

8. OCS 包被的 PLGA 纳米微球的制备

引言

由于壳聚糖对细胞膜的亲和力较强,因此可以在纳米乳剂、纳米微囊或微球的表面包上一层壳聚糖包被,以增加纳米载药系统的生物利用度。已经有研究将壳聚糖包被到脂质体和PLGA纳米微粒和己内酯PECL纳米微粒的表面,形成包被一核心似的结构,壳聚糖通过离子作用吸附在微囊的表面,增加了整个载药系统的物理稳定性,并有利于冻干后的纳米微囊的重新分散在适当的溶剂中。

共聚乙丙交酯(poly(D, L-lactide-co-glycolide), PLGA)是一种可生物降解的高分子聚合物,其代谢产物乳酸是高等动物体内的一种自然代谢产物,易从体内排出而不蓄积。聚乳酸分子上没有肽链,无免疫原性,可安全用于体内(Kulkarni, 1996),因此被用作是可生物降解的控释骨架(Yolles, 1970),目前已经经过美国FDA批准用于医用手术缝合线以及注射用微球、微囊、组织等制剂的材料。PLGA是浅黄色透明固体,易溶于二氯甲烷、氯仿、丙酮、乙腈等有机溶剂。无毒、无刺激性,具有良好的生物相容性,可生物分解、吸收,且可塑性好,易加工成型。聚乳酸在体内经过水解或酶解,最终形成二氧化碳和水,因而被认为是最有发展前途的可生物降解高分子材料,倍受国内外关注。

本实验用乳化方法制备 OCS 包被的 PLGA 核心纳米微球,并检测了制备过程中各个条件对所形成的纳米微球成球率、稳定性以及所形成的纳米微球形态等的影响,用原子力显微镜检测了所形成的纳米微球的形态。

8.1 材料和方法

8.1.1 药品与试剂

OCS(自制); PLGA(50/150, MW 6万, 济南岱罡生物科技有限公司); 二氯甲烷(中国医药集团上海化学试剂公司); TPP(上海精细化工材料研究所); 聚乙烯醇(PVA, 30000, Sigma-Aldrich); 海藻酸钠(天津市瑞金特化学品有限公司)

8.1.2 仪器

均质机(上海标本模型厂); 透射电镜(DU-650 spectrophotometer (BECKMAN Co., U. S. A.)); SHA-B 恒温震荡器(国华企业); XSZ-D 型倒置显微镜(重庆光学仪器厂); 原子力显微镜(M203726); 透射电镜(DU-650 spectrophotometer

(BECKMAN Co., U. S. A.))

8.1.3 方法

8.1.3.1 OCS 包被的 PLGA 纳米微球制备

准确称量一定量OCS溶于 15ml 0.5%乙酸溶液中，得到OCS溶液；一定量PLGA溶于二氯甲烷中，充分溶解后，加入到上述溶液中；16000rpm均质 20min均质完毕加入（或不加）0.5%TPP, 搅拌 1h，真空除去二氯甲烷，得到微球分散液。改变PLGA加入量、OCS浓度、CH₂Cl₂加入量、均质速率等条件以期探讨成球过程中的影响因素。

8.1.3.2 红外光谱检测

将2 mg OCS包被的PLGA纳米微球（PLGA-OCS）与100 mg KBr混合，通过压片法制成薄片，然后用傅立叶变换红外光谱仪对样品进行分析，扫描范围为400-4000cm⁻¹。

8.1.3.3 单因素实验设计

通过改变OCS浓度、有机相CH₂Cl₂的加入量、PLGA加入量、均质速率等条件，来确定成球条件对纳米微球形成的影响，具体条件见表 8-1。

表 8-1 制备 PLGA-OCS 纳米微球的各个条件

Table 8-1 preparation condition of PLGA-OCS nanoparticles

样品	均质速率 (rpm)	PLGA 加入量 (mg)	OCS (g/L)	CH ₂ Cl ₂ (ml)
A	16000	20	2.0	0.5
B	16000	10	2.0	0.5
C	16000	2	2.0	0.5
D	16000	10	0.5	0.5
E	16000	10	1.0	0.5
F	16000	10	2.0	0.3
G	16000	10	2.0	1.0
H	6000	10	2.0	0.5
I	10000	10	2.0	0.5
J	13000	10	2.0	0.5

8.1.3.4 成球率检测

纳米微球制备完毕，用移液管移取 4ml 微球样品置于离心管中，高速离心；则没有成球的材料被离心下来，将离心沉淀干燥并称重。通过计算沉淀的质量(M)和 4ml 样品中材料的质量(M_0)，得到成球率公式 (8-1)：

$$\text{成球率 (\%)} = (M_0 - M) / M_0 \times 100\% \quad (8-1)$$

8.1.3.5 稳定性实验

将所制备的纳米微球悬液分成两部分，一部分加入交联剂 TPP，另一部分不加。检测上清液的透光率来检测纳米微球悬液的稳定性，隔一段时间测定一次，直到测定值恒定为止。通过微球悬液透光率随时间的变化情况来判断其稳定性。

