

PLGA 改性聚氨酯微球的制备及性能研究

王明强 薛龙辉 熊鑫 蒋婉莹 王萃娟 张志斌*

(西南交通大学生命科学与工程学院,成都 610031)

摘 要 以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)、聚乙二醇(PEG)、异佛尔酮二异氰酸酯(IPDI)和 2,2-二羟甲基丙酸(DMPA)为原料,采用预聚—扩链—中和—分散法制备 PLGA 改性聚氨酯水溶液,然后采用钙离子(Ca^{2+})的交联作用凝聚成 PLGA 改性聚氨酯微球。优化了合成条件,并对 PLGA 改性聚氨酯微球进行了傅里叶变换红外光谱(FT-IR)和扫描电子显微镜(SEM)表征,研究了 PLGA 含量和 pH 对微球降解性能的影响,以盐酸四环素(TH)为模型药物研究微球体外释药情况。结果表明,在降解反应初期微球的降解速率较大,而后趋于平稳,微球在碱性环境降解性能优于酸性环境,载药微球的载药量为 0.83%,包封率为 59.17%,载药 PLGA 改性聚氨酯微球的累积释药率可达 74%。

关键词 聚氨酯,聚乳酸-羟基乙酸共聚物,盐酸四环素,改性,降解,药物释放

Research of synthesis and property of polyurethane microsphere modified with PLGA

Wang Mingqiang Xue Longhui Xiong Xin Jiang Wanying Wang Cuijuan Zhang Zhibin

(College of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031)

Abstract Polyurethane modified with PLGA aqueous solution was synthesized using poly lactic-co-glycolic acid (PLGA), polyethylene glycol (PEG), isophorone diisocyanate (IPDI) and dihydroxymethyl propionic acid (DMPA) as raw materials by prepolymerization-chain extension-neutralization-dispersion method. The polyurethane microspheres were coacervation by the crosslinking of Ca^{2+} ions. The synthesis conditions were optimized, and fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and scanning electron microscope (SEM) were applied for further characterization. The effect of PLGA content and pH on the degradation performance of microspheres were studied. The drug release of microspheres using tetracycline hydrochloride (TH) as a model drug was studied. The results showed that the degradation rate of microspheres was higher at the initial stage of degradation reaction and then stabilized, and the degradation performance of microspheres in alkaline environment was better than acid environment. And the drug-loading rate of microspheres was 0.83%, the encapsulating rate of microspheres was 59.17%, and the accumulating drug release rate was 74%.

Key words polyurethane, poly lactic-co-glycolic acid, tetracycline hydrochloride, modification, degradation, drug release

聚氨酯(PU)由于其优异的物理性能、良好的生物相容性和较高的生物活性,广泛应用于生物医学材料领域,其微囊或微球材料能作为药物、蛋白质和生物活性分子等的有效负载材料,因此聚氨酯微球在控制释放、医疗诊断和化学保护等领域具有广阔的应用前景^[1-4]。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)是由乳酸(LA)单体与羟基乙酸(GA)单体按一定配合比聚合

而成的共聚物。PLGA 在生物医用材料领域被广泛应用于治疗药物、抗原以及蛋白质的微胶囊化和缓释,其具有良好的生物降解性和生物相容性,得到了包括美国食品药品监督管理局和欧洲药品局在内的国际监管机构的安全认证^[5-9]。利用 PLGA 对聚氨酯进行改性可以显著提高聚氨酯的降解性能,改性微球的内部腔体结构和表面孔隙结构有利于药物的负载与释放。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21401151)

作者简介:王明强(1992-),男,硕士,主要从事医用高分子材料研究。

联系人:张志斌(1958-),男,博士,教授,主要从事生物医用材料研究。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

