

改进的自乳化溶剂挥发法制备的核/壳型 Me. PEG-PLA 纳米粒的表征

董 静¹, 刘明星¹, 杨亚江^{1*}, 徐辉碧¹, 杨祥良²

(华中科技大学 1. 化学系, 2. 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074)

摘要: 目的 表征甲氧基封端的聚乙二醇/聚乳酸共聚物(Me. PEG-PLA)纳米粒。方法 采用本体聚合合成了亲水改性的 Me. PEG-PLA, 用改进的自乳化-溶剂挥发法制备了该共聚物纳米粒。结果与结论 ¹HNMR 和 FT-IR 表征了共聚物结构为嵌段共聚物。原子力显微镜(AFM)对纳米粒的形态研究表明, 未经 PEG 改性的 PLA 纳米粒呈规整的球形, 而 PEG 改性的 PLA 纳米粒为核/壳结构, 外壳为亲水性的 PEG 链段, 内核为疏水的 PLA。激光粒度仪测定共聚物纳米粒的 zeta 电势为零, 进一步证明其核/壳结构。共聚物纳米粒的粒径在 70 ~ 160 nm, 并呈正态分布。

关键词: 聚乳酸; 聚乙二醇; 纳米粒; 自乳化-溶剂挥发法

中图分类号: R944

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2004)09-0677-04

Characterization of Me. PEG-PLA copolymer nanoparticles prepared by modified spontaneous emulsion-solvent evaporation

DONG Jing¹, LIU Ming-xing¹, YANG Ya-jiang^{1*}, XU Hui-bi¹, YANG Xiang-liang²

(1. Department of Chemistry, 2. Institute of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: **Aim** Characterization of poly (*D, L*-lactic acid)/monomethylether terminated/polyethylene glycol (Me. PEG-PLA) block copolymers nanoparticles. **Methods** Me. PEG-PLA block copolymers were prepared by bulk polymerization. A series of nanoparticles were made from Me. PEG-PLA block copolymer by modified spontaneous emulsion-solvent evaporation technique. **Results and conclusion** The structure of copolymer was performed by means of ¹HNMR and FT-IR. The morphological examination of nanoparticles was performed by means of atomic force microscope (AFM). Results indicated that nanoparticles exhibited a smooth spherulite and core-shell structure. The hydrophilic shell is consisted of PEG segments and hydrophobic core is consisted of PLA segments. Zeta potential of nanoparticles was zero and further indicated core-shell structure. The particle size and size distribution of nanoparticles were measured by laser light scattering technique. The effective particle size range was from 70 to 160 nm and showed a normal distribution.

Key words: poly (*D, L*-lactic acid); polyethylene glycol; nanoparticle; self-emulsion solvent evaporation

聚乳酸(PLA)是一种具有良好的生物相容性和生物降解性的聚合物, 并已用于医药领域。但 PLA 较差的水溶性限制了它的应用。亲水性的聚乙二醇

(PEG)具有良好的生理相容性, 在 PLA 分子链中引入 PEG 链段可极大改善 PLA 亲水性, 其共聚物纳米粒具有优良的长循环和缓控释性^[1, 2]。

适于 PLA 及其共聚物纳米粒的制备方法很多, 如溶剂蒸发法^[3]、复合乳液法^[4]和透析法^[5]等, 而乳化分散法由于对水溶性、脂溶性药物均适宜而被广泛采用。但是传统的乳化分散法由于使用有毒溶

收稿日期: 2003-09-14.

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2001AA218051).

* 通讯作者 Tel: 86-27-87547141, Fax: 86-27-87543632, E-mail: jyjiang@mail.hust.edu.cn

剂(如二氯甲烷、乙腈等),存在溶剂残留及药物包封率低等问题。Murakami 等^[6]改进了自乳化溶剂挥发法,以丙酮和乙醇代替了传统的丙酮和二氯甲烷,同时在水相中加入了表面活性剂聚乙烯醇 PVA,其产率和药物包封率都比较高。

本文采用常规的本体聚合方法合成了系列亲水改性的甲氧基封端的聚乙二醇/聚乳酸共聚物。对于该共聚物和 PLA 均聚物纳米粒的制备,本文在 Murakami 方法的基础上,进一步改进自乳化溶剂挥发法,通过在水相中加入高分子表面活性剂 poloxamer 188(环氧乙烷/环氧丙烷共聚物)代替传统的聚乙烯醇(PVA),用丙酮/乙醇代替有毒性的二氯甲烷,制备了 Me. PEG-PLA 共聚物纳米粒。这是考虑到有机相丙酮与 PEG-PLA 的亲合力比较大,而乙醇与 poloxamer 的亲合力比较大,这样把共聚物的有机溶液滴加到水相中时,共聚物易于分散在水相中。即使聚合物的浓度较大,也不会发生团聚。在水相中加入 poloxamer 的另一优点是在纳米粒形成时, poloxamer 与共聚物中的 PEG 亲和性好,可与 PEG 共同在纳米粒的表层形成一层亲水外壳,可以阻止纳米粒团聚,增加纳米粒的稳定性。

