

4.4 焊接器具

焊接器具是焊接设备的重要组成部分，不同的软组织吻合需要不同的焊接器具，焊接器具的开发能促进高频焊接技术的普及发展。

目前乌克兰国家科学院巴顿焊接研究所在软组织高频焊接方面取得了巨大的进展，已经在临床上应用于肝、肺组织焊接吻合。广东省医疗器械研究所正在与巴顿所合作，引进其先进的焊接技术，并继续完善和发展，使其最终成为外科手术中常用的软组织吻合方法。

参考文献

- [1] 曹登科. 外科医生的成长之路：浅谈外科医生基本素质的培养 [EB/OL]. <http://www.ycrh.com>. 2011-10-14.
- [2] 薛燕. 组织粘合剂在伤口中的应用[J]. 中国医疗器械信息. 2012.(2):7-12.
- [3] 赵玉沛. 普通外科缝合技术和缝线的发展历史现状和展望[J]. 中国实用外科杂志. 2008.28(10): 789-792.
- [4] 李健. 手术缝线:不断挑战你的想像力[N]. 中国消费者报. 2008-05-07(C04).
- [5] 徐铮奎. 外科缝合器：需求支撑开发价值[N]. 医药经济报. 2011-01-05(005).
- [6] 李洪涛，杨继庆，王文革. 激光在生物组织焊接中的研究进展[J]. 第四军医大学学报. 2005.26(z1):42-43.
- [7] 以色列开发出激光焊接手术伤口技术[J]. 广西科学院学报. 2008.(04):283.
- [8] 活性组织连接公司. 控制组织缝合的系统和方法[P]. 中国 CN1638700A. 2005-07-13.
- [9] Oleksandr Linchevskyy, Anatoliy Makarov, Vadym Getman. Lung sealing using the tissue-welding technology in spontaneous pneumothorax[J]. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. 2010.37:1126-1128.

内水相结构对微球包封率及控释行为影响的研究

陈龙^{1,2}，吴刚^{1,2*}

(1 华南理工大学材料科学与工程学院，广州，510640；2 国家人体组织功能重建工程技术研究中心，广州，510006)

摘要：本研究采用水-油-水双乳化溶剂挥发法制备 PLGA/氧氟沙星载药微球，并考察介孔硅、透明质酸、

多聚赖氨酸不同内水相成分对微球粒径及其分布、表面形态、包封率以及释放特性的影响。研究表明采用该方法制备出了内部具有多孔结构的载药微球，透明质酸内水相组微球平均粒度最大，粒径分布最小；介孔硅和透明质酸的加入提高了微球包封率；三种内水相组的初期爆释均高于对照组；多聚赖氨酸内水相组释放速率最快，透明质酸内水相组释放速率最慢。

关键词：PLGA 微球，双乳化溶剂挥发法，内水相，包封率，释放特性

骨和关节手术后的感染会引起严重的并发症并导致手术失败，由于病变处骨组织及其周围血运较差^[1]，以往为了使病灶部位局部抗生素浓度达到预期值就需要加大全身给药量，而加大全身给药量又会带来药物毒性及副作用^[2]。为了避免这种药物治疗方法的缺陷，采用可降解的聚乳酸-羟基乙酸共聚物（PLGA）作为载体材料，包裹抗生素制成微球，将微球与骨水泥混合后应用于骨和关节创伤部位^[3]，被包裹的抗生素等药物随着 PLGA 降解，在局部的持续释放给药。这种方法已经逐渐成为了未来解决骨科临床局部给药问题的重要手段，并成为相关领域的研究热点。

氧氟沙星作为一种抗生素对多种感染有效，具有抗菌谱广、抗菌活性强，同时其还有不良反应轻、细菌耐药性小等优点^[4]，在骨和关节创伤后的感染治疗上具有广阔的应用前景。但是氧氟沙星作为一种亲水小分子，在采用双乳液溶剂挥发法制备载药微球时，在 PLGA 这种油性聚合物中包封率较低，且释放过程中初期突释现象严重^[5,6]。上述问题的存在，大大影响了类似氧氟沙星的亲水性药物在缓释治疗上的应用，而对上述问题的解决成为了相关研究领域所关注的焦点。

