

# PLGA/PEG 缓释微球的制备与载药性能的研究

汪求精 孙新林 祝爱萍 曾晨光 全大萍

**【摘要】** 目的 以不同组成丙交酯/乙交酯共聚物(PLGA)为载体,制备载牛血清白蛋白(BSA)聚合物微球,考察共聚物组成、浓度及混合聚乙二醇(PEG)对聚合物微球粒径、BSA 包封率和体外释放规律的影响。方法 采用水/油/水(W/O/W)双乳化溶剂挥发技术制备载 BSA 的 PLGA/PEG 聚合物微球。利用扫描电子显微镜观察聚合物微球表面形貌,激光动态粒度分析仪测定聚合物微球粒径,紫外分光光度法测定聚合物微球药物包封率和体外释放速率。结果 PLGA 共聚物中 GA 含量越高,聚合物微球粒径越大,释放速率越快。同时,PEG 的加入导致聚合物微球对 BSA 的包封率增加,最高达 88.22%,且释放速率也加快。采用双乳化溶剂挥发法制备的 BSA-PLGA/PEG 聚合物微球包封率较高、突释量较小、缓慢释放时间达 3 周以上并能维持较高药物浓度。结论 通过调整各组份的比例及添加 PEG,可以得到较高包封率和适当载药量的 BSA-PLGA/PEG 缓释微球。

**【关键词】** PLGA/PEG 缓释微球; 牛血清白蛋白; 双乳化溶剂挥发法; 控制释放

**【中图分类号】** R318.08 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)07-0674-04

**Preparation of PLGA/PEG microspheres and its sustained drug release property** WANG Qiu-jing\*, SUN Xin-lin\*, ZHU Ai-ping, ZENG Chen-guang, QUAN Da-ping. \*Department of Neurosurgery, Guangdong Neurosurgery Institute and Key Laboratory on Brain Function Repair and Regeneration, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

**【Abstract】** **Objective** To prepare PLGA/PEG microspheres for sustained release of bovine serum albumin (BSA), and evaluate the effect of the microsphere composition, proportion of the components and integration of PEG on the size, BSA encapsulation rate and in vitro BSA release properties of the microspheres. **Methods** BSA-loaded PLGA/PEG microspheres were prepared by water-in-oil-in-water double emulsions-solvent evaporation method (W/O/W). The morphology of the microspheres was observed with scanning electron microscope, the diameter was determined by Mastersizer 2000, and the encapsulation efficiency and in vitro BSA release were evaluated by UV spectrophotometry. **Results** Increased GA to LA ratio was associated with increased size of the microspheres and accelerated BSA release. The incorporation of PEG obviously increased the BSA encapsulation rate to as much as 88.22% with also increased BSA release rate. The BSA-PLGA/PEG biodegradable microspheres prepared was characterized by high encapsulation rate, low burst release, and slow BSA release for over 3 weeks at high drug concentrations. **Conclusion** BSA-PLGA/PEG microspheres with relatively high encapsulation efficiency and proper drug loading can be prepared by adjusting the parameters during the preparation process.

**【Key words】** PLGA/PEG microspheres; Bovine serum albumin; Double emulsions-solvent evaporation technique; Controlled release

自 20 世纪 90 年代初 Guglielmi 用电解脱铂金

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.07.007

基金项目:广东省科技计划项目(2007B031003011);广州市科技计划项目(2006J1-C0081)

作者单位:510282 广州,南方医科大学珠江医院神经外科,广东神经外科研究所,广东省脑功能修复与再生重点实验室(汪求精、孙新林);510275 广州,中山大学高分子研究所(祝爱萍、曾晨光、全大萍)

弹簧圈(GDC)栓塞治疗颅内动脉瘤以来,作为一种微侵袭治疗方法,已广泛用于颅内动脉瘤的栓塞治疗。用 GDC 治疗较小的窄颈动脉瘤效果十分明显。但是,由于目前所用的铂金弹簧圈属于相对生物惰性材料,动脉瘤栓塞入铂金弹簧圈后需要很长时间才能形成血栓。术后长期随访发现 GDC 栓塞治疗存在再通、增大和破裂问题<sup>[1]</sup>。而解决问题的关键在

