

一种新型热敏聚乳酸微球的制备与表征*

彭坤^{1,2}, 王远亮¹, 甘晓玲², 王易振², 阮长顺¹, 张静文², 王抒², 孙双凌², 陈俊意²

Preparation and characterization of a new-type thermal-sensitive polylactic acid microsphere

Peng Kun^{1,2}, Wang Yuan-liang¹, Gan Xiao-ling², Wang Yi-zhen², Ruan Chang-shun¹, Zhang Jing-wen², Wang Shu², Sun Shuang-ling², Chen Jun-yi²

Abstract

BACKGROUND: At present, the research of controlled drug release has been focused on intelligent microspheres based on polylactic acid.

OBJECTIVE: To prepare a temperature-controllable and biodegradable microsphere carrier.

METHODS: First, 2-hydroxyethyl methacrylate was used as evocating agent for ring-opening polymerization of lactide, and stannous octoate used as catalyst. Through regulating the proportion of lactide and ethyl methacrylate, a double-bound polylactic acid ethyl methacrylate (PDLLA-EMA) of different molecular masses was obtained. After that, methylbenzene was used as solvent, and the copolymerizations of PDLLA-EMA with double bound and poly N-isopropylacrylamide (PNIPAm) were initiated by free radical reaction with a solution synthesis method, and then the biodegradable and temperature-sensitive PNIPA-g-PDLLA-EMA was prepared successfully. At last, the thermal-sensitive polylactic acid microspheres were prepared by a double emulsion method.

RESULTS AND CONCLUSION: The thermal sensitive temperature of PNIPA-g-PDLLA-EMA prepared was in a range of 35–42 °C. The range of microsphere particle size was (13.70±0.70) to (28.90±0.50) μm, and the change rate of particle size was (138.7±4.20)% to (170.0±10.00)%. Compared with other same type materials, this kind of microsphere has potentialities in biomedicine.

Peng K, Wang YL, Gan XL, Wang YZ, Ruan CS, Zhang JW, Wang S, Sun SL, Chen JY. Preparation and characterization of a new-type thermal-sensitive polylactic acid microsphere. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(16): 2913-2916. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前, 基于聚乳酸的智能型微球是药物可控释放研究领域的热点。

目的: 制备一种温度响应可控、生物可降解的微球载体。

方法: 以甲基丙烯酸-2-羟乙酯作为丙交酯开环的引发剂, 采用辛酸亚锡作为催化剂, 并调节乳酸与甲基丙烯酸乙酯的比例, 得到了不同分子质量的带双键聚乳酸(PDLLA-EMA)。以甲苯为溶剂, 采用溶液合成法, 自由基反应引发含有双键的聚乳酸以及 N-, N-异丙基丙烯酸酰胺共聚, 成功制得了可降解温敏型共聚物(PNIPA-g-PDLLA-EMA)。采用复乳法, 将 PNIPA-g-PDLLA-EMA 制成了微球。

结果与结论: 实验制得 PNIPA-g-PDLLA-EMA 材料的热响应温度范围为 35~42 °C, 基于该材料制得的微球粒径范围为 (13.70±0.70)~(28.90±0.50) μm, 粒径变化率为(138.7±4.20)%~(170.0±10.00)%, 与同类材料相比, 该微球已具备了应用于生物医学的潜在条件。

关键词: 智能型微球; 可生物降解; 聚乳酸; 制备; 载体

缩略语注释: PNIPAm: Poly N-isopropylacrylamide, 聚(N-异丙基丙烯酸酰胺)

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.16.015

彭坤, 王远亮, 甘晓玲, 王易振, 阮长顺, 张静文, 王抒, 孙双凌, 陈俊意. 一种新型热敏聚乳酸微球的制备与表征[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(16):2913-2916. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Research Centre of Biomaterial and Bionic Engineering, Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400030, China; ²Department of Medical Technology, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China

