

## 研究計畫之背景及目的

自從 1950s, 新的藥物傳遞系統之研究快速地增加<sup>(1~4)</sup>, 一方面由於生物技術在醫藥應用快速的發展, 生肽 (peptides)和蛋白質(proteins) 藥物在胃腸道會被分解或吸收率差; 另一類如神經系統疾病(neurological disorder)之治療藥物, 在臨床上主要障礙在於無法有效率地將藥物輸送至腦細胞之特地區域, 因大部分藥物無法穿透 blood-brain barrier, 或神經末梢代謝了主要作用藥物及不規則的藥物吸收<sup>(1)</sup>, 因此大量的研究報告紛紛探討利用各種可分解性高分子當作此類藥物攜帶之基質(carrier matrices), 將此類藥物設計成長期控制釋放劑型, 以克服上述之缺點, 也可減輕病患長期打針之痛苦(如糖尿病患者長期以注射 insulin 治療)。

無論是何種高分子攜帶基質或是藥物劑型設計最大的困難在於發展均一顆粒大小及準確控制藥物釋放速率, 因為影響藥物釋放主要因素之一即是顆粒大小 (microparticle size)<sup>(2~14)</sup>, 因此無論在劑型設計與藥物動力學研究之初, 或藥廠未來生產品管管制流程上, 篩除過大或過小之顆粒是必須的, 常用之顆粒分離(particle separation), 如篩濾(sieving)方法, 或常用應用於高分子分離之 GPC, 常發生堵塞, 此對昂貴且微量之藥品將造成莫大的損失。

分流薄層分離技術(SPLITT Fractionation)近年來已發展成為分析、純化分離之有用技術<sup>(15~20)</sup>, SF 可依分離樣品性質, 選擇不同的分離場(driving forces), 如電場、重力場、磁場等, 分流薄層分離技術除了分析(Analytical SF)之應用外, 主要用於準備(純化分離, preparative SF)用<sup>(21~23)</sup>, 其中以重力場(gravitational SF)最為簡單、最方便。重力場分流薄層分離技術最佳應用之一, 即是高密度(density > 1.5 g/ml)微米顆粒物質之分離, 如 latex beads<sup>(21, 23)</sup>。本研究室使用自行製備之重力場分流薄層, 初步試驗已成功地應用於各種拋光劑顆粒分離(narrowing size distribution), 本計畫的目的在發展重力場分流薄層分離技術應用於控制釋放藥物傳遞顆粒之分離, 以提供一簡單、快速之方法, 去除劑型製備時所產生之過大或過小之顆粒, 方便進一步探討新劑型之藥物動力學。

## 研究方法、進行步驟及執行進度

### 1. 本計畫採用之研究方法與原理

分流薄層分離技術(SPLITT Fractionation, 簡稱 SF)，相對於色層分析是一群新的分離技術，近年來已發展成為純化分離、分析之有用技術，分流薄層分離技術可依分離樣品之性質，選擇不同的分離場(driving forces)，如電場、重力場、磁場等來達成分離及分析之目的，分流薄層分離技術雖然有一些分析(Analytical SPLITT Fractionation)上之應用，但主要是用於準備性之純化分離 (Preparative SPLITT Fractionation)用，且主要應用於大分子 (macromolecules)、膠體 (colloids)，和顆粒 (microparticles)。(15-20) 與傳統的液相層析主要應用於小分子相較，他們是互補的而非互相競爭。

