

复乳化-溶剂蒸发法制聚 3-羟基丁酸酯成球行为的研究

田丰^{1,2}, 成国祥¹, 刘长军², 邢楠², 李勇²

(1. 天津大学材料科学与工程学院, 天津 300072;

2. 军事医学科学院卫生装备研究所, 天津 300161)

摘要: 利用盖玻片与带圆形凹槽的载玻片对刚乳化完成的乳液进行密封, 控制乳液溶剂的挥发速率, 利用光学显微镜 (OM) 观察不同乳化条件下得到的复乳液滴, 其内部分别封装有一个、几个或多个初乳液滴, 且因所封装初乳液滴的数量不同, 溶剂挥发后, 导致形成微球的结构不同, 在扫描电镜 (SEM) 下可分别观察到坍塌、空心或具有类似蜂巢的结构。X 射线衍射 (XRD) 和差示扫描量热 (DSC) 的分析结果表明: 微球结构和表面形貌与聚羟基丁酸酯 (PHB) 凝结过程中的结晶行为有关, 较快的结晶速率和较大的结晶度时形成的微球孔隙度大, 表面形貌粗糙, 皱褶多; 反之, 孔隙度较小, 表面形貌相对平滑。

关键词: 复乳化-溶剂蒸发技术; 聚 3-羟基丁酸酯; 微球

中图分类号: TQ316.334

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2006)S1-0144-04

Poly-3-hydroxybutyrate microparticles formation by double emulsion solvent-evaporation

TIAN-Feng¹, CHENG Guo-xiang¹, LIU Chang-jun², XING Nan², LI Yong²

(1. School of Material Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300161, China)

Abstract: In order to observe in detail the transformation of the double emulsion microdroplets into the final microparticles by optical microscope (OM), a small amount of the double emulsion was dropped on a concave in the center of a microscope slide and sealed with cover glass. The results from the OM observations corroborated with scanning electron microscopy (SEM) showed that the final microparticles with different structures such as deflated, closed, honeycomb microparticles, depended mainly on the secondary emulsion microdroplets in which one or more initial microdroplets were entrapped. The surface morphologies of different microparticles with open porosity and wrinkle depended mainly on the PHB precipitation and were influenced by the crystallization of PHB, which were verified by X-ray diffraction (XRD) and differential scanning calorimetry (DSC).

Key words: double emulsion solvent evaporation; Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB); microparticle

应用可生物降解聚合物材料作为药物、酶或多肽的载体可实现持续控制释放和针对病灶的靶向治疗, 并且可使被封装的药物或生物活性物质避免受应用环境的影响而失效, 是医药新剂型研究领域的热点课题之一。通过单乳化或复乳化溶剂蒸发技术, 采用聚乳酸 (PLA)、乳酸与羟基乙酸共聚物 (PLGA)^[1-5]、壳聚糖^[6]、聚酞^[7]、脂质^[8]、硅树脂^[9]和聚苯酯 (PHB)^[10]等为基材, 可制得具有不同内腔结构、壳层透过性能和表面形貌中空或类似蜂巢结构的微球, 其中复乳化溶剂蒸发技术因可制得高稳定性核-壳结构聚合物微容器尤其受到重视。

复乳化溶剂蒸发技术制备微球的基本方法是: 将溶有药物或活性物质的内水相 (W_1) 在不相溶的溶有聚合物的油相 (O) 内乳化得到初乳液 (W_1/O),

W_1/O 再在不相溶的外水相 (W_2) 中进行第 2 次乳化得到复乳液 ($W_1/O/W_2$); 复乳液中的液滴通过溶剂挥发和聚合物凝结逐渐硬化成球; 最后进行微球分离、洗涤和干燥。目前该领域的研究工作大多集中于乳化成球工艺参数的优化、球径大小及分布, 被封装药物或活性物质的封装率及体外释放行为等方面, 对乳化完成后溶剂挥发, 液滴逐渐变硬成球阶段的研究相对较少, 而该阶段对微球的结构、表面形貌以及应用时的封装率和释放行为均产生重要影响。

笔者选用具有生物相容性且可生物降解的 PHB 作为基材, 利用复乳化溶剂蒸发技术, 以不含任何药物的去离子水为 W_1 , 制备出具有不同结构和表面形貌的 PHB 微球, 并利用光学显微镜跟踪观察液滴演变成球的过程, 研究二次乳化完成后复乳液滴内包

