

文章编号: 1003-9015(2008)05-0785-06

嵌段材料的分子量对PLGA-mPEG载药微球降解和释药行为的影响

李 近, 蒋国强, 丁富新
(清华大学 化学工程系, 北京 100084)

摘 要: 改变嵌段材料PLGA-mPEG亲、疏水端的分子量, 通过体外降解和释药实验, 考察材料性质对PLGA-mPEG载药微球的性质、降解以及释药行为的影响。当亲水链段mPEG较短时, PLGA-mPEG材料疏水链段的分子量越高, 微球对药物包封率越高; 微球的降解取决于材料的性质和水渗入的速度, 亲水链段mPEG的引入增强了微球的吸水性, 加速了材料的水解, 释药速率相应提高, 低分子量mPEG加速水解的效应更明显; 但mPEG对微球有增塑作用, 使微球在降解过程中维持了一定机械强度和完整形态, 降低了降解后期微球崩解造成药物突释的风险。

关键词: PLGA-mPEG; 微球; 药物控释; 分子量; 降解

中图分类号: R944.9

文献标识码: A

Effects of Molecular Weight of Blocks on *in vitro* Degradation and Drug Release Performance of PLGA-mPEG Microparticle

LI Jin, JIANG Guo-qiang, DING Fu-xin
(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The degradation and drug release profiles of poly (*dl*-lactide-co-glycolic acid) – methoxypoly (ethyleneglycol) (PLGA-mPEG) microparticles were investigated by altering the molecular weights (M_w) of both PLGA and mPEG chains through *in vitro* test. Higher encapsulation efficiency was achieved with higher PLGA molecular weight but lower mPEG molecular weight. The degradation of microparticles depends on the properties of polymer and the penetrating rate of water. The incorporation of hydrophilic mPEG chains acting as a surface modifier of hydrophobic PLGA network could enhance the permeation of water into the center of microparticles, and increase the polymer hydrolysis rate as well as drug release rate. But as the increase of mPEG molecular weight, both polymer hydrolysis rate and drug release rate of the PLGA-mPEG microparticles will be reduced. However, the incorporation of hydrophilic mPEG chains plasticizes the PLGA polymer, promotes the mechanical intensity of the microparticles and maintains the shape of PLGA-mPEG microparticles during the whole degradation, which reduce the risk of severe drug release caused by microparticle collapse during degradation.

Key words: PLGA-mPEG; microparticle; controlled drug release; molecular weight; degradation

1 前 言

聚酯类材料如聚乳酸(poly (*dl*-lactide), PLA)、聚乳酸-羟基乙酸(poly (*dl*-lactide-co-glycolic acid), PLGA)具有良好的生物降解性和生物相容性, 不会对生物体造成伤害, 已在控缓释载药微球中获得了广泛的应用。采用PLA、PLGA作为载药微球、纳米粒的载体, 可以起到保护药物、增溶、提高生物利用度及靶向释药等作用^[1,2]。但是这两种材料的疏水性限制了其在药物载体领域中的发展。在PLGA分子链上引入亲水性聚乙二醇单甲醚(methoxypoly(ethyleneglycol), mPEG)链段, 形成PLGA-mPEG嵌段共聚物, 可以使材

收稿日期: 2008-01-09; 修订日期: 2008-04-19。

基金项目: 国家自然科学基金(20576057); 清华大学基础研究基金(JCqn2005033)。

作者简介: 李近(1981-), 女, 辽宁葫芦岛人, 清华大学博士生。通讯联系人: 丁富新, E-mail: dingfx@tsinghua.edu.cn

料具有两亲性质^[3],且可通过改变共聚物分子量和组成调节材料的理化性质,达到控制其降解速度、改善其释药速率的目的^[4]。而且mPEG作为一种水溶性高分子材料,分子链柔性好、活动性高,同样具有良好的生物相容性,在体内不降解,可直接被排出体外。近年来国内外对PLGA-mPEG材料的关注很多,但主要集中于材料的制备^[5,6]、材料的理化性质分析^[7]、以及PEG对微球或纳米粒载体在体内循环的影响^[8,9],而有关微球载体及其降解和释药行为的基础理论研究报道却很少。这使得目前对微球释药速率控制手段匮乏,增加了制备和筛选成本。对于生物可降解型载药微球来说,其释药行为受控于载体材料的降解,而载体材料的组成性质是影响微球降解的重要因素之一。因此,研究材料的组成对微球降解过程的影响,具有重要意义。

