

3-羥基丁酸酯與 3-羥基戊酸酯共聚物 微粒製備與藥物制放

Preparation and Drug Delivery of Microspheres from 3-Hydroxybutyrate and 3-Hydroxyvalerate Copolymers

盧正慧
Lu, Jen Hui

王賢達*
Wang, Hsin Ta *

國立台北科技大學有機高分子研究所

摘要

本研究是以雙乳化($W_1/O/W_2$)溶劑揮發法製備含小牛血清蛋白(BSA; bovin serum albumin)之 3-羥基丁酸酯與 3-羥基戊酸酯共聚物(PHBV; poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid))微粒。製備參數包括乳化溫度、攪拌速度、BSA 濃度、PHBV 濃度、界面活性劑種類和界面活性劑濃度，以了解會對微粒產率、BSA 含量、粒徑、表面形態和藥物制放的影響。

乳化溫度和攪拌速度的改變並未造成微粒產率、BSA 含量和粒徑較大的變動。BSA 濃度的降低和 PHBV 濃度的增加，造成 BSA 含量和微粒產率的提升。PHBV 的濃度增加也增大了粒徑。聚乙烯醇(PVA; polyvinyl alcohol)界面活性劑濃度的增加降低了粒徑和 BSA 含量，但增加了粒子表面孔洞性。山梨醇單油酸酯(Span 80; sorbitan monooleate)界面活性劑濃度的增加，降低了粒徑和 BSA 含量，但增加了粒子表面平滑性。使用 Pluronic F-68 界面活性劑降低了 BSA 含量。

含 BSA 微粒的制放曲線大致開始以較大的制放，隨後就是微緩的制放或是趨近於零的制放。微粒製備使用低濃度的 PHBV、相對較高濃度的 PVA 或 Pluronic F-68 會有較高的 BSA 起始制放；使用 Span 80 界面活性劑製備的微粒，其 BSA 起始制放較小。使用低濃度 PHBV 製備微粒具有較多的孔洞，因而造成隨後 BSA 微緩制放。

關鍵詞：3-羥基丁酸酯與 3-羥基戊酸酯共聚物、微粒、雙乳化溶劑揮發法、藥物制放

投稿受理時間：95 年 8 月 21 日

審查通過時間：95 年 12 月 26 日

ABSTRACT

Microspheres of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate copolymers (PHBV) containing bovine serum albumin (BSA) were prepared using double emulsion ($W_1/O/W_2$) solvent evaporation method. Temperature of emulsification, stirring velocity, concentrations of BSA and PHBV, and species of surfactants were varied for microsphere preparation. Yields of different preparation methods, BSA incorporation efficiency, average microsphere diameter, surface morphology of microspheres and BSA delivery were investigated.

BSA incorporation efficiency and average diameter of microspheres were not influenced by emulsification temperatures and stirring velocities in preparation. Higher BSA concentration used in microsphere preparation would not cause higher BSA incorporation. Higher PHBV concentration, polyvinyl alcohol(PVA) and sorbitan monooleate(Span 80) used as surfactants, applied in preparation gave higher yield and larger average diameter of microspheres. Higher concentrations of PVA and Span 80 used in formulation produced microspheres with lower BSA incorporation and average diameter. Both PVA and Span 80 used in preparation would give microspheres with much smooth surface. The use of Pluronic F-68 (PF-68) surfactant lowered BSA incorporation efficiency of microspheres.

The cumulative BSA release curves for microspheres showed two stages, a burst release and a slow release. Microspheres with different formulations would cause different level of burst release in two days. Microspheres prepared with both PVA and Span 80 surfactants displayed extensive release character in 10 days, and surface porosity of microspheres was believed to be the major reason of BSA release.

Keywords : Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), Microsphere, Double Emulsion Solvent Evaporation Method, Drug Delivery

壹、簡介

1976 年英國 ICI 化學公司從 *Alcaligenes eutrophus* 菌株發酵培養，並萃取出聚 3-羥基丁酸酯(PHB)，如在發酵過程中供給不同濃度的丙酸酯(propionate)，則可得到 3-羥基戊酸酯(HV)含量在 0~47mole%範圍的 PHBV[1]。

包覆藥物微粒的形成需要一個核(藥物)及一個殼(聚合物) [2-3、4-6]，殼包著核的最初型式是以乳化液的狀態呈現，可使用攪拌、超音波等達成。

乳化液典型的型式可分為兩類：(1) O/W 型，即分散相為油，連續相為水。(2)

W/O 型，即分散相為水，連續相為油。另外還有一些複雜的型式，包括雙乳化液(double emulsion，又稱多重乳化液，分為 W/O/W 型和 O/W/O 型)和乳化液含有分散的固體微粒[7-10]。

以熱力學的觀點來說，乳化液是一個不穩定系統，往往受到界面活性劑[8、11-12]、溫度[7]和攪拌速度[13-15]的影響。除了上述的因素之外，還有各成分的體積比及聚合物的濃度，都會影響到最後微粒的結果。

