

# 改良自乳化溶剂挥发法制备 MePEG - PLGA 纳米粒的研究

张 勇<sup>1</sup>, 袁 超<sup>1</sup>, 焦 举<sup>1</sup>, 沈 辉<sup>2</sup>

(1. 中山大学 附属第三医院, 广东 广州 510630; 2 中山大学 工学院, 广东 广州 510006)

**摘要:** 对改良自乳化溶剂挥发法制备甲氧基封端的聚乙二醇 - 聚乳酸聚乙醇酸嵌段聚合物 (MePEG - PLGA) 纳米粒的工艺进行优化, 并对纳米粒子加以表征。以形态、粒径为指标, 采用正交设计筛选出比较理想的制备工艺。以扫描电镜 (SEM) 和动态光散射粒度分析仪 (DLS) 对纳米粒的形态、大小和 zeta 电位进行研究。优化的制备方案: 丙酮与乙醇体积比为 3 : 3, MePEG - PLGA 30 mg, 聚乙烯醇 (PVA) 含量为 3%, 有机相与水相体积比为 1 : 10。所得纳米粒为球形粒子, 分布较均匀, 平均粒径 118.9 nm。zeta 电位为 - 1.7 mV。改良自乳化溶剂挥发法适于 MePEG - PLGA 纳米粒子的制备。

**关键词:** 聚乳酸聚乙醇酸共聚物; 聚乙二醇; 纳米粒; 自乳化溶剂挥发法

**中图分类号:** O766.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2008)09 - 0960 - 04

## Preparation of MePEG - PLGA Nanoparticles by Modified-self-emulsion Solvent Evaporation Method

ZHANG Yong<sup>1</sup>, YUAN Chao<sup>1</sup>, JIAO Ju<sup>1</sup>, SHEN Hui<sup>2</sup>

(1. The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;

2. School of Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** The technological process for the preparation of MePEG - PLGA nanoparticles by modified self-emulsion solvent evaporation technique was optimized with an orthogonal design of four factors and three levels. The shape, size, and zeta potential of the nanoparticles were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and differential light scattering (DLS), respectively. The optimal preparation conditions were as follows:  $V(\text{acetone}) : V(\text{ethanol}) = 3 : 3$ , MePEG - PLGA amount was 30 mg, PVA concentration was 3%;  $V(\text{organic phase}) : V(\text{water phase}) = 1 : 10$ . The resultant nanoparticles were spherical and uniform with a mean diameter of 118.9 nm. The zeta potential was of - 1.7 mV. The modified-SESD technique is appropriate for the preparation of MePEG - PLGA nanoparticles.

**Key words:** poly(*D,L*-lactide-co-glycolide); polyethylene glycol; nanoparticle; self-emulsion solvent evaporation

两性嵌段聚合物由于自组装胶束、纳米粒、纳米膜的理论研究而得到广泛关注<sup>[1-2]</sup>。聚乳酸聚乙醇酸共聚物 (PLGA) 是一种生物相容性好、可生物降解且广泛用于生物医药和生物工程的高分子。MePEG - PLGA 是由 PLGA 与甲氧基封端的聚乙二醇 (MePEG) 聚合而成的嵌段聚合物, 由于加入了亲水性强的 MePEG 分子, 使 MePEG - PLGA 成为一端亲水另一端疏水的两性分子。与 PLGA 纳米粒相比, MePEG - PLGA 纳米粒能够延长所载药物在体循环中的滞留时间<sup>[3]</sup>, 而 PLGA 纳米粒则因其疏水性迅速被网状内皮系统 (reticuloendothelial system, RES) 清除; 且由于 MePEG - PLGA 纳米粒粒径较小, 已经成为一种很有潜力的药物载体。

文献已报道很多聚合物纳米粒子的制备方法, 包括: 纳米共沉淀法、盐析法、胶束形成法等<sup>[4-5]</sup>。但这些方法由于各种原因在实际应用中受到很大的限制。比如: 制备中需使用二氯甲烷 (dichloromethane, DCM)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 等有毒的有机溶剂; 需要高能设备 (均质器、超声

