

新材料与新技术

# 超临界流体技术制备吗啡/聚乳酸-聚乙二醇 共聚物缓释微球

陈 浮<sup>1</sup> 廖晓明<sup>1\*</sup> 尹光福<sup>1</sup> 顾建文<sup>2</sup>

(1. 四川大学材料科学与工程学院, 成都 610065; 2. 成都军区总医院, 成都 610083)

**摘 要** 以 L-聚乳酸-聚乙二醇三嵌段共聚物(PLLA-PEG-PLLA)为载体材料,通过超临界流体强制溶液分散技术制备吗啡/聚乳酸-聚乙二醇共聚物(MF/PLLA-PEG-PLLA)的复合微球,考察了 PEG 分子量的变化对微球性能的影响。通过表面形貌,粒径及粒径分布,载药量,封装率及释放性能来表征复合微球的各项性能;利用气相色谱法测定二氯甲烷和甲醇的残留量;通过溶血实验来评价复合微球的血液相容性。实验表明,所制备的复合微球呈球形或类球形形貌,平均粒径在 1.99~6.20 $\mu\text{m}$  之间,载药量达到 17.92%,封装率最高可至 69.57%,复合微球的药物释放呈先突释后缓释的释药模式;二氯甲烷和甲醇的残留量分别为 0.0076% 和 0.0016%;微球溶血率 < 1%,远小于国家标准 5%,证明复合微球具有较好的血液相容性。

**关键词** 超临界流体技术,吗啡,L-聚乳酸-聚乙二醇嵌段共聚物,微球

## Preparation of morphine loaded PLLA-PEG-PLLA microspheres by supercritical fluid technique

Chen Fu<sup>1</sup> Liao Xiaoming<sup>1</sup> Yin Guangfu<sup>1</sup> Gu Jianwen<sup>2</sup>

(1. College of Materials Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065;

2. Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083)

**Abstract** Morphine loaded copolymer microspheres(MF/PLLA-PEG-PLLA) were prepared via solution-enhanced dispersion by supercritical CO<sub>2</sub> (SEDS) technique, using poly(L-lactide)-polyethylene glycol-poly(L-lactide) as a matrix and morphine as a drug. The effect of PEG molecular weight on the properties of the microspheres was investigated. The morphology, particle size, particle size distribution, drug loading, encapsulation efficiency and release profiles of microspheres were characterized. Headspace gas chromatography was performed to test the residual dichloromethane(DCM) and methanol (MeOH) in microspheres. The hemolysis test was utilized to evaluate the biocompatibility of the microspheres. The result indicated that the microspheres showed spherical or ellipsoidal shape with mean diameter between 1.99~6.20 $\mu\text{m}$ . The highest drug loading reached 17.92% and the encapsulation efficiency can be as high as 69.57%. The drug release of microspheres presented a burst release followed by sustained release. The residues of DCM and MeOH in microspheres were 0.0076% and 0.0016%, respectively. The hemolysis rate of microspheres was lower than 1%, which was far less than the Chinese standard of 5%, showing good blood compatibility.

**Key words** supercritical fluid technique, morphine, poly(L-lactide)-polyethylene glycol block copolymer, microsphere

吗啡是一种阿片受体激动剂,临床上最常用于术后镇痛或缓解中重度癌症疼痛。半衰期为 1.7~3h,一次给药镇痛作用维持 4~6h,因此需要频繁给药以持续有效治疗浓度,而且最大血药浓度( $C_{\text{max}}$ )超出治疗窗时会导致一系列副反应<sup>[1]</sup>。以聚合物为基质的缓控释体系可以克服传统制剂给药频繁、半衰期短及高的血药浓度造成的毒副作用等缺陷<sup>[2-4]</sup>。聚乳酸(PLA)由于其良好的生物相容性和可降解性,被广泛用于药

物缓控释系统,但由于其结构中含有大量酯键而疏水,影响了其与水溶性药物的复合,而且 PLA 降解周期较长。聚乙二醇(PEG)是一种具有优异生物相容性的亲水性链段,免疫原性低。在 PLA 中引入 PEG 链段不仅能改善 PLA 的亲水性,还可以提高水溶性药物与聚合物的亲和能力,并且通过调节 PEG 的分子量及 PEG 的含量可以得到不同理化性质的共聚物,因此使得 PEG 与 PLA 共聚物的研究非常活跃<sup>[5-8]</sup>。制备