Peng Kun★, Master, Lecturer, Research Centre of Biomaterial and Bionic Engineering, Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400030, China; Department of Medical Technology, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China pk3001@163.com

Corresponding author: Wang Yuan-liang, Professor, Department of Research Centre of Biomaterial and Bionic Engineering, Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400030, China wyl@cqu.edu.cn

Received: 2011-10-15
Accepted: 2012-03-09

0 引言

微球作为一种新的药物载体, 在药物的控制释放领域得到了广泛的研究和应用。微球载体能够克服现有药物制剂的一些弊端, 利用自身的微小粒径和药物的高度分散, 改善难溶性药物的水溶性和溶出速率, 提高药物的生物利用率。

微球载体常用的生物降解聚合物有聚乳酸、聚羟基乙酸、聚己内酯、共聚乙丙交酯和聚氰基丙烯酸酯以及壳聚糖、明胶、藻酸钠等

天然聚合物^[1-6]。改变聚合物类型、浓度, 体系的黏度、表面张力等性质随之发生变化, 致使制备的微球具有不同的大小和形态。而不同聚合物制备的微球具有不同的降解方式, 其降解速率也不相同。对于微球载体的制备来说, 基于乳酸和羟基乙酸的脂肪族聚酯是目前研究最多的可生物降解材料之一^[7-12]。

聚(N-异丙基丙烯酸酰胺)(Poly N-isopropylacrylamide, PNIPAm)对温度的敏感响应性非常高, 并且其最低临界溶解温度在 32 °C 左右, 与人体体温相近, 在研究温敏材料方面得到了广泛应用^[13-22]。实验拟将 PNIPAm

¹ 重庆大学生物工程学院生物材料与仿生工程中心, 重庆市 400030; ² 重庆医药高等专科学校医学技术系, 重庆市 401331

彭坤★, 男, 1982年生, 重庆市人, 汉族, 2008年重庆大学毕业, 硕士, 讲师, 主要从事生物材料与组织工程的研究。
pk3001@163.com

通讯作者: 王远亮, 教授, 重庆大学生物工程学院生物材料与仿生工程中心, 重庆市 400030
wyl@cqu.edu.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)16-02913-04

收稿日期: 2011-10-15
修回日期: 2012-03-09
(20110515007/WL·T)

引入到聚乳酸分子链中, 采用复乳法以期得到一种温度响应可控、生物可降解的微球载体^[23-24]。

1 材料和方法

设计: 观察性实验。

时间及地点: 实验于2009-06/2011-03在重庆大学生物工程学院生物材料与仿生工程中心完成。

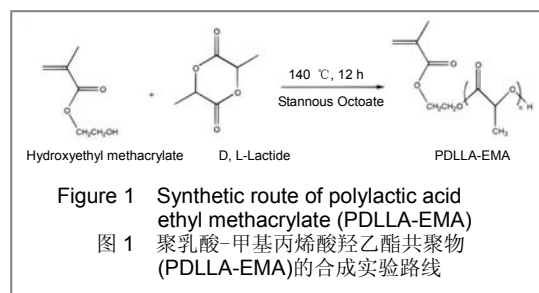
材料:

主要材料、试剂及仪器:

材料及仪器	来源
粗丙交酯	自制
甲基丙烯酸-2-羟乙酯、 N-异丙基丙烯酰胺、 辛酸亚锡	Sigma 公司, 美国
过氧化二苯甲酰	山东恒通化工
Spectrum GX 型红外及显微镜 系统、Pris Diamond TG/DTA 型热重/差热综合热分析仪	Perkin Elmer 公司, 美国
AV-300型超导核磁共振波谱仪	Bruker 公司, 瑞士
Zetasizer μV 纳米粒径仪	Malvern 公司, 英国

实验方法:

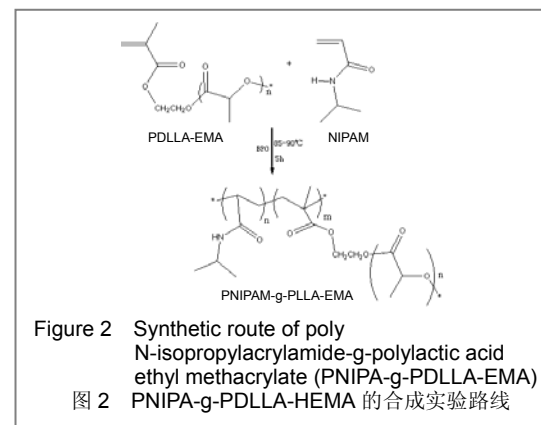
聚乳酸-甲基丙烯酸羟乙酯共聚物(PDLLA-EMA)的制备、纯化及表征: 制备: 将经乙酸乙酯重结晶的丙交酯置于圆底烧瓶中, 加入甲基丙烯酸-2-羟乙酯(丙交酯与甲基丙烯酸-2-羟乙酯的摩尔比为20:1)和辛酸亚锡后充分混合, 抽真空除去瓶内的空气, 密封; 再将该圆底烧瓶放入140℃的恒温油浴锅中反应20 h。PDLLA-HEMA的合成实验路线见图1。



纯化: 待反应结束后, 将反应产物移出反应瓶, 冷却; 二氯甲烷溶解, 并用二氯甲烷/乙醇共沉淀体系提取产物, 于30℃真空干燥箱中干燥产物。接着再用正己烷提纯产物, 重复2次。干燥, 备用。表征红外吸收光谱分析: 将上述产物溶解于二氯甲烷后, 在透明的KBr板上溶液浇铸成膜, 待溶剂完全挥发后用Spectrum GX型红外及显微镜系统记录样品在

400~4 000 cm⁻¹的红外吸收光谱。核磁共振谱分析: 以氘代氯仿CDCl₃(Fluka Chemical, 重氢含量不低于99.8%)为溶剂, 四甲基硅烷(TMS)为内标, 用AV-300型超导核磁共振波谱仪检测样品的¹H NMR图谱, 工作频率为300 MHz。化学滴定计算相对分子质量: 利用过量的乙酸酐和PDLLA-EMA末端的羟基在催化剂对苯磺酸和溶剂乙酸丁酯的作用下发生乙酰化反应的原理, 用滴定法检测出被PDLLA-EMA消耗的乙酸酐, 从而计算出PDLLA-EMA的相对分子质量。

PNIPA-g-PDLLA-EMA的制备、纯化及表征: 将彻底干燥的PDLLA-EMA、N-异丙基丙烯酰胺、过氧化二苯甲酰于室温下充分溶解在无水甲苯后, 通入氮气, 冷凝回流, 于恒温磁力搅拌器上, 控制温度在85~90℃反应5 h。PNIPA-g-PDLLA-EMA的合成实验路线见图2。



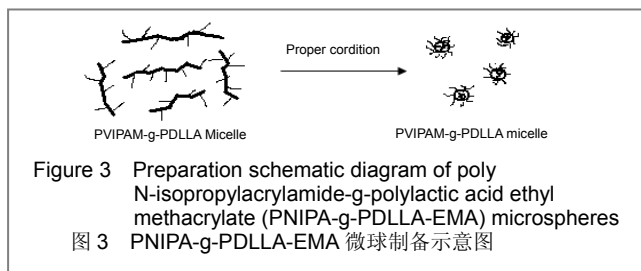
纯化: 待反应结束后, 将反应产物移出反应瓶, 冷却; 二氯甲烷溶解, 并用二氯甲烷/乙醇共沉淀体系提取产物, 于30℃真空干燥箱中干燥产物。接着再用正己烷提纯产物, 重复2次。干燥, 备用。表征: 红外吸收光谱分析: 同上。核磁共振谱分析: 同上。热性能分析: 称取10 mg左右的试样, 仪器温度以Al₂O₃来校准, 测试温度为-50~300℃, 升温速率为5℃/min, 氮气气氛。

