

明胶微球粒径控制的研究^{*}

孙瑞雪^{1,2} 史京京¹ 郭燕川^{1,2} 陈丽娟^{1**}

(¹ 中国科学院理化技术研究所 北京 100080) (² 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要 采用乳化-凝聚法,在油包水(w/o)的体系中,对明胶微球(GMs)粒径、微球的形态和分散性等进行了研究.扫描电子显微镜(SEM)和粒径分布曲线的结果表明,在乳化体系中,提高明胶溶液的浓度或水油比例,明胶微球的粒径增大,增加乳化剂的用量,微球的粒径减小.选择合适的乳化时间和搅拌速率,可以改善微球的分散性和表面光滑程度.同时,通过调控实验条件,在明胶溶液浓度 0.100 g/mL,水油比 1/5,乳化剂浓度 0.05 g/mL 时研制出了平均粒径为 3.58 μm 的表面光滑、分散性好的明胶微球.

关键词 明胶微球, 乳化法, 研制条件, 粒径, 表面形貌

乳化法由 Tanaka^[1] 等首先提出.该法与其它方法相比,所需要的设备简易、操作简单、条件温和,已成为生物、医学等领域中研制明胶微球的最常用的一种方法^[2-9].但是该方法在实际操作中,各种条件的影响使得研制一定粒径的微球难度较大,通常人们制得的微球粒径偏大、分布范围宽、表面形貌不理想^[10,11].目前对明胶微球用途最广研究最多的是载药微球的研究.詹国平^[12] 等以明胶为载体制成硫酸链霉素明胶微球,研究了研制 5.0 ~ 25.0 μm 粒径范围的微球时乳化剂、交联剂、搅拌速率的影响,作者认为搅拌速率很关键,但没有进行深入探讨.李维新^[13] 等也是以明胶为基材研制医用微球,研制的微球粒径范围达 50 ~ 1000 μm ,并借助于筛子筛选出不同粒径分布范围的明胶微球. Elisabetta^[14] 等在研制明胶微球中,对明胶浓度、搅拌速率、油相的选择、乳化剂的类型和浓度等进行了综合考察,研制出 6 ~ 105 μm 范围的微球.但是,作者研制微球的重点仍在微球载药后的包封率控制和改善药物的疗效上,对明胶微球粒径及分散性的影响鲜见详细的探讨.

目前文献报道的对明胶微球粒径控制技术的专一性研究很少,主要是以药物微球载药量和包封率为目的展开的研究.本文采用乳化-凝聚法,系统研究了明胶溶液浓度、乳化剂浓度、乳化时间、水油比和搅拌速率等,重点考察了这些因素对明胶微球粒径和分散性的影响.实验结果表明,随着明胶溶液浓度和水油比例的增加,明胶微球的粒径增大;随着乳化剂用量的增加,微球粒径减小.选择合适的乳化时间和搅拌速率,可以改善微

球的分散性和表面光滑程度.通过实验研究,本文研制出分散性好、表面光滑、平均粒径为 3.58 μm 的小粒径明胶微球.利用常规方法有效控制明胶微球的粒径范围,这对药物、生物及其它领域的应用与发展提供了一个很好的平台.

1 实验部分

1.1 试剂

商品明胶,食用油,北京艾森绿宝油脂有限公司;失水山梨醇单油酸酯(Span 80),化学纯,北京化学试剂公司;戊二醛溶液(50%),生化试剂,北京化学试剂公司;丙酮,分析纯,北京化学试剂公司;蒸馏水.

1.2 明胶微球的研制

选用 250 mL 的三口烧瓶,加入一定体积的食用油,搅拌下加入乳化剂,水浴加热至 50 ~ 60℃;随后加入明胶溶液,并选定乳化时间进行乳化.待乳化完成后,迅速将三口烧瓶移入冰水浴,使体系温度降至 10℃ 以下,再加入 50 μL 50% 的戊二醛溶液,交联固化 60 min.然后,在体系中加入 30 mL 丙酮脱水 40 min;最后,将样品抽滤,丙酮洗涤 3 次,自然晾干,得到浅黄色的粉末产物.本实验得到的微球产率均在 80% 以上,各条件的具体参数见结果与讨论.