8.1.3.6 纳米微球形态检测

将所制备的纳米微球悬液做 AFM 和 TEM 检测以观察纳米微球形态。

8.2 结果和讨论

8.2.1 红外图谱

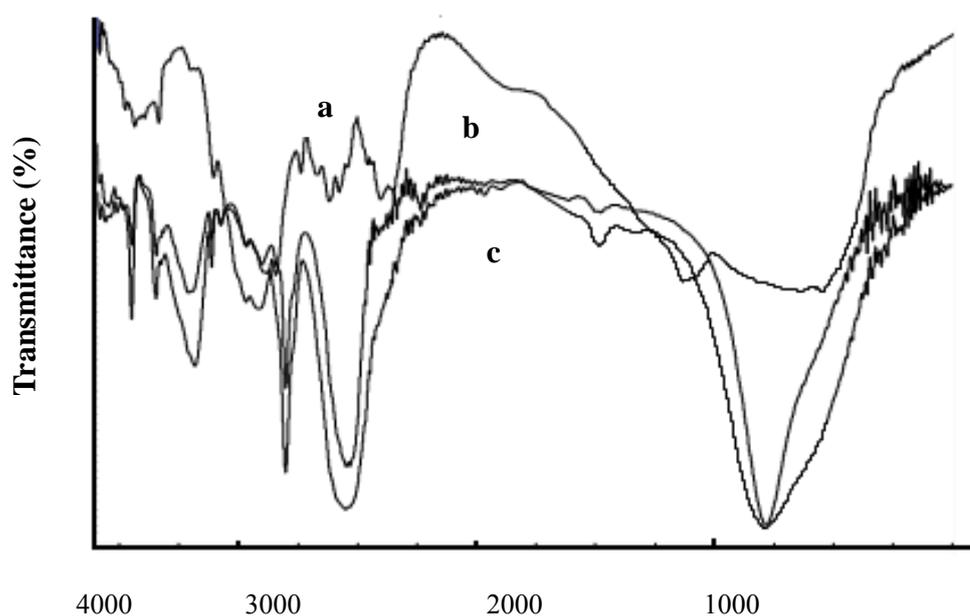


图 8-1 具有 PLGA 核心的 OCS 纳米微球的红外图谱

Figure 8-1 FTIR of OCS nanoparticles and PLGA-OCS nanoparticles

a: OCS; b: PLGA-OCS(PLGA:OCS=4:30); c: PLGA-OCS(PLGA:OCS=10:30)

OCS 纳米微球和 OCS 包被的 PLGA 纳米微球的红外图谱见图 8-1。从图 8-1 中可以看出，与 OCS (8.1. a) 纳米微球在在 2924 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$)， 2854 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$)， 1464

cm^{-1} (δCH_2), 1182 cm^{-1} (CH_2) 的吸收峰越强, 说明在OCS分子中数量较多— CH_2 或— CH_3 。PLGA-OCS (8.1. b, 8.1. c) 纳米微球红外图谱与OCS纳米微球发生了很大的变化, 出现了PLGA的特征吸收峰: 3326 cm^{-1} (C-H), 2400 cm^{-1} , 1750 cm^{-1} (C=O), 1100 cm^{-1} (C-O)。可以看出微球具有各种材料的特征吸收峰。

8.2.2 PLGA-OCS 纳米微球成球率

8.2.2.1 PLGA 加入量对成球率的影响

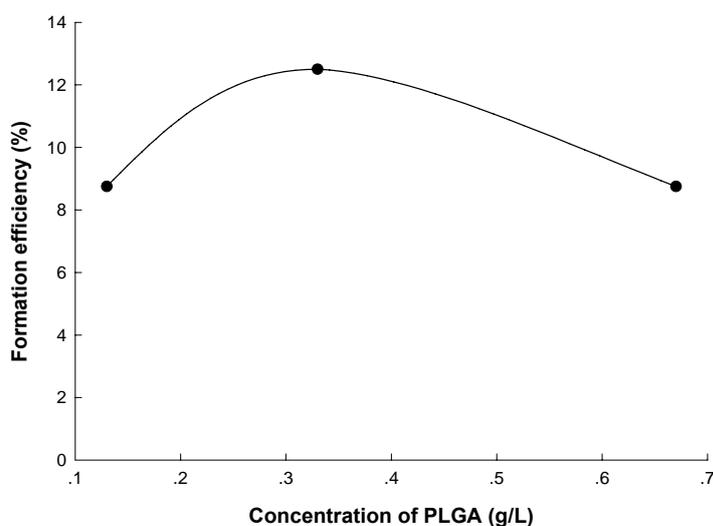


图 8-2 PLGA 浓度对 PLGA-OCS 纳米微球成球率的影响

Figure 8-2 Effect of PLGA concentration on Formation efficiency of PLGA-OCS nanoparticles