收稿日期: 2005-12-28; 修回日期: 2006-04-17

作者简介: 田丰 (1964-), 男, 博士生, 副研究员, 主要从事医用高分子材料的研究, 022-84656754, tianfeng62037@yahoo.com.cn; 成国祥 (1965-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事生物材料的研究, gxcheng@tju.edu.cn。

封初乳液滴的数量、液滴收缩与 PHB 凝结过程中结晶行为对微球结构和表面形貌的影响。

1 实验部分

1.1 原料与试剂

PHB, 相对分子质量 4.37×10^5 , 纯度为 96% ~ 98%, 天津天露有限公司; 聚乙烯醇 (PVA), 水解度 98%, 聚合度 1750 ± 50 , 中国医药集团上海化学试剂公司; 氯仿, 分析纯, 天津科锐思精细化工有限公司。

1.2 PHB 微球制备

采用复乳化-溶剂挥发法制备 PHB 微球, W_1 为去离子水, 油相为质量分数 2% 的 PHB 氯仿溶液, W_2 为质量分数 2% 的 PVA 溶液。将 3 mL 去离子水在搅拌条件下滴加到 15 mL 质量分数 2% 的 PHB 氯仿溶液中, 一定的搅拌速度下 (500、1 500 或 8 000 r/min) 乳化 2 ~ 3 min, 得到 W_1/O 。将其滴加到 100 mL 质量分数 2% 的 PVA 溶液中, 500 r/min 搅拌速度下乳化 4 ~ 5 min, 得到 $W_1/O/W_2$ 。然后将 300 mL 质量分数 0.5% 的 PVA 溶液加入到该 $W_1/O/W_2$ 中, 磁力搅拌 4 ~ 5 h, 溶剂充分挥发, 5 000 r/min 离心分离, 用去离子水洗涤 3 次, 冷冻干燥得 PHB 微球。制备过程中 W_1 和 W_1/O 均采用注射器 (针头孔径为 0.2 mm) 进行滴加, 滴加时间控制在 20 s 内。

1.3 液滴成球行为观察

取数滴刚乳化完成的 $W_1/O/W_2$, 滴加在载玻片中央的圆形凹陷处, 用盖玻片将其密封。此时 W_2 中溶剂呈饱和状态, 仅在盖玻片与载玻片之间很窄的缝隙处与外界空气接触, 而溶剂也只有通过该狭窄的接触面进行挥发, 溶剂的挥发受到较大限制, 挥发速率明显降低, 使用光学显微镜 (美国光学公司) 较详细观察 $W_1/O/W_2$ 及其溶剂挥发演化成球的过程。

1.4 微球表面形貌观察

用扫描电镜 (SEM, Hitachi X-650) 观察冻干的微球的表面形貌。取适量微球样品放置于 2 片载玻片之间, 然后将载玻片浸入液氮中数分钟, 用镊子压挤载玻片, 使 2 玻璃片之间的微球被夹破, 喷金后用 SEM 观察微球内部结构。

1.5 X 射线衍射分析

X 射线衍射实验使用日本理学 X 射线广角衍射仪, 扫描范围 2θ 角为 $6^\circ \sim 36^\circ$, 扫描速度为 $3^\circ/\text{min}$ 。

1.6 差示扫描量热分析

DSC 实验使用 NETZSCH 204 型差示扫描量热仪, 样品质量 4 ~ 10 mg, 温度 $30 \sim 250^\circ\text{C}$, 升温速率

$10.0^\circ\text{C}/\text{min}$ 。

2 结果与讨论

2.1 液滴成球行为观察

由于 $W_1/O/W_2$ 被密封在载玻片与盖玻片之间, W_2 中的溶剂基本处于饱和状态, 而只有 W_2 中溶剂浓度低于其饱和浓度时, 液滴中的溶剂才能扩散进入 W_2 中进行挥发。 W_2 中溶剂仅能通过载玻片与盖玻片之间的缝隙缓慢挥发, 因此靠近缝隙处的液滴先开始溶剂挥发, 然后逐步向远离缝隙的区域扩展。液滴中溶剂挥发一旦开始, 油相中的 PHB 也开始凝结, 可观察到液滴直径会逐渐变小。

