

# 初乳搅拌速率对复乳法制备载蛋白微球性质的影响\*

黄小舟<sup>1</sup>, 成晓岚<sup>1</sup>, 罗宇燕<sup>1</sup>, 郭喆霏<sup>1</sup>, 钟 晨<sup>2</sup>, 张永明<sup>1</sup>

(1. 中山大学附属第三医院, 广东 广州 510630;

2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006)

**摘 要:** 采用复乳法制备载牛血清白蛋白的聚乳酸聚乙醇酸 (PLGA) 微球, 研究初乳搅拌速率 (5 000、10 000 和 15 000 r/min) 对微球性质的影响。以包封率、载药量、粒径等为指标, 评价其理化性质; 扫描电镜观察微球内外形态, 并通过图像分析软件计算其结构参数; 激光共聚焦显微镜观察蛋白在微球表面及骨架内的分布情况; 荧光摄取实验考察孔洞与微球表面连通情况; 并考察微球体外释药行为及降解过程中微球的内外形态变化。随着搅拌速率的增加, 微球表面及内部孔洞增加, 内部孔洞孔径减小, 微球释药及降解速率减慢, 但对微球粒径及截面孔隙率无显著影响。10 000 r/min 组, 微球包封率有最大值, 1 d 的突释率最低, 且有最低的表面孔洞连通率; 5 000 r/min 和 15 000 r/min 组, 微球突释率较高。不同初乳搅拌速率所得微球的内外形态在载蛋白的 PLGA 微球的释放中发挥重要作用。

**关键词:** 微球; 显微结构; 缓释; 聚乳酸聚乙醇酸; 初乳搅拌速率

**中图分类号:** R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2015) 03-0119-06

## Effect of Homogenization Speed on Morphology and Release of Protein Loaded PLGA Microspheres Made by WOW Method

HUANG Xiaozhou<sup>1</sup>, CHENG Xiaolan<sup>1</sup>, LUO Yuyan<sup>1</sup>, GUO Zhefei<sup>1</sup>, ZHONG Chen<sup>2</sup>, ZHANG Yongming<sup>1</sup>

(1. The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres loaded bovine serum albumin were prepared by WOW double emulsion method. The influence of homogenization speed during primary emulsion (5 000, 10 000, 15 000 r/min) on the physicochemical properties was investigated. Encapsulation efficiency, drug loading and particle size were used to evaluate the physicochemical properties of the microspheres. The surface and internal morphology of the microspheres was investigated by scanning electron microscopy (SEM). The structure parameters were analyzed by image analysis software. Confocal laser scanning microscopy was utilized to observe protein distribution within the skeletons of the microspheres. Finally, the connectivity of the microspheres was examined by the uptake experiments. Moreover, the release behaviors and the surface and internal structural evolution were also systematically studied. When the homogenization speed increased, the number of surface and internal pores increased, pore size of internal pores decreased. Besides, higher homogenization speed may result in slower drug release and degradation of the microspheres. But it caused no significant difference in the particle size and cross-sectioned porosity. In 10 000 r/min group, the microspheres showed highest encapsulation efficiency and

\* 收稿日期: 2014-10-29

基金项目: 广东省重大专项科技计划资助项目 (2011A080504003)

作者简介: 黄小舟 (1981 年生), 女; 研究方向: 药理学; 通讯作者: 张永明; E-mail: 874477522@qq.com

lowest burst release rate in the first day and lowest surface pore connectivity. While in 5 000 r/min and 15 000 r/min group, microspheres released faster, with a higher burst release. The microspheres prepared at different homogenization speed showed different surface and internal morphology, which play a significant role in *in vitro* release behaviors.

