附件一

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ■成果報告

計畫名稱:以超臨界流體為反溶劑況澱技術法製備奈米微粒

計畫類別：■ 個別型計畫　　□ 整合型計畫

計畫編號：NSC 92－2626－M －041－001－

執行期間：　92 年 08 月　01 至　93 年 07 月 31 日

計畫主持人：王翠霜

共同主持人：林維炤

計畫參與人員：　蔡銀棟

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：■精簡報告　□完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

□赴國外出差或研習心得報告一份

□赴大陸地區出差或研習心得報告一份

□出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

□國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

□涉及專利或其他智慧財產權，□一年□二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學醫藥化學系

中　華　民　國　93　年　10　月　31 日

附件二

可供推廣之研發成果資料表

☐ 可申請專利　　☐ 可技術移轉　　日期：93 年 10 月 31 日

國科會補助計畫	計畫名稱：以超臨界流體為反溶劑況澱技術法製備奈米微粒 計畫主持人：王翠霜 計畫編號：NSC 92－2626－M －041－001　　學門領域：
技術/創作名稱	以超臨界流體為反溶劑況澱技術法製備奈米微粒
發明人/創作人	王翠霜
技術說明	中文：本研究採用不同分子量之生物可分解性之 Poly(dl-lactide/glycolide)(PLA/GA)做為溶質,以乙酸乙酯做為溶劑並以超臨界流體 CO_2 做為反溶劑,配合超臨界流體輔助分散法(Solution enhanced dispersion by supercritical fluids， SEDS)方式將溶質奈米化,並在藥物濃度、烘箱內溫度、氣體輸出流速、壓力、樣品輸送流速、過程時間、加入反溶劑及收集法之不同為操作變因之下，探討對粒徑之影響. 根據結果顯示;最佳奈米化之條件是烘箱溫度為 30℃,壓力為 100 bar,氣體輸出流速為 59 L /min,樣品輸送流速為 0.350ml/min 之下,以 PLA/GA 75:25iv 之顆粒粒徑最小,約 57 ± 8.5 nm,呈圓形
	英文： The method of Solution enhanced dispersion by supercritical fluids(SEDS) were made Biocompatible-polymer of Poly(dl-lactide/glycolide)(PLA/GA) precipitated from an organic solution (ethyl acetate) by spraying the solution into carbon dioxide. Then, different products of particle distribution were obtained by vary with the values of operating parameters. such as oven temperature、CO_2 flow rate、pressure、solution flow rate、different molecular weigh of PLA/GA、time…etc. A result; the optimum condition to form nanoparticle was 30℃,100bar, CO_2 flow rate 59 L /min, solution flow rate 0.35 ml/min, mean particle size was 57.6 ± 8.5424 nm.
可利用之產業及可開發之產品	材料、化工、輕工、冶金、電子、生物醫學等領域皆廣泛應用
技術特點	超臨界流體二氧化碳無毒且在常溫下易揮發，可減少有機溶劑的使用與殘留外，超臨界流體在超臨界情況下,可變化其密度大小,改變壓力,便可進行再結晶,或萃取,或超細粉粒之製備等等之技術。故超臨界流體二氧化碳被喻為環保型溶劑。
推廣及運用的價值	

以超臨界流體為反溶劑況澱技術法製備奈米微粒

蔡銀棟,林維炤[b],王翠霜[*a]
執行單位：a 嘉南藥理科技大學醫藥化學系
b 嘉南藥理科技大學妝品系

一、摘要

本研究採用不同分子量之生物可分解性之 Poly(dl-lactide/glycolide)(PLA/GA)做為溶質,以乙酸乙酯做為溶劑並以超臨界流體 CO_2 做為反溶劑,配合超臨界流體輔助分散法(Solution enhanced dispersion by supercritical fluids， SEDS)方式將溶質奈米化,並在藥物濃度、烘箱內溫度、氣體輸出流速、壓力、樣品輸送流速、過程時間、加入反溶劑及收集法之不同為操作變因之下，探討對粒徑之影響.