于改进 GDC 的生物活性,促进栓塞材料的功能化。许多学者利用细胞外基质蛋白、生物可吸收聚合物、离子植入物等方法修饰弹簧圈表面来促进血栓形成、内皮细胞的迁移和增殖<sup>[2]</sup>。其中生物可吸收聚合物修饰的 GDC 更具有临床应用价值。生物可吸收聚合物属于高分子化合物,具有制备简单、容易控制的优点,如果加入某些细胞因子,利用药物控释技术对生长因子进行保护和控制释放,对于构建具有生物功能的栓塞材料具有重要价值。

聚乳酸(PLA)具有良好的生物相容性和可降解吸收性,在医学上得到广泛应用<sup>[3]</sup>。但 PLA 有较强的疏水性,在蛋白类药物控制释放应用中存在包封率较低、体内降解速率过于缓慢等不足。聚乙醇酸(PGA) 也具有较好的生物相容性和可降解吸收性,同时其在体内的降解速率较快。因此,采用丙交酯(LA)/乙交酯(GA)共聚物(PLGA)可控聚合物在体内的降解速率,加入生物相容性好的聚乙二醇(PEG)能改善材料亲水性,并能稳定蛋白<sup>[3,4]</sup>,可望获得对蛋白类药物释放具有可控性的材料。基于此,本研究采用不同摩尔比例 LA/GA 的 PLGA 共聚物,并添加一定量的 PEG,通过水/油/水(W/O/W)双乳化溶剂挥发技术<sup>[5]</sup>制备聚合物微球,并考察共聚物组成、浓度及添加 PEG 对聚合物微球粒径、牛血清蛋白(BSA)包封率及体外释放规律的影响。

## 材料和方法

### 一、材料与试剂

PLGA 共聚物由中山大学高分子研究所全大萍实验室提供。二氯甲烷(分析纯)、三氯甲烷(分析纯)、氯化钠(分析纯)、氯化钾(分析纯)、磷酸氢二钠(分析纯)、磷酸二氢钾(分析纯)均购于广州化学试剂厂。BSA(产品编号:ZLI-9027)购自北京中山生物技术有限公司。聚乙烯醇(PVA-205)购自日本KURARAY公司。PEG为进口分装。

### 二、共聚物特性粘度测试

乌氏粘度计测定不同摩尔比例 LA/GA 制得的 PLGA 共聚物特性粘度(摩尔比例分别为 85/15、75/15、50/50),溶剂为三氯甲烷,温度为 25℃,溶液浓度为 0.24 g/dL,计算公式: $\eta_r = t/t_0$ ;  $\eta_{sp} = \eta_r - 1$ ;  $[\eta] = [2(\eta_{sp} - \ln \eta_r)]^{0.5}/C$ 。

### 三、负载 BSA 的聚合物微球的制备

采用双乳化溶剂挥发技术<sup>[5]</sup>制备聚合物微球。将一定质量的 PLGA 共聚物分别溶于二氯甲烷中,搅拌下加入 BSA 水溶液,超声乳化 2 min 得到初乳液;将初乳液在快速搅拌条件下滴入到 5%的聚乙

烯醇(PVA)水溶液中,继续搅拌 2~3 min;然后将乳液倾入到 0.3%的 PVA 水溶液(含 5%NaCl),1800 r/s 转速下室温搅拌过夜,让溶剂挥发。将上述溶液冷冻离心,收集产品并用超纯水洗 4~6 次,冷冻干燥得聚合物微球粉末。

空白聚合物微球的制备方法与上述方法相同,只是初水相中不含 BSA。

### 四、聚合物微球的载药量和包封率的测定

测定采用紫外分光光度法。精确配制一系列不同浓度的标准液,于  $\lambda = 278 \text{ nm}$  处测定吸光度值(A),线性回归得到如下标准曲线: $Y = 0.00182 + 0.51349X$ ,  $R = 0.9996$ 。其中 Y 为 278 nm 处的 A 值, X 为 BSA 的质量浓度(mg/mL)。

