

Manufacturing of polylactide nanospheres

Otrzymywanie nanosfer polilaktydowych

DOI: dx.medra.org/10.12916/przemchem.2014.1311

Poly-L-lactide nanospheres were prepd. by emulsifying CH_2Cl_2 soln. of the polymer in aq. soln. of poly(vinyl alc.) at 0–50°C under stirring. After removal of the solvent by evapn., the nanospheres were filtered out and analyzed for grain size. The size decreased with decreasing the mol. mass of the polymer. The polylactide nanospheres of size less than 100 nm were produced in many cases.

Przedstawiono wyniki badań doświadczalnych procesu wytwarzania nanosfer polilaktydowych otrzymanych metodą emulsyjną. Zbadano wpływ temperatury, szybkości mieszania, rodzaju użytego stabilizatora oraz długości łańcucha polimerowego na rozmiar otrzymywanych nanosfer. Na podstawie wyników badań opracowano warunki pozwalające na powtarzalne otrzymywanie nanosfer polilaktydowych o rozmiarze poniżej 100 nm.

Polilaktyd (PLA) jest alifatycznym poliesterem, zbudowanym z linio-wo połączonych ze sobą cząsteczek kwasu mlekowego (rys. 1)¹⁾. Ze względu na obecność chiralnego atomu węgla w cząsteczce monomeru, możliwe jest otrzymywanie PLA o różnej konfiguracji. Polilaktyd, zawierający tylko cząsteczki kwasu L-mlekowego (L-PLA) lub tylko kwasu D-mlekowego (D-PLA) charakteryzuje się wysoką krystalicznością, natomiast L-PLA z domieszką izomeru D ma budowę amorficzną²⁾.

PLA otrzymywany może być przez bezpośrednią syntezę z kwasu mlekowego lub przez polimeryzację z otwarciem pierścienia lak-

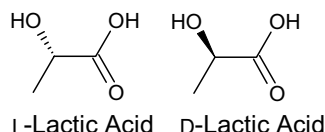


Fig. 1. Enantiomers of lactic acid

Rys. 1. Enancjomery kwasu mlekowego

tydu. Pierwsza metoda prowadzi do polimeru o małej średniej masie molowej (<5000 g/mol). Polimery o średniej masie molowej (>100 000 g/mol), uzyskuje się w wyniku polimeryzacji z otwarciem pierścienia (rys. 2)³⁾.

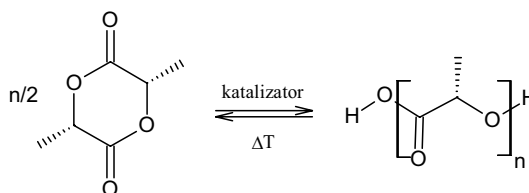


Fig. 2. Ring-opening polymerization of lactide

Rys. 2. Schemat polimeryzacji z otwarciem pierścienia laktydu

Mimo że polilaktyd znany jest już od kilkudziesięciu lat, to nadal cieszy się niesłabnącym zainteresowaniem ze strony nauki. Wielkie nadzieje wiąże się z wprowadzeniem go do masowej produkcji opakowań, jednak ciągle wysoka cena skutecznie hamuje jego ekspansję na rynku tworzyw sztucznych. Dziedzinami, w których polilaktyd znajduje nowe zastosowania są medycyna i farmacja. Z PLA produkowane są materiały opatrunkowe, resorbowalne nici chirurgiczne, implanty kostne, a także łączniki i śruby do łączenia złamanych kości. Coraz większą popularnością cieszą się systemy inteligentnego podawania leków DDS (*drug delivery systems*), których istotą jest osiągnięcie długotrwałego efektu terapeutycznego po jednorazowej aplikacji leku. Ma to na celu ograniczenie ilości przyjmowanych leków, a w konsekwencji zmniejszenie ich niepożądanych działań ubocznych⁴⁾.