根據結果顯示;最佳奈米化之條件是烘箱溫度為 30℃,壓力為 100 bar,氣體輸出流速為 59 L /min,樣品輸送流速為 0.350ml/min 之下,以 PLA/GA 75:25iv 之顆粒粒徑最小,約 57 ± 8.5 nm,呈圓形.

The method of Solution enhanced dispersion by supercritical fluids(SEDS) were made Biocompatible-polymer of Poly(dl-lactide/glycolide)(PLA/GA) precipitated from an organic solution (ethyl acetate) by spraying the solution into carbon dioxide. Then, different products of particle distribution were obtained by vary with the values of operating parameters. such as oven temperature、CO_2 flow rate、pressure、solution flow rate、different molecular weigh of PLA/GA、time…etc.

A result; the optimum condition to form nanoparticle was 30℃,100bar, CO_2 flow rate 59 L /min, solution flow rate 0.35 ml/min, mean particle size was 57 ± 8.5 nm.

Key words: supercritical antisolvent; biopolymer; particle

二、前言

超細微粒,特別是奈米級之研究,在當前的高科技技術中已成為一種熱門領域,不論在材料、化工、輕工、冶金、電子、生物醫學等領域皆廣泛應用。一般超微細粒子之製備有很多方法,一般是溶質從過飽合之溶液中況澱下來,形成結晶的或無定形的粉體。通常會利用蒸發、加熱、或冷卻、或添加另一種成分到溶液中以降低溶質的溶解度來形成過飽合之現象。所以應用超臨界流體技術製備法不但超臨界流體二氧化碳無毒且在常溫下易揮發，可減少有機溶劑的使用與殘留外，超臨界流體在超臨界情況下,降低壓力以致過飽合度的產生,從而將固體溶質從超臨界流體中析出。故超臨界流體二氧化碳被喻為環保型溶劑。所以逐漸地以超臨界二氧化碳流體取代傳統的有機溶劑是目前許多研究者研究的目標。

目前以超臨界流體製備微膠囊或奈米膠囊的方式主要有兩大類 (1):第一類：超臨界急速膨脹法(Rapid expansion of supercritical solution， RESS) 將藥物與高分子殼物質溶於超臨界流體中，再經噴嘴急速噴出而形成微膠囊或奈米膠囊。此法所得到的物質不含有機溶劑，亦可得到均勻的顆粒。但是由於許多高分子在超臨界流體中的溶解度不佳，使得其應用受到限制。第二類：超臨界反溶劑沉澱法(Supercritical antisolvent precipitation， SAS) 即先將藥物與高分子溶於有機溶劑而形成的溶液預先注於況澱槽內，再將超臨界流體加入該溶液中，造成溶液的膨脹，使得溶液中的物質因為溶解度降低而析出沉澱。此法中超臨界流體之功用是反溶劑，不同於超臨界流體急速膨脹法中超臨界流體扮演溶劑的角色，是屬於半批次操作，為製造方式是最簡單的一種。此法所得的膠囊在不同的研究中大小差異頗大，如 Forter-Barth 等人利用 SAS 進行微粒子製造，所得膠囊大小在 60 um 左右(2)。Yeo，等人所得的顆粒約在 10 um 左右 (3)。 Pallado 等人則可製造出 0.5 um 左右的奈米粒子(4)。另一是不同於半批次操作的連續式操作，如氣膠溶液萃取法(aerosol solvent extraction system， ASES)，乃將配製好的含高分子溶液，經由