1.3 表征

先将双面导电胶粘贴在样品台上,再取少量明胶微球粉末粘在导电胶上,真空喷金 60 s.然后,用扫描电子显微镜(SEM, Hitachi 4300-S)观察微球的形态,拍照,得到不同分布形态的明胶微球

照片.用 SemAfore 4 Demo 软件测量 SEM 照片上的微球直径,统计 200 个以上的微球直径,计算出平均粒径和标准偏差,绘出粒径分布图.

2 结果与讨论

2.1 明胶溶液浓度对微球粒径的影响

明胶溶液的浓度是影响微球粒径和形态的关键参数之一.当溶液浓度低于 0.020 g/mL 时,明胶在溶液中难以形成球体.因为,明胶溶液液滴中的水分含量高,一旦形成凝胶,脱水后得到的是不规则的颗粒,其内部结构疏松,见图 1 所示.因此,制备微米级明胶微球时明胶溶液的浓度不宜过低.本节选用 0.050、0.075、0.010、0.125、0.150、0.175、0.200 g/mL 7 个不同的明胶溶液浓度,恒定水油比 1:5,搅拌速率 900 r/min,乳化时间 10 min,不添加乳化剂的条件下进行实验,比较不同浓度下制得的明胶微球.

图 2 是其中 4 个不同明胶溶液浓度下得到的

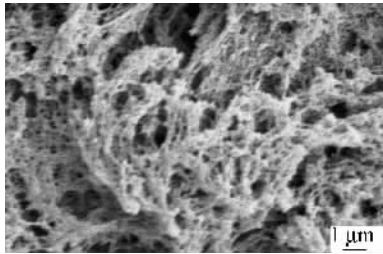


图 1 The SEM image of the surface morphology of GMs
Gelatin concentration :0.020 g/mL

微球 SEM 图.由图可见,明胶溶液浓度较低时制得的微球出现团聚现象(图 2a、图 2b 中箭头所示),这仍归因于明胶在溶液中的低浓度,使明胶液滴含水量偏高,加之在搅拌过程中球与球之间的碰撞,使原本疏松结构的微球形态更易遭到破坏.继续增加明胶溶液浓度(图 2c、图 2d),微球的球形和分散性得到大大改善,相互粘连与团聚现象消失.

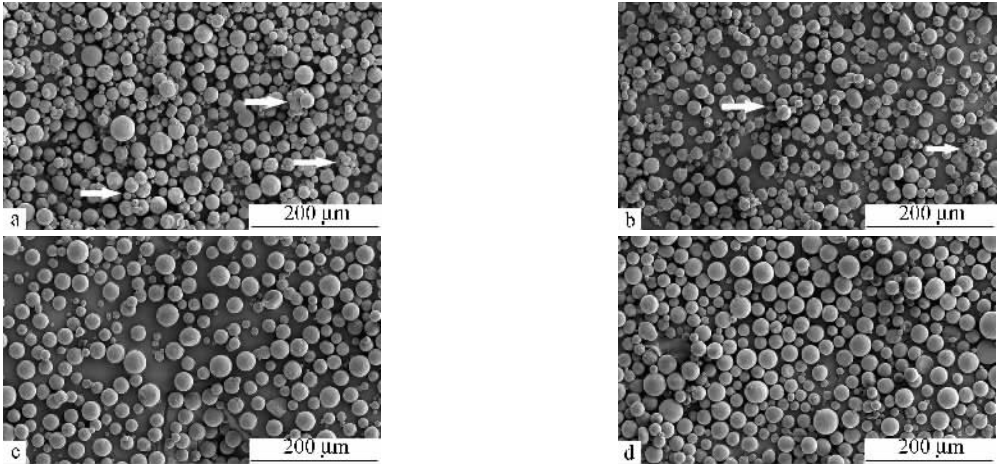


Fig. 2 The SEM image of the GMs at different gelatin concentrations
a) 0.075 g/mL ; b) 0.125 g/mL ; c) 0.175 g/mL ; d) 0.200 g/mL

Table 1 Size distribution percentage of gelatin microspheres (GMs) prepared with different gelatin concentrations