Wielu badaczy opisuje możliwości tworzenia systemów terapeutycznych zbudowanych z biodegradowalnych polimerowych filmów, w których zawieszona jest substancja aktywna. Jednakże zastosowanie tego rozwiązania wymusza podawanie substancji leczniczych transdermalnie (przez skórę) lub przez pokrywanie nimi implantów kostnych. Natomiast, zdecydowanie częściej substancje lecznicze podawane są w formie doustnej lub dożylniej. Dlatego też, niesłabnącym zainteresowaniem cieszą się emulsje



Mgr inż. Agnieszka A. GADOMSKA w roku 2010 ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Od 2010 r. jest doktorantką w Laboratorium Procesów Technologicznych Wydziału Chemicznego PW. Specjalność – zastosowanie polimerów biodegradowalnych w medycynie.



Mgr inż. Ilona WARYCH w roku 2013 ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Badania w ramach pracy magisterskiej zrealizowała w Laboratorium Procesów Technologicznych Wydziału Chemicznego PW. Specjalność – zastosowanie polimerów biodegradowalnych w medycynie.

zawierające sfery polimerowe zawieszony w wodnych roztworach surfaktantów. Na rynku farmaceutycznym dostępnych jest kilka preparatów zawierających sfery polimerowe w rozmiarze mikrometrycznym. Jednakże, tego typu preparaty mogą być podawane tylko wziewnie lub doustnie⁵⁾.

Rozmiar mikrometryczny dyskwalifikuje preparat do podawania dożylnego. Naczynia włosowate występujące w organizmach ludzkich i zwierzęcych mają średnicę 7–15 μm , a więc mogłoby dochodzić do zatykania naczyń o małej średnicy. Ponadto, cząstki mikrometryczne nie mogą przenikać bariery krew-mózg, co wyklucza możliwość leczenia np. nowotworów mózgu. Problem ten można rozwiązać zmniejszając rozmiar sfer polimerowych do nanometrycznego. Nanosfery polimerowe mogą być bezpiecznie podawane dożylnie, co powoduje, że są obiektem zainteresowania naukowców⁶⁾.

Nanosfery polimerowe można otrzymać głównie trzema sposobami. Pierwszą metodą jest suszenie rozpyłowe. Polimer rozpuszcza się w rozpuszczalniku organicznym, a następnie rozpyla za pomocą strumienia ciepłego powietrza, co prowadzi do powstania nanometrycznych sfer polimerowych. W drugiej, niezwykle popularnej metodzie, polimer rozpuszcza się w ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym. Następnie, w wyniku rozprężenia roztworu polimeru i odparowania CO_2 wytrącają się mikrosfery polimerowe. W metodzie tej nie stosuje się rozpuszczalników organicznych, a ditlenek węgla krąży w obiegu zamkniętym. Jej wadą jest przede wszystkim stosunkowo duży rozmiar uzyskiwanych sfer oraz konieczność stosowania skomplikowanej aparatury⁷⁾.

Najbardziej popularną i nieskomplikowaną zarówno pod względem aparatury, jak i wykonania, jest metoda emulsyjna. Najpierw sporządza się roztwór polimeru w rozpuszczalniku organicznym oraz surfaktantu w wodzie. Najczęściej stosowane surfaktanty to poli(alkohol winylowy) (PVA), siarczan dodecylosodowy oraz żelatyna. Następnie wkrapla się roztwór polimeru do roztworu surfaktantu przy bardzo intensywnym mieszaniu. W końcowym etapie odparowuje się pozostałości rozpuszczalnika organicznego. W wyniku takiego procesu otrzymuje się sfery polimerowe mikro- i nanometryczne. Opisana metoda poza prostotą realizacji, umożliwia bardzo łatwe powiększanie skali.