PNIPA-g-PDLLA-EMA微球的制备及表征:

初乳的制备: 将PNIPA-g-PDLLA-EMA按一定比例充分溶解到二氯甲烷/丙酮溶液中, 并于恒温磁力搅拌器上以200 r/min的转速搅拌使其充分溶解。再缓慢滴加一定比例的蒸馏水, 控制转速在1 000 r/min, 10 min。

复乳的制备: 按2:8的比例加入1%~2%海藻酸钠溶液搅拌2~5 min, 接着在加入适量0.1%的海藻酸钠稀溶液, 搅拌10 min; 再加入一定比例的10%氯化钙溶液搅拌5 min。过滤、异丙醇分散、冻干。表征使用Zetasizer μV纳米粒径仪

测定粒径时, 检测温度范围从30~45 °C, 以PBS 1 : 10的比例稀释样品。PNIPA-g-PDLLA-EMA微球制备见图3。



主要观察指标: PDLLA-EMA相对分子质量, PDLLA-EMA和PNIPA-g-PDLLA-EMA核磁共振H谱图, PNIPA-g-PDLLA-EMA的热性能及粒径。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 10.0软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 PDLLA-EMA相对分子质量计算结果 采用核磁共振H谱计算PDLLA-EMA的数均分子质量为2 600。采用化学滴定法计算出PDLLA-EMA的数均分子质量为2 800。两种方法计算的结果相差不大, 属合理范围内(相差500~100), 表明其计算结果是可信的。

2.2 PNIPA-g-PDLLA-EMA的热性能分析及粒径结果 见表1, 图4。

表1 PNIPA-g-PDLLA-EMA 的玻璃化转变温度
Table 1 Glass transition temperature of PNIPA-g-PDLLA-EMA

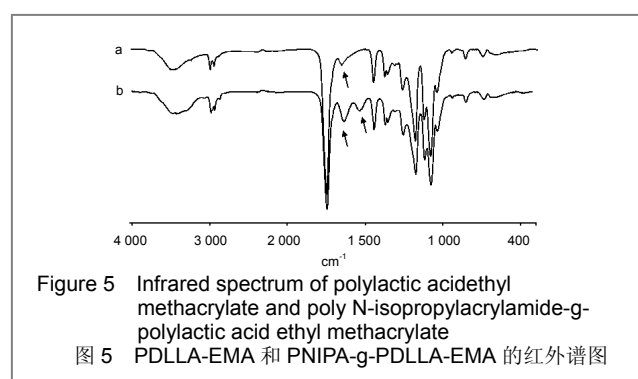
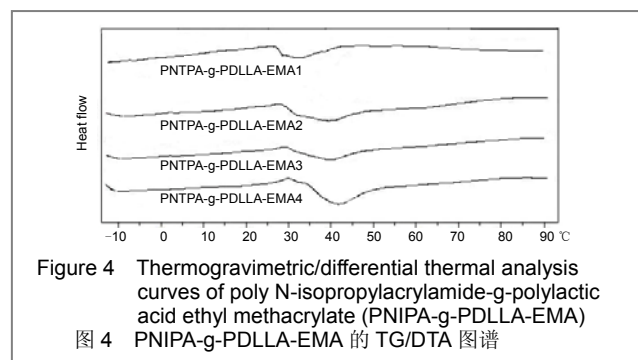
Sample	PNIPA (%)	PDLLA-EMA (%)	Glass transition temperature ¹ (°C)
PNIPA-g-PDLLA-EMA1	30	70	35.30
PNIPA-g-PDLLA-EMA2	40	60	37.80
PNIPA-g-PDLLA-EMA3	50	50	40.10
PNIPA-g-PDLLA-EMA4	60	40	42.50