收稿日期: 2008 - 03 - 14; 修回日期: 2008 - 04 - 23

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (200501697); 广州市科技计划资助项目 (2007Z3 - E0201)

第一作者: 张 勇 (1968 - ), 男, 安徽怀远人, 副教授, 博士, Tel: 020 - 85252304, E - mail: ychsysu@yahoo.com.cn

细胞破碎仪等); 盐析法中使用的盐溶液往往与生物活性分子不相容; 胶束形成法很难用于大规模制备聚合物纳米粒。改良自乳化溶剂挥发方法(modified-SESD)由 Murakami 等<sup>[6]</sup>首次报道用于制药, 将 PLGA 溶于丙酮与乙醇的混合溶液, 取代了 SESD 方法中常用的丙酮、二氯甲烷混合溶液。这样纳米粒子制备过程中既不使用 DCM, 降低了毒性; 又不使用高能设备如均质机、超声乳化设备等, 因此聚合物纳米粒子的大规模制备成为可能。目前采用此法制备 MePEG - PLGA 嵌段聚合物纳米粒的报道尚不多见。

本研究的目的在于优化 modified-SESD 法制备 MePEG - PLGA 纳米粒子的工艺, 并采用扫描电子显微镜(SEM)、动态光散射粒度分析(DLS)对其形态和表面性质进行表征, 为其作为药物载体, 特别是为构建安全有效的基因传输系统奠定基础。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

聚乙烯醇(PVA,  $M_r = 37$  ku, 美国 Sigma 公司); 甲基封端的聚乙二醇 - 聚乳酸聚乙二醇酸嵌段聚合物(MePGE - PGLA,  $M_r = 23$  ku, MePEG 嵌段  $M_r = 5$  ku, 山东岱罡生物科技有限公司定制); 丙酮、乙醇均为分析纯。TGL-20M 冷冻离心机(湖南凯达科学仪器公司); ZFQ-85A 真空旋转蒸发仪(上海医械专机厂); FEIQUANTA 600 扫描电镜(美国 FEI 公司); Zetasizer Nano ZS90 激光粒度测定仪(英国 Marven 公司); Equinox55 傅立叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司); DSC-204 差示扫描量热仪(德国 Netzsch 公司)。

### 1.2 MePEG - PLGA 纳米粒子的制备

采用 modified-SESD 法制备 MePEG - PLGA 纳米粒子, 室温下将一定量的 MePEG - PLGA 溶于 3 mL 丙酮 - 乙醇混合溶液中, 形成有机相。将此溶液在磁力搅拌(300 r/min)下缓慢滴入一定比例的 PVA 溶液, 形成 MePEG - PLGA 纳米粒子悬液, 有机相滴加完成后继续磁力搅拌 5 min 停止。将所得纳米粒溶液置入真空旋转蒸发仪, 于 40 °C 水浴中, 以 100 r/min 减压蒸发 40 min, 除去残留的丙酮和乙醇。而后将纳米粒溶液置入低温离心机, 以 2 000 r/min 离心 20 min 去除团聚的大粒子, 再以 12 000 r/min 离心 30 min 沉淀纳米粒, 弃去上清液, 去除残留的 PVA, 双蒸水重新悬起纳米粒子, 重复洗涤 3 次。将得到的纳米粒溶液冻干后保存。

## 2 结果与讨论

### 2.1 MePEG - PLGA 的表征

对 MePEG - PLGA 的结构进行傅立叶变换红外光谱(FTIR)分析, FTIR 测试中将聚合物溶于二氯甲烷中然后涂于 KBr 盐片上, 室温真空干燥后测试。结果见图 1, MePEG - PLGA 在  $1\ 762\ \text{cm}^{-1}$  处有强吸收峰, 是典型的直链羰基伸缩振动峰, 表明己内酯和丙交酯开环反应形成了直链酯键, 在  $2\ 700 \sim 3\ 100\ \text{cm}^{-1}$  区域 PLGA 链段中 CH 伸缩振动峰与 MePEG 中的 CH 伸缩振动峰发生重叠, 而 PEG 链段中的弯曲振动峰同时存在, 表明 MePEG 已与 PLGA 形成嵌段共聚物。