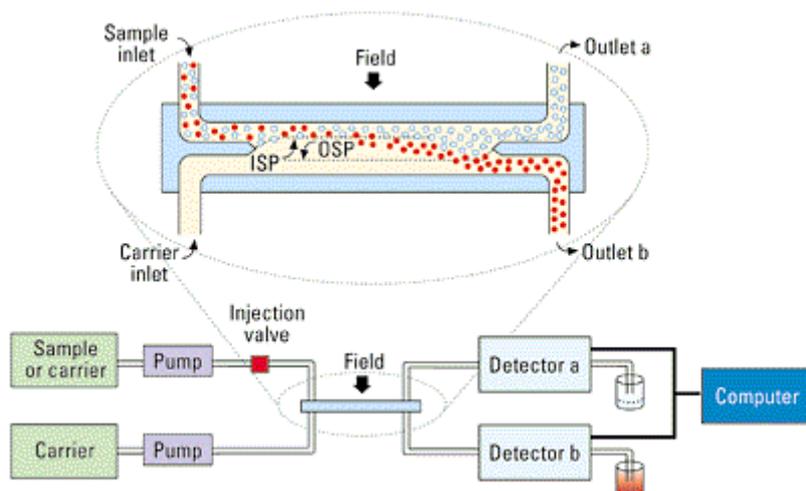


圖 1 SPLITT 系統概要圖。白色圈子代表低輸送率樣品; 紅色圈子代表高輸送率樣品。

分流薄層分離槽(SPLITT channel)主要是呈扁帶狀(ribbonlike)，由沒有填充物的薄層(通常< 0.5 毫米)所組成，所以有時被稱為單相的層析技術(one phase chromatography)，SF 在出口或在入口和出口處都裝置分流板(splitter)，一個以上之出口分流板在理論上雖然可行，但技術上不容易且不實際。分流薄層分離槽典型的尺寸是 4-12 cm 寬，20-1000 cm 長，200 毫米至數毫米厚。因為切除直徑( $d_c$ )的生產

量和大小可能與渠道尺寸有關，剪裁分流薄層分離槽尺寸經常在分離最佳化時的一種具體應用。分流薄層分離槽的特點是有二個入口和二個出口。典型的分流薄層分離槽有一個入口和一個出口分流板如圖一所示。其功能敘述於下：

通常樣品尤其中醫入口被注入分流薄層分離槽。而載體(carrier)從另一入口以較大流速進入，使樣品在開始分離前侷限在一小區域，以達到較高解析的分離。當二條水流相遇，樣品進樣水流被壓縮成薄層流體(thin laminate)。入口分流板允許二入口流體平和順利合併，出口分流板允許被分離的樣品的平和順利的收集在不同的出口，不再被混合。在橫跨分離槽流體的垂直方向上外加一個適當的場(driving force)或梯度，使樣品中各成分選擇性地在流軸垂直方向(側向位置)做不同程度的移動而達到分離的目的(圖 1)。為瞭解分流薄層分離之機制，我們在二入口流體之間定義一虛擬的平面，稱入口分流平面(Inlet Splitting Plane, ISP)，二入口流體的流速比率定義入口分流的平面的位置；在二出口流體之間定義的虛擬平面，則稱之出口分流平面(Outlet Splitting Plane, OSP)，二出口流體的流速比率定義出口分流的平面的位置。此分流平面將有助於此系統操作機制的了解。

轉折區域(Transition zone)為介於兩個分流平面間的區域，其大小由兩個分流平面之相對位置而定，在樣品進樣水流被壓縮成薄層流體之後，樣品也許可以(或不可以)通過轉折區域。入口及出口的流速以及外加場的大小可被適當的調整以便讓某些樣品可選擇性地橫渡轉折區域，如比特定質量或直徑大的樣品等。那些外加場所產生遷移速率大的樣品能橫渡出口分流平面將從底下出口流出。那些外加場所產生遷移速率較小的樣品移動到出口分流板時仍未能橫渡出口分流平面，則將保留在出口分流平面上，從上面出口流出，且樣品可以連續進樣做準備應用之連續性分離。

SF 使用之外加場包括重力場、離心力、電場、和磁場。根據樣品不同的物理性質來選擇不同的外加場來達到分離的作用，如帶電荷樣品可選用電場來做外加場，密度大且靜大的樣品可選用重力場，密度小及粒徑小的樣品可選用離心場，磁化率不同的可選用磁場來做外加場。