噴嘴或毛細管噴灑進充滿超臨界流體的環境中。由於高分子溶液經由噴嘴霧化，大幅增加溶液與超臨界流體間接觸的表面積，液滴便急速膨脹而生成沉澱。相較於半批次操作而言， 連續性操作可避免半批次中況澱槽內缺乏攪拌所產生的不均勻過飽和度的問題，且更易於得到粒徑分佈均勻不易膠結之微粒。如 L. Sze Tu， F. Dehghani 等人藉著調整超臨界流體的壓力、溫度、溶液的濃度及噴霧的速度，來控制溶質沉澱之特性。此法所得的膠囊大小約在 0.1~5 um 左右(5~7)。另由上法延伸出一超臨界流體輔助分散法(Solution enhanced dispersion by supercritical fluids， SEDS)此種方式將超臨界流體與溶液經不同的管路在出口端混合噴出，藉著超臨界流體將溶液分散成細小微粒。此項裝置已經成功的用於製備許多奈米微粒，所得的顆粒大小在 10 微米以下，甚至於到達奈米級。Hanna 等人在 1995 年設計了一個專利噴嘴 (8)，由三個同心管組成，核心物質與外殼高分子分別溶於溶劑中，分別在不同同心管中移動，並與超臨界流體在出口處混合並產生沉澱。即可製備奈米級膠囊(9). Hanna 等人以 SEDS 方法製備許多含藥物的奈米級膠囊所得的顆粒大小均在 0.04 ~1 um (10)。這顯示了以 SEDS 在製備奈米級粒子上的優越性。

於此研究中,乃以 CO_2 做為超臨界流體,並選用生物可分解性之原料 Poly (dl-lactide/glycolide)做為藥物載體(即溶質)進行奈米顆粒化之研究(11~13).並採用臨界流體輔助分散法(Solution enhanced dispersion by supercritical fluids， SEDS)方式將超臨界流體與溶液經不同的管路在出口端混合噴出，藉著超臨界流體將溶液分散成細小微粒。而噴嘴部分本次研究設計二套管式之同心管，高分子藥物溶於溶劑中，與超臨界流體分別在不同同心管中移送，並與超臨界流體在出口處混合並產生沉澱,再依各項變數進行粒徑分佈結果及大小型態、再現性做一系列之探討,以期獲得最佳製備奈米級顆粒之條件。

三、研究方法

3-1 實驗設備

超臨界流體實驗裝置．．．如（圖一）此裝置各分成三大部分,分別是：

幫浦部分：

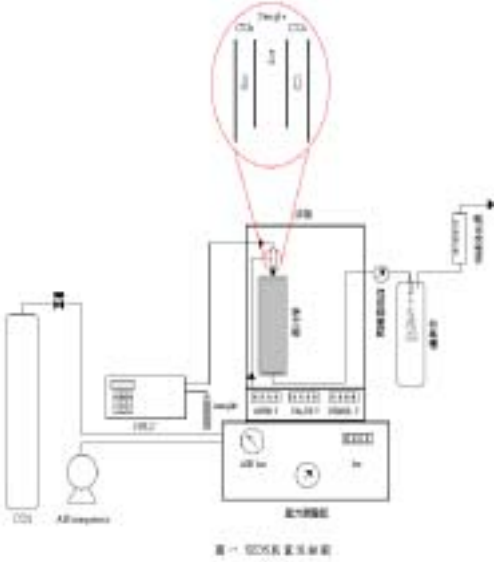
a. 高壓幫浦→加壓運送 樣品（樣品輸送流速)
b. 空氣幫浦→將空氣加壓運送至超臨界裝置內
c. 超臨界裝置→可調整式超臨界壓力控制

控溫部分：

a. 烘箱內部溫度控制→可調整式烘箱內部溫度控制，由 OVEN (T)顯示溫度
b. 壓力槽溫度感知器→藉由壓力槽溫度感知器來知道壓力槽目前的溫度，由 VESSEL (T) 顯示溫度
c. 輸出管路溫度控制→可調整是溫度控制可控制輸出噴嘴之溫度，由 VALVE (T)顯示溫度

噴嘴部分：

a. 在烘箱內部的第一個噴嘴（圖一），可看出二套管設計圖，其噴嘴系統，由內而外分別為藥物溶液及超臨界流體
b. 而第二個噴嘴則是在烘箱外部連接收集槽之單管型噴嘴，最後在收集槽連接一外管經由輸出流速表將超臨界流體洩壓排出



3-2 藥品及溶劑

Ethyl Acetate,99.9%(Tedia), n-Hexane99%(Tedia) , Poly (dl-lactide/glycolide)(50:50 i.v., 75:25 i.v,

85:15 i.v) Polysciences Inc.