**Key words:** microsphere; microscopic structure; sustained-release; poly lactic acid glycolic acid; homogenization speed

利用生物可降解高分子材料包载蛋白类药物制备成可注射缓释微球,可延缓药物释放,减少给药频率,增加病人顺应性,减少毒副作用的发生。其中,聚乳酸聚乙醇酸(PLGA)是一种可生物降解且具有良好的生物相容性的聚合物材料,以其为载体制备可注射缓释微球制剂受到了广泛关注<sup>[1]</sup>。

目前已有许多使用复乳法制备载蛋白药物 PLGA 微球,并研究工艺参数对其包载性能、突释影响的报道。但是对工艺参数、微球内外结构、释放降解关系方面的研究是有限的<sup>[2]</sup>。因此,本文以复乳法中重要影响因素之一初乳搅拌速率作为考察的工艺参数,制备载牛血清白蛋白(BSA)的 PLGA 微球,研究该因素对微球内外形态、载药、释药和降解行为的影响,为载蛋白的长效微球制剂研发提供一定的理论基础。

## 1 试剂与仪器

### 1.1 试剂

牛血清白蛋白(BSA,美国 Genview 公司);聚乳酸聚乙醇酸(PLGA,美国伯明翰公司);异硫氰酸荧光素牛血清白蛋白(FITC-BSA)(美国 Sigma 公司);异硫氰酸荧光素(FITC)(美国 Sigma 公司);蛋白试剂定量盒 Micro BCA(美国 Pierce 公司);其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器

T25 高速匀浆器(德国 IKA 公司);RW16 电动搅拌器(德国 IKA 公司);SL16/40(R)冷冻离心机(美国 Thermo 公司);92SM-202A 电子天平(瑞士 Precisa 公司);TGL-18C 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂);ALPHA1-4LSC 冷冻干燥机(德国 CHRIST);Mastersizer2000 激光粒度仪(英国马尔文仪器有限公司);LSM710 激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司);LeicaCM1850 冷冻切片仪(德国徕卡);JSM-6330F 冷场扫描电镜(日本电子公司);BIO TEK ELX 800 全自动酶标仪(美国宝特公司);SHA B 水浴恒温振荡器(江苏省金坛市宏华制造厂)。

## 2 方法

### 2.1 BSA-PLGA 微球的制备

将适量的 BSA 粉末溶解于含一定浓度泊洛沙姆 188 的水溶液中,形成均一的内水相。将 PLGA 溶解于二氯甲烷中作为油相;然后把内水相注入油相中,在冰水浴中高速搅拌(转速分别设为 5 000、10 000 和 15 000 r/min)形成初乳(W/O);将初乳迅速转移至聚乙烯醇(PVA)溶液(外水相 1)中,搅拌形成复乳;最后将复乳转移至大体积的 PVA 溶液(外水相 2)中,低速搅拌 3 h 使有机溶剂挥发、微球固化。用蒸馏水洗涤 3 次,离心收集微球,冷冻干燥得微球成品。除将内水相中的 BSA 替换为 FITC-BSA 及避光操作外,FITC-BSA 微球的制备方法与上述方法一致。

### 2.2 微球包封率的测定

精密称取 BSA-PLGA 微球约 10 mg,加入 4.0 mL 裂解液(0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH / 5 mg·L<sup>-1</sup> SDS 水溶液),37 °C 恒温水浴振荡 48 h,使微球完全溶解。离心后,取上清液使用 BCA 法进行蛋白含量测定。按上述步骤处理空白微球作为对照。根据吸光度值换算得到微球的包封率。

### 2.3 微球的粒径分布及平均粒径

激光粒度仪被用于测定微球的粒径分布及平均粒径,本试验采用干法测量,遮光度为 0.5~6,测量时间为 8~10 s,分散气压为 150 kPa。

### 2.4 扫描电子显微镜

取适量的干燥微球或切片样品固定在导电胶上,置于真空条件下,喷上金粉。采用扫描电子显微镜(SEM)在电子束强度为 10 kV 的条件下观察微球形态。微球切片步骤为:先用明胶-甘油冷冻混合剂固定微球,然后在冷冻切片仪上进行切片操作<sup>[3]</sup>。每个处方的微球切片扫描电镜图片中选取至少 6 张,使用 Image J 软件分析微球截面的孔洞总面积及微球截面积,计算微球截面孔隙率<sup>[4]</sup>,并计算平均孔径。

$$\text{截面孔隙率} = \frac{\text{微球截面孔隙的总面积}}{\text{微球的截面积}} \times 100\%$$

进行降解过程中微球形态变化实验时, 于不同降解周期取出微球样品, 冷冻干燥后, 按上述条件观测微球内外形态。

## 2.5 激光共聚焦显微镜

采用激光共聚焦显微镜 (CLSM) 来考察初乳搅拌速率对微球内部药物分布的影响<sup>[5]</sup>。将包载有 FITC-BSA 的 PLGA 微球分散在激光共聚焦培养皿中使用油镜进行观测, 固定吸收波长/激发波长为 488/525 nm。