本文以甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)作模型药物,制备载药微球,通过改变嵌段材料PLGA-mPEG亲、疏水端的分子量,考察对PLGA-mPEG载药微球性质、降解以及释药行为的影响,并进行相应的理论分析。

2 材料与实验方法

2.1 药品和材料

PLGA-mPEG (PLGA, $M_w = 50k/80k/84k/110k$, LA:GA=75:25(摩尔比); mPEG, $M_w = 3k/5k$)和PLGA($M_w = 80k$)(山东济南岱罡生物科技有限公司), MTX(湖北展望化学药业有限公司)。mPEG($M_w = 3k/5k$)标准品(Alfa Aesar, US)。聚苯乙烯标准品($M_w = 1k \sim 70k$, Fluka, US)。二氯甲烷等其它药品及试剂均为分析纯。

2.2 微球制备

采用乳化溶剂挥发法制备微球。具体过程如下:将聚酯材料溶于定量二氯甲烷溶液中,按一定药材比例投入MTX,充分混匀。将混悬液在一定搅拌速度下滴加到一定浓度的PVA水溶液中进行乳化,之后于磁力搅拌下,挥发有机溶剂4~5 h。抽滤法收集固化后微球,蒸馏水洗涤三次,再用甘露醇(质量分数30%)作为冻干保护剂进行洗涤,避免冻干过程中造成微粒的形态破坏。微粒经冷冻干燥,置于干燥器内保存。

2.3 微球性质的表征

包封率:称取10 mg载药微球,完全溶解于二氯甲烷中,再采用PBS缓冲溶液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7.4)萃取。采用分光光度法测定溶液中的药物浓度,按照下式计算微球的包封率(Encapsulation efficiency, EE):

$$EE = \Delta D / DT$$

其中 ΔD 为微球中实际药物含量, DT 为总投药量。

吸水率:称取一定量空白微球置于一定量PBS缓冲液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7.4),定时抽滤回收,称量湿重。吸水率=微球湿重/微球干重。

微球的表面形态特征采用电子扫描显微镜(SEM, JSM 7401F, JEOL Ltd., Japan)观察;微球的平均粒径采用动态光散射粒度仪(Malvern Mastersizer 2000, Worcestershire, UK)测定。

2.4 微球体外释放实验

体外释放实验在恒温水浴振荡器(HZS21, 哈尔滨东联)中进行,转速 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,温度 37°C 。将60 mg载有MTX的微球置于PBS缓冲液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 7.4),定时取样,并补充新鲜缓冲液。采用分光光度法(6010紫外可见分光光度计,安捷伦上海分析)测定取样中MTX的含量,绘制累积释放曲线。MTX检测波长305 nm,浓度在 $2.5 \sim 50.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内具有良好线性,相关系数 $r = 0.9999$ 。释放液中mPEG的检测按文献[10]中的方法。

2.5 聚合物平均相对分子量检测

采用凝胶渗透色谱法测定聚合物平均相对分子量 M_w ,洗脱溶剂为四氢呋喃,示差折光检测器(RID-10A, Shimadzu, Japan),校正物质为聚苯乙烯。

3 结果与讨论

3.1 材料分子量对微球性质的影响

采用溶剂挥发法制备微球,乳化和溶剂挥发过程是决定微球性质的两个重要因素。而材料的黏度和

亲水性会影响乳化和挥发过程,进而影响微球性质。如表1,材料的特性黏度 $[\eta]$ 随PLGA分子量提高而显著增加,但受mPEG分子量影响较小。在乳化过程中,相同乳化转速条件下,油相黏度越大,制得的微球粒径越大。PLGA嵌段mPEG后,亲水性增强,当乳滴界面张力相同时,制得的微球粒径比PLGA微球略大。

表1 不同材料嵌段分子量对微球性质的影响
Table 1 Effects of molecular weight of blocks on microparticle properties

Sample	M_w (PLGA)	M_w (mPEG)	$[\eta] / \text{dL} \cdot \text{g}^{-1}$	Mean size $\pm$ S.D. / μm	EE / %
A	50k	none	0.191	46 $\pm$ 10	66.43 $\pm$ 3.32
B	50k	3k	0.203	48 $\pm$ 20	76.12 $\pm$ 2.45
C	81k	3k	0.319	53 $\pm$ 12	82.65 $\pm$ 3.37
D	81k	5k	0.337	53 $\pm$ 21	78.81 $\pm$ 2.86
E	84k	3k	0.323	58 $\pm$ 16	81.33 $\pm$ 1.35
F	110k	3k	0.527	78 $\pm$ 29	85.24 $\pm$ 3.98

