DOI：10.19789/j.1004-9398.2024.06.004
文献引用：李嘉炜，秦仟皓，赵胜博，等.乳化交联法制备生物相容性高分子载药微球[J].首都师范大学学报（自然科学版），2024，45（6）：30-35.
LI J W，QIN Q H，ZHAO S B，et al. Preparation of biocompatible drug-loaded microspheres by emulsion crosslinking[J]. Journal of Capital Normal University（Natural Science Edition），2024，45（6）：30-35.

乳化交联法制备生物相容性高分子载药微球*

李嘉炜[1]，秦仟皓[1]，赵胜博[1]，李　宁[1]，王耀宗[2]，黄潇楠[1**]
（1. 首都师范大学化学系，北京　100048；2. 北京教育考试院，北京　100083）

摘要：为了解决高分子载药微球尺寸不均一、制备方法难等问题，使其更好地应用于肿瘤治疗、软骨修复等临床领域。本文以聚乙烯醇、明胶和海藻酸钠为原料，通过自由基聚合、席夫碱反应和钙离子配位反应共3种乳化交联法制备高分子载药微球，并载药阿霉素盐酸盐。利用红外光谱仪、扫描电子显微镜和紫外-可见分光光度计等仪器对其进行表征。结果表明，本文所制备的3种载药微球尺寸均一，材料易降解，且能够满足癌症治疗中的释药需求。

关键词：高分子；载药微球；乳化交联法；药物缓释
中图分类号：O6-3　　**文献标志码**：A

Preparation of biocompatible drug-loaded microspheres by emulsion crosslinking*

LI Jiawei[1]，QIN Qianhao[1]，ZHAO Shengbo[1]，LI Ning[1]，WANG Yaozong[2]，HUANG Xiaonan[1**]
（1. Department of Chemistry，Capital Normal University，Beijing　100048；
2. Beijing Education Examinations Authority，Beijing　100083）

Abstract：In order to solve the problems of uneven size and difficult preparation methods of drug-loaded microspheres，and to better apply them in clinical fields such as tumor treatment and cartilage repair. In this paper，drug-loaded polymer microspheres were prepared from polyvinyl alcohol，gelatin and sodium alginate by free radical polymerization，Schiff base reaction and calcium ion coordination reaction. It was characterized using instruments such as infrared spectroscopy，scanning electron microscopy，and ultraviolet-visible spectrophotometer. The results indicate that the three drug-loaded microspheres prepared in this article have uniform size，easy degradation of materials，and can meet the drug release requirements in cancer treatment.

Keywords：high polymer；drug-loaded microspheres；emulsion crosslinking method；drug release
CLC：O6-3　　**DC**：A

0　引　言

高分子载药微球是可缓释药物的高分子聚合物的微小球状实体，其粒径一般为1~250 μm[1]。由于其特殊的尺寸[2]，高分子载药微球近年来在生物医药领域得到了广泛地应用：在肝癌等富血管肿瘤

收稿日期：2023-03-13
*首都师范大学青年卓越人才培养计划项目
**通信作者：huangxn@cnu.edu.cn

进行经导管栓塞治疗中,可经导管将高分子载药微球递送至肿瘤病灶的血管内,阻塞血液流动,降低氧和营养物质对肿瘤的输送,同时释放化疗药物与肿瘤细胞作用,使其凋亡[3];与全身治疗相比,高分子载药微球通过导管定向递送能够提高化疗或放疗对癌症的疗效,减少不良反应[4];在骨科领域中,将药物与高分子微球结合,制成注射制剂可治疗骨关节炎[5-6];同时微球还被应用在白血病治疗[7]和组织再生工程[8]等领域。

