

T 型微通道装置制备单分散 PLGA 微球*

缪世锋 余金鹏 关怡新** 姚善泾

(浙江大学化学工程与生物工程学系 杭州 310027)

摘 要 利用微通道法乳化技术原理,研制了一个可拆卸 T 型玻璃微通道装置,以聚乙烯醇水溶液为连续相,聚(乳酸-co-羟基乙酸)(PLGA)的二氯甲烷溶液为分散相,制备了单分散的 PLGA 微球.考察了乳化剂用量、连续相和分散相流速以及 PLGA 浓度对形成的液滴平均粒径和变异系数(CV 值)的影响.结果表明,增大乳化剂用量,提高连续相流速或降低分散相流速,制备得到的 PLGA 微球直径减小;分散相浓度在 5~20 g/L 之间变化时,其对微球直径的影响有限. PLGA 微球表面光滑无孔,且内部是实心的.用本装置制备得到的 PLGA 微球,其粒径范围在 30~200 μm 之间,CV 值在 15% 以下,最低可至 3%.该方法可使用挥发性有机溶剂作为分散相而且能避免微球制备时易堵塞等问题,可应用于药物缓控释领域中微米级单分散微球的制备.

关键词 微通道,单分散,PLGA,微球

作为缓控释药物载体,单分散生物可降解聚合物微球不仅可以提高生物利用度,而且在药物缓控释体系中发挥着不可替代的作用.因为在一个药物缓释体系中,如果所用的载药微球都负载相同剂量的药物,那么这个体系就能对药物剂量实现最好的控制^[1,2].制备单分散聚合物微球的方法主要有膜乳化法^[3]以及聚合反应法^[4,5]等.膜乳化法所用的 Shirasu 多孔玻璃(Shirasu porous glass,SPG)目前需从国外进口,价格昂贵;聚合反应法存在单体残留的问题,且其制备的聚合物微球粒径一般较小,多在 5 μm 以下,而粒径在几十至几百微米的聚合物微球不易被细胞吞噬,具有靶向性且负载的药物释放时间长,作为肿瘤治疗中的药物载体具有优势^[6].微流控技术是近年来发展起来的一门新兴技术,其在制备单分散微球中的应用已崭露头角,该法流场分布均匀,操作条件温和且容易控制,已应用于壳聚糖微球^[7]和乙基纤维素微球^[8]的制备.

聚乳酸(PLA)及聚(乳酸-co-羟基乙酸)(P(LA-co-GA),缩写为 PLGA)体系由于具有优良的生物相容性及生物可降解性^[9],质量稳定,可通过调节单体摩尔比和分子量来控制聚合物降解速率,且降解终产物为 CO_2 和水,对人体无害,其在生物医药领域^[10,11],尤其是在缓控释药物载体中的应用越来越广泛.其中,PLGA 已通过美国

FDA 认证,被正式作为药用辅料收录进美国药典.已有研究者利用微流控技术制备了 PLA 微珠^[12]和 PLGA 纤维^[13],但是用该法制备 PLGA 微球研究还鲜见报道.

一般的微流控技术所用的微通道芯片是一体的,不可拆卸,鉴于微通道尺寸在 10~300 μm 之间,即使通过微通道的流体经过严格的过滤,在操作过程中也易发生堵塞,特别当用到强挥发性有机溶剂时,更易因溶质析出而发生堵塞,给使用带来不便.本文拟研制一个可拆卸 T 型微通道装置,只有在 T 型管口处通道的尺寸较小,而且是由两个可拆卸的管路连接而成,可克服传统微通道芯片中易堵塞、不能使用挥发性有机溶剂的缺点,拓宽了该技术的适用范围.利用该装置以二氯甲烷为分散相制备单分散 PLGA 微球,并研究操作条件对形成液滴的平均粒径及粒径分布的影响规律.

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

PLGA 由山东医疗器械研究所提供,分子量 15000,其中单体乳酸与羟基乙酸的比例为 50:50;聚乙烯醇 124(PVA)购于上海化学试剂公司;二氯甲烷(分析纯)购于杭州双林化工试剂厂.