3-3 實驗架構

步驟一:

- 變因部分：
- 藥物濃度(w%) →0.5%(PLA/GA)/乙酸乙酯 及 1.0%(PLA/GA)/乙酸乙酯
- 烘箱內溫度(T) → 30℃、40℃及 50℃
- 氣體輸出流速(CO_2) → 23、45、59 及 66
- 壓力 bar (P) → 72bar、85bar、100bar 及 130bar
- 樣品輸送流速 → 0.250、0.350、0.450 及 0.650 ml/min
- 過程時間(Time) → 5 分、7 分、10 分、30 分
- 加入反溶劑 → Hexane、Hexane+span80(1%)、Hexane +span 20(1%)
- 收集法→ 密閉式收集法與開放式收集法

步驟二：尋求變因的最佳水準

每次實驗只改變要尋求最佳水準之變因，其餘之變因皆固定在一特定水準之下，一但找尋到了最佳水準之後，此變因即以此水準固定之，再往下尋求其他變因的最佳水準。

步驟三：最佳實驗的參數組合

由步驟二進行到最後，可得到每一變因之最佳水準，因此將其組合在一起便可得到最佳化實驗的條件，以此條件下進行其他變探討以期獲得最佳之粒徑範圍。

3-4 實驗步驟

3-4-1 實驗第一部分 (變因對於微粒子所造成之影響)

變因部分：

- 藥物濃度 →0.5%(PLA/GA)/乙酸乙酯 及 1.0%(PLA/GA)/乙酸乙酯
- 烘箱內溫度 → 30℃、40℃及 50℃
- 氣體輸出流速 → 23、45、59 及 66 L /min
- 壓力→ 72bar、85bar、100bar 及 130bar
- 樣品輸送流速→ 0.250、0.350、0.450 及 0.650 ml/min
- 過程時間→ 5 分、7 分、10 分、30 分
- 收集法→ 密閉式收集法與開放式收集法

根據粒徑平均分佈趨勢圖，討論變因對於微粒子所造成之影響

3-4-2 實驗第二部分 (不同分子量之藥品，討論其不同差異之)

在實驗第二部分運用實驗第一部分所測得較佳粒徑之變因，進行再現性之測試，同時配合不同分子量之藥品，討論其不同差異之處。

新變因部分：

- 烘箱內溫度 → 30℃、40℃及 50℃
- 氣體輸出流速 → 45、59 及 66 L /min
- 壓力→ 72bar、85bar、100bar 及 130bar
- 樣品輸送流速 → 0.250、0.350、0.450 及 0.650 ml/min

