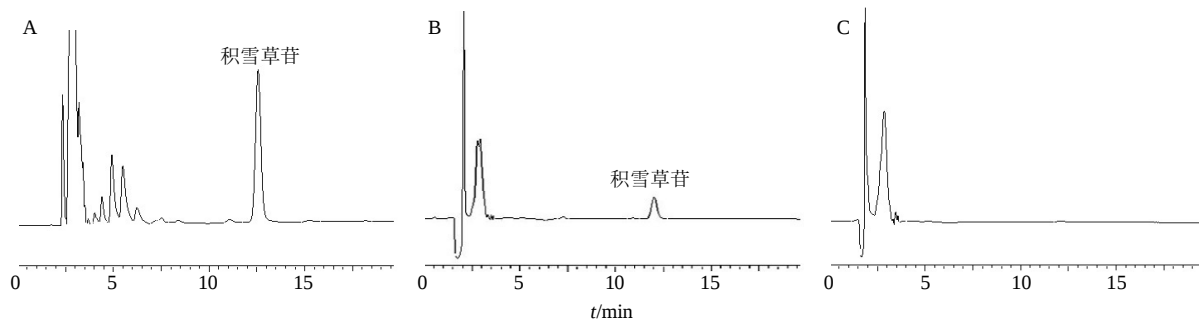


图 1 积雪草苷溶液(A)、CASI 上清(B)和空白脂质体镶囊上清(C)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of asiaticoside solution (A), supernatant of CASI (B), and supernatant of blank capsosome (C)

111.0 mg, 置于 1 000 mL 棕色量瓶中, 甲醇定容至刻度, 即得质量浓度为 111.0 $\mu\text{g/mL}$ 的积雪草苷储备液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏保存。分别取适量积雪草苷储备液进行稀释, 得到质量浓度依次为 0.56、1.11、2.24、2.22、4.44、8.88、17.76、35.52 $\mu\text{g/mL}$ 的积雪草苷对照品溶液, 采用“2.1.1”项下 HPLC 色谱条件进行检测, 得到积雪草苷的峰面积 (A) 与质量浓度 (ρ) 的标准曲线 $A=1\,194.10\rho-765.21$, $r=0.999\,3$ ($n=3$)。

2.2 CASI 的制备

2.2.1 积雪草苷阳离子脂质体的制备 采用薄膜分散法制备积雪草苷阳离子脂质体^[8-9]。取磷脂 300 mg、积雪草苷 21 mg、胆固醇 50 mg、维生素 E 10 mg、十八胺 3 mg, 置于 1 000 mL 圆底烧瓶中, 10 mL 乙醇溶解后, 使用旋转蒸发仪在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下减压蒸发 1 h (真空度为 0.09~0.095 MPa, 转速 100 r/min), 待乙醇充分挥发后得到脂质薄膜。在附有脂质薄膜的圆底烧瓶中加适量 PBS 水化 1 h, 使薄膜自然脱落形成纳米级球状微粒, 继而使用均质机匀粒, 即得积雪草苷阳离子脂质体。所得脂质体的平均粒径为 120.4 nm, 多分散指数 (PDI) 为 0.207, ζ 电位为 20.8 mV, 粒径分布见图 2, 电镜下的脂质体形态见图 3。

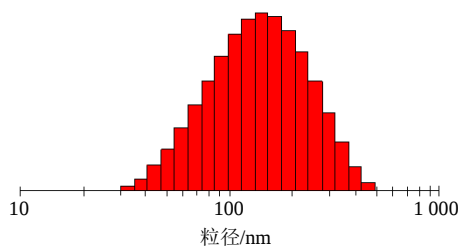


图2 积雪草苷阳离子脂质体的粒径分布图

Fig. 2 Size distribution of asiaticoside-loaded liposome

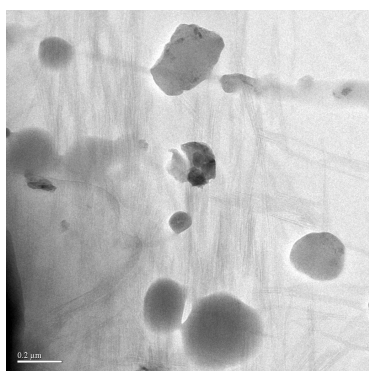


图3 积雪草苷阳离子脂质体的透射电镜图 ($\times 10\,000$)