取适量微球置于 1.5 mL 离心管中, 加入少量  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 FITC 溶液, 在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  下孵育 4 h 后离心, 弃去上清液。加入 1 mL 蒸馏水清洗两次后, 转移至激光共聚焦培养皿中。在激光共聚焦显微镜下观察荧光染料扩散进入不同处方微球内部的情况。

## 2.6 微球的体外释放

精密称取约 50 mg BSA-PLGA 微球, 置于 5 mL 的离心管中, 加入 1.5 mL PBS 溶液, 于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温水浴振荡器中。分别于不同时间点离心过滤, 取出上清液, 同时补加新鲜的 PBS。使用 BCA 法测定所取样品中的蛋白含量, 计算累积释药量, 绘制体外释药曲线。

## 3 结果

### 3.1 初乳搅拌速率对微球性质的影响

初乳稳定性是复乳法中影响微球性质的重要因素之一。在相同的内水相/油相比例下, 初乳的搅拌速率与内水相液滴分散程度密切相关, 直接影响初乳的性质<sup>[6]</sup>, 进而对微球的性质产生影响(见表 1、图 1)。

表 1 初乳搅拌速率对微球性质的影响 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )

Table 1 Characteristics of PLGA microspheres prepared at different homogenization speed ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )

初乳搅拌速率/( $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ )	包封率/%	平均粒径/ $\mu\text{m}$	截面孔隙率/%	平均孔径/ $\mu\text{m}$
5 000	$75.88 \pm 1.81$	$78.75 \pm 2.81$	$37.60 \pm 6.85$	$7.53 \pm 0.27$
10 000	$79.57 \pm 3.14$	$77.30 \pm 1.77$	$39.12 \pm 1.29$	$3.76 \pm 0.087$
15 000	$74.76 \pm 1.84$	$78.79 \pm 3.76$	$39.31 \pm 8.28$	$2.50 \pm 0.28$