图 1 为复乳液滴溶剂挥发成球过程 OM 照片 [溶剂挥发时间 (a) 为 10 min、(b) 为 30 min]。图 1(a) 显示靠近缝隙处溶剂先开始挥发, 其附近的液滴首先收缩变小; 而距缝隙较远处 W_2 中溶剂浓度处于饱和状态, 液滴无溶剂挥发, 其直径在一定时间内不会发生变化, 可以看出靠近缝隙区域液滴的直径较远离缝隙区域液滴的直径明显小很多。图 1(b) 与图 1(a) 是同一视场的 OM 照片, 但溶剂挥发时间较长, 显示远离缝隙区域液滴的直径也在逐渐变小, 表明溶剂挥发是从边缘区域逐渐向内部扩展。

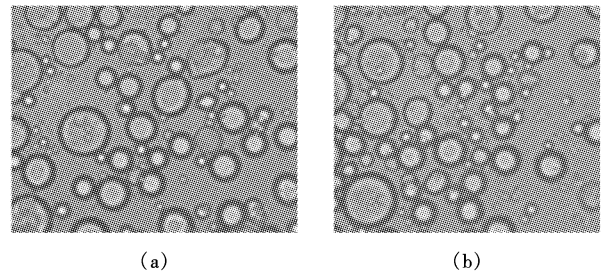


图 1 复乳液滴溶剂挥发成球过程 OM 照片

在乳化过程中形成的液滴, 其直径大小与所受到的剪切力有关, 不同的搅拌速度下形成液滴的直径不同。若初乳和复乳过程中搅拌速度均为 500 r/min, 则初乳液滴与复乳液滴直径相近, 2 次乳化后复乳液滴内仅能包封 1 个初乳液滴, 如图 2(a) 所示; 若初乳、复乳搅拌速度分别为 1 500、500 r/min, 则初乳液滴的直径较复乳液滴小几倍, 复乳液滴内可包封有 1 个或多个初乳液滴, 如图 2(b) 所示; 若初乳、复乳搅拌速度分别为 8 000、500 r/min, 则初乳液滴的直径较复乳液滴小很多, 复乳液滴内可包封较多的初乳液滴, 如图 2(c) 所示。不同搅拌转速下得到的 $W_1/O/W_2$ 主要有 3 种结构, 因其溶剂挥发过程中

表现行为不同,从而形成微球的结构不同。

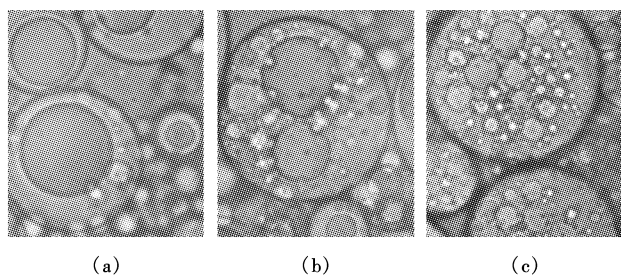
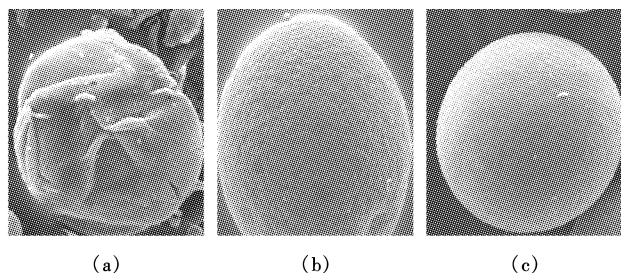


图 2 不同搅拌转速下得到的 $W_1/O/W_2$ 的 OM 照片

2.2 微球扫描电镜观察

扫描电镜(SEM)观察结果表明,不同结构的复乳液滴溶剂挥发后得到的 PHB 微球结构和表面形貌不同,其原因与复乳液滴中所包封的初乳液滴的数量及 PHB 凝结过程中的结晶行为有关。当复乳液滴内包封了 1 个或多个初乳液滴时,溶剂挥发后可分别形成:坍塌或瘪掉的微球,如图 3(a)所示,空心微球,如图 3(b)所示或具有类似蜂巢结构的微球,如图 3(c)所示。



(a)初乳和复乳搅拌速度均为 500 r/min;(b)初乳搅拌速度为 1 500 r/min,复乳搅拌速度为 500 r/min;(c)初乳搅拌速度为 8 000 r/min,复乳搅拌速度为 500 r/min