聚乙二醇 200 (PEG-200)、丙酮,均为分析纯,成都科龙化工试剂厂;异佛尔酮二异氰酸酯(IPDI,分析纯),济宁华凯树脂有限公司;聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA, LA:GA=90:10),本实验室合成;三乙胺(TEA,分析纯),天津市进丰化工有限公司;2,2-二羟甲基丙酸(DMPA,分析纯),兰溪恒润化工;无水氯化钙(CaCl_2 ,分析纯),天津市美琳工贸有限公司;磷酸缓冲盐溶液(PBS, pH=1.5、pH=7.4、pH=9.2)缓冲溶液,本实验室自制;盐酸四环素(TH,分析纯),武汉远程科技有限公司。

恒速搅拌器(S212型),上海梅颖浦仪器制造有限公司;电热套(ZNHW型),南京科尔仪器设备有限公司;高速台式离心机(TGL-16G型),上海安亭科学仪器有限公司;气浴恒温振荡器(THZ-82B型),常州申光仪器有限公司;傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR, Nicolet560型),美国尼高力仪器公司;扫描电子显微镜(SEM, JSM-7500F型),日本电子公司;恒温水浴锅(XMTE-7000型),上海申顺生物科技有限公司;真空干燥箱(DZF-6090型),上海一恒科学仪器有限公司;紫外-可见分光光度计(UV-Vis, 721型),上海精密科学仪器有限公司。

1.2 样品的制备

1.2.1 PLGA 改性聚氨酯微球的制备

往干净的三口烧瓶中加入计量的 PLGA、丙酮、PEG-200、IPDI,在3个口上分别装恒速搅拌器(S212型,上海梅颖浦仪器制造有限公司)、冷凝管和温度计,保证良好的密封性,采用恒速搅拌器(S212型,上海梅颖浦仪器制造有限公司)进行搅拌,搅拌速度固定为 550r/min,采用电热套(ZNHW型,南京科尔仪器设备有限公司)缓慢将反应体系温度升至 70℃,搅拌 2h,得到聚氨酯预聚物的丙酮溶液。随后将体系温度降至 50℃,维持搅拌,加入计量的 DMPA 扩链反应 3h。接着降温至 30℃,适当加快搅拌速度,滴加计量的 TEA 中和反应 15min,得聚氨酯的丙酮溶液。升温至 60℃蒸出三口烧瓶内剩余丙酮后,剧烈搅拌并加入定量的蒸馏水,得到 PLGA 改性聚氨酯水溶液。将所得溶液滴加到一定浓度的氯化钙水溶液中,在 Ca^{2+} 的交联作用下凝聚形成微球,静置 24h 后取出于常温干燥,即制得 PLGA 改性聚氨酯微球。

1.2.2 载药 PLGA 改性聚氨酯微球的制备

于 PLGA 改性聚氨酯水溶液中加入一定量的 TH,随后再滴入氯化钙溶液中成球。将干燥后的载药微球研磨成粉末,称取一定量放置于 250mL 烧瓶中,加入 100mL pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液,采用恒速搅拌器(S212型,上海梅颖浦仪器制造有限公司)充分搅拌,促使药物充分释放。采用高速台式离心机(TGL-16G型,上海安亭科学仪器有限公司)离心分离后取上清液 1mL 定溶至 100mL,再取出 0.5mL 稀释至 10mL,即制得载药 PLGA 改性聚氨酯微球。

1.3 样品的测试

1.3.1 FT-IR 测试

将数颗干燥好的 PLGA 改性聚氨酯微球碾碎,取少量微球粉末与溴化钾混合碾磨,至其呈均匀粉末,将其压成透明薄片,采用傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR, Nicolet560型,美国尼高力仪器公司)对样品进行测试。

1.3.2 SEM 测试

将 PLGA 改性聚氨酯微球采用液氮冷冻后剖开,整粒的和剖开的微球分别涂上少量碳粉,用导电胶将其粘于胶面上,干燥后喷金,采用扫描电子显微镜(SEM, JSM-7500F型,日本电子公司)观察微球表面和剖面的形貌结构。