加入PLGA浓度对纳米微球的成球率的影响见图8-2。从图8-2中可以看出, 当PLGA浓度为0.4g/L时, 成球率最高; 浓度再增大或者减小, 成球率都降低。造成这种现象的原因是: 当PLGA浓度较小时, 由于核心物质PLGA的量较少, 因此形成的PLGA液滴较少, 不利于纳米微球的形成; 当PLGA浓度较大时, 油相的粘度增大, 在一定的机械力分散作用下, 形成的乳滴变大, 最终微球的粒径变大。另一方面, PLGA 的质量浓度增加, 聚合物更易于沉积, 微球的固化更迅速。因此形成的微球粒径较大, 因此响应的纳米微球的数量较少。

8.2.2.2 OCS 浓度对纳米微球成球率的影响

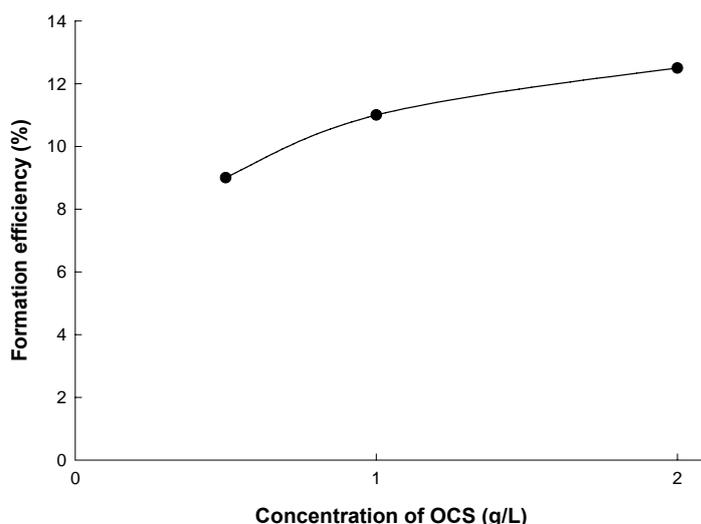


图 8-3 OCS 浓度对 PLGA-OCS 纳米微球成球率的影响

Figure 8-3 Effect of OCS concentration on Formation efficiency of PLGA-OCS nanoparticles

OCS浓度对纳米微球的成球率的影响见图8-3。从图8-3中可以看出，当OCS浓度为0.5g/L时成球率最低，提高OCS浓度使成球率提高。造成这种现象的原因是：当OCS浓度较低时，由于OCS是发挥的表面活性剂的作用，它的加入可以增加连续相的粘度，在一定的机械力作用下，实际作用在油相上的剪切力变大，易形成较小的乳滴。同时，OCS具有一定的表面活性，可以增加油相与外水相的润湿性，降低乳滴的表面自由能，这类表面活性剂可以在形成的液滴表面形成一层保护膜，防止已形成的小液滴聚结成大液滴，从而有利于形成稳定、细小、均匀的液滴。因此，随着OCS的质量浓度增加，微球的粒径减小，因而有利于纳米微球成球率的提高。

8.2.2.3 二氯甲烷加入量对成球率的影响

二氯甲烷浓度对纳米微球的成球率的影响见图8-4。从图8-4中可以看出，当 CH_2Cl_2 加入量在0.2-1ml之间时，成球率随着 CH_2Cl_2 加入量的增多而上升。造成这种现象的原因是：当 CH_2Cl_2 浓度较低时，油相由于溶解了大量的PLGA因而有较高的PLGA浓度，因此不利于PLGA在连续相中的分散，因此成球率比较低；当 CH_2Cl_2 浓度提高时，则由于PLGA能够较充分的分散，形成更多地疏水性液滴，有利于OCS疏水聚集的有序性，因而有利于纳米微球的形成，因此成球率上升。

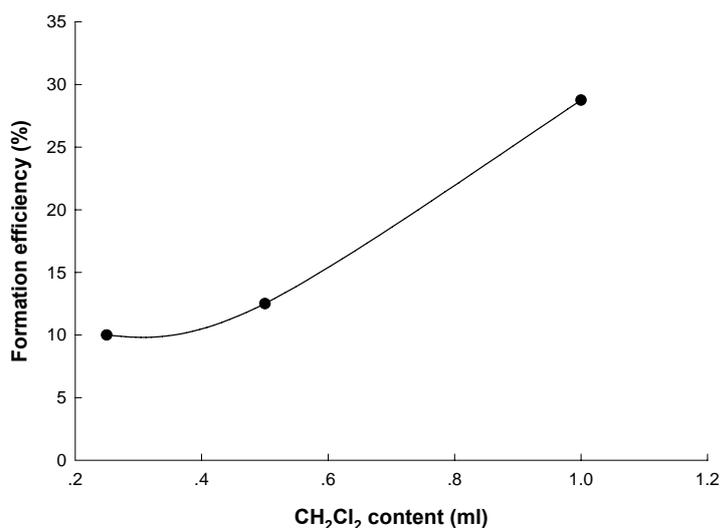


图 8-4 二氯甲烷加入量对 PLGA-OCS 纳米微球成球率的影响

Figure 8-4 Effect of CH₂Cl₂ content on Formation efficiency of PLGA-OCS nanoparticles