畫出粒徑平均分布趨勢圖，討論在相同藥品在不同分子量有何不同。

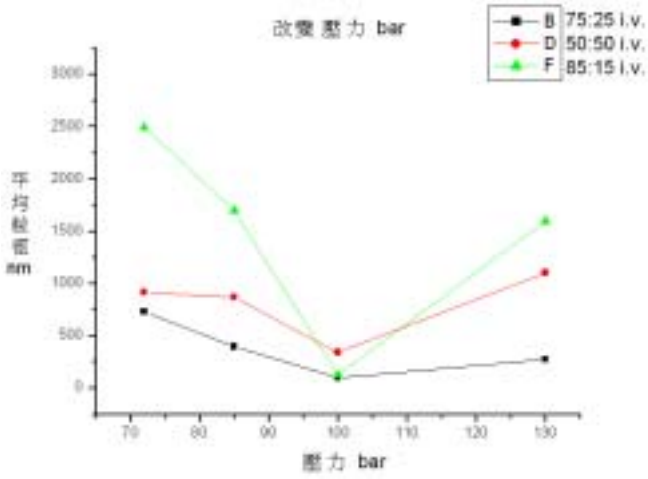
3-4-3 實驗第三部分

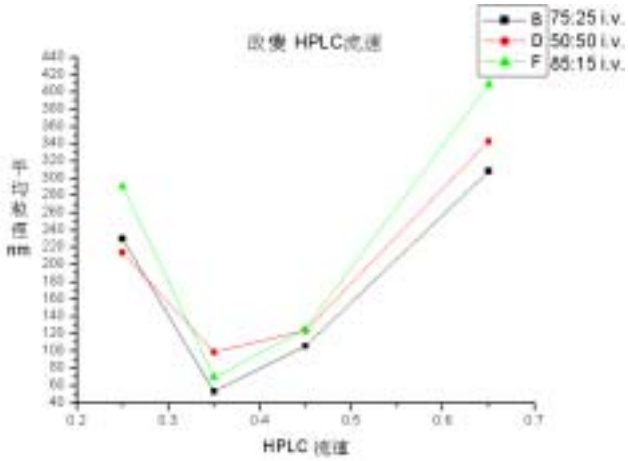
最佳條件下平均粒徑再現性的探討並利用穿透式顯微鏡 TEM 了解奈米顆粒之型態。

- (最佳條件)變因部分：
- 改變 OVEN 溫度→ 30℃
- 改變 壓力 → 100 bar
- 改變 氣體輸出流速 → 59 L /min
- 改變 樣品輸送流速 → 0.350 ml/min

三、結果與討論

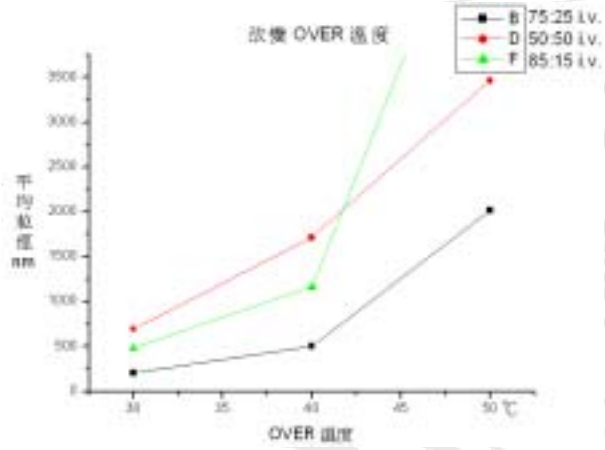
A. 改變烘箱溫度對粒徑大小之影響





時間，及較多的晶種，故會得到尺寸較小的粒子。

C.改變樣品輸送流速對粒徑大小之影響



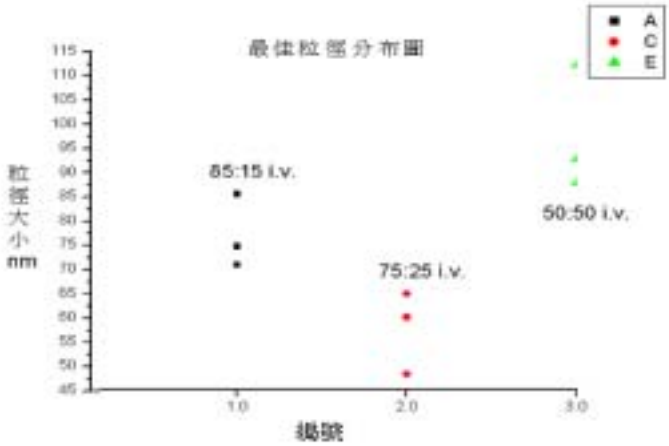
由改變烘箱內溫度 對粒徑大小之影響最大,當烘箱內溫度設為 30℃時，所得到的粒徑最小.當烘箱內溫度偏高，可看出所得到之微粒粒徑偏向於較大.主要乃因溫度變化對超臨界流體之密度影響甚鉅.