取 10 mg 聚合物微球溶解于 1 mL 二氯甲烷中,室温静置 30 min。向上述溶液加入 10 mL PBS (pH7.4)缓冲溶液,振荡 2 min。混合液室温放置 1 h 至溶液分层。取水相在  $\lambda = 278 \text{ nm}$  处测定 A 值(UV-2000 紫外分光光度计,美国 UNICO 公司)。由 A 值换算成浓度,按以下公式计算载药量和包封率。载药量 = (实测负载的 BSA 质量/聚合物微球总质量) × 100%。包封率 = (实测负载的 BSA 质量/加入的 BSA 总质量) × 100%。

### 五、聚合物微球的粒度分析

使用英国马尔文仪器有限公司 Mastersizer 2000 激光动态粒度分析仪,将冷冻干燥后的聚合物微球分散到超纯水中按操作规程测试。测试条件:搅拌速率 1200 r/min,超声分散 12.5 s,介质为超纯水。

### 六、聚合物微球形貌观察

使用日本 Hitachi 公司 S-520 型扫描电子显微镜,将冷冻干燥的聚合物微球分散在扫描电镜样品台上,喷金后观察聚合物微球的表面形貌。

### 七、聚合物微球体外释放研究

取 30 mg 聚合物微球于试管中,加入 15 mL PBS(pH7.4)缓冲溶液,封口,置于 37℃恒温振荡器中,间隔一段时间取出 5 mL 溶液,离心后取上层清液在  $\lambda = 278 \text{ nm}$  处测定 A 值,同时补充 5 mL 新鲜 PBS 缓冲溶液。

## 结 果

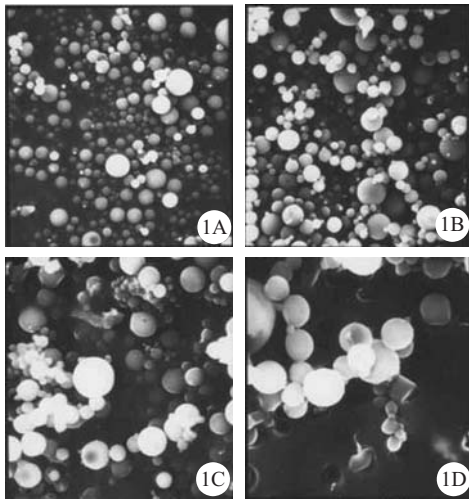
### 一、共聚物特性粘度

采用不同摩尔比例 LA/GA 制得的 PLGA 共聚物的粘度测试结果为: $[\eta]_{[PLGA(85/15)]} = 0.6417$ ,  $[\eta]_{[PLGA(75/15)]} = 1.0914$ ,  $[\eta]_{[PLGA(50/50)]} = 0.5684$ 。

### 二、聚合物微球的形貌

从扫描电子显微镜图中可以看出,采用双乳化

溶剂挥发技术和优化的实验条件, 所制得的 PLGA 聚合物微球大小分布均匀, 微球表面光滑, 分散性好, 基本不粘连。(图 1)



1A:PLGA(85/15) 聚合物微球扫描电镜图( $\times 2000$ );1B:PLGA(85/15)/PEG 聚合物微球扫描电镜图( $\times 2000$ );1C:PLGA(75/25)/PEG 聚合物微球扫描电镜图( $\times 2500$ );1D:PLGA(50/50)/PEG 聚合物微球扫描电镜图( $\times 5000$ )

图 1 PLGA 聚合物微球扫描电子显微镜图

Fig.1 Scanning electron micrographs of the PLGA microspheres

### 三、聚合物微球粒径大小

不同摩尔比例 LA/GA 和不同有机相浓度条件下制得的 PLGA/PEG 聚合物载药微球粒径大小见表 1。4 种聚合物载药微球粒径均在 2~6  $\mu\text{m}$  之间。

表 1 不同摩尔比例 LA/GA PLGA 聚合物载药微球粒径大小( $\mu\text{m}$ )

Tab.1 Size of the microspheres with different LA to GA ratios ( $\mu\text{m}$ )