8.2.2.4 均质速率对纳米微球成球率的影响

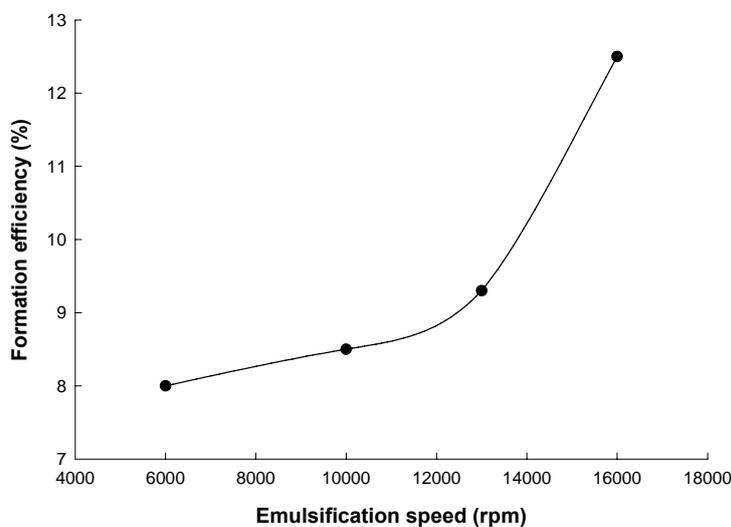


图 8-5 均质速率对 PLGA-OCS 纳米微球成球率的影响

Figure 8-5 Effect of emulsification speed on Formation efficiency of PLGA-OCS nanoparticles

均质速率对纳米微球成球率的影响见图 8-5。由图 8-5 可知，提高均质速率有利于纳米微球的形成。当均质速率较低时，由于有机相在均质过程中不能很充分的分散，因此形成的微球粒径较大，在离心的过程中即被离心下去；而随着均质速率的提高，有机相能够更充分的分散到溶液中，形成更微小的纳米微球，而且使纳米微球迅速固化，减少微球聚集的机会，因此纳米微球成球率逐渐提高。

8.2.3 制备条件对纳米微球稳定性的影响

8.2.3.1 PLGA 加入量对纳米微球稳定性影响

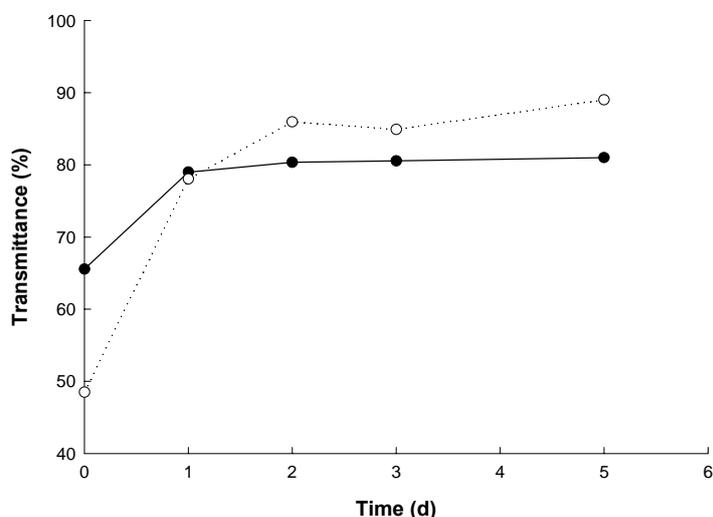


图 8-6 PLGA-OCS 纳米微球稳定性

Figure 8-6 Stability of PLGA-OCS nanoparticles

(○:加入交联剂 TPP; ●: 不加交联剂, 20mgPLGA)

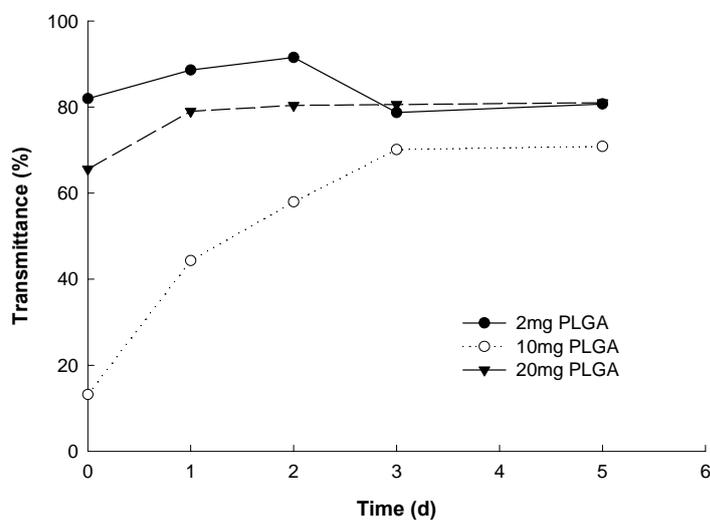


图 8-7 PLGA 加入量对 PLGA-OCS 纳米微球稳定性的影响

Figure 8-7 Effect of PLGA content on stability of PLGA-OCS nanoparticles

PLGA 加入量对纳米微球稳定性的影响见图 8-7。从图 8-7 中可以看出, 三个所选的浓度中, 加入 PLGA 的量为 10mg 时有利于纳米微球的形成, 溶液的浊度最低; 另外两个 PLGA 浓度 2mg 和 20mg 所形成的样品在浊度均高于 10mg 的样品。这和前面成球率实验结果一致。提高 PLGA 的量有利于纳米微球核心的形成, 因