内水相是指在水-油-水复乳体系中被油相包覆的水相。改变内水相的组成，提高亲水性药物在内水相中的比例，有可能改善相关药物在最终微球中的包封效果，同时由于内水相结构的变化，对药物的释放行为也有一定的影响，但目前尚无研究对上述内水相对药物的包封效果影响规律进行探讨。本研究通过将介孔硅（MS）、透明质酸（HA）、多聚赖氨酸（PLs）加入氧氟沙星内水相中以提高微球载药量，同时考察了物理吸附和静电作用对包封率和释放性能的影响，为未来亲水性药物控释微球的制备提供重要的研究参考。

1 实验部分

1.1 实验材料

PLGA（50/50 特性粘数 0.78 dLg⁻¹），济南岱罡生物科技有限公司；透明质酸，上海其胜生物制剂有限公司；多聚赖氨酸（Mn=7000-10000），sigma；甲基纤维素，国药集团化学试剂有限公司；二氯甲烷，分析纯，广州化学试剂厂；其余试剂均为国产分析纯级。

1.2 PLGA/氧氟沙星微球制备

微球采用双乳液溶剂挥发法（W/O/W）制备，取 500 μ l 的氧氟沙星/PBS（1% w/v）水溶液作为内水相，将内水相加入到 5ml PLGA/二氯甲烷（10% w/v）溶液中，在高速分散机下以 7200rpm 分散 10min 后得到初乳，将初乳加入到 20ml 甲基纤维素水溶液（0.5%w/v）中，在高速分散机下以 7200rpm 分散 10min 得

到复乳，将复乳转移至 400ml 去离子水中以 35℃ 脱溶 4h。真空抽滤后以 30℃ 干燥 24h 后得到 PLGA/氧氟沙星微球。研究中分别将介孔硅、多聚赖氨酸、透明质酸加入内水相中以提高包封率。

1.3 分析测试

1.3.1 形态学表征扫描电子显微镜(SEM,quanta 200, 美国)观察微球表面形貌。观察前将样品分为两组，一组进行表面喷金，在高真空模式下观察（ 1.06×10^{-6} Pa）；一组不喷金，在低真空模式下观察（60Pa），两组的扫描电压均为 10kv。

1.3.2 微球粒径及分布测试微球的粒径采用激光光散射粒度分析仪表征（MASTERSIZER 2000, Malvern, 英国），样品折射率定义为 1.46。粒径分布的 U 定义为：

1.3.3 $(D[v,90], D[v,10], \text{和 } D[v,50])$ 分别代表在 90%，10%，50% 体积时的平均粒径。^[7] 微球包封率测定将 50mg 氧氟沙星/PLGA 微球溶解于 5ml 二氯甲烷中，加入 10ml 去离子水萃取氧氟沙星，收集萃取液后，用紫外可见分光光度计（Lambda950, PERKINELMER, 美国）在 293.8nm 处测定吸光度 y 。测定已知浓度氧氟沙星的吸光度作为标准曲线， $y=13.21847 * x - 0.55224$ ，相关系数为 0.9997。其中微球包封率定义为：

1.3.4 微球体外释放体外释放试验在 37℃ 恒温水浴中进行，取 50mg 氧氟沙星/PLGA 微球置于 6ml 的 PBS 溶液中。在预定时间间隔将样品离心，取 5ml 上层清液测定溶液中氧氟沙星含量，同时补充新鲜的 PBS 溶液。

2 结果与讨论

2.3 PLGA 微球粒径及其分布

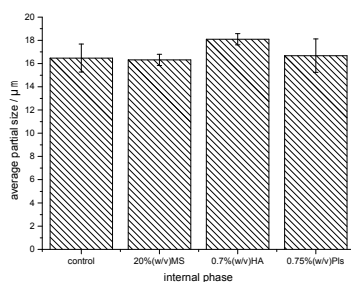


Fig.1. Average particle size of ofloxacin-loaded PLGA microspheres which contain MS, HA and Pls.