材料和方法

材料 聚乙二醇单甲氧基醚(Me. PEG, $M_r = 2000$, Aldrich)和 *D,L*-丙交酯(Aldrich)在使用前按文献^[7]方法纯化; poloxamer 188(沈阳药科大学集琦药业公司)、PLA(山东医疗器械研究所)、辛酸亚锡(Aldrich)等试剂均为分析纯。

Me. PEG-PLA 嵌段共聚物的合成 将丙交酯 3.27 g、聚乙二醇单甲氧基醚(Me. PEG) 1.0 g 和催化剂辛酸亚锡 18.4 mg 加入到安培管中,减压干燥 2 h 并充氮气除氧,封管后置 140 °C 油浴中反应 7 h,冷却后取出共聚物,溶于丙酮 10 mL 中,搅拌下将此溶液缓慢滴加到冷乙醚 75 mL 中,得到白色絮状沉淀,过滤,室温下水洗 20 min,除去游离的 Me. PEG。重复两次以纯化产物。室温下真空干燥 2 d,得白色粉末状产物,产率为 75%~80%。用乌氏粘度计测定了共聚物的特性粘数 $[\eta]$,由以下公式计算共聚物的分子量^[8]。

$$[\eta] = 1.63 \times 10^{-4} M_r^{0.73}$$

Me. PEG-PLA 和 PLA 纳米粒的制备 称取 Me. PEG-PLA 共聚物 100 mg 溶于丙酮 9 mL 中,再加入乙醇 6 mL,快速搅拌下将混合溶液滴加到含有 poloxamer 188 (1.0%) 的水 45 mL 中,滴加完毕,继

续搅拌 3~5 min,于 40 °C 减压除掉有机溶剂,升温到 70 °C 除去水,最后浓缩到 10 mL,得到澄清透明有微蓝色乳光的悬浮液。同样的方法制备 PLA 纳米粒。

¹H NMR 和 FT-IR DMX 500 型核磁共振波谱仪(Bruker)和 EQUINX55 型傅力叶变换红外光谱仪(Bruker)对共聚物的结构进行了表征。

原子力显微镜(AFM)和 zeta 电位/动态激光粒度分析仪测试 将共聚物纳米粒悬浮液用二次蒸馏水稀释 5 倍后置于 JY92-2D 超声波细胞粉碎机中分散均匀,取一滴该分散液置于固定在双面胶上的云母片上,室温凉干。用 SPA 400 型原子力显微镜(日本精工仪器公司)观察;用 Zeta PALS 无机/有机多功能 zeta 电位/动态激光粒度分析仪(Brook Haven)测定纳米粒的粒径、多分散指数和 zeta 电势。

结果

图 1 是共聚物的 ¹H NMR 谱图。 δ 1.52~1.60 是 PLA 的 -CH₃ 质子信号; δ 3.36 是 Me. PEG 的 -OCH₃ 质子信号; δ 3.60~3.67 是 Me. PEG 的 -CH₂ 质子信号; δ 5.14~5.22 是 PLA 的 -CH 质子信号;而 δ 4.3~4.4 是连接 Me. PEG 和 PLA 的 -COOCH₂ 质子信号。图 2 是共聚物的 FT-IR 谱图。3 451 cm⁻¹ 处的宽峰为共聚物端基-OH 的吸收峰;2 998 cm⁻¹ 和 2 946 cm⁻¹ 处的弱吸收峰为 -CH₃ 的伸缩振动吸收峰;1 757 cm⁻¹ 处的强峰为 C=O 的伸缩振动吸收峰;而在 1 192 cm⁻¹ 处的峰为 C-O 的伸缩振动吸收峰。