## SF 操作模式

除了變化分流薄層分離技術之外加場外，SPLITT 主要可以有輸送模式(transport mode)、平衡模式(equilibrium mode)的操作方式。擴散的操作模式(diffusion mode)雖然有被提出但應用上大部分在分析上之應用，而準備性之應用相對較少。在輸送之操作模式下(如圖 1)，分離槽需要有入口分流板及出口分流板，樣品在液態載體(carrier)裡被注入一入口水流，而另一入口載體以高於含樣品之入口流速數倍之流速注入。這個做法讓最初的樣品限制在一個小區域，提供更好的解析度(resolution)(圖 1)。樣品在被外加場驅動，但以不同的場驅動速率(field-induced velocity)朝同樣方向移動。樣品以較高的場驅動速率被移動(如在圖 2a 紅點)，可以通過 OSP 朝外部牆壁前進。樣品以較低場驅動速率則移動較少距離而沒通過 OSP (白色圈子)。當樣品通過分離槽，將有差別地分佈在不同薄層(laminate)並且到達出口分流板時由出口分流板分至不同的出口而分別被收集。樣品如到達出口分流板前以足夠快速地場驅動率橫渡 OSP 的話，會在一個出口，那些場驅動速率較慢的樣品則在到達出口分流板前未能跨越 OSP 而從另一出口出來。決定樣品是否通過 OSP 的主要因素為外加場的大小、入出口流速大小、ISP 及 OSP 之位置，所以主要以外加場之大小及流速來決定分離之作用。

切除直徑( $d_c$ ) 是 SF 應用參考一個特定的直徑( $d_c = \{18\eta \nabla(t) / b L G (\rho_p - \rho)\}^{1/2}$  equation 1)。原則上，所有顆粒粒徑比  $d_c$  小的從一個出口流出口，粒徑較大的顆粒

從另一個出口流出。當然也可以設定不同之回值如  $F_b = 0.5$ ，利用方程式 2 來計算切除直徑。若樣品物理參數和外加的場是已知的，分離的結果根據簡單的理論是可預測的。此簡單理論為完成成功的分離和分離實驗提供好的指南與好的開始實驗值。一般而言，若分離的結果不理想則可依簡單的理論稍微調整實驗參數而達到成功分離。

在 SF 選擇性主要決定於從各種不同的外加場和應用在入口和出口可控制的流速。外加場的選擇取決於被分離樣品物理性質。有時可以結合二個外加場為某些應用可以達到更好的分離。實驗結果出口之回收率  $F_b$  可以相似的模式使用聯合的場導致的流速( $bLU_m - bLU_g$ ) 來計算預估。

重力場(gravitational SF) 為最簡單、經濟、容易使用的外加場，但只能有效的應用於大並且/或者高密度顆粒。當樣品具有不同大小、電荷、電泳移動速率、或磁化率，使用離心場、電場、或磁場可提供比重力場更好的分離及更大的解析度。

#### 回收率演算 (Retrieval calculation)

在出口 b 的樣品百分比，定義為回收率  $F_b$ ，理論回收率  $F_b$  在輸送模式下可以利用下列方程式計算。

$$F_b = \frac{\dot{V}(b)A(b)}{\dot{V}(b)A(b) + \dot{V}(a)A(a)} \quad (2)$$

$A(a)$  和  $A(b)$  是在出口 a 和 b 分別之偵測面積(peak areas)，在多數應用只有一出口分流板，所以在出口 a 之回收率( $F_a$ ) 與 出口 b 之回收率( $F_b$ )相加應等於 1。

在這篇文章裡，我們假設顆粒進入入口後，任意地被分佈在最初的樣品區域並且有固定的場產生的驅動速度( $U$ ) (field-induced velocity)。因而  $F_b$  取決於，場導致的入口 a' 流速 $\dot{V}(a')$  和出口 a 流速 $\dot{V}(a)$ 的相對大小。場產生的驅動速度即為  $bLU$ ， $b$  是分離槽的寬度， $L$  是分離槽的長度。然後  $F_b$  可以根據指定的入口和出口流速等條件

計算。當  $bLU > \dot{V}(a)$  (高場產生的驅動流速)，所有樣品成分都可以通過 OSP 而從出口 b 流出，則  $F_b = 1$ 。當  $bLU < \dot{V}(a) - \dot{V}(a')$  (低場驅動流速)，所有樣品成分無法通過 OSP 而從出口 a 流出，則  $F_b = 0$  (即  $F_a = 1$ )。當場驅動流速 ( $bLU$ ) 介於以上高低場驅動流速之間，即  $\dot{V}(a) - \dot{V}(a') < bLU < \dot{V}(a)$ ，則只有部分數量樣品成分通過 OSP 而從出口 b 流出。在這種情況下，則回收率之計算方程式是

$$F_b = \frac{bLU - \dot{V}(a) + \dot{V}(a')}{\dot{V}(a')} \quad (3)$$

理論回收率演算適用於分析和分離純化應用。擴散在微米顆粒和次微米顆粒 (submicrometer) 的分離影響是微不足道的，但在奈米顆粒 (nano-size) 的應用時變得重要。<sup>(3, 11)</sup> 在後者，擴散將導致在理論回收率和實驗測量所得回收率的之間差異增加。