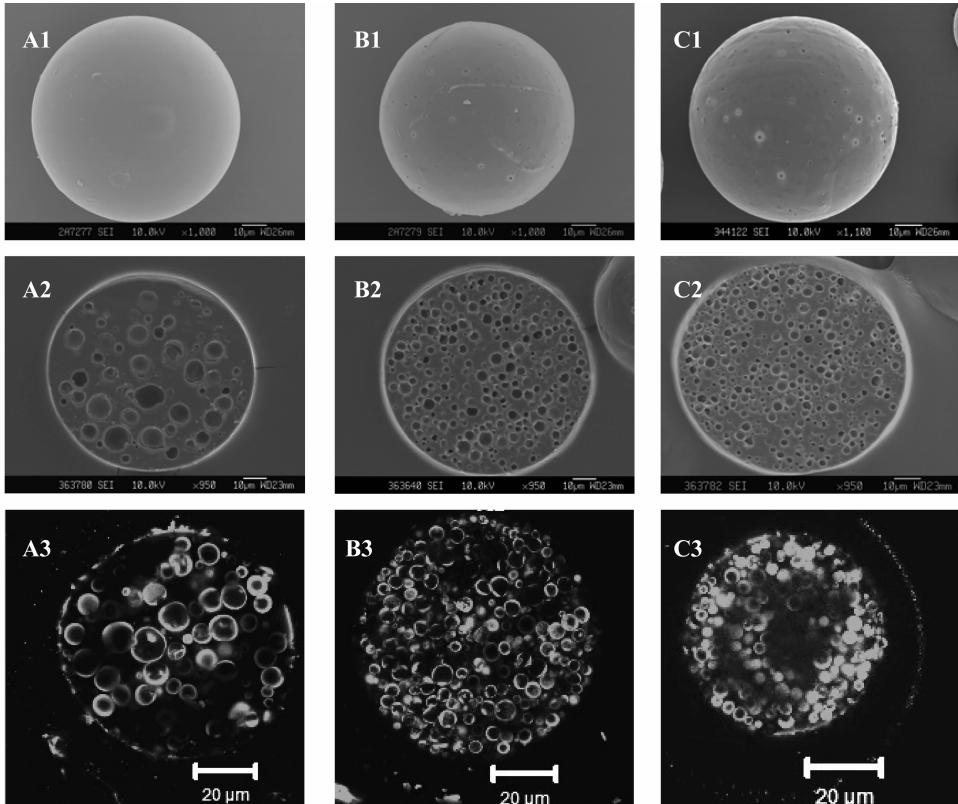


图 1 不同初乳搅拌速率制备微球的外观、内部形态及药物分布

Fig. 1 Internal and surface morphology of microspheres and distribution of FITC-BSA prepared at different homogenization speed A: 5 000 r/min 组微球 (A1: 外观 SEM 图; A2: 截面 SEM 图; A3: CLSM 图); B: 10 000 r/min 组微球 (B1: 外观 SEM 图; B2: 截面 SEM 图; B3: CLSM 图); C: 15 000 r/min 组微球 (C1: 外观 SEM 图; C2: 截面 SEM 图; C3: CLSM 图)

实验数据表明, 初乳搅拌速率对微球的内外形态具有较为显著影响, 当初乳搅拌速率为 5 000 r/min 时, 微球的表面光滑致密, 随着初乳搅拌速率的增加, 微球表面的孔洞逐步增加, 同时微球内部孔洞的孔径减小; 但初乳搅拌速率对微球的孔隙率及粒径无显著影响。当初乳搅拌速率从 5 000 r/min 增加至 10 000 r/min 时, 微球的包封率增加, 继续增加至 15 000 r/min 时, 包封率则降低。

### 3.2 初乳搅拌转速对微球体外释放的影响

考察不同初乳搅拌转速制得的微球体外释药行为: 分别测定不同时间的释药量以横坐标为释药时间, 纵坐标为累计释药百分比绘制曲线 (图 2)。

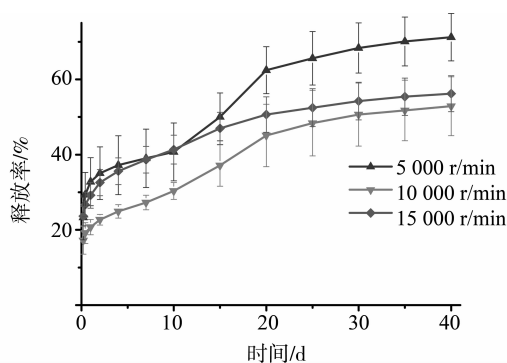


图 2 初乳搅拌速率对药物释放的影响

Fig. 2 Influence of homogenization speed on the release of protein from microspheres

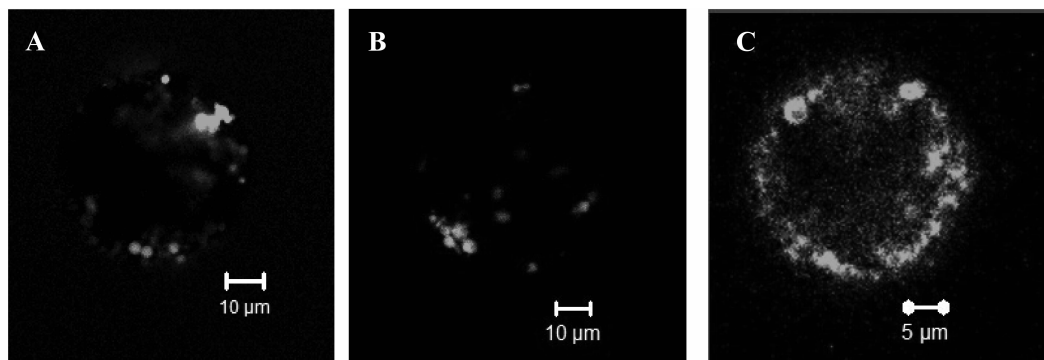


图 3 不同初乳搅拌速率所得微球的摄取实验

Fig. 3 Uptake experiments of microspheres prepared at different homogenization speed (A: 5 000 r/min; B: 10 000 r/min; C: 15 000 r/min)