采用差示扫描量热(DSC)对 MePEG - PLGA 聚合物的热性质进行分析。将干燥 10 mg 样品在氮气( $\text{N}_2$ )中进行测试, 样品从  $-60 \sim 120$  °C 扫描 2 遍, 加热速率  $10\ \text{°C}/\text{min}$ 。由 MePEG - PLGA 的 DSC 曲线(见图 2), 可得到聚合物的玻璃转变温度(glass transition,  $T_g$ )始于  $17.9$  °C, 中间点为  $0.9$  °C, 结束于  $-16.1$  °C。

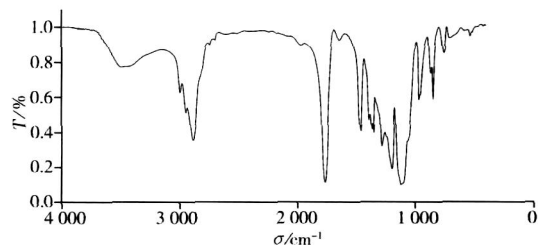


图 1 MePEG - PLGA 红外光谱图  
Fig. 1 FTIR spectrum of methoxypolyethylene glycol - poly(*D, L*- lactide-co-glycolide) (MePEG - PLGA) copolymer

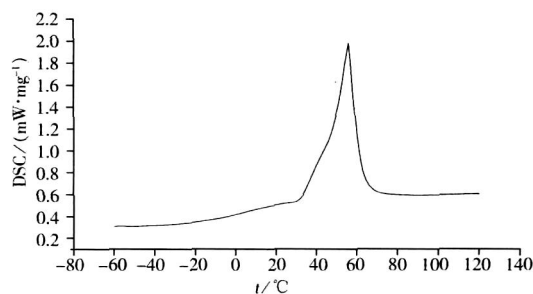


图 2 MePEG - PLGA DSC 曲线  
Fig. 2 DSC curve of MePEG - PLGA copolymer

## 2.2 正交设计优化纳米粒子的制备条件

选择影响纳米粒子制备的 4 个重要因素, 考察它们对最终纳米粒子粒径的影响, 同时观察粒子表面 zeta 电位的变化。因素为 A: 丙酮与乙醇的比例; B: MePEG - PLGA 用量; C: PVA 溶液的浓度; D: 有机相与外水相的比例。每个因素分 3 个水平, 因素水平表和实验结果见表 1, 对正交试验的结果进行极差分析, 分析结果见表 2。

表 1 实验安排表<sup>\*</sup>  
Table 1 L9(34) orthogonal experimental table<sup>\*</sup>

No	Level				Particle diameter d/nm
	Factor A	Factor B m/mg	Factor C /%	Factor D	
1	A1(3 1)	B1(30)	C1(3)	D1(1 5)	190.2
2	A1(3 1)	B2(60)	C2(2)	D2(1 10)	210.3
3	A1(3 1)	B3(90)	C3(0.5)	D3(1 15)	231.6
4	A2(3 2)	B1(30)	C2(2)	D3(1 15)	185.8
5	A2(3 2)	B2(60)	C3(0.5)	D1(1 5)	206.5
6	A2(3 2)	B3(90)	C1(3)	D2(1 10)	190.8
7	A3(3 3)	B1(30)	C3(0.5)	D2(1 10)	138.2
8	A3(3 3)	B2(60)	C1(3)	D3(1 15)	178.2
9	A3(3 3)	B3(90)	C2(2)	D1(1 5)	163.5

\* factor A, acetone to ethanol volume ratio(3 1, 3 2, 3 3); factor B, MePEG - PLGA amount(30, 60, 90 mg); factor C, PVA concentration(3%, 2%, 0.5%, by volume); factor D, organic phase to water phase volume ratio(1 5, 1 10, 1 15)