有机相浓度	PLGA(85/15)/PEG	PLGA(75/25)/PEG	PLGA(50/50)/PEG	PLGA(85/15)
2%	-	-	-	3.606
5%	2.183	3.475	5.810	3.767
10%	-	-	-	4.173

### 四、聚合物微球的包封率和载药量

4 种负载 BSA 的聚合物微球载药量都大于 7%, 包封率均大于 77%, 其中 PLGA(75/25)/PEG 聚合物载药微球载药量为 7.05%, 包封率为 77.55%, 为 4 种聚合物载药微球中最低; PLGA(50/50)/PEG 聚合物载药微球载药量为 7.24%, 包封率为 79.63%; PLGA(85/15) 聚合物载药微球载药量为 7.44%, 包封率为 81.84%; PLGA(85/15)/PEG 聚合物载药微球载药量达 8.02%, 包封率达 88.22%, 为 4 种聚合物载药微球中最高。

### 五、聚合物微球的体外释放研究

从图 2 中可以看出, BSA 的释放经历两个阶段: 初始的暴释阶段和其后的缓释阶段。随着聚合物微球中 GA 比例的增加, BSA 的释放速率增加。20 d 后, PLGA(50/50)/PEG 聚合物微球中 BSA 累积释放量达 90.1%, 而 PLGA(85/15)/PEG 聚合物微球中 BSA 累积释放量仅为 60.4%。比较 PLGA(85/15) 聚合物微球和 PLGA(85/15)/PEG 聚合物微球的曲线可知, 加入 PEG 后, BSA 的释放速率加快。

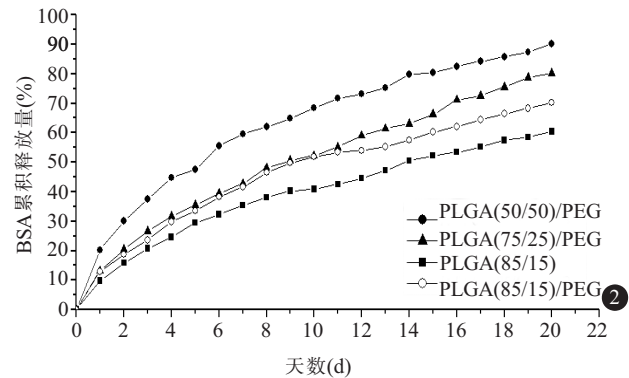


图 2 聚合物微球的 BSA 体外释放速率比较

Fig.2 In vitro release of BSA in PLGA microspheres

### 讨 论

#### 一、影响聚合物微球粒径及形貌的因素分析

共聚物的组成、有机相浓度及添加 PEG 对聚合物微球粒径影响较大。从本研究中可以看出, 随着共聚物中 GA 比例的提高, 聚合物微球粒径逐渐增大; 聚合物有机相浓度增大, 聚合物微球粒径变大。因为有机相浓度越大, 聚合物微球碰撞的几率越大, 越容易聚集; 同时, 有机相浓度越大, 意味着聚合物分子间相互作用越强, 在水中分散效果越差, 两方面的作用使聚合物微球粒径变大。

添加 PEG 后, 聚合物微球粒径变小。因为 PEG 具有良好的水溶性, 在第二次乳化成球过程中, 覆盖在聚合物微球表面, 由于空间位阻使得聚合物微球相互碰撞而聚集的几率减少, 故粒径变小。

Péan 等<sup>[6]</sup>曾报道加入 NaCl 会使聚合物微球表面变得紧致和坚硬, 从而使聚合物微球表面看起来光滑而规整, 聚合物微球内部孔洞变得更小。这是由于水相中的 NaCl 诱使水从内水相通过有机层向外水相扩散, 有机层的阻碍作用引起。

二、影响聚合物微球负载 BSA 性能的因素分析  
本实验所采用的制备方法和工艺条件对水溶性药物 BSA 具有良好的包封效果, PLGA(85/15)/PEG



聚合物微球的载药量和包封率最高。加入 PEG 后聚合物微球载药量和包封率都有所提高,这是由于有良好亲水性的 PEG 对水溶性蛋白 BSA 有更好的相容性。同时 PEG 的加入使内水相的粘度升高,导致蛋白包封率提高<sup>[7]</sup>。