很多的制放曲線是一開始有一個較多的起始制放(burst effect)[16]，隨後就呈現一個穩定的制放曲線，隨著藥物釋放殆盡

或是高分子的降解，制放曲線可能逐漸降低下來或是突然上升(catastrophic effect) [2-3、16]。

微粒表面形態結構對藥物制放曲線有很大影響，尤其在初期的階段。Abe[17]將不同濃度的單硬酯酸甘油酯(GMS; glycerol monostearate)和三硬酯酸甘油酯(GTS; glycerol tristearate)個別的加入與 PHB 一起形成微粒，由於 GTS 與 PHBV 的不容易混合，在微粒成型的過程中造成微粒表面有較大的孔洞形成，所以含有 GTS 的制放最快。Conway[3]則是將分子量相近的 PHB 與 PHBV 做藥物制放的比較，觀察到 PHB 的釋放比率較高，原因是隨著 HV 含量增加，分子之間可動性增加，聚合物的可塑性也愈高，所以微粒基質形成較少的孔洞，相對的制放量少。

Atkins[2]認為初期的藥物(BSA)制放先從微粒表層發生，可能經由緩衝溶液進入孔洞將藥物從孔洞擴散出來，隨後的制放則因為緩衝溶液更深入基質，慢慢將內部的 BSA 溶解出來，此時 BSA 的制放量有受到 BSA 裝入比率的影響，裝入率愈高，制放量愈多。

本研究使用商業上已生產之 PHBV，並製成微粒，調整微粒製程所需要的參數，包括蛋白質濃度、PHBV 濃度、攪拌速度、乳化溫度及界面活性劑種類和濃度，並研究微粒產率、蛋白質含量、粒徑大小、表面孔洞性及蛋白質長期制放性質。

貳、實驗材料及方法

一、材料

PHBV 分子量為 40 萬，其中 HV 含量 12wt%(Aldrich)；BSA(Sigma)；PVA 分子量 22000(Aldrich)；Coomassie Brilliant Blue

G-250 染液(Biorad)；山梨醇單油酸酯，Span 80(Showa)；Pluronic F-68，PF-68(Sigma)，皆直接使用。

二、實驗儀器與檢測方法

(一) 紫外光/可見光光譜法(UV/VIS)：用來測量微粒的 BSA 含量及微粒藥物制放的 BSA。使用 Varian 公司的 Cary50 紫外光/可見光光譜儀，掃描速度 24000nm/min，掃描範圍 190~1100 nm，以 595nm 波長測量。

(二) 掃描式電子顯微法 (SEM)：SEM 提供微粒表面形態影像圖，並可藉此得到粒徑的分佈。SEM 為 JEOL 公司的 JSM-6300，真空度 10^{-6} torr，電子槍使用 5KeV 電壓，量測前微粒先行真空鍍金。

三、微粒製備

微粒形成是用雙乳化($W_1/O/W_2$)溶劑揮發法製得，其溶劑使用二氯甲烷，由於 BSA 不溶於其中，揮發性高與 PHBV 有極好的溶解度，因此選其作為油相的溶劑。另外在 W_2 相裏使用丙酮與水的混合液的原因，是因為多次的試驗結果，發現 W_1/O 相在含有 PF-68 的 W_2 相裏容易形成微粒 [5]，而文獻[4]則說明並無導致蛋白質變性的可能。

首先將 BSA 溶在去離子水裏，條件上若是有加入 PVA，則此時一起加入，此溶液為水相 W_1 。PHBV 溶解在二氯甲烷中，條件上若是要加入 Span 80，此時加入，此溶液為油相 O。將 W_1 與 O 在 4°C(或 25°C)時加在一起，並用超音波震盪 4 分鐘，形成乳化液，為 W_1/O 型式；此乳化液置放於室溫 25°C 或低溫 4°C 備用。外部連續相 (W_2) 是使用 PVA(或 PF68)，溶解在去離子水裏。把 W_1/O 形式乳化液用配有推桿的

微量吸量管，以 20~30 μ l 的量取出，然後滴入以均質機攪拌(速度依製備條件而異)之室溫下的 W_2 溶液裏，滴完後繼續攪拌 30 分鐘。

製備好的 $W_1/O/W_2$ 型式的乳化液，裡面已有許多微粒沉澱在底部，這些微粒是已經固化，但乳液內仍然有未固化的微粒，所以用旋轉式真空濃縮機將未固化微粒內的二氯甲烷抽出。

固化好的微粒用去離子水清洗，再用離心機以轉速 2600rpm，時間 5 分鐘的操作條件，分離出微粒。如此步驟重複清洗三次，才將微粒以冷凍乾燥機真空乾燥 24 小時，最後將微粒儲存於低溫下。

表一至五列出在甲、乙、丙、丁、戊五個系統製備條件。

四、磷酸鹽緩衝溶液製備

體積 1 公升 0.15M 的磷酸鹽緩衝溶液，其配法如後：將 0.15M 磷酸氫二鈉、0.9%氯化鈉和 0.1%疊氮化鈉(sodium azide)溶解在去離子水裏，然後測其 pH 值，並用磷酸調降至 pH 7.2，最後將去離子水加至刻度線。

五、微粒蛋白質萃取

置 100mg 的微粒於試管內，加入 0.2ml 的二氯甲烷，待微粒完全溶解後，再置入 0.6ml 的磷酸鹽緩衝溶液，以渦漩機振盪 30 分鐘，使 BSA 萃取到緩衝溶液裏，再將溶液以 2600rpm，離心 5 分鐘，並抽取上層的緩衝溶液，重複步驟 3 次以上萃取，BSA 將能完全被萃取出來。