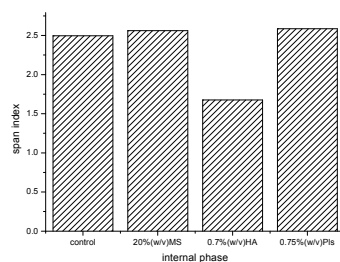


Fig.2. Span index of ofloxacin-loaded PLGA microsphere which contains MS, HA and Pls.

图 1 是采用激光光散射法测定的不同内水相条件下制备出微球的平均粒径。从图中可以看出，四种具有不同内水相的微球，平均粒径均在 16-18 μm 间，相互之间差异不大。同时，内水相为 0.7%(w/v)的 HA 时，最终制备出的微球，与对照组相比，平均粒径有所增大；而 MS 以及 Pls 内水相组，制备出的微球其平均粒径与对照组差异不大。各组微球粒径分布可见图 2。从图中可以看出，粒径分布结果与平均粒径类似，向内水相中加入 20%(w/v)MS 和 0.7%(w/v)Pls 后几乎没影响，粒径分布集中在 2.5 左右，而加入 0.7%(w/v)HA 后粒径分布变窄。产生这种现象的原因是 HA 是一种分子量较大的粘性聚糖，在水溶液中的溶解度小，且溶解后导致内水相的粘度急剧增加，初乳难以分散，同时分散后再聚集的需要消耗更大的内能，最终使得平均粒径增加，同时分布变窄。研究中采用的 Pls 为分子量不大，在水溶液中的溶解度较高，加入内水相后对内水相粘度的影响较小。而 MS 为一种纳米介孔材料，主要是悬浮在水相中，对内水相的影响也较小。因此，MS 和 Pls 组制备出的微球粒径及其分布相对对照组而言变化不大。

2.4 微球形态表征

图 3 是制备出微球的 SEM 照片，图 3(a)是在环境扫描模式下，不喷金得到的照片，从图中可以看出微球表面光滑，没有明显孔洞。当对微球表面喷金后，如图 3(b)所示微球表面产生了明显的塌陷。这是由于微球内部的空泡结构所导致的。微球在真空下进行喷金后，在取出样品前需要排除真空。在解除真空状态时，由于微球内部空泡中的压力与外部压力不平衡，导致了微球表面结构的塌陷，最终产生了这种表面褶皱的形态。而采用环境扫描电镜观察时，由于抽真空过程相对排气过程而言更为缓慢，微球内部空泡与外部空气压力容易平衡，所以能够观察到真实的微球表面形貌。Zheng Wang^[8]等人的研究表明采用双乳液法制备的微球，其内部主要为三类结构，即空腔结构、囊泡结构及多孔结构，如示意图 4，微球中各种结构的形成与初乳液的稳定性相关。在图 3(b)中同时也能观察到少量表面大范围塌陷的微球，以及表面出现空洞的微球（如箭头所示），这可能是由于内部空腔结构及囊泡结构所形成的。表明具有上述结构的微球在本制备方法中也同样存在。内部多孔结构对最终提高药物的包封效率、调控药物的释放曲线特性具有重要的影响。其它内部结构微球的存在在一定程度上对最终的微球载药及释放性能的波动产生影响。

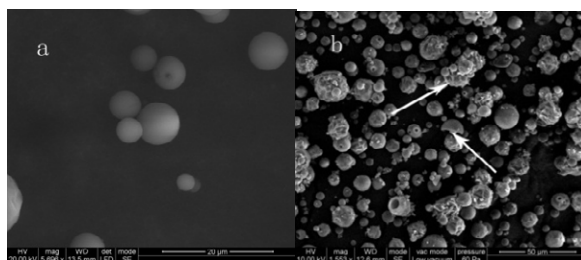


Fig.3. SEM photographs of ofloxacin-loaded microsphere without sputter coated with gold (a), sputter coated with gold and venting in a high speed (b)