W produkcji sfer polimerowych do zastosowań biomedycznych, należy wziąć pod uwagę kilka ważnych aspektów. Przede wszystkim, polimer taki musi być biokompatybilny, o przewidywalnym metabolizmie oraz nietoksycznych produktach rozkładu. PLA spełnia te warunki, przy czym produkty handlowe mogą zawierać resztki cyny, ponieważ w przemyśle, PLA otrzymuje się wobec 2-etyloheksanianu cyny(II). Maksymalna zawartość cyny(II) w produktach dopuszczalnych do kontaktu z żywnością nie powinna przekraczać 1%, a w produktach mających kontakt z organizmami żywymi 20 ppm⁸⁾.

W związku z tym, w prezentowanych badaniach wykorzystywano polimery otrzymane w wyniku polimeryzacji z otwarciem pierścienia L-laktydu wobec 2-etyloheksanianu magnezu jako katalizatora. Po przeprowadzeniu reakcji produkty oczyszczano z pozostałości nieprzereagowanego substratu strącając PLA z roztworu dichlorometanu zimnym metanolem. Zbadano wpływ temperatury prowadzenia

procesu, intensywności mieszania, rodzaju użytego surfaktantu oraz średniej masy molowej polimeru na wielkość otrzymywanych sfer polimerowych.

Część doświadczalna

Surowce

Do otrzymywania nanosfer polimerowych stosowano poli-L-laktyd o średniej masie molowej 2300–86000 g/mol. Polimery o M_n 2300–40000 g/mol otrzymano w Laboratorium Procesów Technologicznych metodą polimeryzacji z otwarciem pierścienia wobec 2-etyloheksanianu magnezu, natomiast polimery o M_n 53500–86000 g/mol były produktami handlowymi Nature Works (NW2002, NW2003, NW 3051). Jako stabilizatory emulsji, stosowano dwa PVA Mowiol, o symbolach 4_88 (M_w ok. 30 000 g/mol, stopień hydrolizy 88%) i 18_88 (M_w ok. 130 000 g/mol, stopień hydrolizy 88%) oraz dichlorometan cz.d.a. POCh SA.

Aparatura

Badania procesu otrzymywania nanosfer prowadzono w kolbie kulistej o poj. 250 mL zaopatrzonej we wkraplacz z wyrównaniem ciśnienia. Kolba umieszczona była w łaźni wodnej z regulatorem temperatury ETS-D5 firmy IKA. Jako elementu mieszającego używano mieszadła baryłkowego o wymiarach 20 × 50 mm, poruszanego przez mieszadło magnetyczne RTC Basic firmy IKA.

Metodyka badań

W celu przygotowania 0,1-proc. roztworu PVA, naważkę 0,5 g PVA (Mowiol 4_88 lub 18_88) i 400 mL wody destylowanej pozostawiano w kolbie miarowej poj. 500 mL na 2 dni do całkowitego rozpuszczenia alkoholu. Następnie, uzupełniano objętość kolby wodą destylowaną do kreski. W celu przygotowania 1-proc. roztworu L-PLA, naważkę 1 g polilaktydu (o $M_n = 2600$ –86000 g/mol) i 80 mL dichlorometanu pozostawiano w kolbie miarowej poj. 100 mL do całkowitego rozpuszczenia polimeru. Następnie, objętość kolby uzupełniano dichlorometanem do kreski.

W celu otrzymania sfer polilaktydowych, w kolbie kulistej 250 mL umieszczano 100 mL 0,1-proc. wodnego roztworu PVA, a we wkraplaczu 5 lub 10 mL 1-proc. roztworu polimeru w dichlorometanie, który następnie wkraplano przez ok. 30 min mieszając z szybkością 600 lub 1200 rpm, w temp. 0, 25 lub 50°C. Po wdropleniu całego roztworu polimeru, zawieszony sfer polimerowych mieszano jeszcze przez 1 h w celu odparowania rozpuszczalnika, po czym sączono na lejku Schotta 3G oraz wykonywano analizę DLS.

Metody analityczne

Średnią masę molową PLA oraz konwersję laktydu wyznaczano za pomocą chromatografii żelowej (GPC) metodą krzywej wzor-



Dr inż. Paweł RUŚKOWSKI w roku 1998 ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Od 2010 r. jest adiunktem w Laboratorium Procesów Technologicznych tego Wydziału. Specjalność – technologia chemiczna, zagadnienia związane z polimerami biodegradowalnymi, optycznie czynnymi pochodnymi kwasu winowego, optymalizacja procesów chemicznych i powiększanie skali.