Fig. 3 Transmission electron micrograph of asiaticoside-loaded liposome ($\times 10\,000$)

2.2.2 碳酸钙粒子的制备 采用共沉淀法制备碳酸钙粒子^[10]。分别制备 0.33 mol/L 的 Na_2CO_3 和 CaCl_2 溶液。将 100 mL Na_2CO_3 溶液于剧烈搅拌下迅速加入等体积的 CaCl_2 溶液中, 搅拌 15 min, 静置, 滤除上清, 蒸馏水洗涤 3 遍, 即得碳酸钙粒子。所得粒子在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下通风干燥 60 min, 贮存备用。

2.2.3 脂质体镶囊的制备 分别配制 1 mg/mL 的 CS 和 ALG 溶液, 采用 0.5 mol/L 的 HCl 溶液或 NaOH 溶液调整 pH 为 5.0。将 500 mg 碳酸钙粒子加入 5 mL CS 溶液中, 于 500 r/min 搅拌下反应 15 min 后, 静置, 离心滤除上清, 为了避免带相反电荷的聚电解质之间发生交联生成聚电解质复合物, 在进行下一层修饰之前, 需要除去未结合的游离聚电解质^[11], 蒸馏水洗涤 3 次, 再加入 5 mL ALG 溶液, 重复以上步骤, 即完成一次双层包衣。重复上述操作直至形成 3 层“前体层”。然后以积雪草苷阳离子脂质体代替 ALG 溶液进行组装, 形成“脂质体包埋层”, 收集所得上清液及洗涤液。最后再以 ALG/CS 组装形成 2 层“保护层”, 加入适量 1% 戊二醛水溶液, 室温搅拌反应 12 h 使壳聚糖交联, 重复离心、洗涤过程, 除去过量戊二醛。最后, 加入 0.2 mol/L EDTA 溶液适量, 搅拌反应 15 min 以去除碳酸钙母核, 离心除上清, 重复此去核过程 3~5 次, 蒸馏水洗涤 3 次, 即得 CASI。

2.3 包封率的测定

2.3.1 包封率测定 收集形成“脂质体包埋层”时的上清液及洗涤液, 置于 25 mL 量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 混匀。取 200 μL 于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 超声破乳混匀, 液相检测, 换算得质量浓度 (ρ_1)。取 200 μL 脂质体混悬液于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 超声混匀, 液相检测, 换算得质量浓度 (ρ_2)。计算 CASI 的包封率。

$$\text{包封率} = 1 - \rho_1 \times 5 / \rho_2$$

2.3.2 包封率测定方法的验证 分别收集形成“脂质体包埋层”时的上清液和洗涤液, 依次测定, 记录峰面积。结果显示, 当洗至第 2 管滤液时, 已无积雪草苷检测出, 说明未镶嵌的脂质体及游离于溶液中的积雪草苷已全部分离。

2.4 单因素考察 CASI 处方和制备工艺

根据预试验及参考文献, 考察处方和制备工艺对 CASI 包封率的影响, 依次为十八胺的用量、ALG 和 CS 溶液浓度、ALG 和 CS 溶液 pH 值、脂质体混悬液的 pH 值、前体层数、脂质体包埋层数、反应