六、藥物制放實驗

取 200mg 微粒置於試管內，加入 2.5ml 磷酸鹽緩衝溶液，旋緊蓋子，放入轉速 100rpm，溫度 37 $^{\circ}$ C 的旋轉式振盪培養箱內。於特定時間區間，取出試管內的液體，

再換入 2.5ml 新鮮的磷酸鹽緩衝溶液於試管內。

由於本實驗的制放天數長達 300 天以上，所以磷酸鹽緩衝溶液中加入疊氮化鈉，以防止微生物的污染，影響數據的準確度。

七、蛋白質分析

使用 G-250 染液，使用蛋白質濃度為 0-25 μ g/ml 範圍。先配製 7-8 個標準溶液，進行 UV/VIS，595nm 吸收值測定，製備檢量線。取 2.4ml 含有 BSA 之溶液，加入 0.6ml 的 G-250 染液，用渦漩機充分的混合 5 分鐘，最後以 UV/VIS 在 595nm 做定量分析。

參、結果與討論

一、微粒產物分析

微粒產率(公式一)、BSA 含量及 BSA 回收率列於表六。甲系統之樣品 1 至樣品 3 微粒產率皆 >50%，但 BSA 回收率不高 (<3.7%)，所使用的 PHBV 濃度(6%)是所樣品中最低，其攪拌速率(17000rpm)則是所有樣品中最高，但相對粒徑範圍(表七)是樣品中最狹窄的。

$$\text{微粒產率}(\%) = \frac{\text{微粒質量}(\text{g})}{\text{聚合物質量}(\text{g}) + \text{BSA質量}(\text{g})} \times 100 \quad (\text{公式一})$$

樣品 1 在 W_1 相中使用 PVA 穩定 BSA 形成乳化液，但並沒有增加 BSA 回收率，所以其他樣品不在於 W_1 相中加添 PVA。

以 BSA 重量除以 PHBV 重量得到的理論 BSA 含量，對照由光譜儀測得之 BSA 重量除以回收 PHBV 重量的實際 BSA 含量(表八)，我們可以發現實際 BSA 含量偏

低，此可能與 PHBV 高親油性以及微粒表面孔洞過大(或過多)有關，因此在製備過程中 BSA 流失很多。

樣品 2 在 W_1 相中不加 PVA，因此 BSA 回收率較佳。樣品 3 為調整 W_1/O 乳化液溫度至 4°C ，BSA 回收率增高，因此其他系統微粒製備皆採用此溫度。當然降低溫度也會增進乳化液穩定。

樣品 4 與樣品 5(含 15 和 18% PHBV) 的 BSA 含量是差不多，但是當 PHBV 的濃度達到 20% 時(樣品 6)，其每克微粒中 BSA 含量足足提高兩倍以上。可能是 PHBV 濃度越高，越可阻擋 BSA 在製備過程中流失，或是因為調降理論 BSA 含量(表八)。因此其他系統(丙、丁、戊)製備微粒時，皆使用 20% PHBV 和 0.75% 理論 BSA 含量。此系統的粒徑範圍變大(表七)，可能使用較低的攪拌速度(5000rpm)及 W_2 使用較低的 PVA 濃度(0.1%)所導致。

表一 甲系統微粒製備條件^{a, b}

No.	BSA (wt%)	PHBV (wt%)	W_1/O 溫度 ($^\circ\text{C}$)	PVA (wt%)	攪拌速度 (rpm)
1	12	6	25	1.5	17000
2	12	6	25	1.5	17000
3	12	6	4	1.5	17000

- a. W_1 含有 1ml 去離子水、BSA 和 3 wt% PVA(樣品 1)；O 含有 25ml CH_2Cl_2 ； W_2 含有 80ml 去離子水和 PVA。
b. 主要改變參數在溫度。

表二 乙系統微粒製備條件^{a, b}

No.	BSA (wt%)	PHBV (wt%)	W_1/O 溫度 ($^\circ\text{C}$)	PVA (wt%)	攪拌速度 (rpm)
4	3	15	4	0.1	5000
5	3	18	4	0.1	5000
6	3	20	4	0.1	5000

- a. W_1 含有 0.1ml 去離子水、BSA；O 含有 2ml CH_2Cl_2 ； W_2 含有 50ml 去離子水和 PVA。
b. 主要改變參數在 PHBV 的濃度。

表三 丙系統微粒製備條件^{a, b}

No.	BSA (wt%)	PHBV (wt%)	W_1/O 溫度 ($^\circ\text{C}$)	PF-68 (wt%)	攪拌速度 (rpm)
7	3	20	4	2.5	5000

- a. W_1 含有 0.1ml 去離子水、BSA；O 含有 2ml CH_2Cl_2 ； W_2 含有 37.5ml 去離子水和 12.5ml 丙酮及 PF-68。
b. 主要改變參數為使用 PF-68 而不是 PVA。

表四 丁系統微粒製備條件^{a, b}

No.	BSA (wt%)	PHBV (wt%)	Span 80 (wt%)	W_1/O 溫度 ($^\circ\text{C}$)	PVA (wt%)	攪拌速度 (rpm)
8	3	20	0	4	0.1	10000
9	3	20	1	4	0.1	10000
10	3	20	2	4	0.1	10000
11	3	20	3	4	0.1	10000
12	3	20	4	4	0.1	10000
13	3	20	5	4	0.1	10000