1.3.3 降解率测试

称取 3 份等质量的微球分别置于装有 50mL 分别为 pH=1.5、pH=7.4、pH=9.2 的 PBS 缓冲溶液的 3 个锥形瓶中,采用恒温水浴锅(XMTE-7000型,上海申顺生物科技有限公司)恒温水浴中维持 37℃,定时取出微球,采用真空干燥箱(DZF-6090型,上海一恒科学仪器有限公司)40℃干燥至恒重,降解率计算见式(1)。

$$D_R = \frac{M_0 - M_t}{M_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中, D_R 为微球降解率,%; M_0 为微球初始质量, g; M_t 为 t 时刻微球质量, g。

1.3.4 微球载药量和包封率测试

定量称取 TH,溶于 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液中,配制浓度为 4mg/L、6mg/L、8mg/L、10mg/L 和 12mg/L 的溶液,采用紫外-可见分光光度计(UV-Vis, 721型,上海精密科学仪器有限公司)对样品的吸光度进行测试,根据测定结果画出标准吸收曲线。

样品的载药量和包封率见式(2)、式(3)。

$$\text{载药量} = (\text{测得含药量} / \text{微球总质量}) \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{包封率} = (\text{测得含药量} / \text{实际投药量}) \times 100\% \quad (3)$$

1.3.5 载药微球体外释药性能测试

称取一定量的载药 PLGA 改性聚氨酯微球,置于锥形瓶中,注入 50mL 的 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液,采用气浴恒温振荡器(THZ-82B 型,常州申光仪器有限公司)温度设定为 37℃,60r/min 的振荡频率,间隔一定时间,取 10mL 上清液测吸光度,同时补充 10mL 缓冲溶液,置换量为 10mL,并结合标准曲线计算药物的累积释放率,见式(4)。

$$E_r = \frac{V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{W_e} \times 100\% \quad (4)$$

式中, E_r 为 TH 累积释药率,%; V_0 为释放液 PBS 总体积,mL; V_e 为 PBS 置换体积,mL; C_i 为第 i 次置换取样条件下 TH 的浓度, $\mu\text{g/mL}$; W_e 为用于释放的载药微球中包裹的 TH 的质量, μg ; n 为置换 PBS 缓冲溶液的次数,次。

2 结果与讨论

2.1 PLGA 改性聚氨酯微球的合成条件优化分析

采用单一因素变量法,对同一因素、不同水平下的 PLGA 改性聚氨酯微球的形貌进行考察,得到合成微球的最优条件。PLGA 改性聚氨酯微球的合成配合比见表 1。从表 1 可知,通过对比 PLGA 改性聚氨酯微球合成配合比的成球性、球型圆整程度和微球截面形态等,确定 PLGA 改性聚氨酯微球的最佳合成条件为:PLGA 粘均分子量为 5000,PLGA 用量占 PEG 用量的 20%(wt,质量分数,下同),—OH:—NCO 的配合比为 1:3,固含量为 45%(wt,质量分数,下同), CaCl_2 质量浓度为 6%,此条件下制得的 PLGA 改性聚氨酯极易成球,球形圆整度较好,无拖尾现象,微球截面有大量的沟槽和孔隙。

表 1 PLGA 改性聚氨酯微球的合成配合比

PLGA 粘均 分子量	PLGA 占 PEG (质量分数)/%	—OH:—NCO	固含量/ %	CaCl_2 质量 浓度/%
1000	10	1:2	35	4
2500	20	1:3	40	6
5000	30	1:4	45	8
—	40	1:5	50	10

2.2 FT-IR 分析

PLGA 改性聚氨酯微球的 FT-IR 谱图见图 1。从图可以看出,在 3640cm^{-1} 附近没有吸收峰,说明 PLGA、PEG 和 DMPA 中的—OH 完全反应;在 3411cm^{-1} 处出现较强的吸收峰,是由于未形成氢键的 N—H 的伸缩振动而引起的;在 2954cm^{-1} 和