恒流泵(Lead-128)和注射泵(LSP02-1B),保

* 2011-04-20 收稿,2011-06-15 修稿;国家自然科学基金(基金号 21076185)资助项目;** 通讯联系人,E-mail:guanyx@zju.edu.cn
doi:10.3724/SP.J.1105.2012.11091

定兰格恒流泵有限公司;恒温振荡器(TH2-C),太仓市实验设备厂;扫描电子显微镜 SEM(JSM-6390A),日本电子株式会社;光学显微镜拍照系统(Eclipse E200),日本 Nikon 株式会社,其物镜标尺(C_1)最小刻度为 10 μm 。

1.2 T 型微通道装置制备 PLGA 微球

实验装置如图 1 所示.连续相为 PVA 的水溶液,置于高位槽中.用蠕动泵 P_1 将储液槽中的 PVA 溶液连续泵入到高位槽中,使高位槽液面维持在一恒定值,从而使连续相流速不会因高位槽内 PVA 溶液的减少而发生变化.连续相流速由高位槽的高度 h 来调节. PLGA 的二氯甲烷溶液为分散相,其流速由注射泵 P_2 控制.连续相和分散相在 T 型管路 Mt 中混合. Mt 由分散相流动通路和连续相流动通路组成,其中分散相流动通路为内径 0.3 ~ 1 mm 的针管,其插入连续相流动通路的输出端通过热处理后内径缩小至 50 ~ 300 μm ;连续相流动通路为内径 0.4 ~ 1 mm 的管路,在接近管路中央处加工一个直径等于分散相流动通路外径的孔,使分散相流动通路与连续相流动通路连通.由于恒定的连续相流速和分散相流速产生稳定的流场,使得在 Mt 中分散相液柱在连续相剪切力的作用下断裂形成一个个均匀的液滴,如图 2(a)和 2(b)所示.经观测池 Op 后,液滴在培养皿中聚集,如图 2(c)所示.将培养皿置于摇床中,乳液中的二氯甲烷挥发出来,形成固化的 PLGA 微球。

1.3 PLGA 微球的粒径分布及形态表征

1.3.1 PLGA 微球的粒径分布

将由 T 型微通道装置制备得到的 PLGA 微球分散在 PVA 的水溶液中,用光学显微镜观察,统计 300 个以上 PLGA 微球粒径,其粒径分布由变异系数(coefficient of variation, CV)表示, CV 值的计算公式如下:

$$\bar{d} = \sum_{i=1}^n \frac{d_i}{n} \quad (1)$$

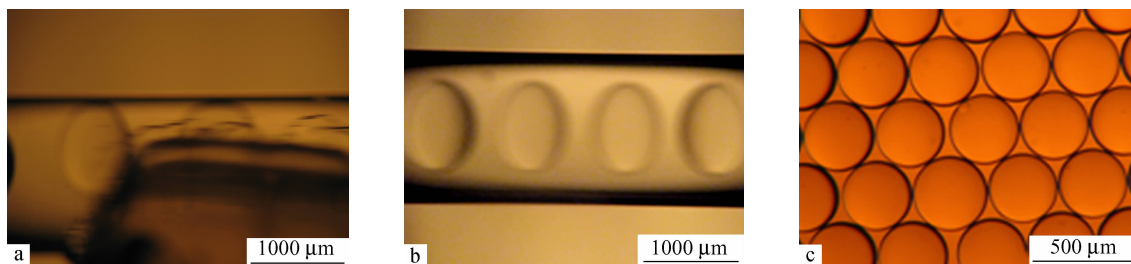


Fig. 2 Formation of monodisperse droplets in the microfluidic T-junction

a) Droplets forming in the mouth of T-junction; b) Droplets in the channel; c) Droplets gathering in the plate

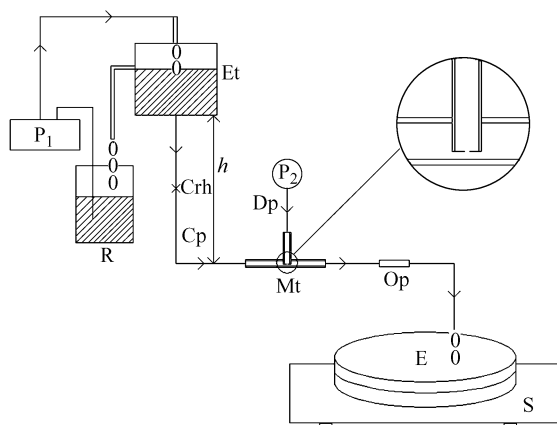


Fig. 1 Schematic diagram of apparatus for preparing monodisperse PLGA microspheres

Cp: continuous phase; Crh: clamp regular holder; Dp: disperse phase; E: emulsion; Et: elevated tank; Mt: detachable microfluidic T-junction; Op: observing pool; P_1 : peristaltic pump; P_2 : syringe pump; R: reservoir; S: shaker

$$CV = 100\% \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2 / (n - 1)}{\bar{d}}} \quad (2)$$