- a. W_1 含有 0.3ml 去離子水、BSA；O 含有 6ml CH_2Cl_2 和 Span 80； W_2 含有 150ml 去離子水和 PVA。
b. 主要改變參數為 Span 80 的濃度。

表五 戊系統微粒製備條件^{a, b}

No.	BSA (wt%)	PHBV (wt%)	Span 80 (wt%)	W ₁ /O 溫度 (°C)	PVA (wt%)	攪拌速度 (rpm)
14	3	20	2	4	0.05	10000
15	3	20	2	4	0.5	10000
16	3	20	2	4	1	10000

a. W₁ 含有 0.3ml 去離子水、BSA；O 含有 6ml CH₂Cl₂ 和 Span 80；W₂ 含有 150ml 去離子水和 PVA。

b. 主要改變參數在 PVA 的濃度。

丙系統與乙系統的主要差別，在於 W₂ 中使用的是 PF-68 為界面活性劑並加入丙酮(表三與四)。從表六中可看到樣品 7 微粒產率偏低(10%)，BSA 回收率也低(11%)，在製備過程中，水與丙酮的比例對 PF68 而言非常重要。當沒加入丙酮時，乳化液(W₁/O)滴入之後無法形成微粒，只形成塊狀高分子懸浮在溶液中，若丙酮加入太多，則會造成殼太軟，微粒因而有聚集的情況發生。

丁系統樣品 9 至 13，在 O 相中分別加入 1-5% Span 80(超過臨界微胞濃度[18])，雖然在 W₁/O 乳液中，也可如同 BSA 一樣位於界面，形成雙層結構(double layer)，但是當形成 W₁/O/W₂ 乳液時仍無法防止 BSA 的流失，而且是 Span 80 濃度越高 BSA 流失越多，再觀察微粒直徑範圍(表七)，Span 80 可能是在形成 W₁/O/W₂ 乳液微粒時，將 BSA 由內層界面帶至外層界面，進而流失於水中，不過 Span 80 存在於外層界面，倒是增加了 W₁/O/W₂ 乳液微粒的穩定度，也增加了微粒產率。

系統戊是將 Span 80 維持在 2% 的條件下，改變 W₂ 相中 PVA 的濃度從 0.05 至 1%，其結果以 W₂ 相含 0.05 及 0.5% PVA

較為適宜；其中 W₂ 相含 0.05%PVA 所產生的樣品 14，微粒產率為 84.3%，BSA 回收率為 26.7%。不過當 W₂ 相所含之 PVA 濃度高於 0.5%時，微粒直徑範圍明顯變小(表七)，BSA 含量也降低，是否因為乳液微粒變小，BSA 就較容易移出，目前仍需要更多實驗數據來證明此論點。

表六 微粒產率、BSA 含量及回收率

系統	樣品	微粒產率 (%)	BSA 含量 (µg/g)	BSA 回收率(%)
甲	1	71.3	749.3	0.67
	2	53.3	1612	1.07
	3	65.3	2909.4	2.37
乙	4	76.7	1330.1	10.2
	5	75.0	1152.8	10.4
	6	67.5	2669.6	24.0
丙	7	10.3	836	6.0
丁	8	73.3	2677.8	26.2
	9	76.2	1643.5	17.5
	10	79.6	2148.8	25.1
	11	83.3	1609.0	20.6
	12	88.2	1406.8	19.9
	13	84.7	1067.3	15.1
戊	14	84.3	2144.0	26.7
	15	79.0	1953.3	22.8
	16	89.5	1640.7	21.7

表七 各樣品之粒徑範圍

系統	樣品	粒徑範圍 (µm)
甲	3	0.5-13
乙	6	5-150
丙	7	5-60
丁	11	18-253
戊	14	12-238
	15	5-79
	16	6-71

綜合以上討論，樣品 3、6、8、10、14 及 15 可得較佳微粒產率和 BSA 含量。樣品 3 產生之微粒直徑範圍最小，但仍然需要較高之理論 BSA 含量。樣品 6 於 W_1 相裏不加入 PVA、降低 W_1/O 乳液的溫度和提高 PHBV 濃度(>6%)的方法，可以增加 BSA 的含量。樣品 8 有同樣的製備參數，因此得到相似的數據。樣品 10 在 O 相裏加入 Span 80 則可以提高微粒產率，但 Span 80 濃度太高，則會導致 BSA 流失。樣品 14 降低 W_2 相中之 PVA 濃度，形成 W_1/O 乳液裏 2% Span 80 的濃度遠大於 PVA 的濃度，其粒徑範圍變大。樣品 15 提高 W_2 相中之 PVA 濃度，其粒徑範圍變小。

表八 微粒理論與實際 BSA 含量

樣品	理論 (%)	實際 (%)
1	8	0.08
2	8	0.16
3	8	0.29
4	1	0.13
5	0.83	0.12
6	0.75	0.27
7	0.75	0.08
8	0.75	0.27
9	0.75	0.16
10	0.75	0.21
11	0.75	0.16
12	0.75	0.14
13	0.75	0.11
14	0.75	0.21
15	0.75	0.20
16	0.75	0.16