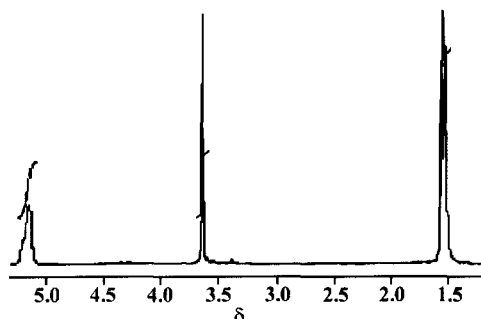


Figure 1 ¹H NMR spectrum of the Me. PEG-PLA copolymer

表 1 总结了 Me. PEG-PLA 纳米粒的粒径、多分散指数和 zeta 电位。

图 3 是 Me. PEG-PLA 纳米粒的粒径分布。图 4 是 Me. PEG-PLA 纳米粒的 zeta 电位。

图 5 是未经 PEG 改性的 PLA 均聚物纳米粒的三维 AFM 照片。图 6 为单个 ME. PEG-PLA 共聚物

纳米粒的二维与三维形貌照片。

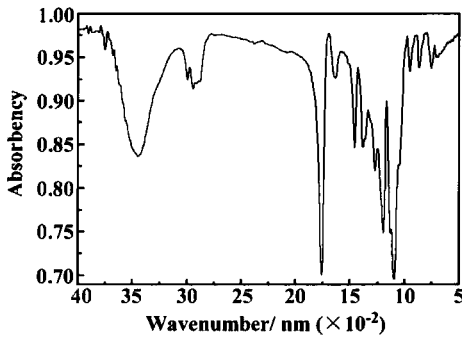


Figure 2 FT-IR spectrum of the Me. PEG-PLA copolymer

Table 1 Characterization of Me. PEG-PLA copolymer nanoparticles

Sample No.	Molecular weight of Me. PEG-PLA	Diameter of nanoparticles /nm	Index of poly-dispersion	Zeta potential
1	75 000	153 ± 3	0.260 ± 0.21	0
2	32 000	103.9 ± 2.4	0.222 ± 0.12	0
2A	32 000	114 ± 6	0.223 ± 0.10	0
2B	32 000	126 ± 4	0.200 ± 0.06	0
3	35 000	109.8 ± 2.2	0.167 ± 0.13	0
4	39 000	113 ± 5	0.207 ± 0.08	0

The copolymer concentration of sample 1, 2, 3, 4 is 1.0%. The concentration of sample 2A and 2B is 2.0% and 4.0%, respectively

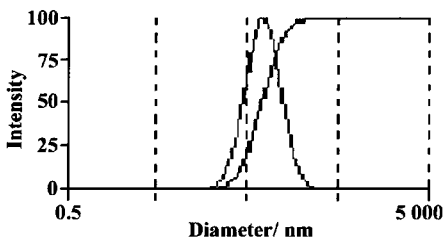


Figure 3 Diameter distribution of sample 2

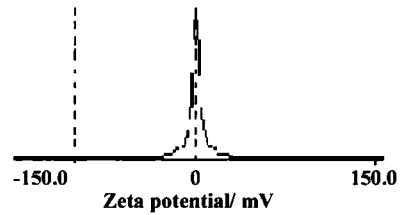


Figure 4 Zeta potential of sample 2

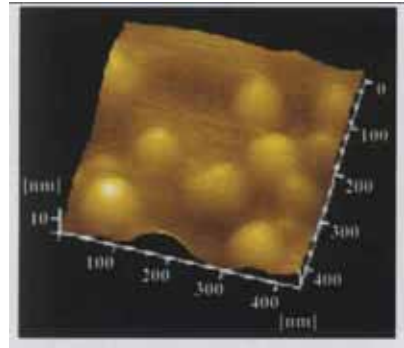


Figure 5 Atomic force microscope (AFM) of unmodified PLA nanoparticles (tridimensional)

讨论

所合成的 Me. PEG-PLA 共聚物在制备过程中,经乙醚沉淀和水洗已除去单体和 Me. PEG 均聚物。共聚物的结构由¹HNMR和FT-IR表征。¹HNMR数据表明 Me. PEG 与 PLA 已通过酯键形成嵌段聚合物。FT-IR测定结果也表明 Me. PEG 与 PLA 发生了酯化反应,其结构与¹HNMR测得的结构一致。

表1显示纳米粒的有效粒径在70~160 nm,并呈正态分布(图3)。随着聚合物分子量的增加,纳米粒的有效粒径逐渐增加,这可能是由于具有较大分子量的聚合物较难分散的缘故^[9]。

值得指出的是,所有 Me. PEG-PLA 纳米粒样品的 zeta 电势均为零(图4)。纯 PLA 纳米粒的表面存在带负电荷的 C=O 基团,因此在 pH 7.4 和低离