共聚物在乳化后,会在O/W界面形成一个分子层^[11],分子层的稳定性决定药物向外水相扩散的难易程度。mPEG在O/W界面上向外水相伸展,进一步增强了分子层的稳定性,有效阻止了药物向外水相的流失。同时,PLGA嵌段后结晶度和固化速度降低,在溶剂挥发过程中,药物更容易在乳滴内部均匀分散。因此,嵌段材料所制备的微球均具有较高的包封率。但随着mPEG分子量的提高,分子链间的空间位阻增大,共聚物分子层的稳定性降低,从而导致包封率降低。微球的包封率也受到PLGA分子量的影响。PLGA分子链越长,对药物的缠绕越紧密,包封效果越好。

3.2 材料分子量对微球降解动力学的影响

微球的降解是由于水性介质通过孔隙通道以及分子链间隙进入聚合物载体,发生酯键的水解。材料从高分子链断裂成低分子链产物,进而水解为乳酸等小分子单体。随着小分子单体的不断流失,微球逐渐溶蚀崩解,直至完全消失。因此,微球的降解主要取决于载体材料的性质以及水分子的渗入速度。

3.2.1 mPEG分子量的影响

以PLGA($M_w=80\text{k}$,LA:GA=75:25)嵌段不同分子量mPEG制备微球,进行为期6周的体外降解实验。研究表明,聚酯类材料分子量的变化遵循假一级变化模式^[12]:

$$M_w(t) = M_{w0} e^{-k_{\text{degr}} t} \quad (1)$$

式中, M_{w0} 为降解前的材料分子量。 k_{degr} 为假一级降解速率常数。以 $\ln[M_w(t) / M_{w0}] - t$ 作图,如图1所示,并将实验数据线性回归拟合,由直线斜率可以求出微球载体材料的降解速率常数 k_{degr} ,见表2。

由表2可知,PLGA-mPEG微球分子量变化快于PLGA微球。且当mPEG分子量较低时,分子量的降低的速率更快。从吸水曲线来看(图2),mPEG亲水链的引入,增强了聚合物材料的吸水性,使得酯键水解速度提高。但较高分子量的mPEG增加了空间位阻,对水分子的摄取能力也有所降低。因此,宏观表现为聚合物分子量的降低速率随着mPEG高分子链的引入加快,但随着mPEG链长的增加又呈现减慢的趋势。

表2 图1中 $\ln(M_w(t) / M_{w0}) - t$ 的线性拟合结果
Table 2 Linear fitting of $\ln(M_w(t) / M_{w0}) - t$ in Fig.1

M_w (mPEG)	k_{degr}	r^2
5k	0.0190	0.94
3k	0.0253	0.92
0k	0.0072	0.90

SEM观察已降解微球表面形貌特征,如图3所示。降解前,PLGA-mPEG微球表面被mPEG链缠绕覆盖,PLGA微球则呈现光滑的表面。降解2周后,PLGA-mPEG微球的表

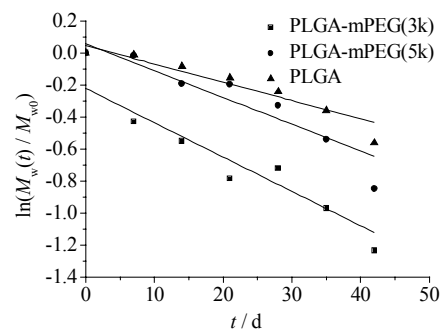


图1 不同嵌段 mPEG 分子量的微球 $\ln(M_w(t) / M_{w0})$ 随时间 t 的变化及拟合直线

Fig.1 Dependence of $\ln(M_w(t) / M_{w0})$ on degradation time with different mPEG chain lengths
Dot: experimental. Line: regressed

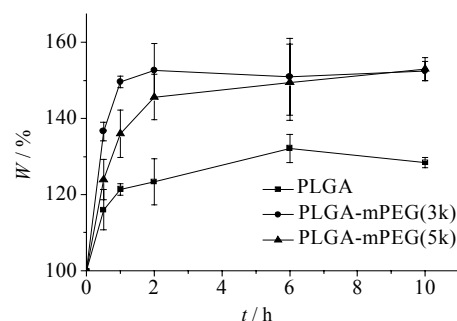


图2 不同嵌段 mPEG 分子量微球的吸水曲线
Fig.2 Water uptake profiles of PLGA-mPEG microparticles with different mPEG chain lengths