二、微粒粒徑大小

粒徑尺寸是從 SEM 影像圖，直接以尺量測，其微粒分佈因而統計出來。以統計

學上常態分配[19]來說，大部分的數據集中於中央，其分配是以平均值為中心的對稱分配，分配曲線由平均值向兩端延伸，逐漸接近橫軸，形成一鐘形曲線。樣品的粒徑分佈並未呈現高斯(Gaussian)分佈曲線形狀，其原因為呈現在 SEM 影像圖內的粒子數目不夠多，如其數目愈多，粒徑分佈愈趨近於高斯分佈。

系統甲之樣品 3，最多數目粒徑約在 $1\mu\text{m}$ (圖一)，其原因為製備微粒過程中使用較低的 PHBV 濃度(6%)以及最高的攪拌速度(17000rpm)。

系統乙之樣品 6，其最多數目粒徑(圖二)約在 $5\mu\text{m}$ ，此數目相較於系統甲來的高，其原因為微粒製備過程中使用高的 PHBV 濃度(20%)以及較低的攪拌速度(5000rpm)。系統丙之樣品 7，其最多數目粒徑(圖三)，約在 $14\mu\text{m}$ ，此數目比甲和乙系統所顯示的高，其原因為使用 PF-68 界面活性劑及 W_2 中使用丙酮溶劑，此兩種之組合，無法製備出較小的最多數目粒徑。

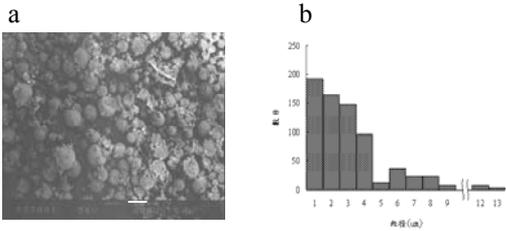
系統丁之樣品 11，其最多數目粒徑(圖四)約在 $18\mu\text{m}$ ，從粒徑分佈圖，粒徑大於 $40\mu\text{m}$ 的數目變多了，因此在油相中使用 Span 80，可能會在製備過程中移至 W_1/O 微粒與 W_2 之界面，並與 PVA 在界面形成競爭關係，當 Span 80 在 W_1/O 中濃度大於 3%時，Span 80 濃度在界面是比 W_2 中 PVA 的濃度來得高，因此會造成微粒結合，因此有較大直徑微粒。

樣品 14 其最多數目粒徑(圖五)約在 $30\mu\text{m}$ ，大於 $40\mu\text{m}$ 直徑粒子頗多，這些數據頗符合使用 2%Span 80 濃度(W_1/O) 在界面高於 0.05%PVA(W_2)的製備條件。樣品 15(表七)和樣品 16(圖六)其最多數目粒徑約在 $5\mu\text{m}$ ，此和樣品 6 的數據相近，大於

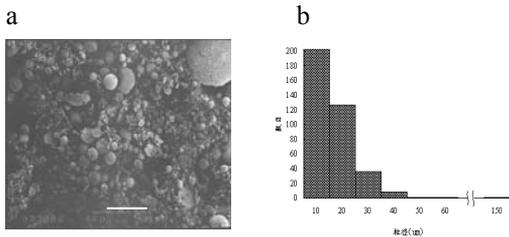
40 μm 直徑粒子也變少，PVA 濃度的提高可能是主因，攪拌速度顯得較次要。

三、微粒表面形態

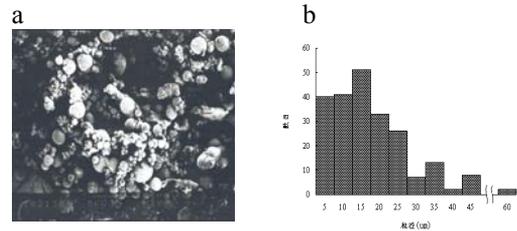
樣品 3 至 6 其 PHBV 的濃度由 6% 增加到 20%，也使得油相的黏度增加，所以在高濃度 (>6%) 時微粒表面形成粒狀結構。樣品 7 (圖七 d) 的表面則與樣品 3 (圖七 a) 的表面形態相似，皺褶間有不少細小孔洞。系統丁 (圖八) 微粒表面形態，隨著親油性 Span 80 的濃度增加而表面越趨於平滑，孔洞有增多的趨勢。其中又以加入 Span 80 為 4% 以上樣品最為明顯 (圖八 b)。圖九顯示出隨著 PVA 的濃度增加，微粒表面也變得較為鬆散，孔洞也隨之增多。



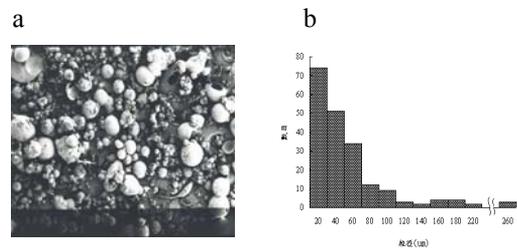
圖一 樣品 3 之 (a) SEM, $\times 800$, bar = 10 μm 與 (b) 粒徑分佈



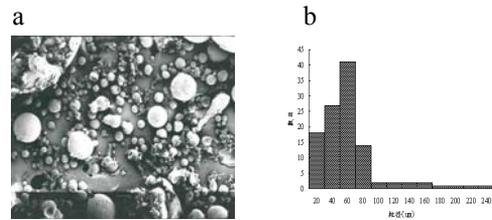
圖二 樣品 6 之 (a) SEM, $\times 190$, bar = 100 μm 與 (b) 粒徑分佈