表 2 极差分析结果  
Table 2 Results of range analysis

Item <sup>*</sup>	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D
$k_1$	210.7	171.4	186.4	186.7
$k_2$	194.4	198.3	186.5	179.8
$k_3$	160.0	195.3	192.1	198.5
R	50.7	26.9	5.7	18.7

\*  $k$ : average value of parameter at the same level(各因素下所得粒径的均值); R: the largest difference between average value(均值的极差)

由表 2 可见, 各种制备因素的重要性顺序为 A > B > D > C。最佳制备条件为 A3B1C1D2, 即丙酮与乙醇体积比为 3 3、MePEG - PLGA 用量为 30 mg、PVA 的含量为 3%、有机相与外水相体积比为 1 10。

根据优化方案重复制备 3 批 MePEG - PLGA 纳米粒子样品, DLS 测定其平均粒径为 118.9 nm, zeta 电位 - 1.7 mV; SEM 进行形态观察, 见图 3。所得粒子为球形纳米粒子, 且粒径分布较均匀。

## 2.3 讨论

PLGA 纳米粒子在药物载体领域已得到广泛应用, 而近年来将其作为基因药物载体的研究成为热点。但是由于 PLGA 的疏水性较高, 在血液循环中易被单核巨噬系统识别、清除。聚乙二醇 (PEG) 为亲水性柔性分子, 与 PLGA 嵌段聚合后可以形成一端亲水、一端疏水的两亲性分子。以 PEG - PLGA 制备的纳米粒子, 由于 PEG 的亲水性, 可以在粒子表面形成构象云, 其空间位阻作用阻挡调理素 (opsonin) 的识别, 减少了 RES 清除, 因此可延长纳米粒子在血液循环中存在的时间, 从而提高药物输送效率。本文采用的 MePEG - PLGA 材料, 是在甲氧基封端的聚乙二醇 (MePEG) 的端羟基引发下, 以辛酸亚锡为催化剂, 与聚乳酸、聚乙醇酸开环聚合而成<sup>[7]</sup>。红外光谱分析表明 MePEG 与 PLGA 成功聚合。MePEG - PLGA 共聚物的 DSC 曲线表明, 其玻璃转化温度较 PLGA (PLGA 中聚乳酸与聚乙醇酸的摩尔比 75 25, 50 ~ 55) 有所下降。由此可见在 PL-

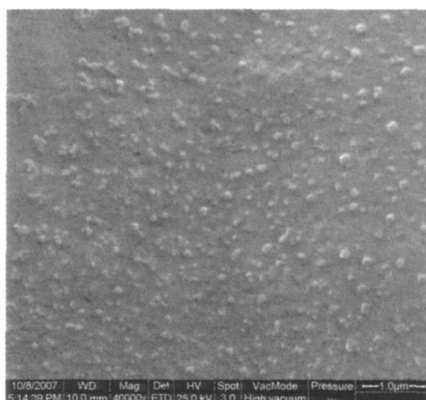


图 3 MePEG - PLGA 纳米粒 SEM 图  
Fig. 3 SEM image of MePEG - PLGA nanoparticles

GA 分子链中引入柔性 PEG 分子后, 在增加共聚物亲水性的同时, 也表明共聚物中的 MePEG 嵌段作为可塑剂降低了 MePEG - PLGA 的  $T_g$ <sup>[8]</sup>。

Modified - SESD 法制备纳米粒子是在沉淀法的基础上发展起来的, 使用溶剂多为丙酮 - 乙醇或丙酮 - 甲醇, 也称作二元溶剂分散法<sup>[9]</sup>。该法的特点: 一种溶剂丙酮和 MePEG - PLGA 亲和但不亲和 PVA; 另一种溶剂乙醇与 PVA 亲和但不亲和 MePEG - PLGA。将混有 MePEG - PLGA 的有机相在搅拌下注入 PVA 水相中, 有机溶剂迅速穿透界面, 显著降低了界面的张力, 而有机相中的聚合物迅速向界面迁移、沉淀, 最终形成纳米粒子。由于乙醇的极性大于丙酮, 优先从乳滴中扩散入水相, 其纳米粒子的产率远大于单独使用丙酮的沉淀法。