由图可得, 不同初乳搅拌速率制备的微球在前四周呈现类似的降解规律, 均为微球表面逐步变得粗糙且孔洞增加, 而内部则出现大量的小孔洞, 原有较大的孔洞一部分由于 PLGA 基质的融合消失, 一部分由于聚合物材料自身降解, 相邻的孔洞连通而进一步增大。在第 6 周时, 初乳搅拌速率为 5 000 r/min 制备的微球表面出现大量的裂隙, 截

当初乳搅拌转速为 5 000 r/min 时, 微球的突释率为 32.8%, 40 d 累积释放约 70%; 增加转速至 10 000 r/min 时, 微球的突释率显著降低至 20.74%, 40 d 内以均匀的速率累积释放约 50%; 当转速为 15 000 r/min 时, 微球突释率上升至 29.19%, 40 d 内缓慢地释放了接近 55%。

### 3.3 初乳搅拌转速对微球摄取荧光的影响

小分子的荧光素 FITC 可随溶液的扩散分布到微球孔洞中, 当微球表面孔洞与其内部孔洞连通时, FITC 便可分散到内部孔洞。通过在共聚焦显微镜下观察微球对荧光素的摄取情况, 可得知微球表面孔洞的连通情况<sup>[7]</sup>。由图 3 可知, 5 000 r/min 和 15 000 r/min 组微球表面荧光素 FITC 的量较大, 并渗透到微球内部的孔道中; 而 10 000 r/min 组微球表面的荧光素 FITC 分布量少, 渗入到微球内部的量也较少。

### 3.4 微球降解过程中内外形态的变化

在释放的初级阶段, 药物通过微球中聚合物高分子链间隙以及孔隙等通道从载体材料中扩散释放出来, 随着释放时间的延长, 由于 PLGA 的降解, 微球产生一系列的理化性质及结构的改变, 从而引起药物扩散路径的改变, 间接调控药物的释放<sup>[8-9]</sup>。采用扫描电子显微镜观察微球在降解过程中内外形态的变化, 结果见图 3。

面图像显示明显的中空结构; 初乳搅拌速率为 10 000 r/min 时, 微球内部的孔洞大量贯通; 初乳搅拌速率为 15 000 r/min 的微球只在表面存在较大的孔洞而无裂隙, 内部部分孔洞连通, 连通程度低于初乳搅拌速率为 10 000 r/min 的微球。整体而言, 随着初乳搅拌速率的增加, 微球的降解速率减慢。

