

温度敏感的 PLGA-PEG-PLGA 水凝胶的合成、表征和药物释放

林浩^{1,2}, 田华雨^{1,2}, 孙敬茹^{1,2}, 庄秀丽^{1,2},
陈学思¹, 李悦生¹, 景遐斌¹

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 高分子物理与化学国家重点实验室, 长春 130022;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 用聚乙二醇 PEG1000 和 4600 引发乙交酯(GA)和 L-丙交酯(L-LA)开环共聚合得到一系列数均分子量为 3 000 ~ 7 000 的 PLGA-PEG-PLGA 水凝胶材料. 综合应用动态粘弹谱仪和相图, 系统报道了该凝胶力学性质和溶胶-凝胶转变的关系, 凝胶区间的模量在 $10^2 \sim 10^4$ Pa 之间. 用荧光光谱证明了该三嵌段聚合物形成胶束的性质并测定了临界胶束浓度, 验证了凝胶由胶束形成的机理. 凝胶中的头孢他定释放呈现一定程度的缓释作用.

关键词 聚乙二醇; 乙交酯-丙交酯共聚物; 水凝胶; 温度敏感; 力学性质; 药物释放

中图分类号 O631

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)07-1385-04

可生物降解的凝胶材料除了 PEO-PPO-PEO^[1] 以及聚 *N*-异丙基丙烯酰胺^[2] 两大类以外, 还有脂肪族聚酯-聚乙二醇系列水凝胶材料. 这类材料包括 Kim 等^[3] 用 PEG 引发聚(L-丙交酯)(PLLA)得到的 PEG-PLLA, 再经侧链接枝得到 PEG-g-PLGA^[4]. Fujiwara^[5] 合成了 PLLA-PEG-PLLA 和 PDLA-PEG-PDLA(PDLA 为聚(D-丙交酯))立体配合型温敏凝胶; Hwang 等^[6] 和 Bae 等^[7] 合成了 PCL-PEG 水凝胶.

PEG 类凝胶由于其较低的机械强度导致难以加工处理^[8], 从而在一定程度上影响了应用. 本文利用动态粘弹谱仪对凝胶材料的力学性质随温度的变化进行了研究. 同时配合相图对凝胶形成温度进行了分析, 扩展了凝胶的表征手段. 同时考察了凝胶中的药物释放.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

自制乙交酯(GA)和左旋丙交酯(LA), 用乙酸乙酯重结晶 3 次; 甲苯(分析纯)经常压蒸馏; 辛酸亚锡(分析纯)和聚乙二醇(PEG, $M_w = 1\ 000, 4\ 600$)均购自 Aldrich 公司.

¹H NMR 用 Bruker AM300 核磁共振仪测量, 溶剂为 CDCl₃, 以四甲基硅烷为内标. 在 35 °C 下, 用 Waters 410 GPC 仪测定分子量, 溶剂为 CHCl₃, 流速为 1.0 mL/min, 以 PS 为标准物. 在室温下, 用 Perkin-Elmer LS50B 荧光光谱仪测量荧光光谱. 激发光谱的检测波长 λ_{em} 设为 390 nm, 狭缝宽度为 5 nm. 溶胶-凝胶转变相图按照文献[3]的方法测定. 动态力学分析仪为 Metravig Mak-04 viscoanalyser, 剪切模式, 频率 5 Hz, 升温范围 4 ~ 50 °C, 升温速率 2 °C/min.

1.2 实验过程

PLGA-PEG-PLGA 按照文献[9]的方法合成. 水凝胶: 将聚合物溶解在二次蒸馏水中, 在 4 °C 条件下, 冷藏 3 ~ 5 d. 胶束: 按照 Tian 等^[10]的方法制备. 水凝胶的体外药物释放实验在 37 °C 的恒温振荡培养箱中进行, 以 pH = 8.6 的缓冲液作为释放介质, 测定水溶性抗菌药头孢他定凝胶的药物释放行

收稿日期: 2005-10-19.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 50573078, 50273038)和国家自然科学基金杰出青年基金(批准号: 50425309)资助.