Sample	Zetasizer-average particle size at room temperature ² ($\bar{x} \pm s$, μm)	Zetasizer-average particle ² ($\bar{x} \pm s$, μm)	Change rate of particle size ($\bar{x} \pm s$, %)
PNIPA-g-PDLLA-EMA1	28.90 $\pm$ 0.50	40.10 $\pm$ 0.30	138.70 $\pm$ 4.20
PNIPA-g-PDLLA-EMA2	20.60 $\pm$ 0.90	29.40 $\pm$ 0.50	142.70 $\pm$ 9.10
PNIPA-g-PDLLA-EMA3	17.30 $\pm$ 1.10	26.20 $\pm$ 0.70	161.40 $\pm$ 5.20
PNIPA-g-PDLLA-EMA4	13.70 $\pm$ 0.70	23.30 $\pm$ 0.50	170.00 $\pm$ 10.00

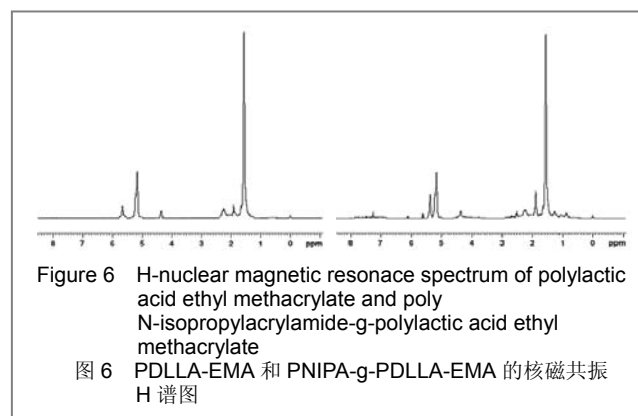
PNIPA-g-PDLLA-EMA: poly N-isopropylacrylamide-g-poly(lactic acid ethyl methacrylate); PNIPA: poly N-isopropylacrylamide; PDLLA-EMA: poly(lactic acid ethyl methacrylate); Glass transition temperature¹: Glass transition temperature of producer came from Figure 6; Zetasizer-average particle size at room temperature²: Average particle size was measured by Zetasizer μV nano particle size analyzer after producer prepared.

2.3 PDLLA-EMA和PNIPA-g-PDLLA-EMA红外图谱结果 PDLLA-EMA红外图谱见图4, 主要吸收峰有: 3 520 cm^{-1}

(OH), 2 950 cm^{-1} (CH), 1 758 cm^{-1} 和1 722 cm^{-1} (两种C=O), 1 640 cm^{-1} (C=C)。PNIPA-g-PDLLA-EMA红外图谱见图5, 主要特征峰有: 2 950 cm^{-1} (CH), 1 758 cm^{-1} 和1 722 cm^{-1} (两种C=O), NH。



2.4 PDLLA-EMA和PNIPA-g-PDLLA-EMA核磁共振H谱图结果 PDLLA-EMA的H谱见图6, 主要特征峰有: 1.4~1.7 ppm归属于链内部乳酸重复单元中CH₃键上氢元素的特征化学位移; 1.9 ppm归属于甲基丙烯酸中CH₃键上氢元素的特征化学位移; 4.35 ppm归属于甲基丙烯酸乙酯中CH₂CH₂键上氢元素的特征化学位移; 4.38 ppm归属于末端乳酸中CH键上氢元素的特征化学位移; 5.1~5.3 ppm归属于内部乳酸重复单元中CH键上氢元素的特征化学位移; 5.6~6.1归属于甲基丙烯酸中CH₂键上氢元素的特征化学位移。



PNIPA-g-PDLLA-EMA的H谱见图6, 将其与PDLLA-EMA的H谱比较, 主要特征峰有: 1.25归属于聚丙基丙烯酸酰胺重复单元中CH₃键氢元素的特征化学位

移; 1.48~1.53 ppm归属于聚丙烯酰胺重复单元和甲基丙烯酸乙酯中CH₂键上氢元素的特征化学位移; 3.9 ppm归属于聚丙烯酰胺重复单元中CH键上氢元素的特征化学位移。