转速及反应时长。结果表明 ALG 及 CS 溶液的 pH 值、反应转速及反应时间对 CASI 的包封率影响较大, 因此选择以上 3 个因素作为考察因素, 进一步采用 CCD-RSM 优化处方。其余处方或工艺则根据包封率最大的原则, 固定十八胺的用量为磷脂量的 4%、ALG 和 CS 溶液质量浓度为 1 mg/mL、脂质体混悬液的 pH 值为 7.9、前体层数为 2 层、脂质体包埋层数为 1 层。

2.5 CCD-RSM 优化处方

分别将 ALG 及 CS 溶液的 pH 值、反应转速、

反应时间为 X_1 、 X_2 、 X_3 。各因素的范围见表 1, 实验安排及结果见表 1。

2.5.1 模型拟合 采用 SPSS 21.0 对所得结果进行模型拟合, 得到拟合方程为包封率 = $0.306 X_1 + 0.012 X_2 + 4.609 X_3 - 0.022 X_1^2 - 0.839 X_2^2 - 7.977 X_3^3 + 0.070 X_1 X_2 + 1.213 X_2 X_3 - 0.074 X_1 X_3 - 0.981$, $r^2 = 0.909$ 。

2.5.2 效应面分析 分别将 X_1 、 X_2 、 X_3 固定为其中值, 绘制二维等高线图和三维效应面图, 结果见图 4。根据等高线图和效应面图, X_1 的最优区间为 6.00~

表 1 CCD-RSM 实验设计及结果

Table 1 Experimental design and results of CCD-RSM

试验号	X_1	$X_2/(r \cdot \min^{-1})$	X_3/h	包封率/%	试验号	X_1	$X_2/(r \cdot \min^{-1})$	X_3/h	包封率/%
1	6.00 (0)	500 (0)	0.42 (+1.732)	76.00	11	2.00 (-1.732)	500	0.25 (0)	30.96
2	3.69 (-1)	270 (-1)	0.35 (+1)	27.53	12	10.00 (+1.732)	500	0.25	66.42
3	8.31 (+1)	270	0.35	77.14	13	6.00	100 (-1.732)	0.25	73.02
4	3.69	730 (+1)	0.35	56.27	14	6.00	900 (+1.732)	0.25	64.00
5	8.31	730	0.35	81.67	15	6.00	500	0.25	74.23
6	6.00	500	0.08 (-1.732)	43.45	16	6.00	500	0.25	76.13
7	3.69	270	0.15 (-1)	33.59	17	6.00	500	0.25	75.16
8	8.31	270	0.15	76.81	18	6.00	500	0.25	77.74
9	3.69	730	0.15	59.30	19	6.00	500	0.25	75.91
10	8.31	730	0.15	75.88	20	6.00	500	0.25	75.78