此随着 PLGA 加入量增大体系的浊度降低；但是如果 PLGA 加入量过多，则形成的微球粒径增大，微球沉淀下来，因此浊度开始上升。

8.2.3.2 OCS 浓度对纳米微球稳定性的影响

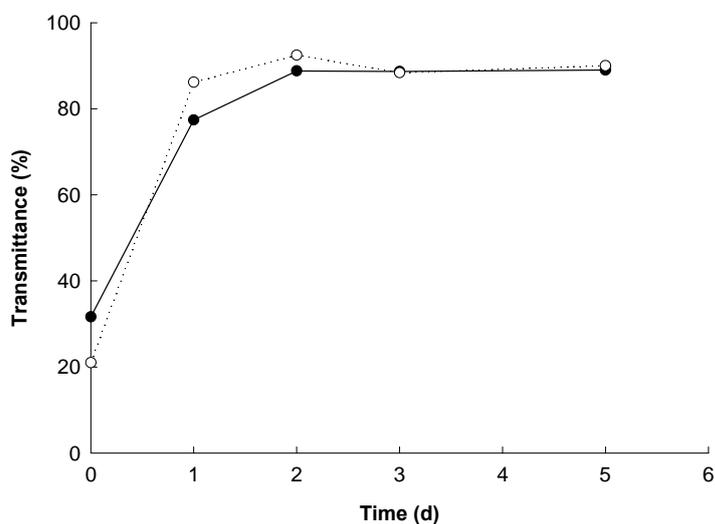


图 8-8 纳米微球稳定性 (●:均质○:加入 TPP, 1g/LOCS)

Figure 8-8 Stability of PLGA-OCS nanoparticles

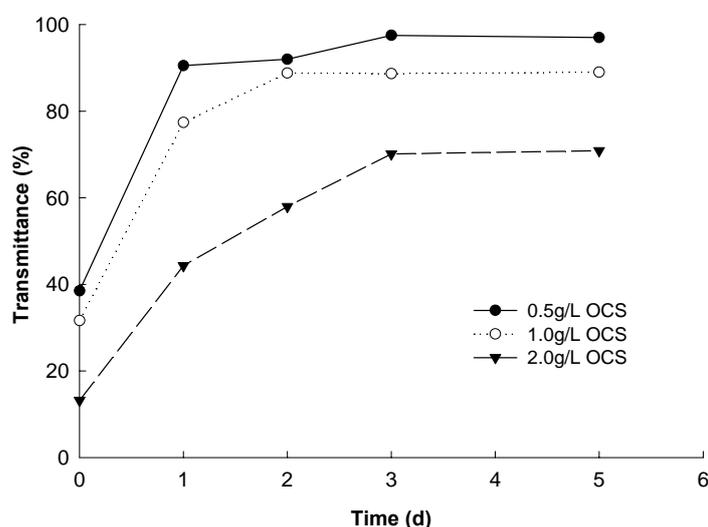


图 8-9 OCS 加入量对纳米微球稳定性的影响

Figure 8-9 Effect of OCS content on stability of PLGA-OCS nanoparticles

OCS 浓度对纳米微球稳定性的结果见图 8-9。从图 8-9 中可以看出，在我们所研究的范围内，它的加入可以增加连续相的粘度，在一定的机械力作用下，实际作用在油相上的剪切力变大，易形成较小的乳滴。同时 OCS 可以在形成的液滴

表面形成一层保护膜,防止已形成的小液滴聚结成大液滴,从而有利于形成稳定、细小、均匀的液滴。随着 OCS 浓度的增大所形成的纳米微球溶液浊度降低,说明微球数量的增多。这是因为提高 OCS 的浓度,也可以提高纳米微球体系的密度,因此溶液的浊度下降。这个结果和前面的成球率实验是一致的,都说明 OCS 浓度的增大有利于纳米微球的形成和微球数量的增多。