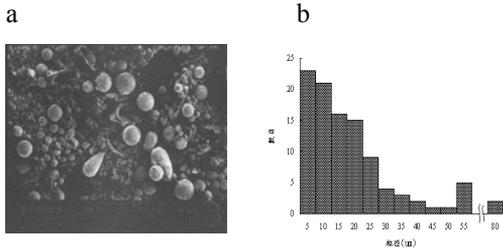
圖三 樣品 7 之 (a) SEM, $\times 200$, bar = 100 μm 與 (b) 粒徑分佈



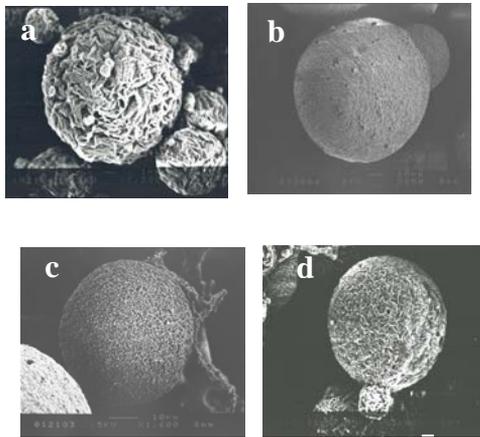
圖四 樣品 11 之 (a) SEM, $\times 50$, bar = 100 μm 與 (b) 粒徑分佈



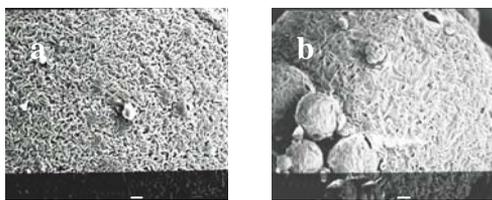
圖五 樣品 14 之 (a) SEM, $\times 75$, bar = 100 μm 與 (b) 粒徑分佈



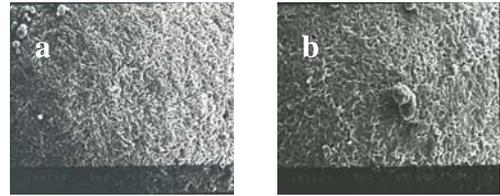
圖六 樣品 16 之(a)SEM, $\times 150$, bar = 100 μm 與(b)粒徑分佈



圖七 微粒表面之 SEM(a)樣品 3, $\times 7500$, bar = 1 μm (b)樣品 4, $\times 850$, bar = 10 μm (c)樣品 6, $\times 1600$, bar = 10 μm (d)樣品 7, $\times 5000$, bar = 1 μm



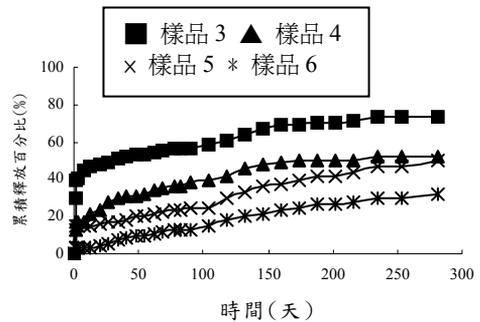
圖八 微粒表面之 SEM(a)樣品 10, $\times 5000$, bar = 1 μm (b) 樣品 12, $\times 5000$, bar = 1 μm



圖九 微粒表面之 SEM(a)樣品 14, $\times 5000$, bar = 1 μm (b)樣品 16, $\times 5000$, bar = 1 μm

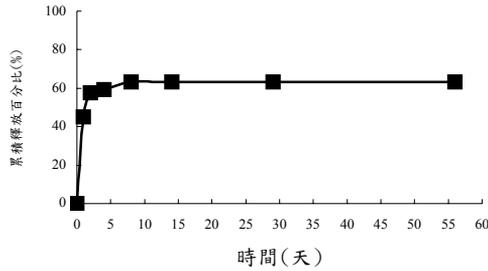
四、微粒藥物制放分析

樣品 3 和乙系統 4、5、6 之藥物制放曲線(圖十)顯示在 2 天內, 皆有較高的起始制放, 尤其是樣品 3 的累積制放達 40%。由前面粒徑大小的討論, 樣品 3 相較於系統乙(以樣品 6 為代表)有較小、較多的數目粒徑(1 μm), 因此樣品 3 有較多的表面積, 如果起始制放是從位於表層的 BSA 所造成的, 那麼較多的表面積就會給予較高的起始制放(圖十四)。4 個樣品的制放曲線皆隨天數有所上升, 根據文獻 [20]PHBV 雖然隨著水解天數的增大, 會降低分子量, 但是要 1% 重量損失, 可能需要的水解天數達 200 天, 因此不可能在 100 天左右就有微粒部分解離, 何況隨後天數的制放曲線, 仍然是向上爬升。