面开始出现一定数量的孔洞, PLGA微球也有孔洞出现。降解第6周, PLGA微球出现明显裂痕, 有崩解趋势, 但此时药物并未释放完全。而PLGA-mPEG微球直到释药完全, 外观仍维持较好的形态, 只是表面形成更多的孔隙。这可能是因为PLGA分子链中引入的亲水性mPEG链段柔软且构型易变, 起到了增塑剂的作用, 使得PLGA分子链的结晶度降低, 柔性增大。嵌段mPEG的分子量对微球降解过程中形态变化影响不大, mPEG3k和mPEG5k微球的外观形态相似(照片未显示)。

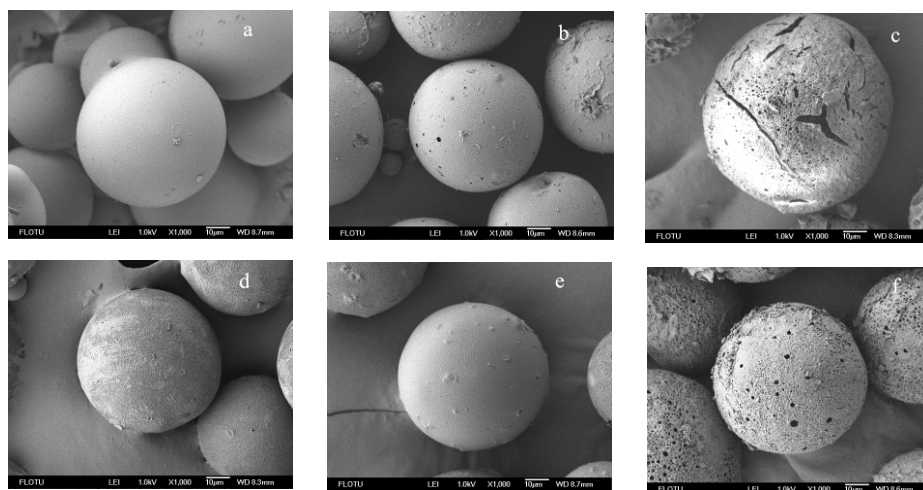


图3 PLGA微球和PLGA-mPEG微球在不同降解时期的扫描电镜照片 $\times 1000$ 。a、b、c分别为PLGA微球降解前, 降解2周和降解6周的照片。d、e、f分别为PLGA-mPEG微球降解前, 降解2周和降解6周的照片

Fig.3 SEM photographs $\times 1000$ of PLGA-mPEG microparticles at different incubation times in PBS (pH 7.4, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) at 37°C . a, b and c show images of PLGA microparticles before incubation, after 2 weeks incubation and after 6 weeks incubation, respectively. d, e and f show images of PLGA-mPEG microparticles before incubation, after 2 weeks incubation and after 6 weeks incubation, respectively.

3.2.2 PLGA分子量的影响

保持嵌段mPEG分子量为3k, 比较PLGA的分子量对微球降解的影响, 见图4。按图4由式(1)计算微球的 k_{degr} , 列于表3。PLGA的分子量越高, 降解过程中分子量降低的速率越快。但与PLGA分子量提高的幅度相比, 材料分子量降低的速率并未呈现相同幅度的增加: PLGA(84k)的 k_{degr} 将近是PLGA(50k)的2倍, 但仅稍低于PLGA(110k)的分子量降低速率。

进一步分析降解过程中mPEG的累积释放量, 发现PLGA的分子量越高, mPEG的释放速率越低, 见图5。在微球制备过程中, 会有一部分的mPEG分子链被PLGA分子链缠绕在微球内部。mPEG和PLGA中

表3 图4中 $\ln(M_w(t)/M_{w0})-t$ 的线性拟合结果

M_w (PLGA)	k_{degr}	r^2
50k	0.0188	0.94
84k	0.0317	0.97
110k	0.0321	0.99

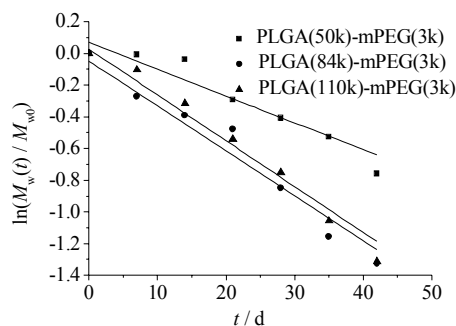


图4 不同嵌段PLGA分子量的微球 $\ln(M_w(t)/M_{w0})$ 随时间 t 的变化及线性拟合直线

Fig.4 Dependence of $\ln(M_w(t)/M_{w0})$ on degradation time for microparticle with different PLGA chain lengths
Dot: experimental. Line: regressed