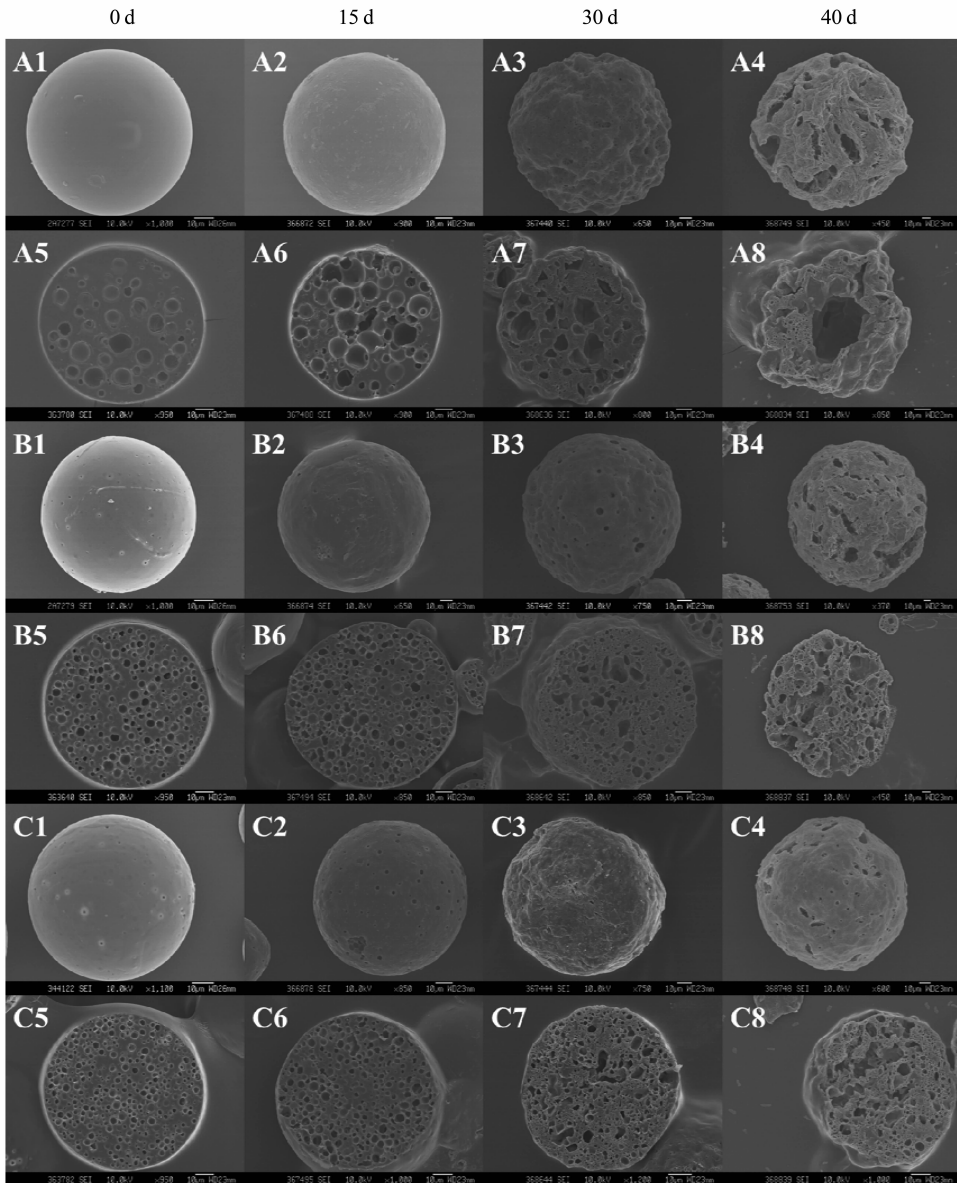


图 4 不同初乳搅拌速率制备微球在降解中外观及内部形态的变化

Fig. 4 Internal and surface morphology of microspheres prepared at different homogenization speed at different incubation stages (A1 – A8; 5 000 r/min; B1 – B8; 10 000 r/min; C1 – C8; 15 000 r/min)

## 4 讨论

本文以初乳搅拌速率为切入点，考察该因素对复乳法制备的 BSA-PLGA 微球的内外形态、载药、释药及降解行为的影响。

当搅拌速率增加时，初乳中形成的内水相液滴数目增加而体积减小，因而在同样的复乳体系中油相含有更多更小的内水相液滴，同时，出现在微球表面附近的内层结构中的液滴也相应增多，在微球的固化阶段，在微球表面形成的孔洞也随之增多且内部孔洞孔径变小。当初乳搅拌速率从 5 000 r/min 增加至 10 000 r/min 时，由于初乳的稳定性增

加，微球的包封率提高；进一步提高至 15 000 r/min 时，由于内水相液滴的增多导致其向外水相中逃逸的概率增加，包封率反而降低。

PLGA 微球的释药行为由药物在聚合物基质中的扩散及 PLGA 的降解两方面控制。在释放的初级阶段，药物通过微球中聚合物高分子链间隙以及孔隙等通道从载体材料中扩散释放出来，随着释放时间的延长，由于 PLGA 的降解，微球产生一系列的理化性质及结构的改变，从而引起药物扩散路径的改变，间接调控药物的释放。

本实验中，5 000 r/min 和 15 000 r/min 组突释较高，而 10 000 r/min 组突释最低。分析原因如

下: 在降解前 3 组微球均具有相似的平均粒径和截面孔隙率, 但是摄取实验表明尽管 5 000 r/min 组表面孔洞较少, 由于孔径较大, 与微球表面连通的区域较大; 15 000 r/min 组表面孔洞较多, 且与内部孔洞有一定的连通; 而 10 000 r/min 组表面孔洞较少, 孔洞连通率也较低。由于表面孔洞数目和孔洞与微球表面连通情况的差异造成释放过程中释放液进入微球内情况的差异<sup>[10]</sup>, 对于前两组微球, 在释放过程中, 释放液更易进入微球, 使蛋白溶出增多, 导致初始释放量较大。