No.	Gelatin concentration (g/mL)	Diameter range (μm)								$\bar{d}^a$ (μm)	SD ^b (μm)	
		4 ~ 8	8 ~ 12	12 ~ 16	16 ~ 20	20 ~ 24	24 ~ 28	28 ~ 32	32 ~ 36			36 ~ 40
A	0.050	31.19	34.40	20.18	11.47	1.83	0.46	0.46	0	0	10.80	4.77
B	0.075	25.00	16.50	27.00	14.00	7.00	7.50	1.00	2.00	0	13.80	7.03
C	0.010	4.55	12.27	29.55	26.82	20.91	5.00	0.90	0	0	16.12	5.35
D	0.125	1.00	13.50	20.50	33.50	19.50	9.00	3.00	0	0	17.37	5.48
E	0.150	0.50	4.00	16.50	20.50	27.00	23.50	8.00	0	0	20.56	5.77
F	0.175	0	2.00	10.00	17.00	24.00	28.50	11.00	5.00	2.50	22.95	6.41
G	0.200	0	0.92	5.50	22.02	24.77	22.94	15.14	5.96	2.75	23.69	6.08

^aThe average diameters of GMs ;^bThe standard deviations of the GMs ' diameters

表 1 是统计微球直径后,将不同粒径范围的微球个数换算成百分率含量,得到的粒径分布表.

从表中可以看出,当明胶溶液浓度从 0.050 g/mL 逐渐增加至 0.200 g/mL 时,微球直径以 4 μm 为一个浓度区间,微球直径的最可几分布范围分别为 8 ~ 12、12 ~ 16、12 ~ 16、16 ~ 20、20 ~ 24、24 ~ 28、20 ~ 24 μm . 这说明随着明胶溶液浓度的增加,微球的粒径逐渐增大. 图 3 是微球的平均直径与溶液浓度的关系图,它更直观地显示了二者的关系. 由图可见,微球的平均粒径随明胶溶液浓度的提高而增大,二者呈直线关系.

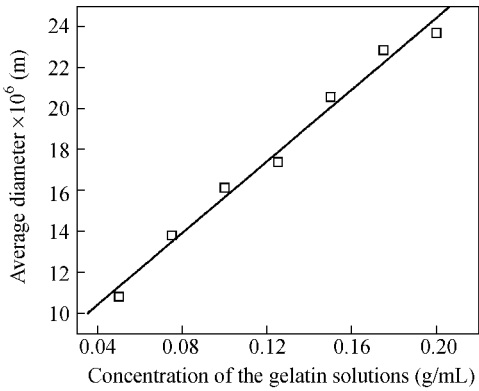


Fig. 3 The relation of gelatin concentration and the average diameter of GMs

2.2 乳化剂浓度的影响

本节选用乳化剂的目的,是降低乳化时油-水间的界面张力,使分散相易于形成较小而稳定的液滴. 乳化剂的介入有利于制备小粒径、分散性好的明胶微球,是影响微球粒径和形貌的一个关键因素之一.

乳化剂的种类与乳化的对象及性能相关. 本实验选择亲油性的 Span 80 作为乳化剂. 在实验过程中,恒定明胶溶液浓度 0.100 g/mL,水油比 1:5,搅拌速率 900 r/min,乳化时间 10 min 等实验条件. 针对乳化剂的浓度及变量对微球粒径、球形和分散性的影响进行研究.

图 4 是乳化剂的浓度从 0 增大到 0.080 g/mL,微球的平均粒径变化图,图中出现了一个近似 L 形的曲线. 当乳化剂的浓度在 0 ~ 0.020 g/mL 之间时,微球粒径变化极大,从 17.32 μm 迅速减小至 5.38 μm ;当乳化剂的浓度继续增加至 0.040 g/mL 时,粒径减小缓慢. 此时乳化剂的浓度增大了 1 倍,微球的平均粒径为 4.08 μm ,仅减小了 1.30 μm . 继续增加乳化剂的浓度,微球的平均粒径始终在 4.0 ~ 5.0 μm 范围内波动,不再出现明显变化. 这说明了乳化剂的浓度与微球粒径不成

正比例关系,而是有一个适当的范围.