式中 d_i 为每个粒子的直径, n 为统计的粒子总数。

1.3.2 PLGA 微球的形态表征

待油相中的二氯甲烷挥发完全后,用砂芯漏斗过滤收集 PLGA 微球,蒸馏水清洗后置于真空干燥箱中 20℃ 干燥 5 h 以上;将微球用液氮冷冻,并用研钵研磨,使微球破裂暴露出横截面,置于真空干燥箱中干燥去除冷凝水.用 SEM 观察 PLGA 微球表面及其截面的形态。

2 结果与讨论

2.1 T 型微通道法制备 PLGA 微球的粒径及其分布

2.1.1 乳化剂用量对液滴粒径的影响

本实验所用的乳化剂为 PVA,其对液滴平均直径的影响如图 3 所示.从图 3 中可以看出,在实

验条件范围内制备的 PLGA 液滴的 CV 值均在 13% 以内,表明 PVA 浓度在 5 ~ 20 g/L 范围内都能得到分散性较好的液滴. 在其他条件一定的情况下,当 PVA 浓度从 5 g/L 增大到 20 g/L 时,液滴的平均直径从 391 μm 减小到 290 μm ,Capan 等^[14]也得到了类似的结果. 一般而言,除了微流控装置的微通道材料及其几何形状影响微球的制备外,用于实验的流体的性质如连续相和分散相流速、黏度等因素对微球的粒径分布和液滴形成机理也会产生影响,这种影响可以用连续相的毛细管值 (capillary number) Ca_c ($Ca_c = \eta\nu/\gamma$, 其中 η 为连续相黏度, ν 为连续相平均流速, γ 为连续相与分散相流体间的界面张力,下标 c 代表连续相) 来表征^[15]. 当分散相流速固定时,所形成液滴的平均粒径与 Ca_c 的倒数成正比,即 $d_{av} \propto 1/Ca_c$ ^[16]. 乳化剂用量的加大增加了连续相溶液的黏度 η , 从而使 Ca_c 增大, d_{av} 减小.

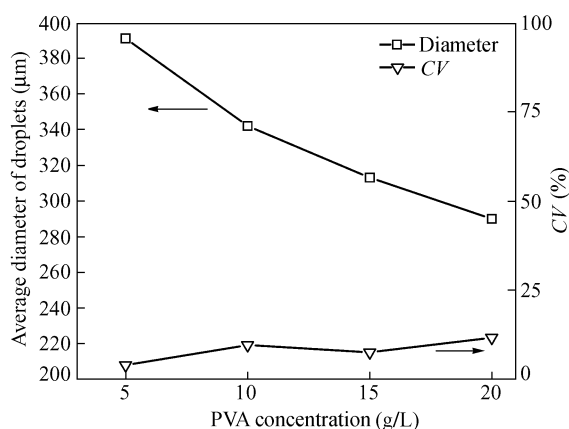


Fig. 3 Effect of PVA concentration on the average diameter of droplets

The concentration of disperse phase PLGA 10 g/L, flow rate of disperse phase 0.2 mL/min, flow rate of continuous phase 4.5 mL/min

2.1.2 连续相和分散相流速对液滴粒径的影响

连续相流速对液滴粒径的影响如图 4 所示,其中横坐标为连续相流速的倒数,纵坐标为液滴的平均粒径. 在其他条件一定的情况下,当连续相流速从 2.7 mL/min 增大到 9.4 mL/min 时,PLGA 液滴的平均直径从 423 μm 减小到 197 μm . 制备得到的乳滴的 CV 值都维持在一个较低的范围内 (< 13 %). 根据毛细管值 Ca_c 推断,当分散相流速固定时, $d_{av} \propto 1/Ca_c$, 由于 η 和 γ 值不变,故所形成液滴的平均粒径与连续相流速的倒数成正比.