2923cm^{-1} 处是甲基和亚甲基的伸缩振动峰;在 2250cm^{-1} 左右未出现明显吸收峰,表明该物质中不含—NCO 基团,IPDI 反应完全;在 1686cm^{-1} 处出现的吸收峰是由氨基甲酸酯中的羰基伸缩振动引起的,说明生成了氨基甲酸酯基;在 1558cm^{-1} 处是酰胺 II 带(N—H 变形)吸收峰。

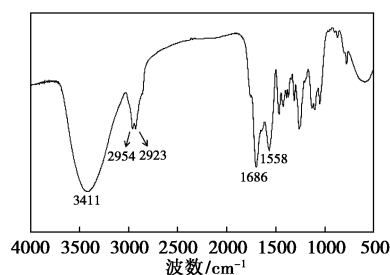


图 1 PLGA 改性聚氨酯微球的 FT-IR 谱图

2.3 SEM 分析

PLGA 改性聚氨酯微球的 SEM 图见图 2。从图 2(a)可以看出,PLGA 改性聚氨酯微球的球形圆整,表面较光滑,有少量空洞;从图 2(b)可以看出,PLGA 改性聚氨酯微球的内部存在大量孔隙和腔道,有空穴存在,此内部结构比表面积大利于药物等物质的负载和释放。

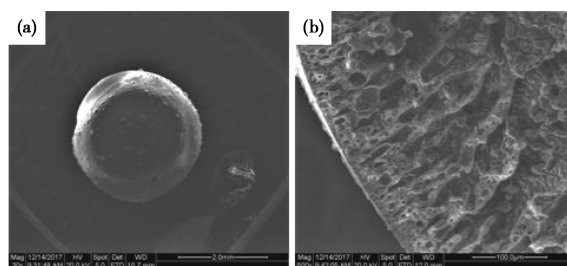


图 2 PLGA 改性聚氨酯微球的 SEM 图

[(a)微球表面;(b)微球剖面]

2.4 添加 PLGA 对 PLGA 改性聚氨酯微球降解率的影响

采用 PLGA 对聚氨酯微球进行改性,研究最佳合成条件制得的 PLGA 改性聚氨酯微球,在 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液中的降解情况,探究 PLGA 改性聚氨酯微球在医疗领域的应用前景。采用最佳合成条件,制得的 PLGA 改性聚氨酯微球,对在 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液中的降解情况进行分析。在 PLGA 用量为 20%,pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液条件下,PLGA 改性聚氨酯微球降解率的曲线见图 3。从图可以看出,PLGA 用量为 20% 的 PLGA 改性聚氨酯微球,在 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液中,在开始至 6h 条件下,PLGA 改性聚氨酯微球的降解率随着

时间的增长呈快速增长趋势,在 6h 条件下,降解率达到 40%,从 >6h 至 24h,降解率呈缓慢增长态势,在 24h 条件下,PLGA 改性聚氨酯微球的降解率达到 43%。这主要是将 PLGA 引入到聚氨酯的软段后,在 PLGA 中的酯基水解条件下,导致聚氨酯大分子链的断裂,聚氨酯进一步降解,形成大量的小分子,加快了微球的降解速率,因此在降解反应初期降解速率较大,而后趋于平稳。