基金项目:国家自然科学基金(51173120)资助项目

作者简介:陈浮(1987-),女,攻读材料学硕士学位。主要研究方向:药物缓释载体材料的研究。

联系人:廖晓明,男,副教授。

载药微球较常见的方法有喷雾干燥法,相分离法,溶剂挥发法等,但是这些方法条件通常比较激烈,易使药物分解或失活,而且存在有机溶剂残留的问题,而超临界流体技术具有条件温和,溶剂残留量低,制备周期短等优点,已成为微球制备领域的研究热点<sup>[9-11]</sup>。因此本方法以 PLLA-PEG-PLLA 为载体材料,利用超临界流体强制分散溶液技术 (solution-enhanced dispersion by supercritical fluids, SEDS) 制备咖啡缓释微球。

## 1 实验部分

### 1.1 材料

盐酸吗啡注射液(规格:10mg/mL),东北制药集团沈阳第一制药有限公司;L-聚乳酸聚乙二醇嵌段共聚物(PLLA-PEG-PLLA, PEG 含量为 3%,分子量分别为 1k, 2k, 4k, 6k),济南岱罡生物科技有限公司;CO<sub>2</sub>(含量≥99.9%),成都拓展气体有限公司;甲醇(MeOH)、二氯甲烷(DCM),成都市科龙化工试剂厂;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 实验方法

SEDS 原理<sup>[12]</sup>:利用超临界流体和样品溶液经同轴喷嘴喷出产生的速度差,将样品溶液雾化为细小液滴,同时利用超临界流体的抗溶剂作用,快速萃取液滴中的有机溶剂,使得溶质过饱和而析出,形成微粒。

实验步骤:称取定量吗啡和 PLLA-PEG-PLLA 分别溶解于甲醇和二氯甲烷,获得质量浓度分别为 4mg/mL 的吗啡溶液和 5mg/mL 的聚合物溶液,然后将两种溶液充分混匀(最终药聚比为 1:5)。将混合溶液以 0.5mL/min 的速度由 HPLC 泵经同轴喷嘴的外部通道泵入体积约为 500mL 的高压釜中,经历 SEDS 过程。过程中温度恒定为 35℃,压力为 12MPa。结束泵样后,维持温度和压力不变,继续通入 CO<sub>2</sub> 30min,以充分去除有机溶剂。然后缓慢卸压至常压,收集样品。

### 1.3 检测方法

#### 1.3.1 形貌及粒径检测

直接将样品粘贴于载物台上喷金,利用 S4800 型扫描电镜(日本日立公司)观察微粒形貌,RISE-2008 激光粒度仪测定粒径及分布。

#### 1.3.2 有机溶剂残留量的检测

称取未经处理的 MF/PLLA-PEG-PLLA 微球约 500mg,

采用 Agilent 6850A 型气相色谱顶空法检测其二氯甲烷及甲醇残留量。

#### 1.3.3 载药量和包封率的测定

盐酸吗啡标准曲线的建立:利用盐酸吗啡注射液(10mg/mL)配制出浓度分别为 2μg/mL、4μg/mL、8μg/mL、10μg/mL 和 20μg/mL 的一系列标准溶液。在 284nm 波长用紫外分光光度计(U3010 型,日本,Hitachi)分别测定吸光度,以吸光度对浓度进行线性回归得标准曲线回归方程。

精密称取 20mg 微球,加入适量二氯甲烷溶解后加入定量 PBS(PH7.4),于 37℃ 恒温水浴中磁力搅拌至二氯甲烷挥发完全,溶液经 0.22μm 微孔滤膜过滤,于 284nm 处测定其吸光度,根据标准曲线计算吗啡含量。

根据 2010 年版《中华人民共和国药典》规定,载药量 = 微粒中所含的药重量/微粒的总重量 × 100%;包封率 = 系统中包封的药量/系统总包封与未包封的总药量 × 100%。