高分子载药微球是生物医用微球,其以水溶性高分子为原料,通过微流控[9]、乳化交联法和喷雾干燥法[10]等合成。其中,乳化交联法是将高分子溶于水形成水溶液,在表面活性剂作用下与有机相形成油包水(W/O)型乳状液,再经水溶性交联剂交联合成W/O型聚合物的工艺方法。与其他方法相比,乳化交联法具有操作简单、反应快、产物可制成干粉和水溶性好等特点[11],适用于工业上大批量制备微球。常用水溶性高分子包括聚乙烯醇、明胶和海藻酸钠等,其中聚乙烯醇是由醋酸乙烯酯聚合后再醇解获得[12]的高分子,具有良好的生物相容性和无毒性[13];明胶和海藻酸钠分别从动物的组织和海藻中提取得到,具有良好的生物相容性和生物降解性[14-15]。现有研究:赵大庆和谭金权[16]通过乳化交联法制备了尺寸为1~15 μm聚乙烯醇微球,应用于静脉注射靶向微球;王朝辉等[17]以海藻酸钠为药物载体,采用喷雾干燥法制备双氯芬酸钠/海藻酸钠微球,其具有载药量高等优点,可用作药物的缓释制剂;任泽宇等[18]制备了一种甲氨蝶呤(methotrexate,MTX)聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid),PLGA)的缓释降解微球,可用于骨肉瘤治疗。上述研究所得产品基本满足了栓塞治疗中的高分子载药微球需求,但设备成本较高,制备方法存在产物尺寸不均一、反应过程不够绿色等问题。本文选取聚乙烯醇-丙烯酸钠、明胶和海藻酸钠作为原料,第1种为合成高分子材料,后2种为天然高分子材料,通过乳化交联法制备3种高分子载药微球,并进行释药测试,以期得到尺寸均一,绿色安全、适合工业化大规模生产的高分子载药微球。

1　实验原理

乳化交联法[19]是在剧烈搅拌和表面活性剂作用下,将高分子水溶液滴入油相分散成微液滴形成乳液,加入水溶性交联剂,使其扩散进入微液滴中,与线性高分子交联形成三维网状结构,得到微米级的微球(图1)。此过程涉及自由基聚合、席夫碱反应和金属离子配位反应交联3种反应原理。

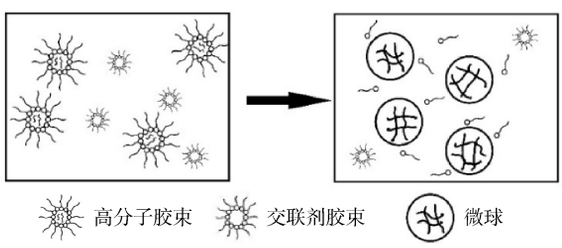
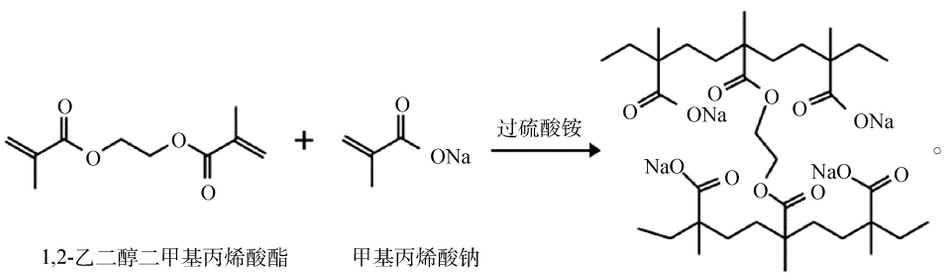


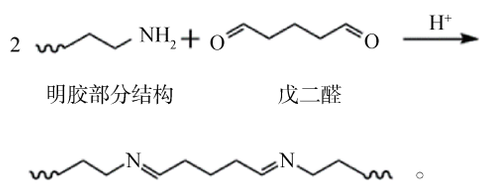
图1　乳化交联法合成示意

(1)自由基聚合交联原理。甲基丙烯酸钠、1,2-乙二醇二甲基丙烯酸酯和聚乙烯醇溶解在水溶液中,自由基引发剂过硫酸铵(ammonium persulphate,APS)分解产生自由基,引发甲基丙烯酸钠和1,2-乙二醇二甲基丙烯酸酯聚合,形成碳链共价键连接的交联网络,交联产物与聚乙烯醇链形成互穿型交联网络结构微球,反应原理为