BSA 体外释放实验表明,聚合物微球的突释量低于或接近 20%。通过改变 PLGA 共聚物中两种单体(LA 与 GA)的组成比,可在一定范围内调控共聚物的降解速率。随着 GA 比例的增加和 PEG 的加入,BSA 的释放速率加快。加入 PEG 和 NaCl 可稳定和减少蛋白的突释<sup>[8]</sup>,负载 BSA 的聚合物微球缓释时间均达 20 d 以上。聚合物微球中 BSA 体外释放早期(初始暴释)主要由吸附在聚合物微球表面和靠近表面的 BSA 扩散控制,后期随着聚合物微球在缓冲溶液中吸水溶胀并水解,BSA 的释放速率主要由聚合物微球的水解速率控制。

本实验采用常用的双乳化溶剂挥发技术制备亲水药物 BSA 聚合物微球,该方法简便且重现性较好,药物包封率较高。加入 PEG,增加了内水相粘度、改善了材料的亲水性及与亲水药物的相容性,进一步提高对 BAS 这类亲水蛋白的包封率和控制它们的释放行为。本研究为下一步血管内皮生长因子的负载及体外释放研究提供了良好的实验依据。

#### 参 考 文 献

[1] Byrne JV, Sohn MJ, Molyneux AJ, et al. Five-year experience in using coil embolization for ruptured intracranial aneurysms:

outcomes and incidence of late rebleeding[J]. J Neurosurg, 1999, 90: 656-663.

[2] Ohyama T, Nishide T, Iwata H, et al. Vascular endothelial growth factor immobilized on platinum microcoils for the treatment of intracranial aneurysms: experimental rat model study [J]. Neurol Med Chir (Tokyo), 2004, 44(6): 279-285.

[3] Kang F, Jiang G, Hinderliter A, et al. Lysozyme stability in primary emulsion for PLGA microsphere preparation: effect of recovery methods and stabilizing excipients[J]. Pharm Res, 2002, 19(5): 629-633.

[4] Meinel L, Illi OE, Zapf J, et al. Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly (D, L-lactide-co-glycolide) microspheres [J]. J Control Release, 2001, 70(1-2): 193-202.

[5] Murakami H, Kobayashi M, Takeuchi H, et al. Preparation of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method[J]. Int J Pharm, 1999, 187(2): 143-152

[6] Péan JM, Venier-Julienne MC, Boury F, et al. NGF release from poly (D, L-lactide-co-glycolide) microspheres. Effect of some formulation parameters on encapsulated NGF stability[J]. J Control Release, 1998, 56(1-3): 175-187.

[7] Jeffery H, Davis SS, O'Hagan DT. The preparation and characterization of poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles. II. The entrapment of a model protein using a (water-in-oil)-in-water emulsion solvent evaporation technique[J]. Pharm Res, 1993, 10(3): 362-368.

[8] Dorati R, Genta I, Montanari L, et al. The effect of  $\gamma$ -irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin [J]. J Control Release, 2005, 107(1): 78-90.

(收稿日期:2009-03-19)

(本文编辑:刘凯)

## · 消息 ·

### 第九届世界神经调控大会

目前神经调控治疗(皮刺激治疗或化学泵的植入)在医学临床领域中的应用日益广泛,已经涉及到神经内、外科,疼痛科,麻醉科,生物工程,中医针灸等多种相关学科。为加快世界各国神经调控技术发展,由世界神经调控学会(INS)主办的第九届世界神经调控大会(9th World Congress of the INS)将于 2009 年 9 月 12 日至 18 日在韩国首尔市召开,会上将由各领域带头人及创新学者作学术报告,为大家提供交流前沿信息的机会,欢迎各学科医生积极参加。详情可登陆 <http://neuromodulation.com/conference.html> 查询。

注:INS 会员可享受会议注册费优惠,会员加入事宜可通过邮件咨询,邮箱地址:phoebeliu3@yahoo.com.cn