#### 1.3.4 体外释放度的测定

精密称取 20mg MF/PLLA-PEG-PLLA 微球移入透析袋内,扎紧放入盛有 100mL PBS(pH 7.4) 的广口瓶中,于 37.0℃ 恒温振荡器(频率 60r/min)中振荡,在预定时间取样 10mL,同时补加 10mL 空白 PBS,所取的溶液经 0.22μm 微孔滤膜过滤后用紫外分光光度计于 284nm 处测定吸光值。计算不同时间药物的累积释放率并绘制时间-累积释放率的释药曲线。

#### 1.3.5 溶血实验

取新鲜抗凝兔血(兔血:ACD=4:1),用生理盐水稀释(兔血:生理盐水=4:5)。实验组加入载药微球和 10mL 生理盐水;阳性对照组加入 10mL 蒸馏水;阴性对照组加入 10mL 生理盐水,将所有烧杯放置在(37 ± 0.5)℃ 恒温水浴 30min。分别准确量取 20μL 新鲜的抗凝血加入各组烧杯中,继续恒温水浴 60min。离心取上清液用 752N 紫外可见分光光度计测吸光度。按式计算:溶血率(%) = (样品吸光度 - 阴性对照组吸光度) / (阳性对照组吸光度 - 阴性对照组吸光度) × 100%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 形貌及粒径