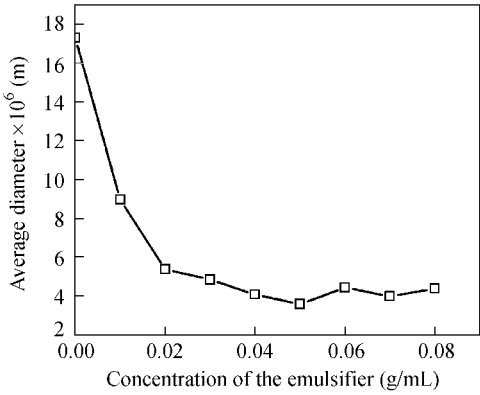


Fig. 4 The particle size at different concentration of Span 80

本实验选用的乳化剂,其浓度在 0.050 g/mL 时,曲线出现了一个最低点,这就是制得微球粒径的最小值 3.58 μm 处. 图 5 和图 6 分别是此时微球的 SEM 照片和粒径分布柱形图,微球粒径分布比较集中,1.0 ~ 5.0 μm 之间的微球占到 94.39%.

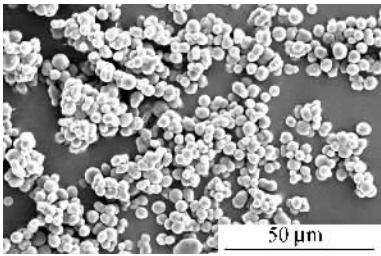


Fig. 5 The SEM image of GMs formed in 0.050 g/mL emulsifier concentration

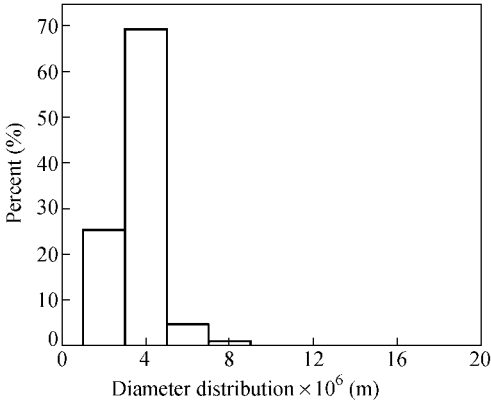


Fig. 6 The diameter distribution of GMs formed in 0.050 g/mL emulsifier concentration

以上实验结果分析表明在乳化过程中,乳化剂的浓度从低到高,微球的平均粒径从大到小. 原

因可能是,当乳化剂开始加入时,打破了油水界面张力的正常值,使表面张力降低,液滴直径迅速变小;当增大乳化剂时,也相应增加了微液滴表面的吸附量,此时界面张力继续减小,液滴直径也在变化.继续增大乳化剂浓度,超过了它在微液滴表面的吸附量,微球粒径不再继续减小^[15].

2.3 水油比的影响

以上两节讨论了明胶和乳化剂的浓度对微球的粒径和形貌的影响规律.乳化体系中还有另一个量度值必须引起我们的关注,那就是水相和油相加入的比例,它对制得明胶微球的形态具有重要的影响.

同样,恒定一些参数,如明胶溶液浓度 0.100 g/mL、乳化剂浓度 0.050 g/mL、搅拌速率 900

r/min、乳化时间 10 min 等,分别以 1/10、1.5/10、2/10、2.5/10、3/10、3.5/10、4/10 这 7 个不同的水油比例进行系列实验(见图 7).由图可见,随着水相体积的增大,微球的表面由凸凹不平到比较光滑;另外,微球的粒径也随着乳化体系中水分的增多而逐渐增大.以水油比为横坐标,微球的平均粒径(μm)为纵坐标绘制平均粒径随水油比的变化图(图 8).从图中可见,微球的平均粒径随水油比的增大呈线性增加(线性相关系数 $R = 0.99$).根据实验结果认为,水油比例越小越有利于水相分散成较小的液滴;水油比越大,油相的分散能力越小,形成的液滴越大,固化之后得到的微球就越大.可以得出,调控水相和油相的比例来控制微球形成的大小与形态是可能的.