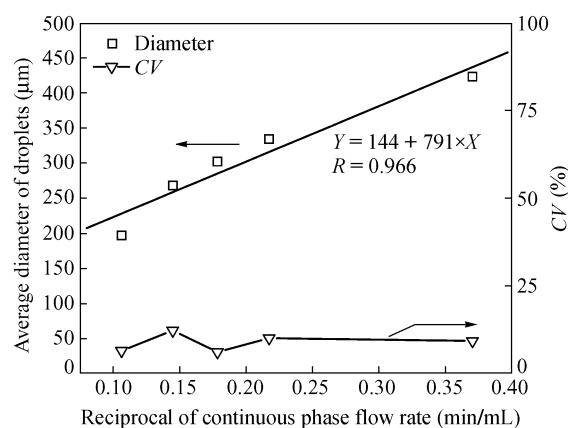


Fig. 4 Effect of flow rate of continuous phase on the average diameter of droplets

The concentration of disperse phase PLGA 10 g/L, the concentration of continuous phase PVA 10 g/L, the flow rate of disperse phase 0.2 mL/min

分散相流速对液滴粒径的影响如图 5 所示,其中横坐标为分散相流速,纵坐标为液滴的平均体积值. 当其他条件一定,分散相流速从 0.03 mL/min 增大到 0.4 mL/min 时,PLGA 液滴的平均体积从 8.7 μL 增加到 45.2 μL ,平均直径从 256 μm 增大到 443 μm . 同样地,制备得到的乳滴的 CV 值也都保持在一个较低的值 (< 13 %). 根据力和力矩的平衡模型,液滴首先要长到一个临界体积 (V_{crit}),在这个临界体积下,连续相对分散相的剪切力和界面张力达到平衡,但是液滴从分散相液柱上分离下来并不是瞬时的,需要一定的时间 (t_{neck}), t_{neck} 与 T 型管的各项参数有关. 因此,分散相流速对液滴粒径的影响可用下式来表示:

$$[V = \varphi_v \times (t_{crit} + t_{neck}) = V_{crit} + t_{neck} \times \varphi_v]$$

其中 φ_v 为分散相流速. 表明分散相流速和液滴直径的三次方成正比. 以分散相流速为横坐标,液滴直径的三次方为纵坐标作图,可推测得到 V_{crit} 值^[17]. 本实验中, V_{crit} 为 3.85 μL .

2.1.3 分散相溶液浓度对液滴粒径的影响

分散相溶液浓度对微球粒径的影响如图 6. 由图 6 可知,当分散相浓度从 5 g/L 增大到 20 g/L 时,液滴的平均直径没有明显的变化. 一般说来,随着分散相中 PLGA 浓度的增加,分散相溶液的黏度会变大,制备得到的微球粒径也略有增大. 图 6 中并没有呈现这种趋势,可能是因为分散相浓度在 5 g/L 和 20 g/L 之间变化时,其对溶液的黏度影响不明显,从而导致液滴的平均直径没有

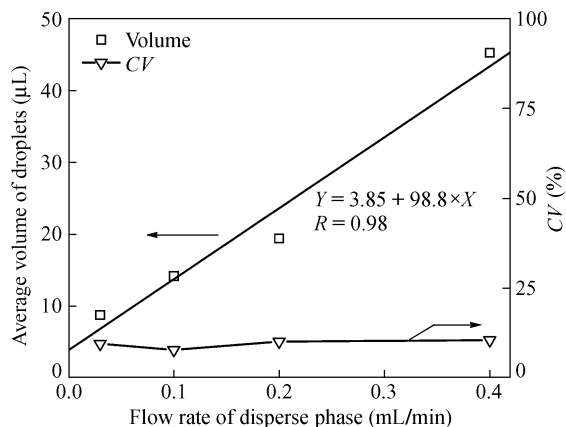


Fig. 5 Effect of flow rate of disperse phase on the volume of droplets

The concentration of disperse phase PLGA 10 g/L, the concentration of continuous phase PVA 10 g/L, the flow rate of continuous phase 4.5 mL/min

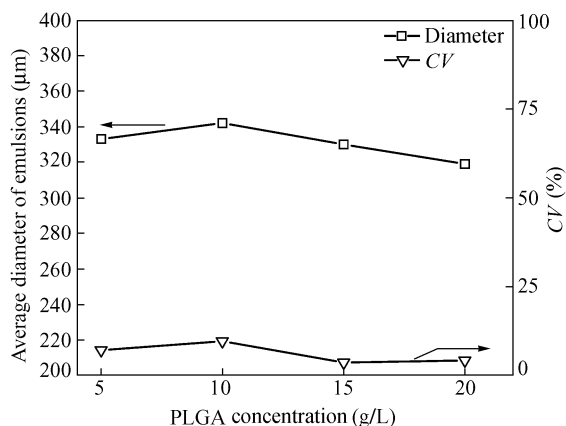


Fig. 6 Effect of PLGA concentration on the average diameter of droplets

The concentration of continuous phase PVA 10 g/L, the flow rate of disperse phase 0.2 mL/min, the flow rate of continuous phase 4.5 mL/min