1,2-乙二醇二甲基丙烯酸酯　　甲基丙烯酸钠

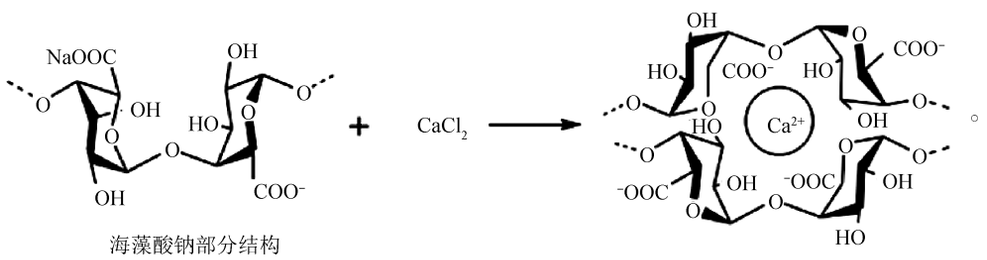
(2)席夫碱反应交联原理。席夫碱反应是醛基和氨基通过缩合形成烯胺的一类反应,明胶微球可通过明胶中赖氨酸的氨基与戊二醛的醛基发生席夫碱反应制备[20],形成三维微球网络结构,反应原理为



明胶部分结构　　戊二醛



(3)金属离子配位交联原理。海藻酸钠分子中的Na^+易与Ca^{2+}等发生离子交换[21],其古罗糖醛酸片段向离子堆叠,形成“蛋盒”结构,从而实现凝胶的三维网络交联。海藻酸钠溶于水加入油相,在表面活性剂作用下形成微液滴,加入$CaCl_2$溶液后通过配位作用交联形成海藻酸钠微球,反应原理为



海藻酸钠部分结构

2　实验部分

2.1　试剂

99%甲基丙烯酸钠、聚乙烯醇、明胶、石油醚、阿霉素盐酸盐和海藻酸钠均购自北京伊诺凯科技有限公司;1 mol/L HCl溶液、分析纯无水乙醇和无水$CaCl_2$均购自中国医药集团有限公司;99%1,2-乙二醇二甲基丙烯酸酯和98%过硫酸铵均购自北京百灵威科技有限公司;50%戊二醛、液体石蜡和司盘-80均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。实验用水均为超纯水,导电率>18.0 MΩ·cm。

2.2　仪器

使用奥豪斯仪器有限公司生产的AR323CN型分析天平称质量;使用大龙兴创实验仪器(北京)股份公司生产的OS20型机械搅拌器搅拌溶液;使用杭州明远仪器有限公司生产的SHZ-D(Ⅲ)型真空泵减压抽滤反应液;使用布鲁克(北京)科技有限公司生产的EQUINOX55型红外光谱仪分析产品化学结构,采用KBr压片法制样分析;使用日本日立公司生产的SU8010型扫描电子显微镜(scanning electron microscope,SEM)表征微球微观结构,在随机区域选取≥100个微球,利用imageJ软件统计粒径;使用青岛聚创世纪公司生产的JC-UT2000型紫外-可见分光光度计测量溶液吸光度,最大吸收波长为480 nm;使用北京历元电子有限公司生产的UPW-20N型超纯水仪制备超纯水。

2.3　溶液配制

在机械搅拌条件下,向200 mL液体石蜡中加入4.0 g司盘-80,搅拌均匀,作为油相,备用。称取500.0 mg聚乙烯醇、100.0 mg海藻酸钠和1.0 g明胶置于3个烧杯中,分别加入10 mL H_2O,在搅拌条件下,过夜溶解至溶液澄清(明胶溶解需加热),得到质量浓度分别为50、10和100 mg/mL的3种溶液;称取10.0 mg甲基丙烯酸钠加入1 mL H_2O溶解,得到质量浓度为10 mg/mL的溶液;称取30.0 mg 1,2-乙二醇二甲基丙烯酸酯加入1 mL H_2O溶解,得到质量浓度为30 mg/mL的溶液;称取1.5 g $CaCl_2$加入50 mL H_2O,得到质量浓度为30 mg/mL的溶液。