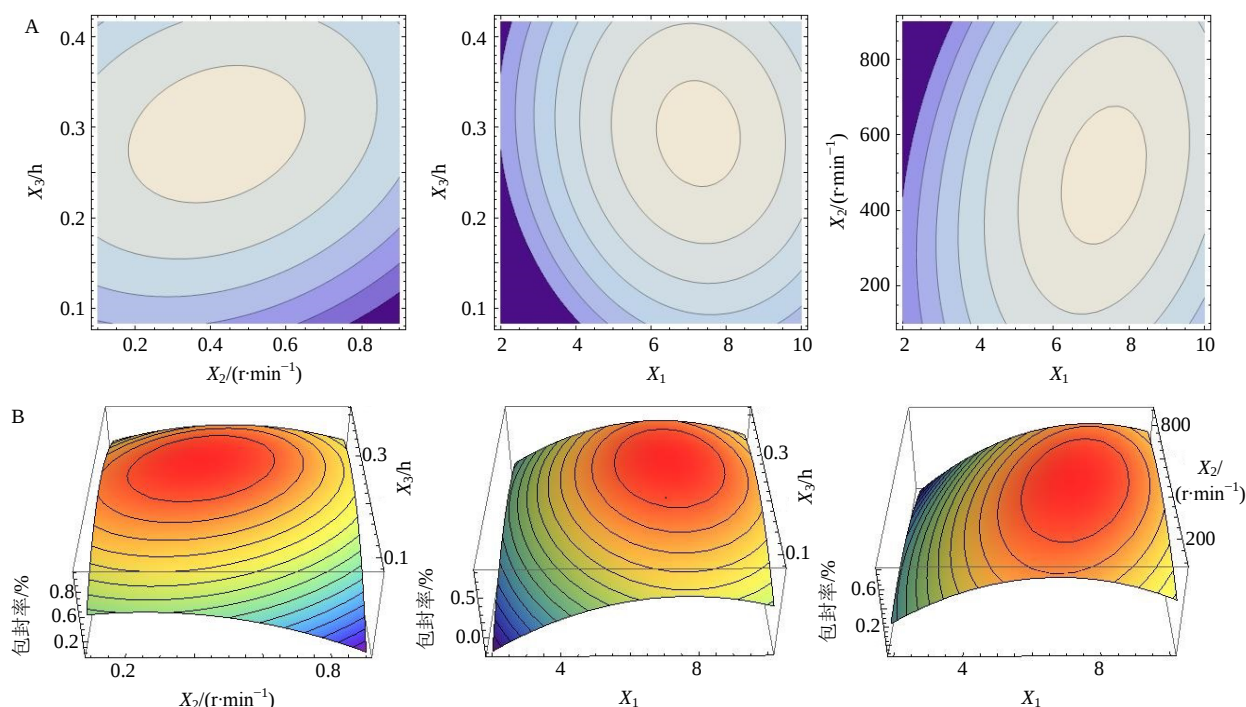


图 4 X_2 与 X_3 ($X_1 = 6$)、 X_1 与 X_3 ($X_2 = 500 r \cdot \min^{-1}$)、 X_1 与 X_2 ($X_3 = 0.25 h$) 对脂质体包封率影响的等高线图 (A) 与效应面图 (B)
Fig. 4 Contour plot (A) and response surface (B) of encapsulation rate as a function of X_2 and X_3 ($X_1 = 6$), X_1 and X_3 ($X_2 = 500 r \cdot \min^{-1}$), and X_1 and X_2 ($X_3 = 0.25 h$)

8.00, X_2 的最优区间为 350~550 r/min, X_3 的最优区间为 0.25~0.35 h。最终确定最优处方为 $X_1=7.00$ 、 $X_2=450$ r/min、 $X_3=0.30$ h, 通过拟合方程计算得到的最优处方的包封率为 81.21%。

2.5.3 最优处方验证试验 根据最优处方工艺的配比, 制备 3 批 CASI, 得到的包封率分别为 79.42%、81.72%、80.02%, 均值为 $(80.39 \pm 0.97)\%$ ($n=3$), 偏差为 -0.83%, 表明该处方工艺稳定, 实测值与预测值相符合。

2.6 CASI 表征

使用 Zeta 电位仪测定组装过程中囊壳表面电位的变化, 测试在超纯水中进行, 每个数据测 6 次, 取平均值, 结果见图 5。取少量囊壳悬液滴在处理过的硅片上, 自然干燥, 喷金, 采用扫描电子显微镜 (SEM) 观察, 结果见图 6-A。

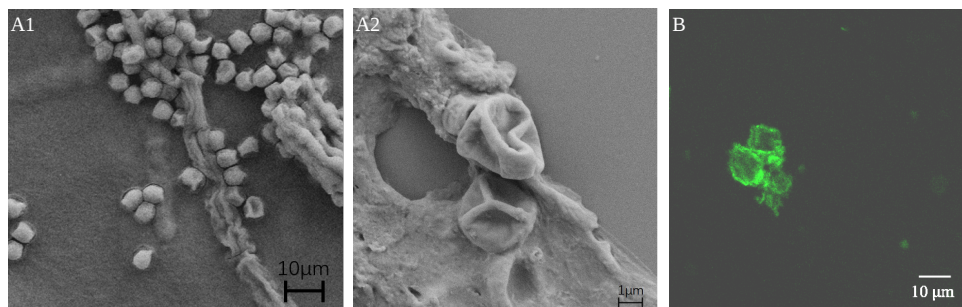


图 5 碳酸钙粒子表面组装 CS/ALG/脂质体的 ζ 电位变化 ($n=6$)