3 讨论

通过分析实验数据可以得出, 产物的红外图谱和核磁共振H谱证明了以甲基丙烯酸-2-羟乙酯和辛酸亚锡共同引发的丙交酯, 再与N-异丙基丙烯酰胺共聚, 能够得到期望的PNIPA-g-PDLLA-EMA生物高分子材料。同时, 通过复乳法制备了粒径范围为15~40 μm, 热响应温度范围为35~42 °C的PNIPA-g-PDLLA-EMA微球。该系列微球为疏水性PDLLA-EMA片段构成微球的核, 亲水性PNIPA片段构成微球的壳。从表1中可以发现, 随着PDLLA-EMA含量比例的增加, 其玻璃转变温度随着提高, Z-平均粒径随着减小。同时, 该系列微球的粒径变化率与PNIPA片段的含量基本一致, 表明其热敏形变能力与PNIPA片段直接相关。

基于甲基丙烯酸-2-羟乙酯及丙交酯均具有生物可降解性, 其共聚产物PNIPA-g-PDLLA-EMA亦具备了同样的生物可降解性。另外, 在降解过程中, 由甲基丙烯酸-2-羟乙酯降解释放的小分子胺能够中和由聚乳酸降解释放的乳酸, 极大地降低了因材料降解而引起的酸中毒风险。

在药物可控释放研究中, 以PNIPA-g-PDLLA-EMA微球作为载体, 借助该微球的可控粒径和可控温度响应, 可以实现载药量及药物释放温度的线程控制, 能够有效提高药物使用效率和缩短临床症状治疗时间。

4 参考文献

- [1] Jung KO, Do IL, Jong MP. Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science*. 2009; 34:1261-1282.
- [2] Rijcken CJ, Snel CJ, Schiffrers RM, et al. Hydrolysable core-crosslinked thermosensitive polymeric micelles: synthesis, characterisation and in vivo studies. *Biomaterials*. 2007;28(36): 5581-5593.
- [3] Dong Y, Feng SS. Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*. 2004;25(14):2843-2849.
- [4] Mahmud A, Xiong XB, Lavasanifar A. Novel self-associating poly(ethylene oxide)-block-poly(epsilon-caprolactone) block copolymers with functional side groups on the polyester block for drug delivery. *Macromolecules* 2006;39:9419-9428.
- [5] Li J, Wang B, Liu P. Possibility of active targeting to tumor by local hyperthermia with temperature-sensitive nanoparticles. *Med Hypotheses*. 2008;71(2):249-251.
- [6] Soga O, van Nostrum CF, Ramzi A, et al. Physicochemical characterization of degradable thermosensitive polymeric micelles. *Langmuir*. 2004;20(21):9388-9395.
- [7] Topp MDC, Dijkstra PJ, Talsma H, et al. Thermosensitive micelle-forming block copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(N-isopropylacrylamide). *Macromolecules*. 1997;30: 8518-8520.
- [8] Neradovic D, van Nostrum CF, Hennink WE. Thermoresponsive polymeric micelles with controlled instability based on hydrolytically sensitive N-isopropylacrylamide copolymers. *Macromolecules*. 2001;34:7589-7591.