联系人简介: 陈学思(1959 年出生), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事生物医用高分子材料的研究.

E-mail: xschen@ciac.jl.cn

为. 包药过程: 先将药物和聚合物 P2 分别溶解在 Tris-HCl (pH = 8.6) 的缓冲液中, 混合后使聚合物的质量分数达到 30%, 再冷藏 3 d, 使水溶性药物在凝胶体系中均匀分散达到包裹的目的. 释放过程: 将药物的溶胶倒入试管(内径 14 mm)中, 放置到 37 °C 的振荡培养箱中, 形成凝胶状态, 加入缓冲液, 定时取样观测释放曲线. 测定头孢他啶的紫外工作曲线是为 $c = 0.0356 \times A$, 质量浓度单位为 mg/mL, 头孢他啶的紫外特征峰出现在 255.80 nm 处. 凝胶的包药率为 35 mg/100 g 凝胶.

2 结果与讨论

2.1 材料的 ^1H NMR 和 GPC

分别以 PEG1000 和 4600 为大分子引发剂, 引发 L-LA 和 GA 开环无规共聚, 所得材料的物理参数列于表 1. P1 和 P2 是以分子量 1 000 的 PEG 为引发剂. 而 P3 以分子量 4 600 的 PEG 为引发剂合成三嵌段聚合物, 数均分子量为 7 000. 在凝胶制备过程以及力学测试中发现 P3 材料的强度明显大于前两个材料, 有助于凝胶作为药物释放和组织工程的应用. GPC 和 ^1H NMR 所测得的数均分子量结果有明显差异, 主要是由于 GPC 测试所用分子量标准物为 PS, 聚合物/溶剂的相互作用参数明显不同所致. 而与文献[11]所报道的 PLLA 的经验公式 $M_n = 0.58M_{n,\text{GPC}}$ 比较吻合, 本文直接引用作为参考.

Table 1 Physical parameters of the synthesized PLGA-PEG-PLGA triblock copolymers

Sample	Designing product PLGA-PEG-PLGA	M_n (^1H NMR)	$w(\text{PEG}):w(\text{PLGA})^a$	$n(\text{LA}):n(\text{GA})^a$	PDI(GPC)	M_n (GPC) ^b
P1	700/350—1 000—350/700	3 100	1:2.1	1.6	1.21	5 700
P2	900/400—1 000—400/900	3 600	1:2.6	1.9	1.31	6 000
P3	1 000/300—4 600—300/1 000	7 000	1.8:1	3.0	1.17	12 600

a. Calculated from ^1H NMR; b. calculated from the value of M_n determined by GPC according to the formula, $M_n = 0.58M_{n,\text{GPC}}$.

图 1 是 P3 的 300 MHz ^1H NMR 谱. 各吸收峰所代表的基团如下: δ 1.60 (图 1 峰 a) 为 LA 链段上的 CH_3 的特征峰, δ 3.67 (图 1 峰 b) 为乙二醇链段上 CH_2 特征峰, δ 4.85 (图 1 峰 c) 为 GA 链段上 CH_2 特征峰, δ 5.20 (图 1 峰 d) 为 LA 链段上 CH 特征峰. 其余的杂质峰 δ 2.20 对应丙酮等的特征峰.