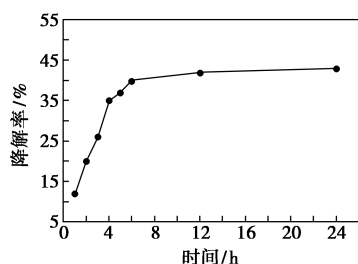


图3 PLGA 改性聚氨酯微球降解率的曲线图

2.5 pH 对 PLGA 改性聚氨酯微球降解率的影响

PLGA 改性聚氨酯微球在不同 pH 的 PBS 缓冲溶液中的降解率曲线见图 4。从图可以看出,在不同 pH 的 PBS 缓冲溶液中,开始至 6h 条件下,PLGA 改性聚氨酯微球的降解率呈快速增长态势,在 6h, PBS 缓冲溶液分别为 pH=1.5、pH=7.4、pH=9.2 条件下,PLGA 改性聚氨酯微球的降解率分别为 21%、40%、54%;从 >6h 至 24h 条件下,PLGA 改性聚氨酯微球的降解率呈缓慢增长态势,在 24h, PBS 缓冲溶液分别为 pH=1.5、pH=7.4、pH=9.2 条件下,PLGA 改性聚氨酯微球的降解率达到 27%、43%、58%。PLGA 改性聚氨酯微球在碱性溶液中降解较快,在酸性溶液中降解较慢,这是由于氨基甲酸酯基中—NH—和羰基都具有吸电子能力,使得羰基碳原子带有较高的正电荷,导致在碱性环境下发生亲核反应的速率快于在酸性环境下发生亲电反应的速率。

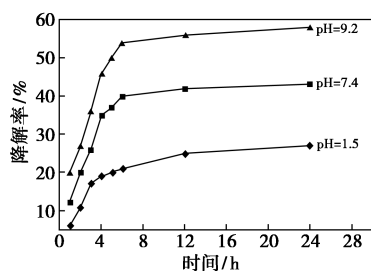


图4 PLGA 改性聚氨酯微球在不同 pH 的 PBS 缓冲溶液中的降解率曲线图

2.6 微球载药量与累积释药率分析

根据测定结果,绘制 PLGA 改性聚氨酯微球对

TH 的标准吸收曲线图,见图 5。从图可以看出,在 PLGA 粘均分子量为 5000, PLGA 占 PEG 用量的 20%, —OH:—NCO 为 1:3, 固含量为 45%, CaCl₂ 质量浓度为 6% 条件下, 计算得到 PLGA 改性聚氨酯微球的载药量为 0.83%, 包封率为 59.17%。

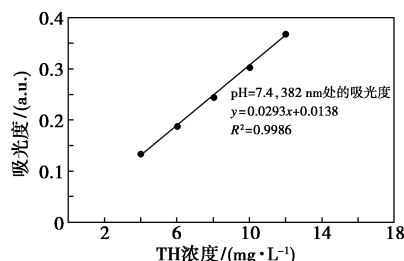


图5 PLGA 改性聚氨酯微球对 TH 的标准吸收曲线图

在 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液中,载药 PLGA 改性聚氨酯微球的 TH 累积释药率的曲线见图 6。从图可以看出,在 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液中,载药 PLGA 改性聚氨酯微球的 TH 累积释药率,在开始释放至 6h 条件下,载药 PLGA 改性聚氨酯微球的 TH 累积释药率呈快速增长态势,在 6h 条件下,载药 PLGA 改性聚氨酯微球的 TH 累积释药率为 67%;在 >6h 至 15h 条件下,载药 PLGA 改性聚氨酯微球的 TH 累积释药率呈缓慢趋于平稳态势,在 15h 条件下,载药 PLGA 改性聚氨酯微球的 TH 累积释药率为 74%。

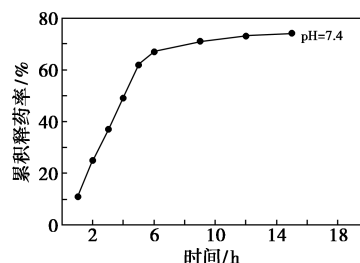


图6 载药 PLGA 改性聚氨酯微球的 TH 累积释药率曲线图

3 结论

(1)成功制得 PLGA 改性聚氨酯微球,最佳合成条件为:PLGA 粘均分子量为 5000, PLGA 占 PEG 用量的 20%, —OH:—NCO 为 1:3, 固含量为 45%, CaCl₂ 质量浓度为 6%。

(2)PLGA 改性聚氨酯微球的降解率,在降解反应初期降解速率较大,而后趋于平稳;PLGA 改性聚氨酯微球在碱性环境下的降解率明显大于酸性环境下的降解率,在 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液中,降解 24h 条件下,PLGA 改性聚氨酯微球的降解率达到 43%。

(下转第 239 页)