* Autor do korespondencji:

Laboratorium Procesów Technologicznych, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska, ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa, tel.: (22) 234-54-63, fax: (22) 625-53-17, e-mail: pawel.ruskowski@ch.pw.edu.pl



Prof. dr hab. inż. Ludwik SYNORADZKI w roku 1971 ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Od 1985 r. jest kierownikiem Laboratorium Procesów Technologicznych na tym samym Wydziale. Specjalność – technologia chemiczna, projektowanie i wdrażanie procesów technologicznych.

cowej (wzorec polistyren). Analizę wykonywano techniką kolumnową za pomocą aparatu UltiMate 3000 Dionex, z detektorem refraktometrycznym RI-101 Shodex i dwiema kolumnami połączonymi szeregowo Jordi Gel DVB Mixed Bed. Przepływ rozpuszczalnika (dichlorometan) 0,8 mL/min, nastrzyk próbki 100 μ L.

Rozmiar otrzymywanych nanosfer oznaczano metodą DLS (*dynamic light scattering*) za pomocą aparatu Malvern Zetasizer Nano model ZEN 3600. Pomiar wykonywano w kuwetach polistyrenowych.

Omówienie wyników

W pierwszym etapie badań określono wpływ temperatury na wielkość otrzymywanych sfer. Dla obydwu stosowanych polialkoholi otrzymane sfery polimerowe miały rozmiar 20–300 nm. W przypadku PVA 4_88 sfery o najmniejszej średnicy (20–200 nm) otrzymano w temp. 25°C (rys. 3). Podobnie stosując PVA 18_88 o większej masie molowej najmniejsze sfery polimerowe uzyskano w temp. 25°C (rys. 4). Jednakże, w porównaniu ze sferami otrzymanymi w środowisku PVA 4_88, były one zdecydowanie większe (80–300 nm).

W kolejnym etapie prac zbadano wpływ średniej masy molowej (M_n) PLA na rozmiar otrzymywanych sfer polimerowych. Otrzymano układy emulsyjne, w których wielkość sfer w większości przypadków wynosiła zdecydowanie poniżej 100 nm (rys. 5). Jednakże nie zaobserwowano jednoznacznego wpływu średniej masy molowej polimeru na ich rozmiar.

Zwiększenie objętości wkraplanego polimeru z 5 do 10 mL (pozostałe zmienne ustalone: temp. 25°C, szybkość mieszania 600 rpm) prowadziło do wzrostu średnicy otrzymywanych sfer polilaktydowych. W przypadku emulsji ze stabilizatorem PVA 18_88 wzrost rozmiaru sfer był znaczny (>100 nm), natomiast z PVA 4_88, nadal otrzymywano układy nanometryczne (<100 nm) (rys. 6).

Zwiększenie szybkości mieszania do 1200 rpm spowodowało 3-krotny wzrost rozmiaru sfer (rys. 7). Sfery o największym rozmiarze (200–300 nm) uzyskano z polimerów o M_n 66000–40000 g/mol. Z polimerów o większej masie molowej (M_n = 86000 g/mol), otrzymywano zdecydowanie mniejsze sfery o średnicy ok. 15 nm, niezależnie od użytego stabilizatora. Zmniejszenie średnicy sfer zaobserwowano również dla polimerów o małej masie molowej (M_n 2300–26000 g/mol). Otrzymywano z nich sfery polimerowe o rozmiarze 40–120 nm.

Podsumowanie i wnioski

Nanosfery polimerowe są dziedziną bardzo silnie rozwijającą się, w której pokładana jest nadzieja, że stanie się przyszłością w rozwoju medycyny. Otrzymywanie sfer polimerowych o rozmiarze nanometrycznym pozwala na zwiększenie ich spektrum zastosowań, m.in. w leczeniu nowotworów mózgu.