流體力學的推舉力 (hydrodynamic lift force) 是將靠近固定式牆壁<sup>(4)</sup> 的元素驅離開的不均勻力量，此力量只有在分離較大微米顆粒，且這些顆粒是緊挨著分離管壁及在高流速情況下 (一般  $> 10 \text{ mL/min}$ ) 才重要。當微米顆粒是在分離管壁附近流體力學的推動力是最大的，當微米顆粒離開在分離槽管壁，流體力學的推動力成指數地下降。這建議，利用 SF 作較大微米顆粒的分離無法由簡單地增加入口流體比率達到高解析度。因此有用的分離需要流體力學的推舉力結合其它力量沿著流體軸 (flow axis) 形成被集中的薄層 (hyperlayers)。

### Experimental

The channel length and breadth of the channel used in this study were 20 cm and 4 cm, respectively. For removing the oversized particles, the channel thickness consisted of top spacer (0.0127 cm), splitter (0.0127 cm), and bottom spacer (0.0127 cm) with a total thickness of 0.0381 cm. The calculated void volume of this channel was 3.05 mL.

Operation was carried out at the ambient laboratory temperature of  $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . The carrier solutions used for CSF experiment were 0.05%  $\text{CaCl}_2$  (Aldrich, Milwaukee, WI,

USA) in the deionized water with a density of 0.99462 g/mL. The drug microsphere placebo was obtained from ITRI. A Teflon rotary valve 5025 with loop volume of 3.5 mL from Rheodyne (Cotati, CA, USA) was used for sample injection in optimization experiment. A LC pump (SSI series II, State College, PA, USA) and two micro-tubing pumps (Eyela, MP-3, Rikakikai, Tokyo, Japan) was used for the continuous sample introduction of abrasive particles in the CSF experiment. Mylar strips were placed symmetrically on the splitter in all of this study.

Image-Pro Plus software (Silver Spring, MD, USA) was used to evaluate the size distribution of abrasive particles before and after SF operation.

Microsphere preparation: 由工研院生醫中心藥物傳輸室主任王藹君博士及簡啟恆博士執行，實驗操作屬配方秘密，不宜在此詳述。

## 結果與討論

本實驗所使用之樣品為工研院生醫中心藥物傳輸室主任王藹君博士所提供，配方編號 ILH029-placebo, total polymer concentration 4.0%，經 lyophilization，利用 Beckman Coulter Multisizer 3 測量，粒徑分布 5.6~280  $\mu\text{m}$ ，於 0.05%  $\text{CaCl}_2$  測量其密度約為 2.2 g/ml，依 equation 1 之理論計算，設定 transport model 之操作條件：a' 入口流速 0.1ml/min, b' 入口流速 10.0 ml/min, a 出口流速 10.0 ml/min，b 出口流速 0.1ml/min，可達移除粒徑直徑 17  $\mu\text{m}$ ，但 micro-tubing pumps 要每次都精準調整至 0.1 ml/min 是非常費時的。



Figure 1 upstream fractionation

(100X)