明显的变化。

图 7 表示不同分散相浓度下液滴和微球的粒径比。随着分散相中 PLGA 浓度从 5 g/L 增大到 20 g/L, 相同大小液滴中所含有的 PLGA 的量增

加, 因而所得的固化微粒的粒径变大, 液滴和微球的粒径比从 6.2 减小到 3.7。

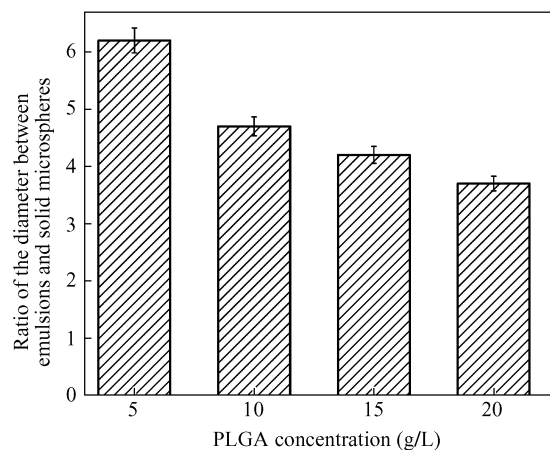


Fig. 7 Ratio of the diameter between emulsion and solid microspheres at different PLGA concentration

The concentration of continuous phase PVA 10 g/L, the flow rate of disperse phase 0.2 mL/min, the flow rate of continuous phase 4.5 mL/min

2.2 PLGA 微球的形貌表征

当油相中的二氯甲烷完全挥发后, 得到的 PLGA 微球如图 8(a) 所示。用 SEM 观察微球表面及横截面的形态, 从图 8(b) 和图 8(c) 可知, 固化的 PLGA 微球呈球形, 表面光滑无孔, 且 PLGA 微球内部是实心的。

3 结论

本文用自行研制的可拆卸 T 型玻璃微通道装置成功制备了单分散的生物可降解 PLGA 微球, 分析了乳化剂用量、水相与油相流速和油相浓度等条件对微球粒径大小及其分布的影响。连续相和分散相的流速及乳化剂用量对微球粒径有较大的影响, 增加连续相流速和乳化剂用量或降低分散相流速, 制备得到的微球直径减小; 分散相浓度在 5 ~ 20 g/L 之间变化时, 其对微球直径的影响不大。该装置具有设备简单, 可拆卸, 管路堵塞

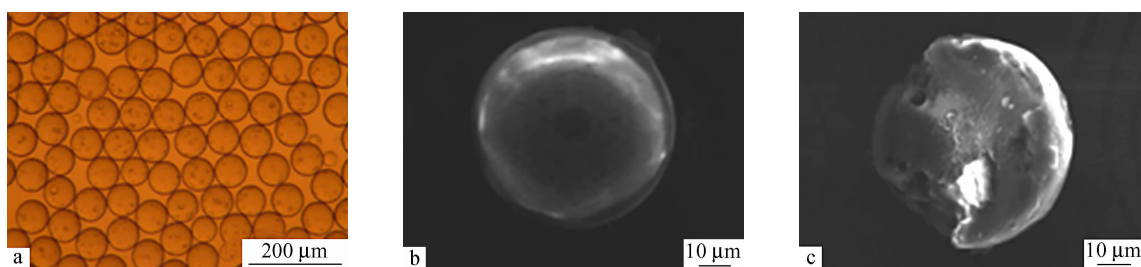


Fig. 8 The morphology of PLA particles: (a) particles in the continuous phase and (b), (c) dry particles

后易疏通等特点. 通过改变操作参数, 用本装置制备的得到的 PLGA 微球, 其粒径范围可控制在 30 ~ 200 μm 之间, CV 值在 15% 以下. 由于高聚

物 PLGA 已获得美国 FDA 的认证, 单分散的生物可降解的 PLGA 微球在药物缓控释体系中的应用将会变得越来越广泛.