- [9] Lee BH, West B, McLemore R, et al. In-situ injectable physically and chemically gelling NIPAAm-based copolymer system for embolization. *Biomacromolecules*. 2006;7(6):2059-2064.
- [10] Neradovic D, Hinrichs WLJ, Kettenes-van den Bosch JJ, et al. Poly(N-isopropylacrylamide) with hydrolyzable lactic acid ester side groups: a new type of thermosensitive polymer. *Macromolecular Rapid Communications* 1999;20:577-581.
- [11] Neradovic D, Soga O, Van Nostrum CF, et al. The effect of the processing and formulation parameters on the size of nanoparticles based on block copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(N-isopropylacrylamide) with and without hydrolytically sensitive groups. *Biomaterials*. 2004;25(12):2409-2418.
- [12] Neradovic D, van Nostrum CF, Hennink WE. Thermoresponsive polymeric micelles with controlled instability based on hydrolytically sensitive N-isopropylacrylamide copolymers. *Macromolecules*. 2001;34:7589-7591.
- [13] Luo XG, Wang T, Huaxue Tongbao. 1996;59(4):10-15. 罗宣干, 王坦. N-异丙基丙烯酰胺系温度敏感聚合物和水凝胶的研究进展[J]. *化学通报*, 1996, 59(4):10-15.
- [14] Duan Q, Miura Y, Narumi A, et al. Synthesis and thermoresponsive property of end-functionized poly(N-isopropylacrylamide) with pyrenyl group. *J Polym Sci: part A: Polym Chem*. 2006;44:1117-1124.
- [15] Dragana N, Wouter L J H, Jantien J K B, et al. Poly(N-isopropylacrylamide) with hydrolyzable lactic acid ester side groups: a new type of thermosensitive polymer. *Macromol Rapid Commun*. 1999;20:577-581.
- [16] You YZ, Hong CY, Wang WP, et al. Preparation and Characterization of Thermally Responsive and Biodegradable Block Copolymer Comprised of PNIPAAm and PLA by Combination of ROP and RAFT Methods. *Macromolecules*. 2004;37:9761-9767.
- [17] Young SK, Eun SG, Tao LL. Synthesis and Characterization of Thermoresponsive-co-Biodegradable Linear-Dendritic Copolymers. *Macromolecules*. 2006;39:7805-7811.
- [18] Liu SQ, Tong YW, Yang YY. Thermally sensitive micelles self-assembled from poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide)-b-poly(D,L-lactide-co-glycolide) for controlled delivery of paclitaxel. *Mol Biosyst*. 2005;1(2):158-165.
- [19] Kim IS, Jeong YI, Cho CS, et al. Core-shell type polymeric nanoparticles composed of poly(L-lactic acid) and poly(N-isopropylacrylamide). *Int J Pharm*. 2000;211(1-2):1-8.
- [20] Le Garrec D, Gori S, Luo L, et al. Poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: in vitro and in vivo evaluation. *J Control Release*. 2004;99(1):83-101.
- [21] Chung JE, Yokoyama M, Aoyagi T, et al. Effect of molecular architecture of hydrophobically modified poly(N-isopropylacrylamide) on the formation of thermoresponsive core-shell micellar drug carriers. *J Control Release*. 1998;53(1-3): 119-130.
- [22] Okano T, Yamada N, Sakai H, et al. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res*. 1993; 27(10):1243-1251.
- [23] Wang ZR, Xu QY, Ye YQ. *Guoji Shengwu Yixue Gongcheng Zazhi*. 2006;29(4):238-242. 汪自然, 徐启勇, 叶燕青. 复乳法制备聚乳酸及其共聚物微球参数的研究进展[J]. *国际生物医学工程杂志*, 2006, 29(4):238-242.
- [24] Wang F, Tu JS, Zhang JS, et al. *Yaoxue Jinzhan*. 2003;27(3): 142-146. 王峰, 涂家生, 张钧寿, 等. PLGA微球控释系统的突释及其控制阴[J]. *药学进展*, 2003, 27(3):142-146.

来自本文课题的更多信息——

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 实验实施为第三作者, 实验评估为第四作者, 资料收集为第五、六、七作者, 第一作者成文, 第二作者审核, 通讯作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

文章要点: 具有智能效应的纳米材料已被应用到细胞水平治疗疾病的领域中, 其中基于聚乳酸的智能型微球是药物可控释放研究领域的热点。

实验拟通过甲基丙烯酸-2-羟乙酯和辛酸亚锡共同引发丙交酯聚合, 再接枝具有温度敏感效应的 N-异丙基丙烯酰胺, 形成可降解温敏型共聚物(PNIPA-g-PDLLA-EMA)高分子材料。