图 3 PHB 微球的 SEM 照片

若复乳液滴为图 2(a)所示的结构,其内仅包封了 1 个初乳液滴,溶剂挥发后微球不足以形成有一定支撑强度的 PHB 壳层,只能形成薄壁微囊,易受外力作用破裂,当 W_1 蒸发后,微囊呈瘪球状,如图 3(a)、图 4(a)所示。

若复乳液滴为图 2(b)所示的结构,则溶剂挥发后主要形成中空的微球结构,如图 3(b)、图 4(b)所示。当包封有 1 个初乳液滴时,随着溶剂挥发,PHB 逐渐凝结,液滴不断收缩,形成封闭的中空微球;当包封有多个初乳液滴时,在溶剂挥发、液滴不断收缩的过程中,被包封的初乳液滴不断受外界挤压,又逐渐结合在一起成为 1 个较大的液滴,最后同样形成封闭的中空微球。

若复乳液滴为图 2(c)所示的结构,其内包封了

较多的初乳液滴,则主要形成具有类似蜂巢结构的微球。在溶剂挥发过程中,复乳液滴收缩,油相中 PHB 逐渐凝结,其内包封的初乳液滴受挤压作用逐渐靠近,初乳液滴之间形成 PHB 薄壁。由于被包封的初乳液滴具有不可压缩性,则 PHB 薄壁易受力破裂,使微球内部形成很多贯通的孔隙。因此 SEM 照片观察的孔隙不仅仅存在于微球表面,也存在于整个微球的内部结构中,如图 3(c)、图 4(c)所示。

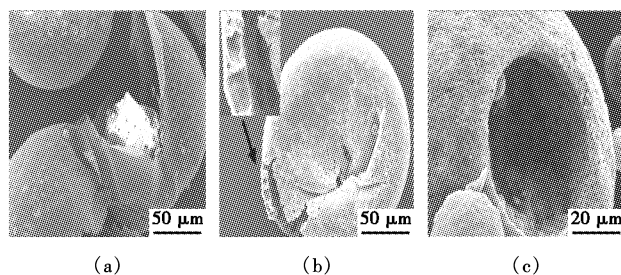
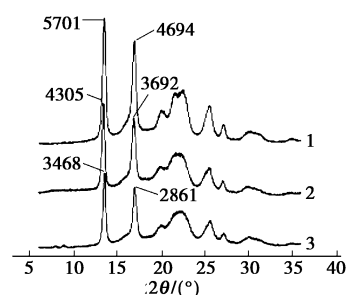


图 4 破裂的 PHB 微球 SEM 照片

2.3 PHB 凝结过程中的结晶行为

PHB 属结晶性聚合物,成球过程中其结晶行为将对微球孔隙度和表面形貌产生重要影响。结晶速率快,结晶度大,结晶部分在壳层中起到“支架”作用,使壳层很快变硬,而较硬的壳层会阻止液滴进一步收缩,易形成松散结构,形成的微球孔隙度大,表面形貌粗糙,皱褶多;反之,慢的结晶速率和较小的结晶度给液滴的收缩可提供更多的时间,壳层结构相对密实,形成的微球孔隙度较小,表面形貌相对平滑。



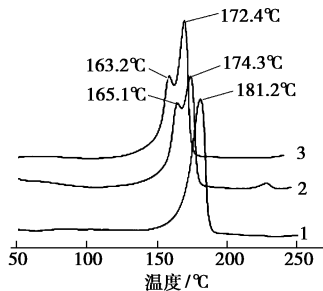
1—纯 PHB 原料;2— W_1 纯去离子水, W_2 为质量分数 2% PVA 溶液;3— W_1 和 W_2 均为质量分数 2% PVA 溶液

图 5 成球前后 PHB 的 X 射线衍射图

XRD 分析表明纯 PHB 原料在扫描范围 2θ 为 13° 、 17° 2 处有特征衍射峰,成球后的 PHB X 射线衍射图显示所有样品的特征衍射峰位置均没有发生变化,也无新的特征衍射峰出现,说明成球前后 PHB 的结晶结构没有变化,但原来较尖锐的衍射峰强度有所降低,结晶度下降(如图 5 所示)。表明随溶剂

挥发,PHB重新凝结形成微球壳层的过程中,分子链在晶格点阵中的堆砌及分子构象受到了影响,结晶度降低, W_1 中加入乳化剂PVA后,结晶度降低更加明显(图5曲线3),相应电镜照片显示,如图3(c),微球表面更趋平滑,孔隙度较小,皱褶较少。