REFERENCES

- 1 Berkland C, King M, Cox A, Kim K, Pack D W. *J Controlled Release*, 2002, 82(1): 137 ~ 147
- 2 Wang Huajie(王华杰), Liu Xingming(刘新铭), Wang Jinye(王瑾晔). *Polym Bull* (高分子通报), 2006, (8): 1 ~ 9
- 3 Joscelyne S M, Trägårdh G. *J Membrane Sci*, 2000, 169(1): 107 ~ 117
- 4 Zhang Kai(张凯), Lei Yi(雷毅), Wang Yuguang(王宇光), Jiang Luxia(江璐霞). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2002, (3): 341 ~ 344
- 5 Song J S, Tronc F, Winnik M A. *JACS*, 2004, 126(21): 6562 ~ 6563
- 6 Yuan Xinyan(袁新彦), Li Chaopin(李朝品), Wang Jian(王健). *Appl J Gen Pract* (实用全科医学), 2004, 2(1): 69 ~ 70
- 7 Hu Xue(胡雪), Wei Wei(魏伟), Lei Jiandu(雷建都), Ma Guanghui(马光辉), Su Zhiguo(苏志国), Wang Huajun(王化军). *Chin J Process Eng* (过程工程学报), 2008, 8(1): 130 ~ 134
- 8 Liu L, Yang J P, Ju X J, Xie R, Yang L H, Liang B, Chu L Y. *J Colloids Interface Sci*, 2009, 336(1): 100 ~ 106
- 9 Kamei S, Inoue Y, Okada H, Yamada M, Ogawa Y, Toguchi H. *Biomaterials*, 1992, 13(13): 953 ~ 958
- 10 Wang W, Li D, Wang M C, Li Y L, Gao C Y. *Chinese J Polym Sci*, 2011, 29(2): 233 ~ 240
- 11 Xu Y, Zhang D, Wang Z L, Gao Z T, Zhang P B, Chen X S. *Chinese J Polym Sci*, 2011, 29(2): 215 ~ 224
- 12 Zhu Liping(朱丽萍), Li Yaogang(李耀刚), Zhang Qinghong(张青红), Wang Hongzhi(王宏志), Zhu Meifang(朱美芳). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2009, (11): 1132 ~ 1137
- 13 Hwang C M, Khademhosseini A, Park Y, Sun K, Lee S H. *Langmuir*, 2008, 24(13): 6845 ~ 6851
- 14 Capan Y, Woo B H, Gebrekidan S, Ahmed S, DeLuca P P. *J Controlled Release*, 1999, 60(2-3): 279 ~ 286
- 15 Zhang Yan(张艳), Lei Jiandu(雷建都), Lin Hai(林海), Geng Liyuan(耿立媛), Su Haijia(苏海佳), Ma Guanghui(马光辉), Su Zhiguo(苏志国). *Chin J Process Eng*(过程工程学报), 2009, 9(5): 1028 ~ 1034
- 16 Xu J H, Li S W, Tan J, Wang Y J, Luo G S. *AIChE J*, 2006, 52(9): 3005 ~ 3010
- 17 van der Graaf S, Steegmans M L J, van der Sman R G M, Schröen C G P H, Boom R M. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2005, 266(1-3): 106 ~ 116

PREPARATION OF MONODISPERSE POLY(LACTIC-*co*-GLYCOLIC ACID) MICROPARTICLES IN A T-SHAPED MICROCHANNEL JUNCTION

MIAO Shifeng, YU Jinpeng, GUAN Yixin, YAO Shanjing

(*Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027*)

Abstract Based on the principle of microchannel emulsification, a simple device with a detachable T-shaped microchannel junction was fabricated to prepare poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) microparticles where aqueous solution of polyvinyl alcohol (PVA) was used as the continuous phase and PLGA dissolved in dichloromethane solution as the disperse phase. The effects of some important parameters such as the amount of emulsifier used in the continuous phase, the PLGA concentration, the disperse phase flow rate and the continuous phase flow rate on the average diameter of PLGA microparticles and the coefficient of variation (CV value) were examined in detail. The experimental results indicated that a decrease of the disperse phase flow rate, an increase of the continuous phase flow rate and increasing the amount of emulsifier used in the continuous phase led to the decrease of the average diameter of PLGA microparticles. When the PLGA concentration was between 5 g/L and 20 g/L, the average diameter of PLGA microparticles kept nearly constant. The uniform spherical PLGA microparticles with smooth surface were successfully prepared and no pores in the interior. By adjusting operating conditions, the average diameters of particles obtained ranged from 30 μm to 200 μm , and CV value of all the microparticles prepared under different operating conditions was below 15% while the lowest CV value was about 3%. This improved method can use organic solvents as disperse phase and avoid the easily blocking in the traditional method, which can be applied in the preparation of micrometer drug/polymer complex spheres with monodispersity and has great potential to be used in control-released drug delivery systems.

Keywords Microchannel, Monodisperse, Poly(lactic-*co*-glycolic acid), Microparticles