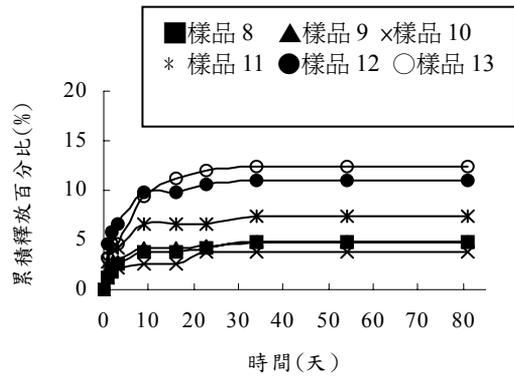
圖十 樣品 3-6 之藥物制放曲線累積釋放百分比

樣品 7 之藥物制放曲線(圖十一), 在 2 天內的高起始制放後, 就成水平狀態, BSA 每日釋放量不是很小就是趨近於零, 藥物制放曲線非常符合 BSA 制放需要經由 PHBV 基質的水解程序。

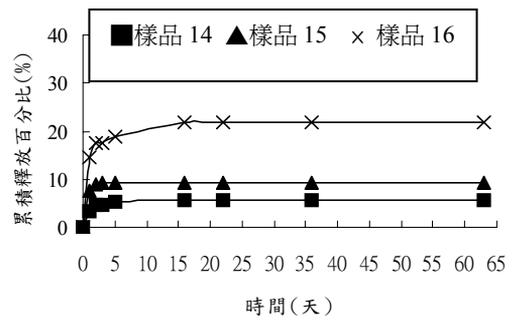


圖十一 樣品 7 之藥物制放曲線累積釋放百分比

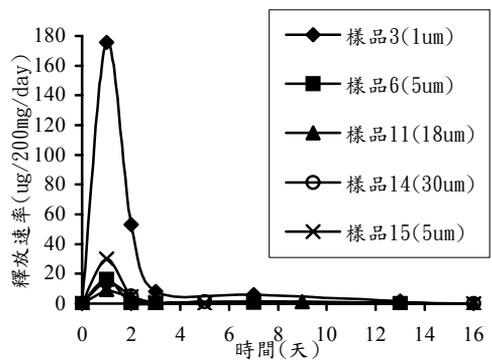
樣品 8-13 的藥物制放曲線(圖十二)呈現微小的起始制放, 其 BSA 每日制放量很小, 隨後的制放曲線稍微向上升, 可能是因為表層 BSA 的制放, 大約 9 天後, 曲線上升趨於平緩, 此段制放曲線符合上述 BSA 制放是經由 PHBV 的基質水解。樣品 8 的制放曲線和樣品 6 的制放曲線雷同, 皆有較低的起始制放(<2%)。樣品 14-16 的藥物制放曲線如圖十三, 除樣品 15 和 16 有較高的起始制放(分別為 7 和 15%), 樣品 14 的起始制放(4%)則較小, 雖然此系統使用 Span 80 (O)和 PVA (W₂)兩種界面活性劑, 但是樣品 15 和 16 在粒子表面的 PVA 濃度比 Span 80 濃度高。樣品 16 制放曲線在 2 至 16 天間有微升趨向, 其較為可能是因為誤差, 因其他二個樣品的制放曲線皆趨於平緩, 此和 PHBV 基質未能水解, 造成孔洞, 讓 BSA 從粒子內部釋出有關。



圖十二 樣品 8-13 之藥物制放曲線累積釋放百分比



圖十三 樣品 14-16 之藥物制放曲線累積釋放百分比



圖十四 初制放速率與粒徑之關係

綜合上面所述，微粒製備以 PVA 或 PF-68 為界面活性劑，其制放曲線必有較高的起始制放。粒子製備以 Span 80 (或 Span 80 濃度高於 PVA) 為界面活性劑，則其制放曲線的起始制放較小。微粒製備的 PHBV 濃度較低(平均粒徑也較小)，則制放曲線的起始制放較大，但隨後天數的制放曲線仍然會緩緩上升，此為前述之粒子表面和裡面有很多孔隙，粒子內部 BSA 則需經由孔隙或經由 PHBV 水解產生的管道制放。

肆、結論

1. 樣品 3、8、10、14 和 15 有較佳的微粒產率和 BSA 含量，但其中樣品 3 需要使用較高之理論 BSA 含量。 W_1 相裏不加入 PVA、降低 W_1/O 乳液的溫度和提高 PHBV 濃度(>6%)，可以增加 BSA 的含量。 O 相裏加入 Span 80 則可以提高微粒產率，但 Span 80 濃度太高，則會導致 BSA 流失。
2. 低濃度 PHBV (6%) 和高的攪拌速度 (17000rpm) 可以降低微粒粒徑到 $1\mu\text{m}$ ，當 W_1/O 乳液裏 Span 80 濃度遠大於 W_2 相裏 PVA 濃度，則粒徑會增大，但提高 PVA 濃度時，粒徑又會變小。
3. 高濃度 PHBV 由於黏度增加，微粒表面形成粒狀結構，隨著 Span 80 的濃度增加，表面趨於平滑，孔洞增多，但將 W_2 相裏 PVA 提高濃度，則表面變得較為鬆散，孔洞也會增多。
4. 低濃度 PHBV 製備的微粒，由於其粒徑也小，增加制放的表面積，所以起始制放較大，但隨後天數的制放曲線仍然會緩緩上升，其原因為粒子表面和裡面有很多孔隙。加入 Span 80 界面活性劑製備