W prezentowanych badaniach przedstawiono wpływ temperatury (0–50°C), szybkości mieszania (600 i 1 200 rpm), oraz średniej masy molowej PLA (M_n 2300–86000 g/mol) na rozmiar sfer polimerowych. Wykazano także, że rozmiar powstają-

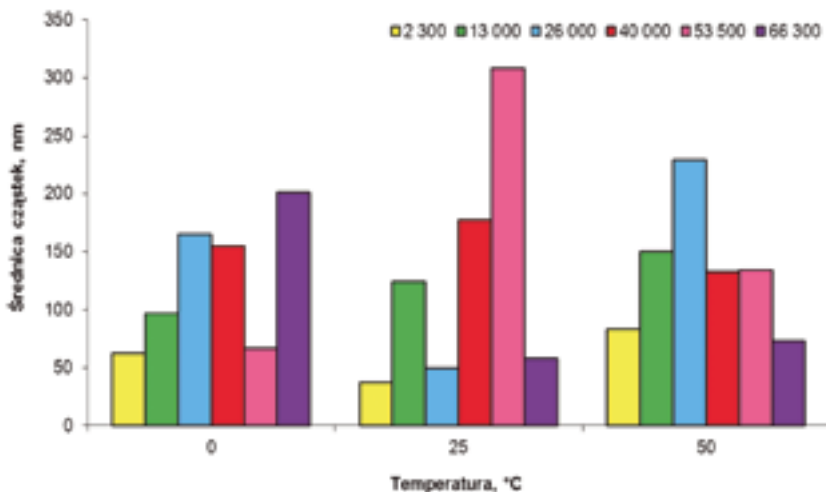


Fig. 3. Effect of temperature and molecular mass of PLA on the size of the poly(lactide) spheres (stabilizer PVA 4_88, agitation speed 1200 rpm)

Rys. 3. Zależność rozmiaru sfer polilaktydowych od temperatury i M_n PLA (stabilizator PVA 4_88, szybkość mieszania 1200 rpm)

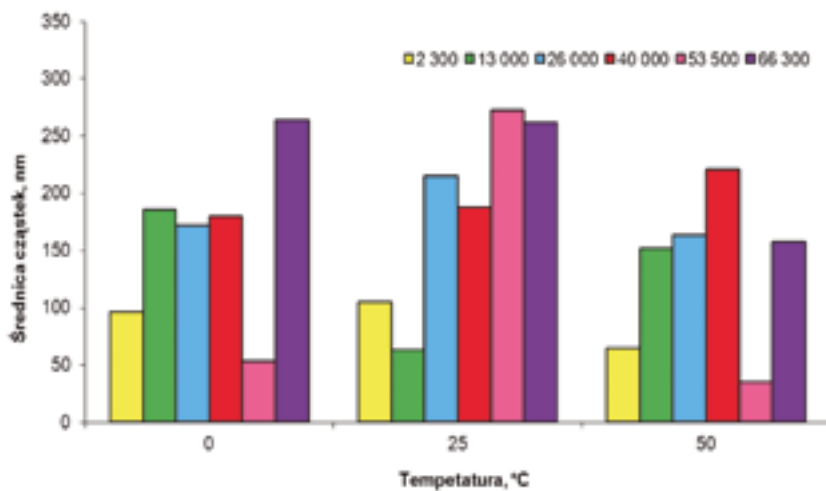


Fig. 4. Effect of temperature and molecular mass of PLA on the size of the poly(lactide) spheres (stabilizer using PVA 18_88, agitation speed 1200 rpm)

Rys. 4. Zależność rozmiaru sfer polilaktydowych od temperatury i M_n PLA (stabilizator PVA 18_88, szybkość mieszania 1200 rpm)