B.改變壓力對粒徑大小之影響

由改變壓力可知，粒子尺寸隨著壓力槽的升高而變大，這是因為大於此壓力的條件下，二氧化碳混合溶液達到真正的超臨界態並具有相當強的溶劑競爭力，一旦溶劑容易被競爭掉時，整個壓力槽內的狀態會達到高的過飽和比，而使壓力槽內物質具較短的成核

由改變樣品輸送流速對粒徑大小之影響可看出，較低的溶液流速會得到較小的粒子。這是因為在製程中，藥物溶液藉由超臨界流體的噴灑而形成液滴，當液滴中的溶劑被超臨界流體競爭掉後，藥物會因此析出固化而型成粒子，在此過程中，若藥物溶液流速越慢，被噴灑後所形成之液滴會越小，故形成的粒子尺寸也較小。

D.最佳粒徑再現性的探討



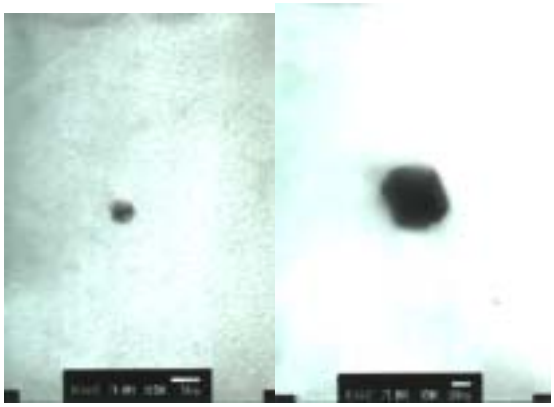
PLA/GA	平均粒徑 nm	CV
50:50 i.v.	101± 18.0 nm	17.9%
75:25 i.v	57 ± 8.5 nm	14.8%
85:15 i.v.	77 ± 7.6 nm	9.9%

E.奈米顆粒之型態(TEM)

此部分之最佳條件下測得最佳粒奈米微粒之 TEM 照片

PLA/GA 75/25　　PLA/GA 50/50

48 nm　　121 nm



四、結論

本研究以烘箱溫度為 30℃,壓力為 100 bar,氣體輸出流速為 59 L /min,樣品輸送流速為 0.350ml/min 之下,以 PLA/GA 75:25iv 之顆粒粒徑最小,約 57.6 ± 8.5424 nm,呈圓形.

五、參考文獻

1. Nicola Elvassore, Alberto Bertucco, Pao. Caliti, Production of insulin-loaded poly(ethylene glycol)/poly(l-lactide)(PEG/PLA) nanoparticles by gas antisolvent techniques, J. of pharma. Sciences, 90(10), 1628-1636, 2001

2 .J. C. Leroux, E. Allemann, E. Doelker, R. Gurnay, New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method, Eur. J. pharm. Biopharm.,41,14-18,1995

3.J. Jung, M. Perrut, particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey, J. supercritical Fluid, 20, 179-219, 2001.

4. Forter-Barth,U. Teipel, H. Krause, Proceedig of the 6 th Meeting on supercritical Fluid

5. S. D. Yeo,J.H. Choi, T.J. Lee, J. supercrit. Fluid,16, 235, 2000

6. P. Pallado, L.Benedetti, L. Callegaro, Patent WO 96/29998,1996

7. J.Tom, P. Debenedetti, Particle formation with supercritical fluids—a review, J. Aerosol Sci., 22(5), 555-584,1991

8. S. Mawson, S. Kanakia, K. Johnston, Coaxial nozzle for controlled of particle morphology in precipitation with a compressed fluid antisolvent, J. Appl. Polym. Sci. 64(11), 2105-2118, 1997

9. L. Sze Tu, F. Dehghani, N.R. Foster, Micronisation and microencapsulation of pharmaceuticals using a carbon dioxide antisolvent, Powder technology 126, 134-149, 2002

10. M. Hanna, P. York, 1994, UK patent Appl. PCT/GB94/01462

11. J. Jung, M. Perrut, particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey, J. supercritical Fluid, 20, 179-219, 2001.

12.Nicola Elvassore, Macro Ba.,Production of different morphologies of biocompatible polymeric materials by supercritical CO2 antisolvent techniques, Bio.,&bioeng., 73(6),449-457, 2001

13. Timothy J. Young,etc.,Encapsulation of lysozyme in a biodegradable polymer by precipition with a vapor-over-liquid antisolvent, J. of Pharm. sciences, 88(6),640-650,1999