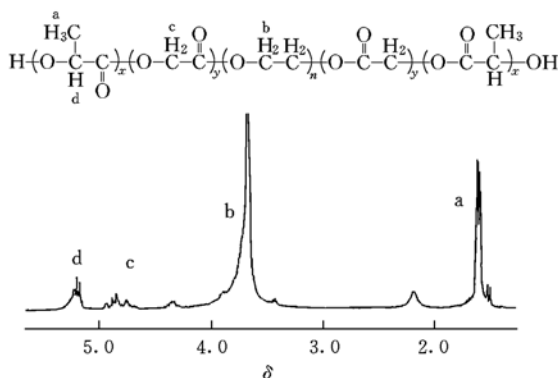


Fig. 1 ^1H NMR of triblock copolymer P3 in CDCl_3

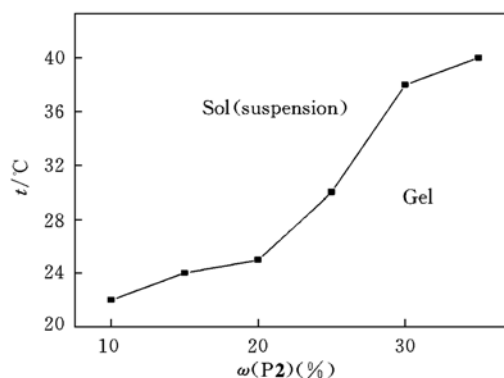


Fig. 2 Sol-gel transition phase diagram of P2

2.2 聚合物的溶胶-凝胶转变相图

PEG 类物理凝胶的溶胶-凝胶转变图可以提供凝胶转变温度和浓度之间的关系. 本文综合运用试管倒置和动态力学分析对 PLGA-PEG-PLGA 凝胶的相变过程进行分析. 图 2 是用前一种方法测定的 P2 材料凝胶化过程的 Sol-Gel 相图. 表明凝胶体系的质量分数在 10% 到 35% 区间, 凝胶的 Gel-Sol 转变温度也逐渐上升. 当凝胶体系质量分数为 10% 时, 凝胶体系转变温度只有 22 °C, 低于此时凝胶体系在室温下是流动态的溶胶状态. 当体系的质量分数达到 30% 时, Gel-Sol 的转变温度已经达到 38 °C, 可以达到 37 °C 下模拟药物缓释的要求, 这是体外药物释放的基本标准. 当质量分数继续增加到 35% 时, 转变温度甚至可以达到 40 °C.

2.3 胶束溶液的荧光光谱

图 3 是以芘为荧光探针一系列 P2 样品水溶液的荧光光谱图. 从下到上聚合物的质量浓度依次增加, 范围是 $5 \times 10^{-4} \sim 0.5$ g/L. 随着溶液的质量浓度的增加, 荧光光谱的强度也依次增加. 在浓度低

于 0.012 5 g/L 时, 光谱发生红移, 荧光光谱的最大吸收峰在 333.5 nm 处, 而浓度大于 0.012 5 g/L 时, 光谱的最大吸收峰转移到 335.5 nm 处. 这一红移值的存在证实了 PLGA-PEG-PLGA 在水溶液中形成胶束的能力. 为凝胶的胶束机理研究提供了实验证据. 将 335.5 和 333.5 nm 处荧光激发光谱强度之比与溶液浓度对数作图, 得到 P2 的临界胶束浓度 (cmc) 为 6×10^{-3} g/L.

2.4 凝胶的动态粘弹性

图 4 是 P2 质量分数为 35% 的凝胶体系动力学分析图. 图 4(A) 表示 G' 和 G'' 的温度依赖关系, 图 4(B) 代表 $\tan\delta$ 和 η' 的温度依赖关系. 从图 4(A) 可以看出, 在 4 ~ 50 °C 温度区间, G' 和 G'' 呈下降趋势. 在比较低的温度范围 5 ~ 23 °C 内, 凝胶的强度最大, G' 和 G'' 都在 1 000 Pa 以上, 这是物理凝胶中较为普遍的强度范围^[12]. 在 9 °C 时储能模量 G' 达到整个温度区间测试的最大值 4 700 Pa, 损耗模量也达到 4 760 Pa 的最大值, 大于一些文献[12,13]报道的凝胶强度. 在 23 ~ 25 °C 温度区间内, G' 和 G'' 发生交替, 此后损耗模量低于储能模量, 对应图 4(B) 上 $\tan\delta$ 值小于 1.0.