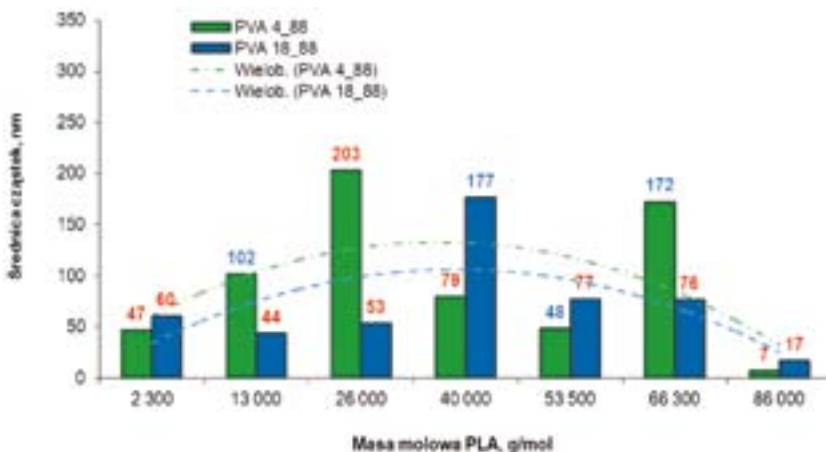


Fig. 5. Effect of the average PLA and PVA molecular mass on the size of poly(lactide) spheres (5 mL solution of the polymer, temperature 25°C, agitation speed of 600 rpm)

Rys. 5. Zależność rozmiaru sfer polilaktydowych od średniej masy molowej PLA i PVA (5 mL roztworu polimeru, temp. 25°C, szybkość mieszania 600 rpm)

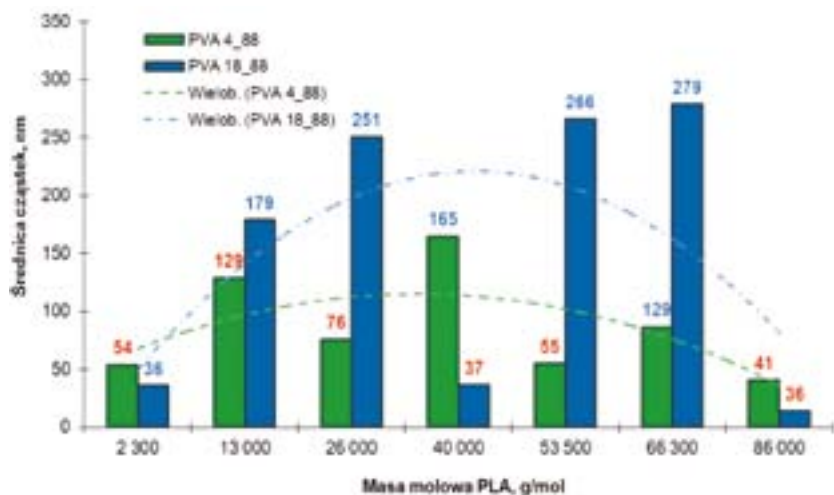


Fig. 6. Effect of the average PLA and PVA molecular mass on the size of polylactide spheres (5 mL solution of the polymer, temperature 25°C, agitation speed of 600 rpm)

Rys. 6. Zależność rozmiaru sfer polilaktydowych od średniej masy molowej PLA i PVA (10 mL roztworu polimeru, temp. 25°C, szybkość mieszania 600 rpm)