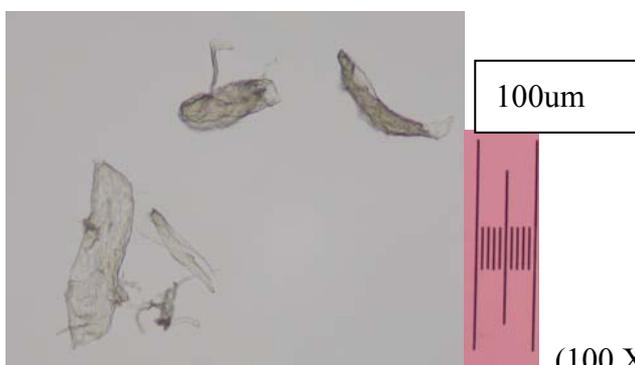
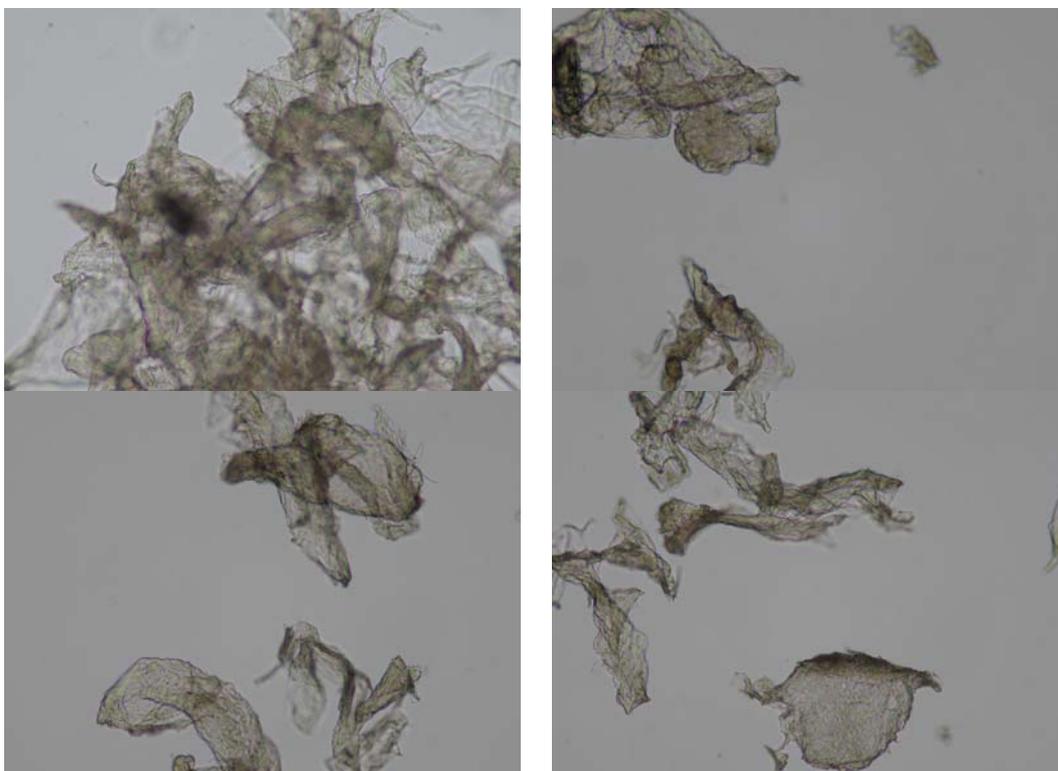


Figure 2 downstream fractionation

(100 X)



由於此 microsphere 呈半透明狀態, Image-Pro Plus software 無法辨識顆粒, 但由顯微鏡照相可觀察到, 此實驗條件可移除過小之顆粒.

### 計畫成果自評

本計畫研究成果內容與原計畫目標略有不滿意之處, 由於所申請相關重要儀器設備於計劃核定時均沒通過, 以現有簡陋之設備(蠕動 pump)無法控制微量流速, 及高流速時所產生之 backpressure, 雖經變更買一台低壓 pump, 實驗結果仍不盡理想:

#### 1. 完成之工作項目:

發展重力場分流薄層分離技術應用於控制釋放藥物傳遞顆粒之分離, 由於標的傳輸劑型(target release), 目前主要以 liposomes 為主, 而其顆粒分布在奈米(nm)範圍, 依照理論計算傳統之重力場分流薄層將無法達成分離之作用, 本實驗本欲嘗試微流體系統, 但所申請之儀器設備均沒核准。本實驗亦試過 chitosan, 實驗過程雖試過幾種極端條件, 一來顆粒太小、二來顆粒密度也低, 因此無法利用重力場達到分離, 最後只成功地完成高分子攜帶之控制釋放藥物顆粒篩選條件。