Fig. 5 ζ -potential of CS/ALG CaCO₃ Particles containing one layer of liposomes ($n=6$)

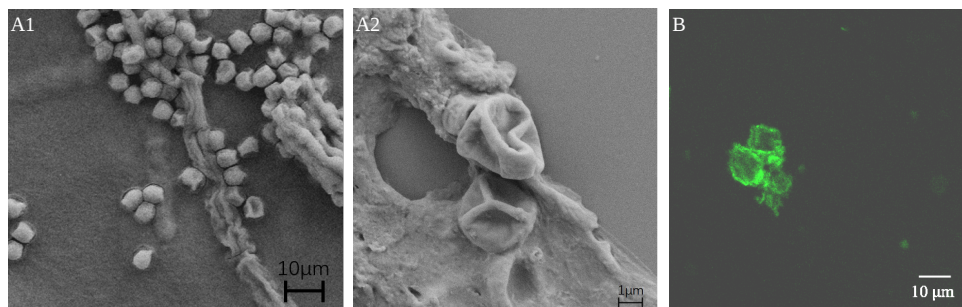


图 6 CASI 的扫描电镜照片 ($\times 1\,000$, A1; $\times 5\,000$, A2) 和激光共聚焦显微镜图 (油镜 $\times$ 目镜: 63×10 , B)

Fig. 6 SEM images ($\times 1\,000$, A1; $\times 5\,000$, A2) and CLSM image (oil immersion lens $\times$ eye lens: 63×10 , B) of CASI

3 讨论

3.1 脂质体囊壳包封率的测定

由于脂质体囊壳的研究仍处于起步阶段, 目前没有确切的包封率的测定方法, 仅有载药量的计算方法^[12-14]。国内仅有施卉等^[10]测定了脂质体囊壳的载药量, 本实验采用低速离心法测定积雪草苷脂质体囊壳的包封率, 并对该方法进行验证, 所得结果准确、稳定。

3.2 脂质体混悬液 pH 对包封率的影响

研究表明, 脂质体混悬液的 pH 值对囊壳的粒径也有影响^[15-16]。根据文献^[17], 如果强聚电解质用于 LbL 组装, 则静电相互作用是主要驱动力, 然而在使用弱聚电解质的情况下, 氢键或疏水相互作用可能起主导作用。

pH 变化导致存在于两性离子脂质和磷脂酰胆碱中的磷酸基团和胆碱基团的酸碱平衡变化, 导致脂质体膜中静电电荷的偏移^[18]。因此, 本实验通过调节脂质体混悬液 pH 研究对脂质体囊壳包封率

影响。当脂质体混悬液 pH 在 6 以上时, 包封率趋于稳定, 可能是由于此时脂质体拥有足够高的 ζ 电位以诱导同聚电解质的静电作用, 此时有效的脂质体吸附在前体层上较多。

3.3 碳酸钙粒子和脂质体的制备与表征

碳酸钙易于去除且无生物毒性, 常被用来作为聚电解质微囊组装的模板。作为组装的模板, 要求能够控制碳酸钙粒子的尺寸和形态。当脂质体粒径在 50~200 nm 时, 脂质体才可被包封^[19]。本实验中脂质体的粒径在 100 nm 左右, 符合包封的条件。

3.4 CASI 的表征

碳酸钙粒子表面电荷的规则节律性波动, 证明了 CS/ALG 囊壳及脂质体在粒子表面的成功组装, 与文献报道一致^[6,10]。

参考文献

- [1] 任翔, 魏仔龙, 陈莉, 等. 积雪草有效成分的制剂工艺研究进展 [J]. 武警后勤学院学报: 医学版, 2016, 25(6): 496-500.