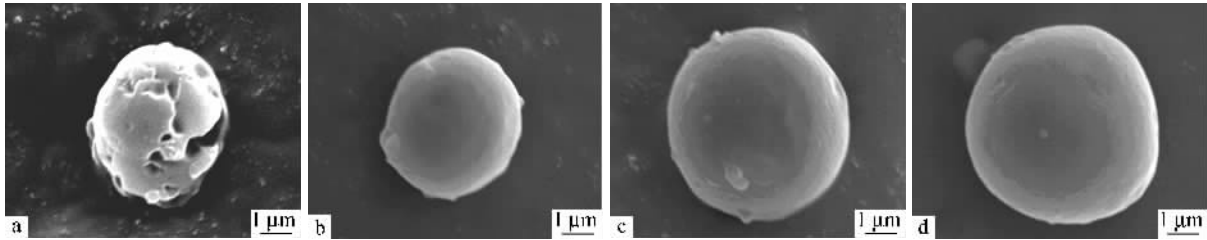


Fig. 7 The SEM image of GMs obtained at different ratios of w/o
a) 1/10 ; b) 2/10 ; c) 3/10 ; d) 4/10

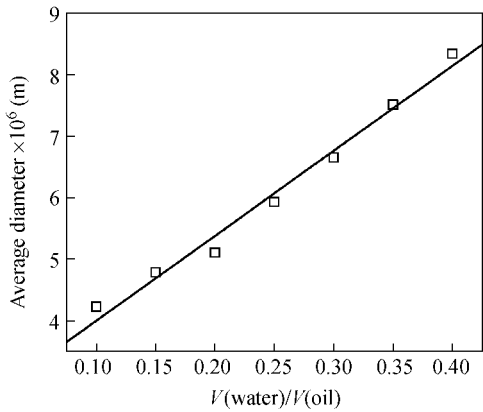


Fig. 8 The relation of w/o ratio and GMs average diameter

2.4 乳化时间的影响

实验发现,在反相乳化过程中,分散相在外力作用下形成的乳液液滴,要经过一定的时间才能达到稳定,这期间液滴会发生相分离、聚集、聚结、

相转化等多种变化,直接影响了微球的大小、形态和结构.因此,为了得到期望中的颗粒小、均匀、形态良好的明胶微球,必须有效控制乳化时间.恒定其它条件(明胶溶液浓度 0.100 g/mL,乳化剂浓度 0.020 g/mL、搅拌速度 900 r/min,水油比 1/5),选取 1 ~ 20 min 内每隔 2 min 的 10 个时间点进行实验.

乳化时间与微球平均粒径的关系如表 2.从表中可见,当其它实验条件恒定时,在不同的乳化时间得到的微球,平均粒径变化不大,实验认为微球粒径随乳化时间不成比例关系.图 9 是在不同乳化时间下研制的明胶微球 SEM 照片.由图可见,乳化 1 ~ 5 min 是一个质的变化,微球从团聚到逐渐分散开来;5 min 后是微球形态改变的调整期,乳化 13 min 比乳化 5 min 得到的微球规整,分散性好,15 min 后微球之间又出现粘连现象.通过多次反复实验,认为乳化时间 13 min 是得到较好微球分散状态的最佳条件.



Table 2 The mean diameter of GMs prepared with different emulsifying time

Emulsifying time (min)	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19
Particle range (μm)	3 ~ 14	2 ~ 17	2 ~ 16	3 ~ 21	3 ~ 17	4 ~ 22	3 ~ 14	3 ~ 21	3 ~ 20	3 ~ 21
Average particle size (μm)	7.72	8.32	8.20	8.56	9.42	10.09	8.34	8.26	8.22	8.19