8.2.3.3 二氯甲烷加入量对纳米微球稳定性影响

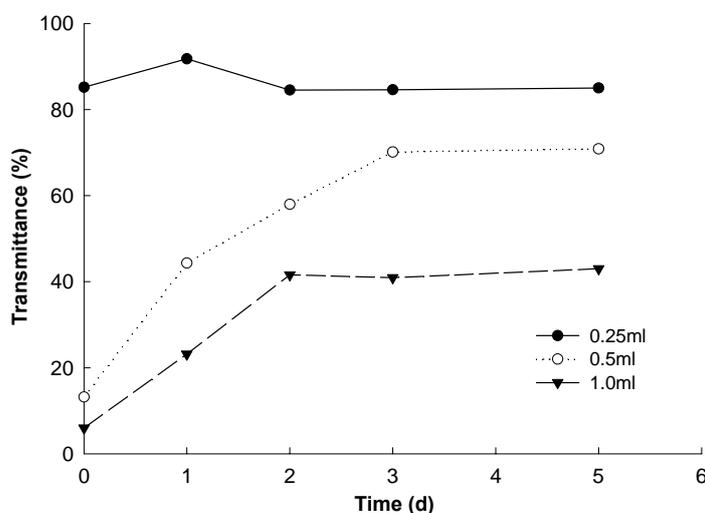


图 8-10 CH_2Cl_2 加入量对纳米微球稳定性的影响

Figure 8-10 Effect of CH_2Cl_2 content on stability of PLGA-OCS nanoparticles

CH_2Cl_2 加入量对纳米微球稳定性的结果见图 8-10。从图 8-10 中可以看出,在我们所研究的范围内,加大 CH_2Cl_2 的加入量有利于纳米微球的形成,随着 CH_2Cl_2 加入量的增大最初所制备的纳米微球溶液浊度降低,说明 CH_2Cl_2 加入量的增大导致纳米微球数量的增多。这是因为 CH_2Cl_2 的量的增多,有利于降低有机相的粘度,在相同的均质速率下,粘度的降低有利于PLGA的分散,并且能够形成更多的疏水性内核,因此有利于纳米微球的数量增多,因此浊度降低。但是值得指出的是加入 CH_2Cl_2 的量较小的样品在放置的过程中稳定性较好,放置过程中浊度变化不大,可能因为纳米微球的粒径较小造成的。

8.2.3.4 均质速率的影响

加入 TPP 对 13000rpm 的样品见图 8-11,从图 8-11 可以看出,加入 TPP 使

纳米微球浊度降低,说明 TPP 的加入使纳米微球的稳定性提高。均质速率对微球稳定性的影响见图 8-12。从图 8-12 中可以看出,随着均质速率的提高,溶液的透光率逐渐降低。这是因为在微球的形成过程中,提高均质速率有利于微球的形成;随着均质速率的提高,更多的纳米微球的形成,使溶液的浊度降低,变得更混浊。

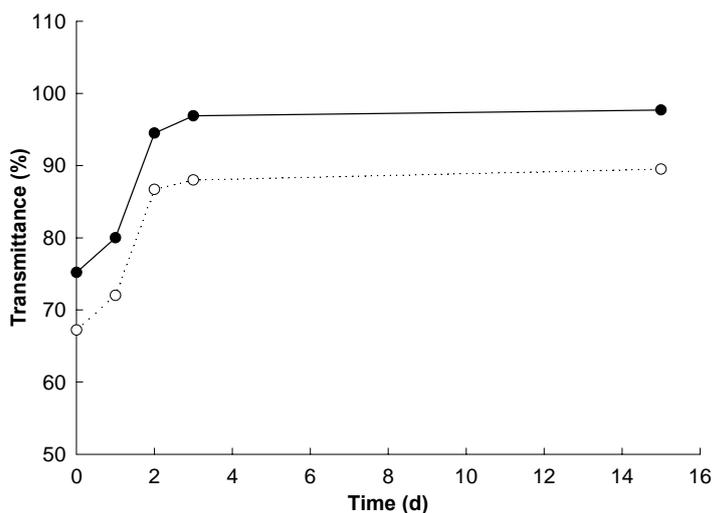


图 8-11 PLGA-OCS 微球的稳定性

Figure 8-11 Stability of PLGA-OCS nanoparticles

(13000rpm, ○:加入交联剂 TPP; ●:不加交联剂)

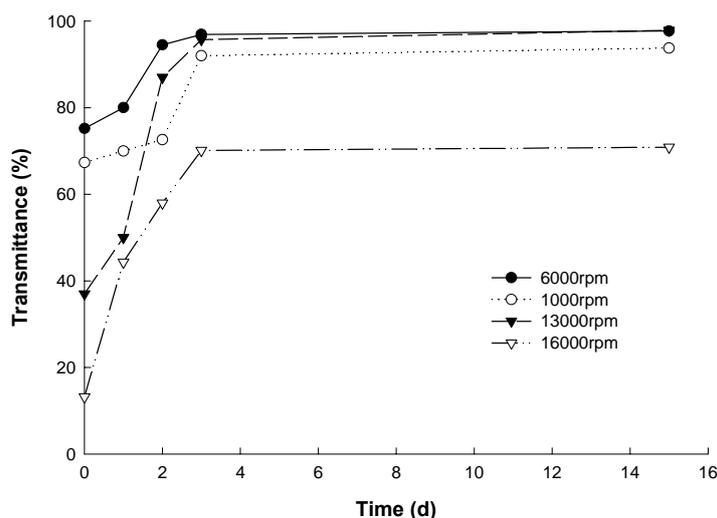


图 8-12 均质速率对 PLGA-OCS 微球稳定性的影响

Figure 8-12 Effect of emulsification speed on stability of PLGA-OCS nanoparticles