- [2] 王 毅. 积雪草苷类化合物对神经系统药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(1): 136-142.
- [3] Ye W J, Zhu X C, Wang X B, *et al.* Asiaticoside attenuates bleomycin-induced interstitial pulmonary fibrosis [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2016, 30(1): 29-37.
- [4] 刘敏敏, 李 锂, 马小来. 积雪草苷柔性纳米脂质体凝胶剂的研制及体外评价 [J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(11): 1120-1122.
- [5] 陈静怡, 任 翔, 王晓辉, 等. 积雪草苷修饰脂质体在大鼠体内的药动学及组织分布研究 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4419-4424.
- [6] Städler B, Chandrawati R, Goldie K, *et al.* Capsosomes: subcompartmentalizing polyelectrolyte capsules using liposomes [J]. *Langmuir*, 2009, 25(12): 6725-6732.
- [7] 李艺丹, 张婷婷, 熊 瑞, 等. 正交设计联用星点设计-效应面法优化雪胆炮制工艺 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 913-917.
- [8] 任 翔, 刘 琨, 张 莉. 星点设计-响应面法优化积雪草苷阳离子脂质体的处方 [J]. 中国药房, 2016, 27(16): 2272-2275.
- [9] 喻 樊, 杨锦明. β -谷甾醇替代胆固醇制备槲皮素脂质体的可行性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3303-3308.
- [10] 施 卉, 唐亮亮, 沈海俊, 等. 新型夹层式药物载体脂质体囊的构建与表征 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(3): 199-203.
- [11] Madrigal-Carballo S, Lim S, Rodriguez G, *et al.* Biopolymer coating of soybean lecithin liposomes via layer-by-layer self-assembly as novel delivery system for ellagic acid [J]. *J Funct Foods*, 2010, 2(2): 99-106.
- [12] Maina J W, Richardson J J, Chandrawati R, *et al.* Capsosomes as long-term delivery vehicles for protein therapeutics [J]. *Langmuir*, 2015, 31(28): 7776-7781.
- [13] Chandrawati R, Hosta-Rigau L, Vanderstraaten D, *et al.* Engineering advanced capsosomes: maximizing the number of subcompartments, cargo retention, and temperature-triggered reaction [J]. *ACS Nano*, 2010, 4(3): 1351-1361.
- [14] Kutscher H L, Chao P, Deshmukh M, *et al.* Threshold size for optimal passive pulmonary targeting and retention of rigid microparticles in rats [J]. *J Control Release*, 2010, 143(1): 31-37.
- [15] Chandrawati R, Städler B, Postma A, *et al.* Cholesterol-mediated anchoring of enzyme-loaded liposomes within disulfide-stabilized polymer carrier capsules [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(30): 5988-5998.
- [16] Yoo C Y, Seong J S, Park S N. Preparation of novel capsosome with liposomal core by layer-by-layer self-assembly of sodium hyaluronate and chitosan [J]. *Colloids Surfaces B*, 2016, 144: 99-107.
- [17] Guzmán E, Ruano M, Ortega F, *et al.* *Stratified Interpolyelectrolyte Complexes: Fabrication, Structure and Properties* [M]. Polyelectrolytes: Springer international publishing, 2014.
- [18] Coustet M, Irigoyen J, Garcia T A, *et al.* Layer-by-layer assembly of polymersomes and polyelectrolytes on planar surfaces and micro-sized colloidal particles [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2014, 421: 132-140.
- [19] Zhang X, Chabot D, Sultan Y, *et al.* Target-molecule-triggered rupture of aptamer-encapsulated polyelectrolyte microcapsules [J]. *Acs Appl Mater Inter*, 2013, 5(12): 5500-5507.