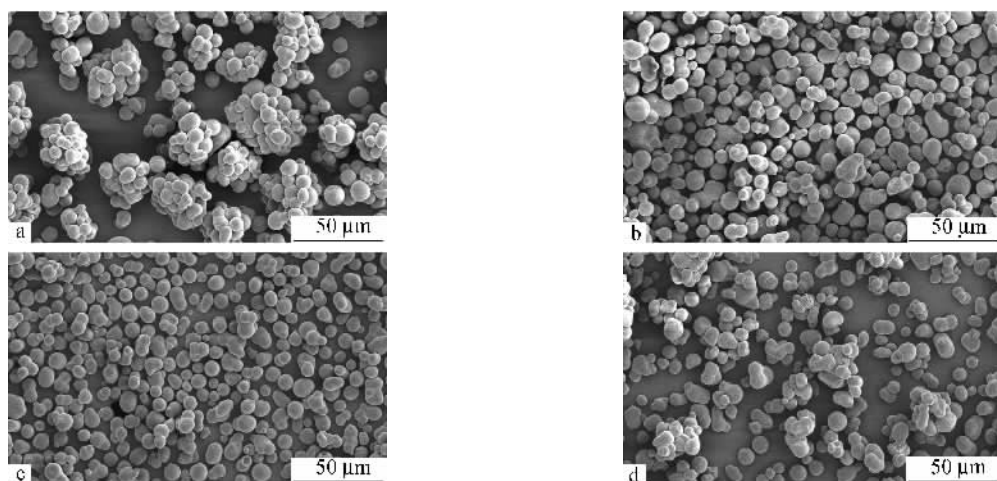


Fig. 9 The SEM image of GMs obtained at different emulsifying time
a) 1 min ; b) 5 min ; c) 13 min ; d) 15 min

2.5 乳化时搅拌速率的影响

搅拌速率的大小是一个物理行为的改变,但在反相乳化-凝聚法中起着重要的角色.

在乳化过程中,恒定其它实验条件(明胶溶液浓度 0.100 g/mL,乳化剂浓度 0.020 g/mL、乳化时间 10 min,水油比 1/5),分别选用 3 个不同范围的搅拌速率.实验发现,当搅拌速率低于 500 r/min 时,微球粒径较大,大颗粒上又粘连有小颗粒;当提高搅拌速率,微球的分散性有明显改善,粒径减小,形态变好;当搅拌速率升至 1500 r/min,微球的分散性反而变差,球与球之间抱团,严重粘连.

不同的搅拌速率下,影响明胶微球粒径及分散性的原因可能是,当搅速较低时,水相受到的作用力较小,不能被有效地分散成液滴,形成的乳液也不够稳定,液滴容易相互接触,絮凝或沉降,因此得到的微球较粘连.搅速增加,乳液各部位受到的剪切力增大,趋于均匀,形成较小尺寸、较均匀

的液滴,并且被搅拌离心力所稳定,不易发生沉降而相互聚结,从而使得直径较小、均匀、分散性好的微球;但是,当搅速过大时,乳液体系会形成湍流,反而使液滴受到的作用力不均匀,液滴之间因碰撞而发生变形、破损的几率也加大,这对形成的微球的形状造成破坏,球形变得不均匀^[14,16].

3 结论

减小明胶溶液浓度、减小水油比例、增大乳化剂用量等都能够减小明胶微球的粒径.提高乳化的搅拌速率、选择合适的乳化时间等有利于微球的分散性和球形的圆整度.本文通过优化实验条件,研制出表面光滑、分散性好、平均粒径在 3.58 μm 的明胶微球.并从实验原理上进行了可能的分析,这对控制明胶微球的粒径提供了科学的实验依据.

REFERENCES

- 1 Tanaka N, Takino S, Utsumi I. *J Pharm Sci*, 1963, 52(7): 664 ~ 667
- 2 Maria A V, Marcello R, Alessandra M, Manuela G, Paolo G, Francesco R, Flavio F. *J Control Release*, 2004, 96: 67 ~ 84
- 3 Kawaguchi H. *Prog Polym Sci*, 2000, 25: 1171 ~ 1210
- 4 Jian W, Yasuhiko T, Kazuhiro M. *J Control Release*, 2006, 113: 31 ~ 37
- 5 Wu H, Zhang Z X, Wu D C, Zhao H P, Yu K T, Hou Z Q. *J Biomed Mater Res B*, 2006, 78B: 56 ~ 62
- 6 Mi F L. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 975 ~ 987
- 7 Narayani R, Panduranga R K. *Int J Pharm*, 1996, 143: 255 ~ 258
- 8 He Ping(贺坪), Cui Longlan(崔陇兰), Qiang Weili(强伟丽), Xu Hong(徐宏), Gu Hongchen(古宏晨). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2007, (8): 731 ~ 736
- 9 Xue Ping(薛屏), Liu Haifeng(刘海峰). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2007, (1): 64 ~ 69
- 10 Vandelli M A, Rivasi F, Guerra P, Forni F, Arletti R. *Int J Pharm*, 2001, 215: 175 ~ 184