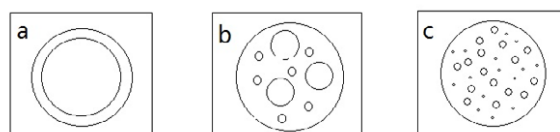


Fig.4. Sketch of the main type of internal morphology for microparticles^[9]

2.5 PLGA 微球包封率

图 5 是由不同内水相结构形成的氧氟沙星/PLGA 微球的包封率数据。从图中可以看出向内水相中加入 20%(w/v)介孔硅后微球包封率从 41%增加到 72%。介孔硅作为一种纳米介孔材料具有高比表面积和孔容,因而具有很强的吸附性,加入到内水相后吸附氧氟沙星,对氧氟沙星起一个固定的作用。同时 MS 表面负电荷也利于与正电的氧氟沙星相结合(表 1),提高氧氟沙星在水相中的保留的几率。当采用二次乳液制备微球时,氧氟沙星迁移到外水相的几率降低,从而大大提水溶性氧氟沙星分子的包封率。

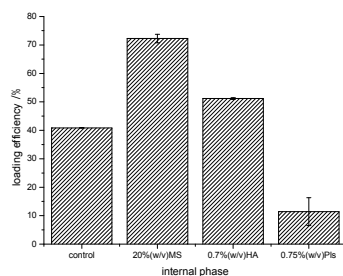


Fig.5. Loading efficiency of PLGA microsphere with different internal aqueous phase concentration of MS, HA and Pls.

透明质酸的加入能够达到同样的效果,包封率略有提升,达到约 50%。透明质酸也是负电性分子,当与氧氟沙星混合时,提高了氧氟沙星在水相中的留存率。同时,由于透明质酸分子量大,分子间有一定的缠结,在二次乳液制备微球时,阻碍了其向外水相的迁移,提高了药物的包封率。

而正电性的多聚赖氨酸加入内水相后,从图中可以看到,微球包封率从 41%降至 10%左右。这除了与多聚赖氨酸的正电特性相关外,还可能与多聚赖氨酸影响了表面活性剂甲基纤维素的乳化效果。有研究表明,初级乳液的稳定性对

最终水溶性药物分析的包封率也有直接影响^[10]。表面活性剂效果的减弱后，当在二次乳液制备微球时，微球容易破损，药物在正电内水相的影响下，更多地迁移到外水相中，大大减少了水溶性药物的包封率。

Table1 Zeta potential of different additives

	Zeta potential (mV)
Ofloxacin	24
MS	-10
HA	-14
Pls	2.5

2.6 PLGA 微球体外释放

不同内水相结构的 PLGA/氧氟沙星微球的释放曲线如图 6，从图中可以看出，内水相有添加其他成分的微球，突释现象均比对照组大。其中加入多聚赖氨酸的 PLGA 微球突释最为严重，而内水相含 MS 和 HA 的微球，突释现象略高于对照组。微球突释主要有表面层吸附的药物引起的。相对疏水的 PLGA 其吸附亲水性药物的能力较弱，所以突释不明显。而添加其他成分后，都提高了微球壳体材料的亲水性，使得表面吸附的药物量增加，增大了突释的几率。多聚赖氨酸的正电效应使得外水相的药物量更高，从而在微球表面吸附的药物含量更多，突释现象更为明显。

从释放速率看，多聚赖氨酸为内水相的微球释放速率最快，这是由于多聚赖氨酸与氧氟沙星的静电排斥作用，加速了氧氟沙星的迁移。MS 内水相组的释放速率也较快，这可能是由于当表面壳体材料降解后，内部的 MS 颗粒暴露或迁移到了浸提溶液里，由于颗粒吸附的药物量较大，造成释放速率更高。释放速率最为平缓的 HA 内水相组，由于 HA 的静电作用，减缓了氧氟沙星向浸提溶液的迁移速率，同时，由于 HA 大分子本身迁移弱，其迁移受到微球壳体材料的降解程度的影响，对相应药物的释放速率也产生了一定的影响。

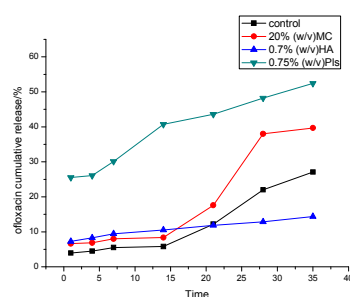


Fig.6.ofloxacin release curve which contains different levels of MS, HA and Pls.