8.2.4 纳米微球形态检测

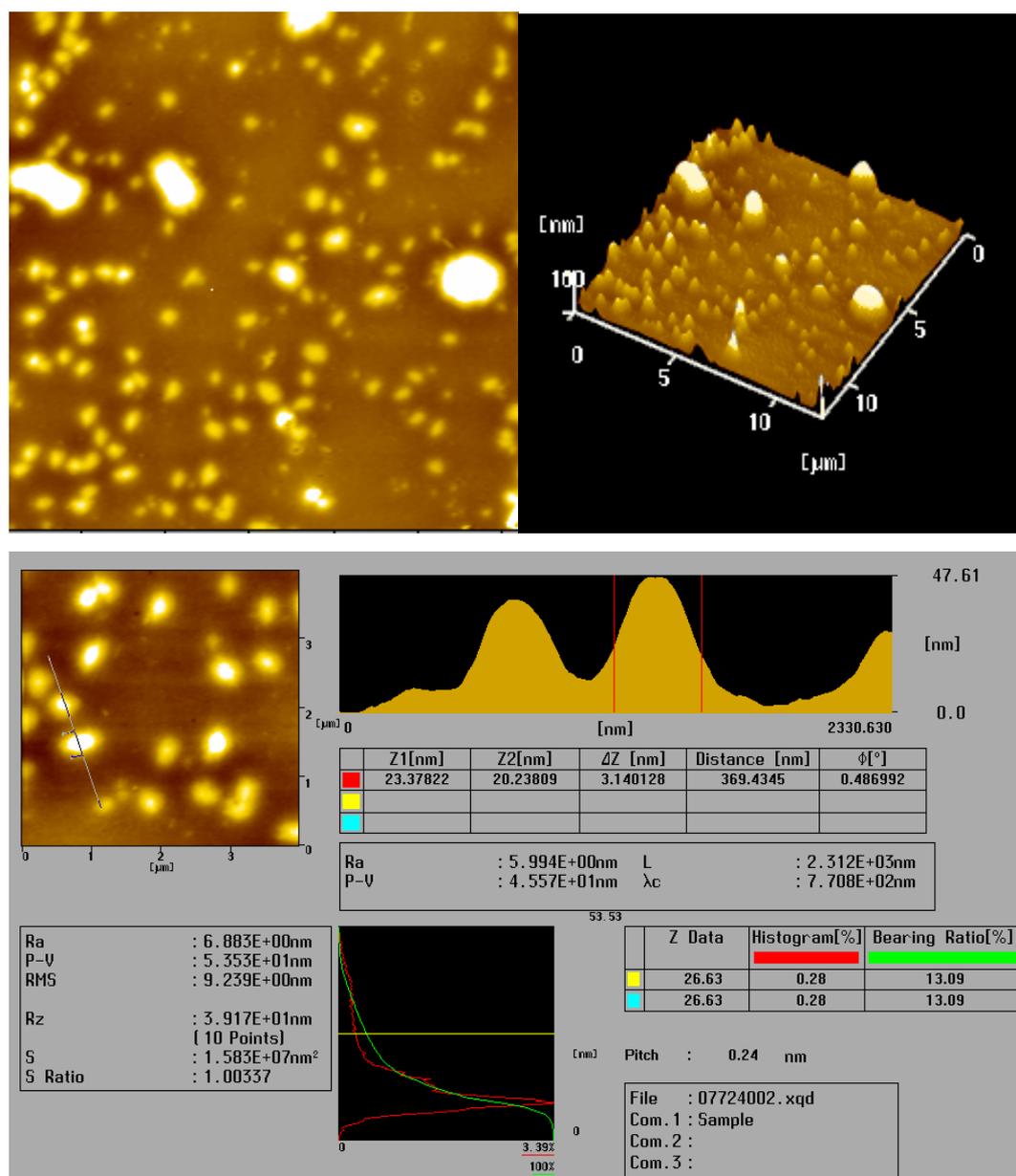


图8-13 PLGA-OCS纳米微球的原子力显微镜照片

Figure 8-13 AFM images of PLGA-OCS nanoparticles (样品 A)

纳米微球的原子力显微镜照片显示如图 8-13。从图 8-13 中可以看出，溶液中有大量微球存在，密度较大，且粒径在纳米尺度；所制备的纳米微球平均粒径为 369nm。