此外, 5 000 r/min 组 40 d 内累积释放量最多; 而 10 000 r/min 组以均匀的速率释放药物, 累积释放量最少。分析原因如下: 降解过程中, 微球形态的变化与药物释放曲线相关联。初始状态下, 5 000 r/min 表面孔洞较少, 降解产物扩散到外界的通道较少, PLGA 酸性降解产物在微球内部大量累积, 自催化效应使微球内部的降解进一步加速<sup>[11]</sup>。并由于该组微球内部孔径较大, 致使降解 6 周内, 内部孔洞不断融合变大, 最终形成中空结构。上述过程中, 微球表面及内部的孔道变大, 使该组微球在中后期以较快的速率释药; 类似的, 10 000 r/min 组的微球表面孔洞及表面孔洞连通率较低, 降解产物扩散通道较少, 致使降解 6 周内, 微球内部孔洞逐渐融合变大, 最后大部分孔洞连通, 可见微球 40 d 内以较均匀的速率释放; 而 15 000 r/min 组的微球表面孔洞多, 且表面孔洞连通率较高, 这些表面孔隙为降解产物的扩散提供了水性通道, 使酸性降解产物更易进入释放介质而不是累积在微球内部。因此降解 6 周内, 该组微球内部孔洞的连通度较低, 表面孔洞数目相对少, 对应其释放曲线, 可见释药缓慢, 第 2 天至第 40 天内累积释放仅约 20%。

结果表明, 初乳搅拌速率的增加, 对所得微球粒径和截面孔隙率没有明显影响; 而表面及内部孔洞数目增加, 内部孔洞孔径减少; 微球的突释率先减少后增加, 释药及降解速率减少。

#### 参考文献:

[1] QI Feng, WU Jie, YANG Tingyuan, et al. Mechanistic studies for monodisperse exenatide-loaded PLGA micro-

spheres prepared by different methods based on SPG membrane emulsification [J]. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10(10):4247-4256.

- [2] WANG Yan, GU Bing, BURGESS D J. Microspheres prepared with PLGA blends for delivery of dexamethasone for implantable medical devices [J]. *Pharmaceutical Research*, 2014, 31(2):373-381.
- [3] 黎呐, 麦海燕, 罗宇燕, 等. 聚乳酸聚乙醇酸微球冷冻切片方法的研究 [J]. *广东药学院学报*, 2014, 30(1):1-5.
- [4] MAO Shirui, XU Jing, CAI Cuifang, et al. Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC dextran loaded PLGA microspheres [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 334(1/2):137-148.
- [5] 罗宇燕, 麦海燕, 黎呐, 等. 复乳法及其改良法制备的干扰素 PLGA 微球载药释药特性的对比 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2014, 53(3):110-114.
- [6] YANG Yang, GAO Yongliang, MEI Xingguo. Effects of formulation parameters on encapsulation efficiency and release behavior of thienorphone loaded PLGA microspheres [J]. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2013, 18(5):1169-1174.
- [7] 周香莲, 贺进田, 周志涛, 等. 外水相中 NaCl 对 S/O/W 法制备的牛血清白蛋白 PLGA 缓释微球性质的影响 [J]. *药学学报*, 2014, 45(8):1057-1063.
- [8] ROTHSTEIN S N, FEDERSPIEL W J, LITTLE S R. A unified mathematical model for the prediction of controlled release from surface and bulk eroding polymer matrices [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(8):1657-1664.
- [9] ROTHSTEIN S N, FEDERSPIEL W J, LITTLE S R. A simple model framework for the prediction of controlled release from bulk eroding polymer matrices [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2008, 18(16):1873-1880.
- [10] KIM T H, PARK T G. Critical effect of freezing/freezing-drying on sustained release of FITC-dextran encapsulated within PLGA microspheres [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 271(1):207-214.
- [11] SIEPMANN J, ELKHARRAZ K, SIEPMANN F, et al. How autocatalysis accelerates drug release from PLGA-based microparticles: A quantitative treatment [J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6(4):2312-2319.