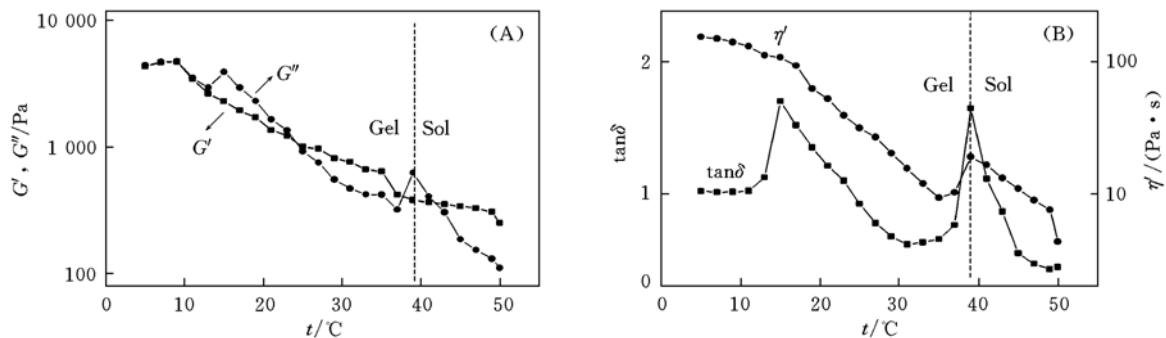


Fig. 4 Dynamic mechanical analysis of P2 ($\omega = 35\%$) hydrogel

(A) G' , G'' - t curves; (B) $\tan\delta$, η' - t curves.

从图 4(B) 可以看出, 15 °C 时 $\tan\delta$ 达到的极大值为 1.70, 这可能是凝胶体系的一个次级转变. 在 39 °C 时, $\tan\delta$ 再次发生突变, 达到极大值 1.65, G'' 也达到一个极大值 630 Pa, 复合粘度 η' 达到一个极大值 19.0 Pa·s, 这对应于凝胶体系的一个主转变 (Gel-Sol 转变). 表明 39 °C 时体系开始发生聚合物脱水聚集的现象, 凝胶体系强度降低. DMA 分析得到的结果与图 2 的 P2 Sol-Gel 相图的结果相同, Gel-Sol 转变点为 40 °C, 从而验证了试管倒置方法测量相图的结果.

2.5 凝胶的水溶性药物控制释放

对药物释放百分比与释放时间的平方根的关系作图, 得到药物释放曲线如图 5 所示, 图 5 曲线 a 为包裹药物凝胶的空白释放曲线, 曲线 b 为释放介质中加入蛋白酶 K (10 mg/mL) 作为参比的释放曲线. 可以看出药物释放百分比与释放时间的平方根成近似线性关系, 符合 Fick 第二定律, 因此药物从凝胶中的释放主要受扩散机理控制. 很明显, 加入蛋白酶 K 后药物释放明显加快, 比正常释放加快约 10%. 原因是酶使聚合物发生降解, 释放速度加快. 此外, 在初始阶段, 两种情况下凝胶

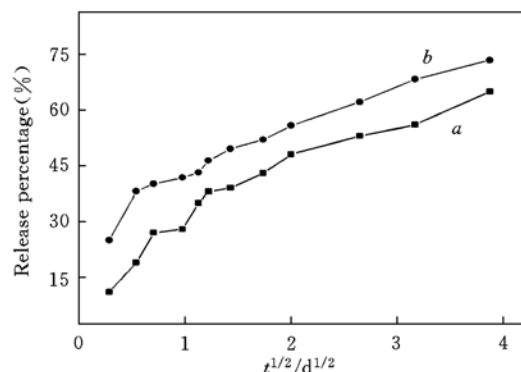


Fig. 5 Release profile of ceftazidime from P2 ($\omega = 30\%$) hydrogel

a. Ceftazidime from the hydrogel; b. ceftazidime from the hydrogel with proteinase K.