不同分子量的共聚物形成的颗粒形貌及粒径如图 1 所示,从图中可以看出微球呈球形或类球形形貌,表面光滑。

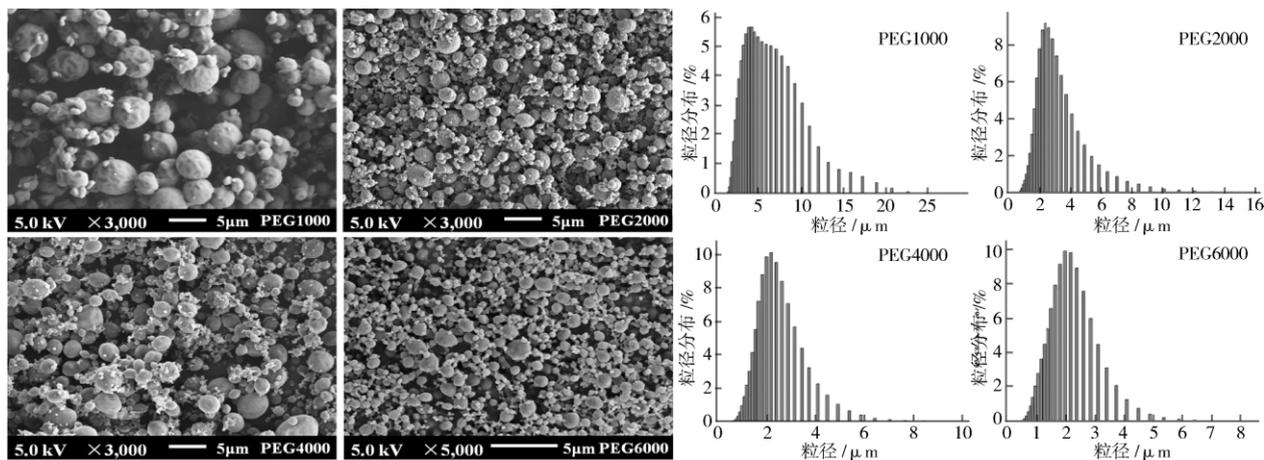


图 1 不同 PEG 分子量的 MF/PLLA-PEG-PLLA 微球形貌及粒径分布图

PEG 分子量为 1K 时形成的共聚物颗粒粒径最大,平均粒径为  $6.20\mu\text{m}$ ,当 PEG 分子量为 2K,4K 和 6K 时,形成的共聚物颗粒平均粒径分别为  $2.82\mu\text{m}$ ,  $2.25\mu\text{m}$  和  $2.00\mu\text{m}$ ,较 PEG1K 所形成的共聚物微粒粒径明显减小,分析原因主要是由于共聚物分子量差异显著所致。共聚物的分子量(表 1)随着 PEG 分子量的增加而增加,PEG 分子量为 1K 时最小,分子量为 6K 时最大。共聚物的分子量越小,其在有机溶剂当中的溶解度就越大,当经过 SEDS 过程时,同分子量较大的共聚物相比就越慢于达到过饱和,沉积速率相对较慢,瞬间成核数量较少,其沉积以生长为主要机理。但是随着分子量的增大,共聚物的黏度也随之增大,形成的雾滴也就较大,使得抗溶剂与溶剂之间的相互传质减弱,雾滴达到过饱和的时间延长,瞬间成核数量少,颗粒的沉积同样以生长为主要机理。分子量的最终影响效果取决于两个方向的作用<sup>[13]</sup>。PEG2K,4K 和 6K 分子量共聚物所形成的颗粒粒径差异不大,只是有逐渐减小的趋势,这可能是由于三者的分子量差异并不显著,而且聚合物分子量增加导致的粘度增大也将影响液滴的雾化,从而使得粒径的减小趋势并不明显。除此之外材料的亲水性也会对微球的形貌、粒径及释放性能产生重要影响。表 1 可以看出,在 PEG 含量一定(3%)的条件下,共聚物的接触角较相同条件下测得的 PLLA( $M_w=100\text{K}$ )的接触角( $96.11\pm 1.15^\circ$ )更小,材料的亲水性有所改善,这将更利于药物的释放及载体材料的降解。

## 2.2 有机溶剂残留量

以二氯甲烷和甲醇标准品为对照,测得未经处理的 MF/PLLA-PEG-PLLA 微球中二氯甲烷残留量  $0.0076\%$ ,甲醇残留量为  $0.0016\%$ ,均低于《中国药典》2010 年版二氯甲烷和甲醇的限度规定  $0.06\%$  和  $0.3\%$ 。

表 1 不同 PEG 分子量的 PLLA-PEG-PLLA 共聚物的物理性能

样品	分子量 /粘均	接触角/ $^\circ$
PLLA-PEG1000(3%)-PLLA	$5.10\times 10^4$	$84.17\pm 3.05$
PLLA-PEG2000(3%)-PLLA	$1.05\times 10^5$	$86.24\pm 1.62$
PLLA-PEG4000(3%)-PLLA	$9.80\times 10^4$	$86.08\pm 1.44$
PLLA-PEG6000(3%)-PLLA	$1.22\times 10^5$	$87.05\pm 2.20$

## 2.3 复合微球的载药量及包封率

以盐酸吗啡浓度对吸光度进行线性回归得标准曲线回归方程:

$$Y = -0.00047X + 0.00451 (R = 0.99935) \quad (1)$$

在此范围内浓度与吸光度相关性良好。根据回归方程计算出微球的载药量和包封率,结果如表 2 所示。从表中可以看出,各 PEG 分子量的共聚物微球载药量均高于  $16\%$ ,组间无显著差异,且实际载药量接近理论载药量,说明药物在超临界过程当中很少流失。实际载药量略高于理论载药量可能是由于聚合物略溶于抗溶剂而流失导致原始的投药理论值失去了相对比较意义。微球的包封率随着 PEG 分子量的增加先增加,而后趋于平稳。当 PEG 分子量为 2K 时有最高包封率  $69.57\pm 4.77\%$ 。包封率的变化规律同样可以由共聚物分子量的变化来解释。当 PEG 分子量为 1K 时,共聚物分子量最

小,在超临界过程中颗粒的沉积最慢,这一点在图 1 当中的形貌和粒径图中也可以观察到,颗粒的沉积以生长为主,此时药物已先于聚合物而沉淀析出,使得药物较多地呈游离状态或是吸附于颗粒表面。当 PEG 分子量继续增大时,共聚物分子量变化不大,因此对共聚物的沉积影响较小。

表 2 不同 PEG 分子量的微球载药量和包封率结果

PEG 分子量	理论载药量 /%	实际载药量 /%	包封率 /%
1000	16.67	$16.06\pm 0.34$	$36.49\pm 3.20$
2000	16.67	$17.92\pm 0.19$	$69.57\pm 4.77$
4000	16.67	$17.29\pm 0.25$	$63.64\pm 1.41$
6000	16.67	$17.32\pm 0.25$	$62.63\pm 3.61$