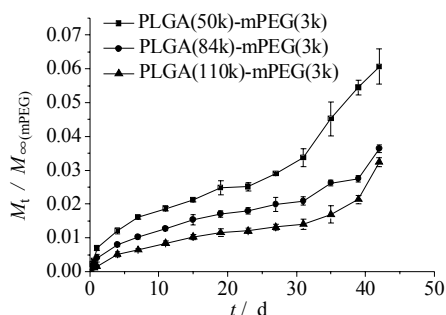


图5 不同嵌段PLGA分子量的PLGA-mPEG微球中mPEG释放曲线

Fig.5 mPEG liberation from PLGA-mPEG microparticles with different PLGA chain lengths, as a function of incubation time

乳酸单体间的键合力较弱, 易受到水分子的攻击而水解释放, 其释放情况可以表明载体对水分子的摄取程度。相同分子量的mPEG对水分子的摄取能力是相当的。由于聚合物酯键的水解具有随机性, 高分子链越长, 被水分子攻击的位点就越多, 因而分子量下降较快。但另一方面, 当PLGA具有较长的分子链时, 高分子链的缠绕阻碍了水分子的渗入, 因此mPEG的释放较慢。由于水分子的缓慢渗入, 使得水解的速度相比低分子量PLGA进行得缓慢, 因此表现出PLGA分子量越高, 分子量降低速率越快, 但是降解幅度却有所衰减的现象。

3.3 材料分子量对微球释药动力学的影响

图6、7分别为改变PLGA分子量和mPEG分子量时微球的释药曲线。释药完全的曲线均呈现明显的三个阶段: 起始的突释、中期的缓慢释放、以及后期释药速率的突然增加, 直至药物的完全释放。由释药曲线分析, 随着PLGA分子量的提高, 药物释放越缓慢, PLGA50k和PLGA84k的微球到第6周已经释药完全, 而PLGA110k的微球仅释放了40%左右; PLGA-mPEG微球比PLGA微球的释药速率快, 但mPEG5k的释药速率要慢于mPEG3k的释药速率。

结合材料的降解行为, 可以发现, 药物释放与载体材料的吸水能力和降解行为具有很大的相关性。材料吸水能力越强, 材料降解速度越快, 药物释放越快。对于微球体系而言, 药物和水性介质是通过载体孔隙以及高分子链间隙的扩散实现药物的释放, 而材料的降解增强了药物以及聚合物降解产物的自由活动空间, 为介质的迁移提供了更多的传递通道, 因此直接影响到药物的释放情况。

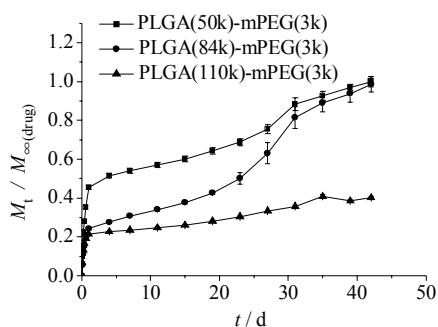


图6 不同嵌段 PLGA 分子量的 PLGA-mPEG 微球在 37℃ 的 PBS (pH 7.4, 0.1 mol·L⁻¹) 的 MTX 释药曲线

Fig.6 In vitro release profile of MTX-loaded PLGA-mPEG microparticles with different PLGA chain lengths, when incubated in PBS solution (pH7.4, 0.1 mol·L⁻¹) at 37℃

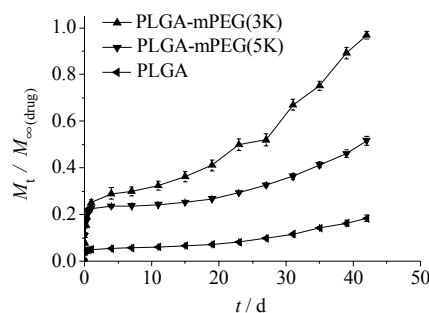


图7 不同嵌段 mPEG 分子量的 PLGA-mPEG 微球在 37℃ 的 PBS (pH 7.4, 0.1 mol·L⁻¹) 的 MTX 释药曲线

Fig.7 In vitro release profile of MTX-loaded PLGA-mPEG microparticles with different mPEG chain lengths, when incubated in PBS solution (pH7.4, 0.1 mol·L⁻¹) at 37℃