DSC实验结果显示,纯PHB表现出单一的熔融峰,成球后PHB的熔融温度有所降低,且表现为双吸热峰的熔融行为(如图6所示)。在成球过程中,壳层中PHB的熔融重结晶或不同结晶阶段形成的不同完善程度片晶的熔融会表现出双吸热峰,其结晶度要低于纯PHB,当 W_1 内加入乳化剂PVA后,其结晶度降低更趋明显(图6曲线3),相应的SEM照片显示微球表面形貌与XRD实验结果相一致,微球表面形貌在结晶度较低时相对平滑、少孔。



1—纯PHB原料;2— W_1 纯去离子水, W_2 为质量分数2% PVA溶液;3— W_1 和 W_2 均为质量分数2% PVA溶液

图6 成球前后PHB的DSC谱图

3 结语

微球结构主要依赖于复乳液滴的结构,因此乳化过程中复乳液滴和初乳液滴的直径是影响微球结构的主要因素之一。在所有的成球工艺中均要求初乳液滴的直径要小于复乳液滴,这样经二次乳化后形成的复乳液滴内可以包封有1个或多个初乳液滴,溶剂挥发后可形成坍塌或瘪掉的微球、空心微囊或具有类似蜂巢结构的微球。

微球的孔隙度和表面形貌主要与溶剂挥发时PHB凝结过程中的结晶行为有关。另外,在成球过程中,复乳液滴逐渐收缩,被包封的初乳液滴受外界压力作用逐渐结合在一起,当初乳液滴不可压缩时,初乳液滴之间形成的PHB薄壁可能受力破裂,因此微球内部的孔隙是相互贯通的。

微球包封率和释放行为分别与成球过程中复乳

液滴内包封的初乳液滴的量及微球结构、表面形貌和孔隙度有关。通过选择合适的成球工艺,制备类似蜂巢或空心结构的微球,可以得到较理想的包封率和释放行为。但是,即使在较佳的成球工艺条件下,在溶剂挥发过程中,由于液滴逐渐收缩,仍然有部分被包封的 W_1 通过这些孔隙流失掉;另外,由于复乳液滴内包封的初乳液滴具有不可压缩性,PHB壳层可能受力破裂,使 W_1 流失。上述2种情况均会造成微球包封率的降低。同样原因,微球的破裂及其内部和表面的孔隙也是造成其应用时释放初期出现突释现象的主要原因。

参考文献

- [1] Ehtezazi T, Washington C. Controlled release of macromolecules from PLA microspheres: using porous structure topology[J]. *Journal of controlled release*, 2000, 68(3): 361 - 372.
- [2] Jain R A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices[J]. *Biomaterials*, 2000, 21(23): 2475 - 2490.
- [3] Kim T H, Park T G. Critical effect of freezing/freeze-drying on sustained release of FITC-dextran encapsulated within PLGA microspheres[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 271(1/2): 207 - 214.
- [4] Yang Y Y, Chia H H, Chung T S. Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method[J]. *Journal of Controlled Release*, 2000, 69(1): 81 - 96.
- [5] Sandor M, Ensore D, Weston P, *et al.* Effect of protein molecular weight on release from micron-sized PLGA microspheres[J]. *Journal of Controlled Release*, 2001, 76(3): 297 - 311.
- [6] Kato Y, Onishi H, Machida Y, *et al.* Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2003, 4(5): 303 - 309.
- [7] Cory B, Kipper M J, Narasimhan B, *et al.* Microsphere size, precipitation kinetics and drug distribution control drug release from biodegradable polyanhydride microspheres[J]. *Journal of Controlled Release*, 2004, 94(1): 129 - 141.
- [8] Reithmeier H, Herrmann J, Gopferich A, *et al.* Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides[J]. *J Control Release*, 2001, 73(2/3): 339 - 350.
- [9] Carelli V, Colo G D, Gesi M, *et al.* Mechanism of drug release from silicone microspheres containing polycarboxiphil[J]. *Journal of Pharmaceutics*, 1997, 153(1): 105 - 114.
- [10] Martin M A, Miguens F C, Rieumont J, *et al.* Tailoring of the external and internal morphology of poly-3-hydroxy butyrate microparticles[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2000, 17(2): 111 - 116. ■