## 2.4 复合微球的体外释放度

图 2 所示为复合微球当中吗啡的累积释放度。四种 PEG 分子量的共聚物微球在初始 30min 内均呈现一定的突释,然后经过一定时间较迅速地释放再进入缓慢释放期,最后进入平台期。值得一提的是,对于需要短时间内发挥药效的药物来说,一定程度的突释是有利的。一些研究者在设计吗啡缓释剂型的时候就将突释纳入考虑,设计成先突释,后缓释的释药模型<sup>[14-15]</sup>。从图 2 也可以看出,释放最快的是 PEG 分子量为 1K 的复合微球,这和较低的包封率结果是一致的。PEG 分子量为 1K 时微球包封率最低,大部分的药物吸附于微球表面或是与微球疏松结合,亦或呈游离状态,使得药物突释明显。另一方面,低分子量的共聚物较高分子量的共聚物可以提供更多的水合活性位点,更利于药物的释放<sup>[16]</sup>。而且 PEG 链段是一种亲水性链段,分子量越小亲水性越好,因此具有小分子量 PEG 的共聚物微球能锁定更多的水分子,促进药物的释放<sup>[17]</sup>。随着 PEG 分子量增加,药物释放越为缓慢,但 PEG 分子量为 6K 的复合微球药物的释放要快于 PEG 分子量为 4K 的微球。这可能是由于 PEG 分子量为 6K 时微球粒径最小,药物的扩散释放具有最短的扩散路径,使得释放速率加快。4 种 PEG 分子量的复合微球药物释放均呈现出先突释后缓释的模式。

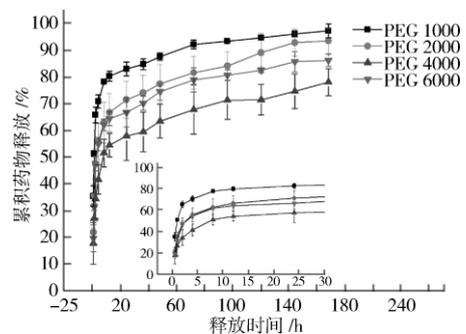


图 2 药物的释放曲线

## 2.5 溶血率

溶血率直接反映了材料对血液中红细胞的损伤程度,体外红细胞的溶血实验可以模拟材料在体内对红细胞的破坏作

(下转第 55 页)

[ 2 ] 周全法. 贵金属深加工及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.

[ 3 ] 徐云龙, 赵崇军, 钱秀珍. 纳米材料学概论[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2008.

[ 4 ] 刘吉平, 郝向阳. 纳米科学与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

[ 5 ] Komarneni S, Li D, Newalkar B, et al. [J]. Langmuir, 2002, 18: 5959-5962.

[ 6 ] Chaki N K, Sharma J, Mandle A B, et al. [J]. Phys. Chem. Chem. Phys., 2004, 6: 1304-1309.

[ 7 ] Yonezawa T, Imamura K, Kimizuka N. [J]. Langmuir, 2001, 17: 4701-4703.

[ 8 ] 郑炳云, 黄加乐, 孙道华, 等. 贵金属纳米材料生物还原制备技术的研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2011, 50(2): 378-386.

[ 9 ] 黄加乐. 银纳米材料和金纳米材料的植物生物质还原制备及应用初探[D]. 厦门: 厦门大学, 2009.

[ 10 ] 王文塔. 还原制备金/银纳米颗粒的生物质筛选及还原成分的初步探索[D]. 厦门: 厦门大学, 2009.

[ 11 ] 傅锦坤, 刘月英, 傅金印. 生物化学法制备负载型钯催化剂[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2000, 39(1): 67-71.

[ 12 ] 张茜. 植物生物质还原合成钯纳米颗粒及其催化加氢性能的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2010.

[ 13 ] 厦门大学. 植物生物质还原法制备钯纳米颗粒的方法: 中国, CN101590532[P]. 2009-12-02.

[ 14 ] Oh S H, Hoflund G B. [J]. J. Phys. Chem. A, 2006, 110: 7609-7613.