中的药物都有一定的突释. 第2天到第15天, 释放比较平稳. 15 d后释放出总药量的65%和73%, 无明显的滞留现象发生.

3 结 论

用分子量为1 000和4 600的PEG为引发剂, 使不同比例的L-LA和GA单体无规共聚, 合成了一系列PLGA-PEG-PLGA三嵌段聚合物, 通过GPC和¹HNMR验证其聚合反应具有分子量可控的特点. DMA和相图表明凝胶状态由温度和浓度决定. 荧光光谱验证了凝胶形成是胶束聚集的机理. 水溶性药物头孢他啶在凝胶中的药物缓释释放行为是由扩散控制的, 并且在蛋白酶K的存在下释放速率明显加快.

参 考 文 献

- [1] ZHU Wen(朱文), ZHANG Ying(张颖), WANG Biao-Bing(王标兵) *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(2): 373—375
- [2] ZHANG Jian-Tao(张建涛), HUANG Shi-Wen(黄世文), WANG Lu-Ling(汪璐玲) *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2004, **25**(12): 2370—2374
- [3] Jeong B., Bae Y. H., Lee D. S. *et al.*. Nature[J], 1997, **388**: 860—862
- [4] Jeong B., Kibbey M. R., Birnbaum J. C. *et al.*. Macromolecules[J], 2000, **33**: 8317—8322
- [5] Fujiwara T., Mukose T., Yamaoka T. *et al.*. Macromol. Biosci. [J], 2001, **1**: 204—208
- [6] Hwang M. J., Suh J. M., Bae Y. H. *et al.*. Biomacromolecules[J], 2005, **6**: 885—890
- [7] Bae S. J., Suh J. M., Sohn Y. S. *et al.*. Macromolecules[J], 2005, **12**: 5260—5265
- [8] Hutmacher D. W. J. Biomater. Sci. Polymer[J], 2001, **12**: 107—124
- [9] Sun J. R., Hong Z. K., Yang L. X. *et al.*. Polymer[J], 2004, **17**: 5969—5977
- [10] Tian H. Y., Deng C., Lin H. *et al.*. Biomaterials[J], 2005, **26**(20): 4209—4217
- [11] Tang Z. H., Chen X. S., Pang X. *et al.*. Biomacromolecules[J], 2004, **5**: 965—970
- [12] Aamer K. A., Sardinha H., Bhatia S. R. *et al.*. Biomaterials[J], 2004, **25**: 1087—1093
- [13] Yamaguchi N., Chae B. S., Zhang L. *et al.*. Biomacromolecules[J], 2005, **4**: 1931—1940

Synthesis, Characterization and Drug Release of Temperature-sensitive PLGA-PEG-PLGA Hydrogel

LIN Hao^{1,2}, TIAN Hua-Yu^{1,2}, SUN Jing-Ru^{1,2}, ZHUANG Xiu-Li^{1,2},
CHEN Xue-Si^{1*}, LI Yue-Sheng¹, JING Xia-Bin¹

(1. State Key Laboratory of Polymer Chemistry and Physics, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China;
2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract A series of PLGA-PEG-PLGAs with $M_n = 3\,000\text{—}7\,000$ were synthesized by ROP of L-lactide and glycolide with PEG ($M_w = 1\,000$ and 4 600) as the initiators. The dynamic viscoanalyser and phase diagram were utilized to investigate the mechanical properties with sol-gel transition of the hydrogel system, and the G' and G'' were between 10^2 and 10^4 Pa. Also, the fluorescence spectroscopy of PLGA-PEG-PLGA micelle solution was investigated to reveal the gelation mechanism of hydrogel. Finally, the controlled release of ceftazidime from the hydrogel was observed.

Keywords PEG; PLGA; Hydrogel; Temperature-sensitivity; Mechanical property; Drug release

(Ed.: Y, Z)