- 11 Kim H W,Yoon B H,Kim H E. *J Mater Sci Mater Med*,2005,16 :1105 ~ 1109
- 12 Zhan Guoping(詹国平),Huang Kelong(黄可龙),Xie Enwei(谢恩伟). *Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志)*,2005,25(7) :625 ~ 628
- 13 Li Weixin(李维新),Gao Guodong(高国栋),Liang Qinchuan(梁秦川). *J Fourth Mil Med Univ(第四军医大学学报)*,2001,22(19) :1812 ~ 1814
- 14 Esposito E,Cortesi R,Nastruzzi C. *Biomaterials*,1996,17 :2009 ~ 2020
- 15 Eric D. *Food Hydrocolloid*,2003,17 :25 ~ 39
- 16 Freiberg S,Zhu X X. *Int J Pharm*,2004,282 :1 ~ 18

STUDIES ON PARTICLE SIZE CONTROL OF GELATION MICROSPHERES

SUN Ruixue^{1,2}, SHI Jingjing¹, GUO Yanchuan^{1,2}, CHEN Lijuan¹

(¹ *Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

(² *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049*)

Abstract A series of gelatin microspheres (GMs) were prepared through emulsification-coacervation method in water-in-oil (w/o) emulsions. The influence of preparation parameters on particle size, surface morphology and dispersity of GMs was examined. The studied preparation parameters include concentration of gelatin solutions, concentration of the emulsifier, water/oil ratio, emulsifying time, stirring speed and so on. The surface morphology, dispersity and particle sizes of GMs were determined by the scanning electron microscopy (SEM), SemAfore 4 Demo software and particle size distribution graphic charts. The experimental results indicated that increasing the concentration of gelatin solution would increase the particle size of GMs. When the solution concentration increasing from 0.050 g/mL to 0.200 g/mL gradually, the particle size increased correspondingly. The relationship between the two quantities was linear. On the contrary, increasing the concentration of the emulsifier would decrease the particle size of GMs. Furthermore, the particle size reduced quickly at initial time and slowed down latterly. With the increase of emulsifier concentration from 0 to 0.020 g/mL, the mean diameters of GMs decreased from 17.32 μm to 5.38 μm . However, the particle size dwindled slowly when emulsifier concentration was higher than 0.020 g/mL. The excellent result was obtained with the condition :0.050 g/mL of emulsifier concentration, 0.100 g/mL of gelatin solution concentration, 1/5 of water/oil ratio, 10 min of emulsifying time and 900 r/min of the stirring speed. The GMs prepared at this condition had the smallest sizes, the narrowest size distribution, the best sphericity and fluidity. The water/oil ratio has the same influence on particle size of GMs as that of gelatin solution concentration. With the increase of water/oil ratio the average particle size increased linearly, and the surface of microspheres became smoother as well. It is supposed that water/oil ratio can be used to change the diameters and surface morphologies of GMs. The emulsifying time had little influence on the mean diameters of GMs, but it affected the dispersity of GMs apparently. When the emulsifying time was shorter than 5 min, the GMs had bad dispersity ;after increasing the emulsifying time to 13 min, the dispersity of GMs changed greatly ;whereas the dispersity of GMs became bad again when the emulsifying time was longer than 13 min. According to the experimental results, 13 min was considered to be the best emulsifying time. The stirring speed had the similar influence on GMs' morphologies as that of emulsifying time. Slow stirring rate made large size distribution and bad sphericity of GMs ;excessive stirring speed resulted in aggregation among GMs likewise. The smaller size distribution and better sphericity of GMs were observed under the stirring rate between 500 r/min to 1500 r/min by SEM. In conclusion, increasing the concentration of gelatin solution or w/o ratio would increase the particle sizes of GMs, increasing the concentration of the emulsifier would decrease the sizes of GMs, proper emulsifying time and stirring speed would result in the best sphericity of GMs.

Keywords Gelatin microspheres (GMs), Emulsification-coacervation method, Preparation parameters, Particle size, Surface morphology