而透射电镜结果显示样品 C 中纳米微球的粒径 200nm 左右，微球形态圆形，大小比较均一。

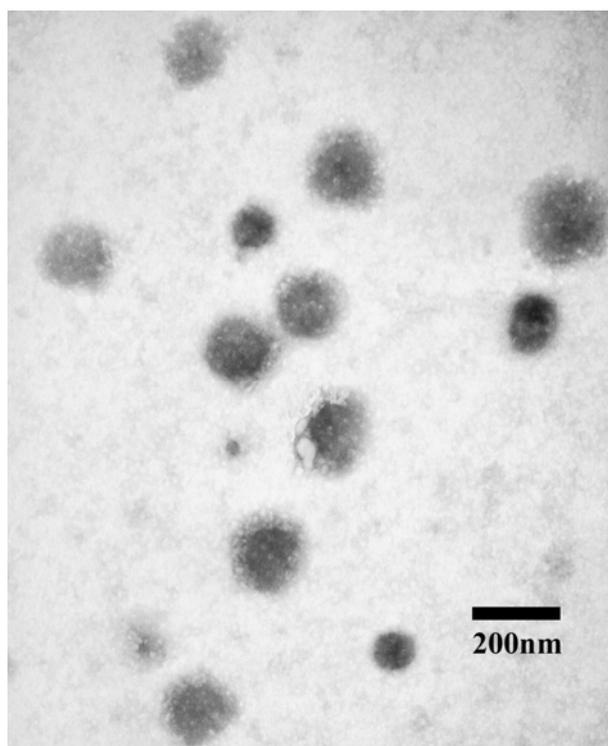


图 8-14 PLGA-OCS 纳米微球的透射电镜照片

Figure 8-14 TEM images of PLGA-OCS nanoparticles (样品 C)

8.3 小结

通过乳化法制备了OCS包被的PLGA纳米微球，检测了制备过程中均质速率、OCS浓度、 CH_2Cl_2 加入量、PLGA加入量对成球率对微球稳定性和微球形态的影响。随着PLGA加入量增多，纳米微球成球率先增大后减小；提高OCS浓度使纳米微球成球率上升；成球率随着 CH_2Cl_2 加入量的增多而上升；提高均质速率使成球率上升。提高PLGA的量先是有利于纳米微球核心的形成，过多的PLGA量反而会易形成粒径较大的微球；OCS可以增加连续相的粘度，以在形成的液滴表面形成一层保护膜，防止已形成的小液滴聚结成大大液滴，因此OCS的浓度增大有利于纳米微球的形成；加大 CH_2Cl_2 的加入量有利于纳米微球的形成， CH_2Cl_2 的量的增多，有利于降低有机相的粘度，在相同的均质速率下，粘度的降低有利于PLGA的分散，并且能够形成更多的疏水性内核。所制备的PLGA—OCS纳米微球具有较好的形态和稳定性，透射电镜结果显示样品C中纳米微球的粒径 200nm左右，微球形态圆形，大小均一。

结论

本文建立了一种壳聚糖油酸复合物纳米微球缓释体系,并对体系进行了特性分析,以及纳米微球制备方法进行了进一步探讨。

通过盐酸降解法制备了不同分子量的壳聚糖,通过控制降解时间,得到分子量 20KDa, 38KDa, 300KDa, 1100KDa 等不同分子量的壳聚糖样品。在降解前 12 个小时内,壳聚糖分子量下降的比较迅速,超过 12 小时后,分子量的变化变得很平缓。通过双突跃电位滴定法检测了壳聚糖的脱乙酰度,结果不同分子量的壳聚糖脱乙酰度基本一致,说明盐酸降解法不影响壳聚糖取代度。所制备的不同分子量的壳聚糖红外光谱基本一致。

采用EDC交联法和油酰氯和壳聚糖反应的方法制备了不同取代度OCS复合物(DS2%, DS5%, DS11%, DS27%)。红外光谱、核磁共振谱及紫外光谱检测证明了产物的结构和取代度。OCS与壳聚糖相比红外光谱发生很大的变化:在 $3000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ (OH, NH_2) 降低,在 1570 cm^{-1} (δ N-H) 消失了,在 1655 cm^{-1} (ν C=O) and 1555 cm^{-1} (δ N-H) 的吸收峰增强了。而且取代度越高,在 2924 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$), 2854 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$), 1464 cm^{-1} (δCH_2), 1182 cm^{-1} (CH_2) 的吸收峰越强。不同分子量OCS红外光谱相差不大。核磁光谱化学位移为 1.2ppm新出现的峰即主要由于壳聚糖与油酸反应后甲基质子的性质表现。OCS和壳聚糖相比,在紫外波段 226nm以及 230nm附近出现了明显的吸收峰,这是油酸基上的双键产生的。

OCS 溶解性比壳聚糖低,但是溶解性随 pH 变化的趋势不变。壳聚糖的溶解是因为其结构上的氨基的存在,OCS 的溶解说明其结构中游离氨基的存在。OCS 具有降低表面张力的能力,这是两亲性分子容易“逃离”水相吸附于表面,从而降低表面张力,这种能力是随着 OCS 取代度的增高和分子量的减小而增强的。OCS 的粘度高于相同分子量的壳聚糖,而且取代度越高粘度越大;分子量越大,粘度越大;OCS 在盐酸中的粘度比在乙酸中低;温度增高 OCS 粘度降低。OCS 具有一定的吸湿性,但是吸湿性比壳聚糖要差,油酸基的引入打破了壳聚糖分子原来的排列,并且占据了部分氨基的位点,氨基数量的减少使氢键的减少,因此 OCS 吸湿性比壳聚糖差。

通过荧光探针实验检测 OCS 在溶液中的自聚集行为,通过改变溶剂 pH、溶剂极性、温度、加入小分子盐等条件来检测纳米微球的形成过程中的影响因素。