3 结论

采用双乳化溶剂挥发法能够制备内部具有多孔结构的微球。微球粒径及分布受内水相粘度的影响较大。亲水药物的包封率、释放特性等受到内水相结构的影响，物理吸附作用和静电吸引作用可以改善高亲水性药物在内水相中的留

存量，并提高药物的包封率，但静电作用也可能会影响表面活性剂的乳化效果，破坏一次乳液的稳定性，造成较低的包封率。内水相亲水性的增加改善了高分子材料整体的亲水性，提高了亲水性药物在微球表面的吸附率，造成初期爆释较高。大分子内水相的静电作用能够在一定程度上调控药物的释放速率，从而在不改变包封材料特性的条件下，调控药物释放效果。就本研究而言，内水相中含有 0.7%透明质酸的微球包封率高，初期释放较少，且释放比较稳定，在骨和关节手术后的感染的治疗领域具有良好的前景。

参考文献：

- [1] Henry SL, Ostermann PA, Seligson D. The prophylactic use of antibiotic impregnated beads in open fractures[J]. *The Journal of Trauma*, 1990, 30(10): 1231-1238.
- [2] 刘成刚, 李中实, 张念非, 等. 庆大霉素 PMMA 珠链在骨和关节感染中的临床应用[J]. *中国全科医学*, 2004, 7(24): 1824-1825.
- LIU C G, LI Z S, ZHANG N F, et al. Gentamicin-PMMA Bead Chains in the Treatment of Bone and Joint Infection. *Chinese General Practice*[J], 2004, 7(24): 1824-1825.
- [3] Ruhe PQ, Hedberg-DirkEL, Padron NT, et al. Porous poly(DL-lactic-co-glycolicacid)/calcium phosphate cement composite for reconstruction of bone defects[J]. *Tissue Engineering*, 2006. 12(4): 789-800.
- [4] 单爱莲, 吕媛, 李家泰. 左旋氧氟沙星和氧氟沙星的临床应用进展与评价[J]. *中国临床药理学杂志*, 1997, 13(2): 115-119.
- SHAN A L, LV Y, LI A T. Advances and evaluation of levofloxacin and ofloxacin in clinical uses[J]. *The chinese journal of clinical pharmacology*, 1997, 13(2): 115-119.
- [5] Hwang S, Kim DD, Chung SJ, et al. Delivery of ofloxacin to the lung and alveolar macrophages via hyaluronan microspheres for the treatment of tuberculosis[J]. *Journal of controlled Release*, 2008, 129(2): 100-106.
- [6] Harsha S, Rani S. Ofloxacin targeting to lungs by way of microspheres[J]. *International journal of pharmaceutics*, 2009, 380(1-2): 127-132.
- [7] Hu Z, Yajun L, Weien Y, et al. Effect of bases with different solubility on the release behavior of risperidone loaded PLGA microspheres[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 86: 206-211.
- [8] Wang Z. Effects of the Process Parameters on the Initial Burst Release of Poly(lactide-co-glycolide) Microspheres Containing Bovine Serum Albumin by the Double-Emulsion Solvent Evaporation/Extraction Method[J]. *Wiley InterScience*, 2008, 115: 2599-2603.
- [9] Nihant N, Chantal S, Christian G, et al. Polylactide Microparticles Prepared by Double Emulsion/Evaporation Technique. I. Effect of Primary Emulsion Stability[J]. *Pharmaceutical research*, 1994, 11(10): 1479-1484.
- [10] Maa YF, Hsu CC. Effect of primary emulsions on microsphere size and protein-loading in the double emulsion process[J]. *Journal of Microencapsulation*, 1997, 14(2): 225-241.