#### 2. 對於學術研究、國家發展及其他應用方面預期之貢獻:

發展自製分流薄層分離槽並以簡單的材料完成, 可節省外購的經費, 提供顆粒物質分離另一可行之技術及其他應用之參考。亦增加此新分離技術另一應用之可行性評估。提供一簡單、快速且便宜之方法, 以去除劑型製備時所產生之過大或過小之顆粒, 方便進一步探討新劑型之藥物動力學, 並可節省購置 GPC column 之費用 (一般從事藥物動力學研究之研究室大都具備 HPLC pump)。

#### 3. 對於參與之工作人員, 預期可獲之訓練:

參與之工作人員從自行裝配分離槽的過程中, 學得薄層分離槽的製造技巧, 由實驗操作瞭解重力場應用於分離技術之原理及分析方法確效(Analytical Method Validation)之作法, 並由實驗結果之處理學習統計分析。操作中瞭解劑型配方設計原理及重力場應用於分離技術之原理及分析方法確效(analytical method validation)之做法, 並由實驗結果之處理學習統計分析。

### 參考文獻:

1. Fuh, C. B. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 266A
2. G.M. Stern Ed. "Parkinson's disease" 1990, p571.
3. T. J. Roseman and S.Z. Mansdorf Ed., "Controlled release delivery system", Marcel Dekker Inc., N.Y. and Basel, 1983, p209~222.

4. R. L. Reford, "Liposomes in drug delivery and Diagnostics", Scrip reports, 1995.
5. Chien Y.W. ed. "Novel drug delivery systems: fundamentals, delvelopmental concepts and biomedical assessments", New York, Marcel Dekker, 1982.
6. M.Victoria Velasco, James L. Ford, Philip Rowe, Ali R. Rajabi-Siahboomi, J. Controlled Release, 1999, 57, 75~85.
7. C.X. Song, V. Labhasetwar, H. Murphy, X. Qu, W.R. Humphrey, R. J. Shebuski, R.J. Levy, J. Controlled Release, 1997, 43, 197~212.
8. G. Golomb, I. Shaked, A. Hoffman, Advanced Drug DeliveryReviews, 1995, 17, 179~190.
9. M. Dunne, O.I. Corrigan, Z. Ramtoola, Biomaterials, 2000, 21, 1659~1668.
10. Cory Berkland, et. al., J. controlled release, 2002, 82, 137~147.
11. O. Franssen, R. J.H. Stenekes, W.E. Hennink, J. controlled release, 1999, 59, 219~228.
12. J. Filipović-Grčić et. al., Int. J. Pharmaceutics, 1996, 135, 183~190.
13. T.M.S. Chang, R. Langer, R.E. Sparks, and G. Reach, Artificial Organs, 1998, 12(3), 248~251.
14. Micheal L. Kleinberg and Lee A. Wanke, Am. J. Health-Syst. Pharm. 1995, 52, 1323~1335.
15. Dieter Swatschek, et. al., European J. Pharm. And Bipharm., 2002, 54, 125~133.
16. Fuh, C. Bor, Anal. Chem., 2000, 72, 226A~271A.
17. Giddings, J.C., Sep. Sci. Technology, 1985, 20, 749~768.
18. Giddings, J.C., Sep. Sci. Technology, 1988, 23, 931~943.
19. Giddings, J.C., Sep. Sci. Technology, 1992, 27, 1489~1504.
20. Fuh, C. Bor, Mayer, M.N., and Giddings, J.C., Anal. Chem., 1992, 64, 3125~3132.
21. Fuh, C. Bor, Levin, S., and Giddings, J.C., Anal. Biochem., 1993, 208, 80~87.
22. Gao, Y., Mayer, M.N., Barman, B.N., and Giddings, J.C., Particulate Sci. Technol., 1991, 9, 105~118.
23. Fuh, C. Bor, Mayer, M.N., and Giddings, J.C., Ind. Eng. Chem. Res. 1994, 33, 355~362.
24. Springston, S.R., Myers, M.N., and Giddings, J.C., Anal. Chem. 1987, 59, 344~350.
25. Emil Chmela and Robert Tijssen, Anal. Chem. 2002, 74, 3470~3475.