4 结 论

嵌段材料的分子量对PLGA-mPEG微球的载药特性、降解和释药行为有显著影响。当亲水链段mPEG较短时, PLGA-mPEG材料疏水链段的分子量越高, 微球对药物包封率越高; 微球的降解取决于材料的性质和水渗入的速度, 亲水链段mPEG的引入增强了微球的吸水性, 加速了材料的水解, 释药速率相应提高, 低分子量mPEG加速水解的效应更明显; 但mPEG对微球有增塑作用, 使微球在降解过程中维持了一定的机械强度和完整的形态, 降低了降解后期微球崩解造成药物突释的风险, 对提高微球临床使用的安全性具有重要意义。

符号说明:

EE — 微球包封率, %
 k_{degr} — 分子量降解速率常数
 $M_t / M_{\infty}(\text{drug})$ — 药物累积释放百分比, %
 $M_t / M_{\infty}(\text{mPEG})$ — mPEG 累积释放百分比, %

M_w — 材料分子量
 r^2 — 线性相关系数
 W — 吸水率, %
 $[\eta]$ — 材料的特性黏度, dL·g⁻¹

参考文献:

- [1] ZHANG Lei(张磊), YANG Song(杨松), GE Zhi-qiang(葛志强) *et al.* Study on the preparation of recombinant human α -2b interferon slowly releasing microcapsules and its *in-vitro* release properties(重组 α -2b干扰素缓释微囊制备工艺及体外释药过程研究) [J]. **J Chem Eng of Chinese Univ**(高校化学工程学报), 2004,18(5): 628-632.
- [2] Kumar N, Ravikumar M N V, Domb A J. Biodegradable block copolymers [J]. **Adv Drug Deliv Rev**, 2001, 53(1): 23-44.
- [3] Zhou S, Liao X, Li X *et al.* Poly-D,L-lactide-co-poly(ethylene glycol) microspheres as potential vaccine delivery systems [J]. **J Control Release**, 2003, 86(2-3): 195-205.
- [4] Mallardé D, Boutignon F, Moine F *et al.* PLGA-PEG microspheres of teverelix: influence of polymer type on microsphere characteristics and on teverelix *in vitro* release [J]. **Int J Pharm**, 2003, 261(1-2): 69-80.
- [5] Jeong B, Bae Y H, Kim S W. Biodegradable thermosensitive micelles of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers [J]. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 1999,16(1-4): 185-193.
- [6] Luo W J, Li S M, Bei J Z *et al.* Synthesis and characterization of Poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol) multiblock copolymers [J]. **J Appl Polym Sci**, 2002, 84(9): 1729-1736.
- [7] Penco M, Marcioni S, Ferruti P *et al.* Degradation behaviour of block copolymers containing poly(lactic-glycolic acid) and poly(ethylene glycol) segments [J]. **Biomaterials**, 1996, 17(16): 1583-1590.
- [8] Fang C, Shi B, Pei Y Y *et al.* *In vivo* tumor targeting of tumor necrosis factor- α -loaded stealth nanoparticles: Effect of MePEG molecular weight and particle size [J]. **Eur J Pharm Sci**, 2006, 27(1): 27-36.
- [9] Lee C M, Choi Y, Huh E J *et al.* Polyethylene glycol (PEG) modified 99mTc-HMPAO-liposome for improving blood circulation and biodistribution: The effect of the extent of PEGylation [J]. **Cancer Biother Radio**, 2005, 20(6): 620-628.
- [10] Avgoustakis K, Beletsi A, Panagi Z *et al.* PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: *in vitro* nanoparticle degradation, *in vitro* drug release and *in vivo* drug residence in blood properties [J]. **J Control Release**, 2002, 79(1-3): 123-135.
- [11] Rosca I D, Watari F, Uo M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation [J]. **J Control Release**, 2004, 99(2): 271-280.
- [12] Siepmann J, Faisant N, Akiki J *et al.* Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release: experiment and theory [J]. **J Control Release**, 2004, 96(1): 123-134.