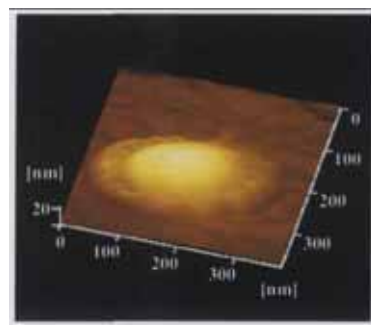
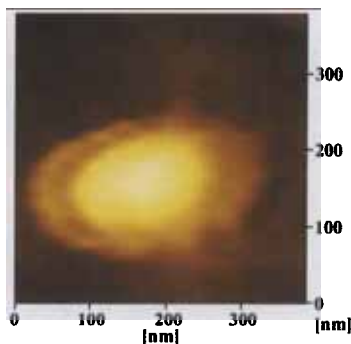


Figure 6 Atomic force microscope (AFM) of Me. PEG-PLA nanoparticles (left: bidimensional; right: tridimensional)

子强度下测得的 zeta 电势都是较大的负值,甚至达到 $-49.6 \text{ mV}^{[7,9]}$ 。但是经改性的 PEG-PLA 纳米粒的 zeta 电势却趋向于零,如非甲氧基封端的 PEG-PLA 纳米粒的 zeta 电势为 $-6.1 \text{ mV}^{[9]}$,而且随着 PEG 链段含量的增加或者 PEG 链长度的增加,纳米粒的 zeta 电势越来越接近零^[7,9,10]。显然,由于 Me. PEG 链段的亲水性,在 Me. PEG-PLA 纳米粒外面形成了一层中性的 PEG 层,有效地将带有负电荷的 C=O 基团屏蔽,从而降低了纳米粒的电负性。如果 PLA 链段完全被外层的 PEG 链段包覆,那么无论用何种非离子型表面活性剂,PEG-PLA 纳米粒的 zeta 电势都应该为零^[17]。本实验测定的 Me. PEG-PLA 纳米粒的 zeta 电势均为零,推断这一方面归因于 C=O 基团被 PEG 层屏蔽,另一方面也与所使用的 poloxamer 吸附在 PEG 层的外面,进一步屏蔽纳米粒有关。图 6 的核/壳结构纳米粒照片也印证了这一推断。

Me. PEG-PLA 纳米粒的外观形貌是通过原子力显微镜(AFM)观察。作为对比,图 5 是未经 PEG 改性的 PLA 均聚物纳米粒子的三维 AFM 照片,可以清晰看出纳米粒子呈规整的球体,由刻度标记估计粒径在 80 nm 左右。球体表面比较光滑,看不出核/壳结构。图 6 为单个 ME. PEG-PLA 共聚物纳米粒的二维与三维形貌照片。照片清晰显示纳米粒为典型的核/壳结构,粒径在 300 nm 左右。由于制备时纳米粒是分散在水中,粒子的外围包覆层应是由亲水性的 PEG 链段构成,而内核部分为疏水的 PLA 链段,内核部分粒径在 200 nm 左右。

所制备的纳米悬浮液样品在低温(4 °C)放置一个月未发现有沉淀析出或者出现团聚现象,而且实验测定其粒度基本上无变化,说明纳米粒稳定。这一方面是因为 PEG 链段增加了共聚物的亲水性,使纳米粒能够在水相中很好的分散;另一方面是因为 PEG 链段的空间位阻效应有效的阻止了纳米粒间的团聚。

References:

- [1] Kim SY, Ha JC, Lee YM. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)/poly(ϵ -caprolactone) (PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres: II. Thermo-responsive drug release behaviors [J]. *J Controlled Release*, 2000, **65**(3):345-358.
- [2] Hyuk SY, Park TG. Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA PEG block copolymer [J]. *J Controlled Release*, 2001, **70**(1):63-70.
- [3] Gömer T, Gref R, Michenot D, et al. Dellacherie, Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix [J]. *J Controlled Release*, 1999, **57**(3):259-268.
- [4] Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R, et al. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method [J]. *J Controlled Release*, 1998, **50**(1-3):31-40.
- [5] Jeon HJ, Jeong YI, Jang MK, et al. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics [J]. *Int J Pharm*, 2000, **207**(1-2):99-108.
- [6] Murakami H, Kobayashi M, Takeuchi H, 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] Tobío M, Sánchez A, Vila A, et al. The role of PEG on the stability in digestive fluids and *in vivo* fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2000, **18**:315-323.
- [8] Luan LB, Tang Y. Preparation and *in vitro* release of polylactic acid microspheres containing kitoprofen [J]. *J Chin Med Univ* (中国医科大学学报), 2000, **31**(2):99-101.
- [9] Riley T, Govender T, Stolnik S, et al. Colloidal stability and drug incorporation aspects of micellar-like PLA-PEG nanoparticles [J]. *Colloid and Surfaces, B: Biointerfaces*, 1999, **16**:147-159.
- [10] Govender T, Riley T, Ehtezazi T, et al. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2000, **199**:95-110.