的微粒，起始制放較小，但以 PVA 和 PF-68 為界面活性劑，則有較高的起始制放，這些樣品隨後的制放曲線，在短暫天數仍然上升，在較長天數則趨平緩，每日 BSA 制放量小於 $15\mu\text{g}$ 。

本研究希望能掌握 PHBV 微粒製備參數，以期研發出大分子藥物短期制放裝置，以便未來在此基礎下，能廣泛應用於醫藥、農藥、食品、化妝品等方面。

參考文獻

- [1] T. L. Bluhm, G. K. Hamer and R. H. Marchessault, "Isodimorphism in bacterial poly(β hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate)", *Macromolecules*, vol.19, 1986, pp.2871-2876.
- [2] T. W. Atkins and S. J. Peacock, "The incorporation and release of bovine serum albumin from poly(β -hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres", *Journal of Biomedical Science Polymer Edition.*, vol. 7, no. 12, 1996, pp. 1065-1073.
- [3] B. R. Conway, J. E. Eyles and H. O. Alpar, "A comparative study on the immune responses to antigens in PLA and PHB microspheres", *Journal of Controlled Release*, vol. 49, 1997, pp. 1-9.
- [4] H. T. Wang, E. Schmitt, D. R. Flanagan and R. J. Linhardt, "Influence of formulation methods on the in vitro controlled release of protein from poly(ester) microspheres", *Journal of Controlled Release*, vol.17, 1991, pp. 23-32.
- [5] T. Chandy, G. S. Das, R. F. Wilson and G. H. R. Rao, "Development of polylactide microspheres for protein

- encapsulation and delivery”, *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 86, 2002, pp. 1285-1295.
- [6] N. Garti, “Double emulsion-scope, limitations and new achievements”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 123-124, 1997, pp. 233-246.
- [7] P. Becher, *Encyclopedia of Emulsion Technology (Volume 2 Applications)*, New York and Basel: Marcel Dekker, Inc., 1985, pp. 15-19 and 159-171.
- [8] M. Frenkel, R. Shwartz and N. Garti, “Multiple emulsions I. Stability: inversion, apparent and weighted HLB”, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol.94, no.1, 1983, pp. 174-178.
- [9] M. H. Lee, S. G. Oh, S. K. Moon and S. Y. Bae, “Preparation of silica particles encapsulating retinal using O/W/O multiple emulsions”, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 240, 2001, pp. 83-89.
- [10] C. M. Chang and R. Bodmeier, “Organic solvent-free polymeric microsphere prepared from aqueous colloidal polymer dispersions by a W/O-emulsion technique”, *International Journal of Pharmaceutics*, vol.130, 1996, pp.187-194.
- [11] M. F. Ficheux, L. Bonakdar, F. L. Calderon and J. Bibette, “Some stability criteria for double emulsion”, *Langmuir*, vol. 14, 1998, pp. 2702-2706.
- [12] C. H. Villa, L. B. Lawson, Y. Li and K. D. Papadopoulos, “Internal coalescence as a mechanism of instability in water-in-oil-in-water double-emulsion globules”, *Langmuir*, vol. 19, 2003, pp. 244-249.
- [13] S. Benita, J. P. Benoit, F. Puisieux and C. Thies, “Characterization of drug-loaded poly (d,l-lactide) microspheres”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 73, 1984, pp.1721-1724.
- [14] Y. Y. Yang, T. S. Chung and N. P. Ng, “Morphology, drug distribution and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/ evaporation method”, *Biomaterials*, vol. 22, 2001, pp. 231-241.
- [15] N. Nihant, C. Grandfils, R. Jérôme and P. Teyssié, “Microencapsulation by coacervation of poly(lactide-co-glycolide) IV”, *Journal of Controlled Release*, vol. 35, 1995, pp.117-125.
- [16] S. Akhtar, C. W. Pouton and J. Notarianni, “Crystallization behaviour and drug release from bacterial polyhydroxyalkanoates”, *Polymer*, vol. 33, 1992, pp. 117-126. H. Abe and Y. Doi, “Controlled release of lastet, an anticancer drug, from poly (3-hydroxybutyrate) microspheres containing acylglycerols”, *Macromolecular Reports*, A29, 1992, pp. 229-235. P. L. Gould, S. J. Holland, B. J. Tighe “Polymers for biodegradable medical devices IV.”, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 38, 1987, pp. 231-237. D. Sendil, I. Gürsel, D. L. Wise and V. Hasirci, “Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles” *Journal of Controlled Release*, vol. 59, 1999, pp. 207-217.
- [17] H. Abe and Y. Doi, “Controlled release of lastet, an anticancer drug, from poly(3-hydroxybutyrate) microspheres

- containing acylglycerols”, *Macromolecular Reports*, A29, 1992, pp. 229-235.
- [18] L. Peltonen, J. Hirronen, J.Yliruusi, “The behavior of sorbitan surface-tants at the water-oil interfaces straight-chained hydrocarbons from pentane to dodecane as an oil phase”, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol.240 (1), 2001, pp. 272-276.
- [19] J. H. Kennedy, *Analytical Chemistry Principles*, U.S.A.; Harcourt Brace Jovanovich, 1984, pp.15-55.
- [20] S. J. Holland, A. M. Yasin and B. J. Tighe, “Polymers for biodegradable medical devices II”, *Biomaterials*, vol. 8, 1987, pp. 289-295.