正交试验结果表明, 在 modified-SESD 法制备 MePEG - PLGA 纳米粒子中显著的影响因素是丙酮与乙醇的比例。丙酮 - 乙醇混合溶液中, 由于乙醇极性大, 其比例提高会加快乳滴的扩散速度, 有利于形成更小的乳滴。而由乳滴固化形成纳米粒子的大小取决于乳滴的大小和稳定性。由于 MePEG 嵌段的亲水性和柔顺性, 可在纳米粒子表层形成一层亲水的壳层, 阻止纳米粒子的团聚增加稳定性。因此该方法中 PVA 在水相中的浓度对粒径影响较小<sup>[10]</sup>; 且由于外围 MePEG 分子的保护, 可以避免 PLGA 带负电荷的羧基暴露, 因而与 PLGA 纳米粒比较可以大幅降低纳米粒子的表面电位<sup>[11]</sup>。有机相中 MePEG - PLGA 的浓度对纳米粒子大小也有一定的影响, 这主要是由于随着聚合物浓度的提高, 其粘度会增加, 不利于其在水相中的分散形成乳滴, 并且乳滴的稳定性下降、团聚几率增高。

采用 modified-SESD 法制备 MePEG - PLGA 纳米粒, 能够避免使用 DCM、DMSO 等有机溶剂对机体的损害, 并且经过正交设计优化制备方案后所制纳米粒相对均匀、粒径较小, 为进一步研究 MePEG - PLGA 纳米药物输送系统奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] B MAS-BEN IIA M, ROMEI N S, JNGNGER H E, et al PLGA - PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2004, 58(1): 1 - 6
- [2] DONG Yuancai, FENG Sishen Nanoparticles of poly(D,L-lactide)/methoxy poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) blends for controlled release of paclitaxel[J]. J Biomed Mater Res A, 2006, 78(1): 12 - 19
- [3] CHENG Jianjun, TEPLY B A, SHERIFI I, et al Formulation of functionalized PLGA - PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery[J]. Biomaterials, 2007, 28: 869 - 876
- [4] HU Yong, JIANG Xiquan, DNG Yin, et al Preparation and drug release behaviors of nimodipine-loaded poly(caprolactone)-poly(ethyleneoxide)-polylactide amphiphilic copolymer nanoparticles[J]. Biomaterials, 2003, 24(13): 2395
- [5] KM J H, KM Y S, PARK K, et al Self-assembled glycol chitosan nanoparticles for the sustained and prolonged delivery of antiangiogenic small peptide drugs in cancer therapy[J]. Biomaterials, 2008, 29(12): 1920 - 1930
- [6] MURAKAMI H, KOBAYASHI M, TAKEUCHI I, et al Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles[J]. Powder Tech, 2000, 107: 137 - 143
- [7] LI Yaping, PEI Yuanying, ZHANG Xianying, et al PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats[J]. J Controlled Release, 2002, 71(2): 203
- [8] 何曼君, 陈维孝, 董西侠. 高分子物理 [M]. 2 版, 上海: 复旦大学出版社, 2000: 44 - 46
- [9] 蒋新宇, 周春山, 唐课文. 二元溶剂分散法制备 PLA 和 PLGA 纳米粒 [J]. 应用化学, 2003, 20(8): 732 - 735
- [10] BA MARY Y, SRISA - ARDM. Preparation of nanoparticle colloids of methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(D,L-lactide): effects of surfactant and organic solvent[J]. Colloid Polym Sci, 2007, 285: 1521 - 1525
- [11] WANG Zhiqing, LU Wei, XU Huibi, et al Preparation and in vitro studies of stealth PEGylated PLGA nanoparticles as carriers for arsenic trioxide[J]. Chin J Chem Eng, 2007, (6): 795 - 801