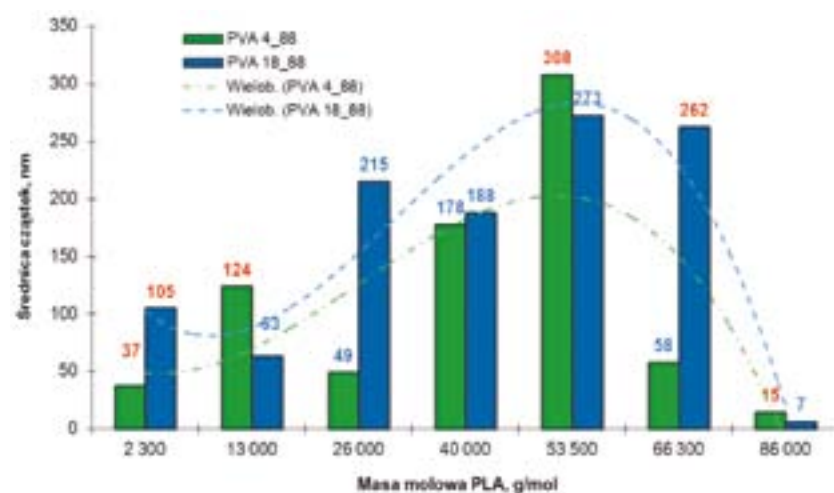


Fig. 7. Effect of the average PLA and PVA molecular mass on the size of polylactide spheres (5 mL solution of the polymer, temperature 25°C, agitation speed of 1200 rpm)

Rys. 7. Zależność rozmiaru sfer polilaktydowych od średniej masy molowej PLA i PVA (5 mL roztworu polimeru, temp. 25°C, szybkość mieszania 1200 rpm)

cych sfer polimerowych zależy od masy molowej użytego surfaktantu (PVA M_w 30 000 i 130 000 g/mol). Zoptymalizowano warunki, tak aby możliwe było uzyskiwanie sfer o rozmiarach 15–200 nm, które wydają się być najcenniejsze. Można będzie podawać je w sposób iniekcyjny. Mogą być zastosowane jako nośniki leków, które ze względu na swój mały rozmiar będą pokonywać wszystkie bariery w organizmie ludzkim, a do tej pory były niedostępne dla mikrosfer. Ponadto, jako zbudowane z polimerów o małej średniej masie molowej, powinny one ulegać degradacji w stosunkowo krótkim czasie, bez konieczności przyspieszenia degradacji czynnikami zewnętrznymi (np. promieniowaniem).

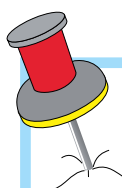
Badania zostały wykonane w ramach projektu „Biopol” POIG 01.01.02–10–025/09.

„Technologia otrzymywania biodegradowalnych poliesterów z wykorzystaniem surowców odnawialnych”. Finansowanie badań pochodziło ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, 2007–2013.

Otrzymano: 30-07-2013

LITERATURA

1. D.J. Sawyer, *Macromol. Symp.* 2003, **201**, 271.
2. D. Garlotta, *J. Polym. Environ.* 2001, **9**, nr 2, 63.
3. R.E. Drumright, P.R. Gruber, D.E. Henton, *Adv. Mater.* 2000, **12**, nr 23, 1841.
4. A.P. Gupta, V. Kumar, *Eur. Polym. J.* 2007, **43**, 4053.
5. M.F. Gonzalez, R.A. Ruseckaite, T.R. Cuadrado, *J. Appl. Polym. Sci.* 1999, **71**, 1223.
6. V.R. Sinha, A. Trehan, *Drug Deliv.* 2008, **6**, 365.
7. T.K. Dash, V.B. Konkimalla, *J. Control. Release* 2012, **153**, nr 1, 15.
8. M. Sobczak, E. Ołędzka, W.L. Kołodziejki, R. Kuźmicz, *Polimery* 2007, **52**, nr 6, 411.



UWAGA, OFERTA SPECJALNA!

Autorom, którzy opublikowali na łamach „Przemysłu Chemicznego” artykuły naukowe sponsorowane przez ich instytucje oferujemy specjalną, ulgową prenumeratę wersji papierowej naszego czasopisma w 2014 r. wraz z dostępem do internetowej bazy archiwalnych artykułów z lat 1993–2013 (3722 publikacje, prawie 24 tys. stron) w cenie 100,- zł brutto.

Oferta dotyczy osób fizycznych, których artykuły opublikowaliśmy w 2013 r. lub których prace oczekują na druk w tym trybie w 2014 r.

Zamówienia proszę kierować na adres:

przemyslchemiczny@sigma-not.pl lub kolportaz@sigma-not.pl