收稿日期: 2012-07-29

(上接第 29 页)

用<sup>[18]</sup>。GB/T-16886 对生物材料溶血率的要求为 5%。本实验中以 PEG 分子量为 2K 的复合微球为样本, 设置三个实验组 1, 2, 3, 每组复合微球的质量分别为 5mg, 10mg 和 50mg。溶血实验结果如表 3 所示。从表中可以看出, 阴性对照组的吸光值小于 0.03, 阳性对照组吸光度值在  $0.8 \pm 0.5$ , 符合国家标准, 实验组 1, 2, 3 的溶血率分别为 0.39%, 0.28% 和 0.67%, 均低于 5%, 符合生物医学材料的血液相容性标准, 表明复合微球具有良好的血液相容性。

表 3 复合微球的溶血实验结果

样品	吸光度/( $\bar{x} \pm s$ )	溶血率/%
实验组 1	$0.0267 \pm 0.0064$	0.39
实验组 2	$0.0260 \pm 0.0026$	0.28
实验组 3	$0.0283 \pm 0.0012$	0.67
阴性对照组	$0.0243 \pm 0.0055$	0.00
阳性对照组	$0.6180 \pm 0.0210$	100.00

### 3 结论

(1) 以超临界流体强制溶液分散技术, 成功制备出呈球形或类球形形貌, 最小平均粒径为  $2.00 \mu\text{m}$ , 载药量达 17.92%, 包封率最高可至 69.57% 的咖啡缓释微球。

(2) 共聚物中 PEG 的分子量对微球的粒径、包封率和药物的释放都具有重要的影响。PEG 分子量小, 微球粒径越大, 包封率越低, 药物的释放越为迅速。4 种 PEG 分子量的共聚物微球其药物的释放都呈现先突释, 后缓释的释药模型, 表现出咖啡缓释剂型的释药特点。

(3) 复合微球有机溶剂残留量远低于国家标准; 溶血实验表明, 复合微球具有良好的血液相容性。

### 参考文献

[ 1 ] Andersen G, Christrup L, Sjogren P. [J]. J. Pain Symptom Manage. 2003, 25(1): 74-91.

[ 2 ] Folkman J, Long D M. [J]. J. Surg. Res. 1964, 4(3): 139-142.

[ 3 ] Freiberg S, Zhu X X. [J]. Int. J. Pharm. 2004, 282(1-2): 1-18.

[ 4 ] 张旭辉, 孙永海, 张宏. 聚乳酸-羟基乙酸共聚物咖啡微球的制备及体外释放模型的建立[J]. 军医进修学院学报. 2009, 30(2): 128-129.

[ 5 ] Lee J H, Go A K, Oh S H, et al. [J]. Biomaterials. 2005, 26(6): 671-678.

[ 6 ] Hiemstra C, Zhong Z Y, Van Tomme S R, et al. [J]. J. Controlled Release. 2006, 116(2): 19-21.

[ 7 ] 王勤, 王传栋, 马丽霞, 刘阳. PEG 改性聚乳酸嵌段共聚物降解性能研究[J]. 化工新型材料, 2012, 40(10): 62-64.

[ 8 ] Venkatraman S S, Jie P, Min F, et al. [J]. Int. J. Pharm. 2005, 298(1): 219-232.

[ 9 ] Cocero M J, Martín á, Mattea F, et al. [J]. J. Supercritical Fluids. 2009, 47(3): 546-555.

[ 10 ] Cansell F, Aymonier C. [J]. J. Supercritical Fluids. 2009, 47(3): 508-516.

[ 11 ] Shariati A, Peters C J. [J]. Curr. Opin. Solid State Mater. Sci. 2003, 7(4-5): 371-383.

[ 12 ] Kang Y Q, Yin G F, Ouyang P, et al. [J]. J. Colloid Interface Sci. 2008, 322(1): 87-94.

[ 13 ] Chen A Z, Pu X M, Kang Y Q, et al. [J]. J. Mater Sci Mater Med. 2007, 18(12): 2239-2245.

[ 14 ] Klepstad P, Kaasa S, Jystad Å, et al. [J]. Pain. 2003, 101(1-2): 193-198.

[ 15 ] Portenoy R K, Sciberras A, Eliot L, et al. [J]. J. Pain Symptom Manage. 2002, 23(4): 292-300.

[ 16 ] Mallardé D, Boutignon F, Moine F, et al. [J]. Int. J. Pharm. 2003, 261(1-2): 69-80.

[ 17 ] Caliceti P, Salmaso S, Elvassore N, et al. [J]. J. Controlled Release. 2004, 94(1): 195-205.

[ 18 ] Pape Wj P U, Hoppe U. [J]. Molecular Toxicology 1987, 1(4): 525-536.

收稿日期: 2013-01-22

修稿日期: 2013-04-09