2.4　制备高分子微球

(1)自由基反应。取9 mL 50 mg/mL聚乙烯醇溶液和1 mL 10 mg/mL丙烯酸钠溶液混合均匀,为水相;取50 mL油相,搅拌速度为350 r/min,将水相逐滴滴入油相内,可观察到油相逐渐由清澈变为白色乳液;待水相全部滴入后,将温度提升到50 ℃,加热30 min;再逐滴加入1 mL 30 mg/mL 1,2-乙二醇二甲基丙烯酸酯溶液和1 mL 5 mg/mL过硫酸铵,继续反应1 h;结束后,冷却静置反应液,倾析上层液体,用石油醚、H_2O和乙醇反复洗涤下层沉淀、抽滤,得到高分子微球产物,置于2~8 ℃、干燥避光处保存。

(2)席夫碱反应。取50 mL油相,升温到60 ℃,搅拌速度为350 r/min,将10 mL 100 mg/mL明胶溶液逐滴滴入油相内,油相逐渐由清澈变为微黄色乳液;搅拌30 min,再置于冰水浴中,滴入1 mL 50%的戊二醛,反应20 min;反应结束后,冷却静置反应液,倾析上层液体,用石油醚、H_2O和乙醇洗涤下层沉淀、抽滤,得到高分子微球产物,置于2~8 ℃、干燥避光处保存。

(3)金属离子配位反应。取50 mL油相,搅拌速度为350 r/min机械搅拌条件下,将10 mL 10 mg/mL海藻酸钠溶液逐滴滴入油相内,油相逐渐由清澈变为白色乳液;30 min后,再逐滴滴入1 mL 30 mg/mL $CaCl_2$溶液,反应1 h后,降低转速至100 r/min,搅拌过夜;将反应液静置,倾析上层液体,用石油醚、H_2O和乙醇反复洗涤下层沉淀、抽滤,得到高分子微球产物,置于2~8 ℃、干燥避光处保存。

2.5　制备高分子载药微球

在 3 种原料溶液中分别加入 0.1 g 阿霉素盐酸盐,搅拌至药品完全溶解,重复 2.4 小节步骤,得到 3 种高分子载药微球产物,置于 2~8 ℃、干燥避光处保存。

2.6　载药微球释药测试

(1)标准溶液配置。称取 100.0 mg 阿霉素盐酸盐,加一定体积 H_2O 充分溶解后转移至 100 mL 容量瓶中定容,得到 1 000 mg/L 标准溶液;移液管分别移取 50、20 和 10 mL 上述溶液置于 3 个 100 mL 容量瓶中分别定容,得到质量浓度分别为 500、200 和 100 mg/L 阿霉素盐酸盐溶液。取上述 4 种溶液按照质量浓度从低到高依次在紫外-可见分光光度计上测量溶液吸光度,记录。

(2)标准曲线拟合。利用 origin 软件对所得数据进行拟合,公式为

$$A=a\rho+b,$$

式中:A 为吸光度,a 为斜率,ρ 为溶液质量浓度,b 为截距。

(3)实际样品检测。分别取 50.0 mg 3 种载药微球置于比色皿中,加入 2 mL 水,置于 37 ℃水浴中。每隔 2 h 分别测量其在 480 nm 处的吸光度。利用拟合公式计算溶液中阿霉素盐酸盐的质量浓度,绘制其与时间(t)的关系曲线并拟合,以曲线斜率表示载药微球释药速度。

3　实验结果

3.1　SEM

3 种高分子微球的微观结构如图 2 所示。可知,聚乙烯醇-甲基丙烯酸钠微球、明胶微球和海藻酸钠微球均呈圆球状,表面较为光滑,未出现大面积粘连现象。粒径分布结果表明聚乙烯醇-甲基丙烯酸钠微球直径约为 40~120 μm,明胶微球约为 10~30 μm,海藻酸钠微球约为 5~20 μm。

3.2　红外光谱

3 种高分子微球及其原料的红外光谱图如图 3 所示。聚乙烯醇,3 448.6 cm^{-1} 处为—OH 的吸收峰,2 918.2 cm^{-1} 处为烷基 C—H 伸缩振动吸收峰,1 019.3 cm^{-1} 处为 C—O 弯曲振动吸收峰;聚乙烯醇-甲基丙烯酸钠微球,3 354.1 cm^{-1} 处—OH 的吸收峰变宽,1 722.4 cm^{-1} 处为 C═O 伸缩振动峰,1 276.8 和 1 114.8 cm^{-1} 处为 C—O—C 键弯曲振动峰。明

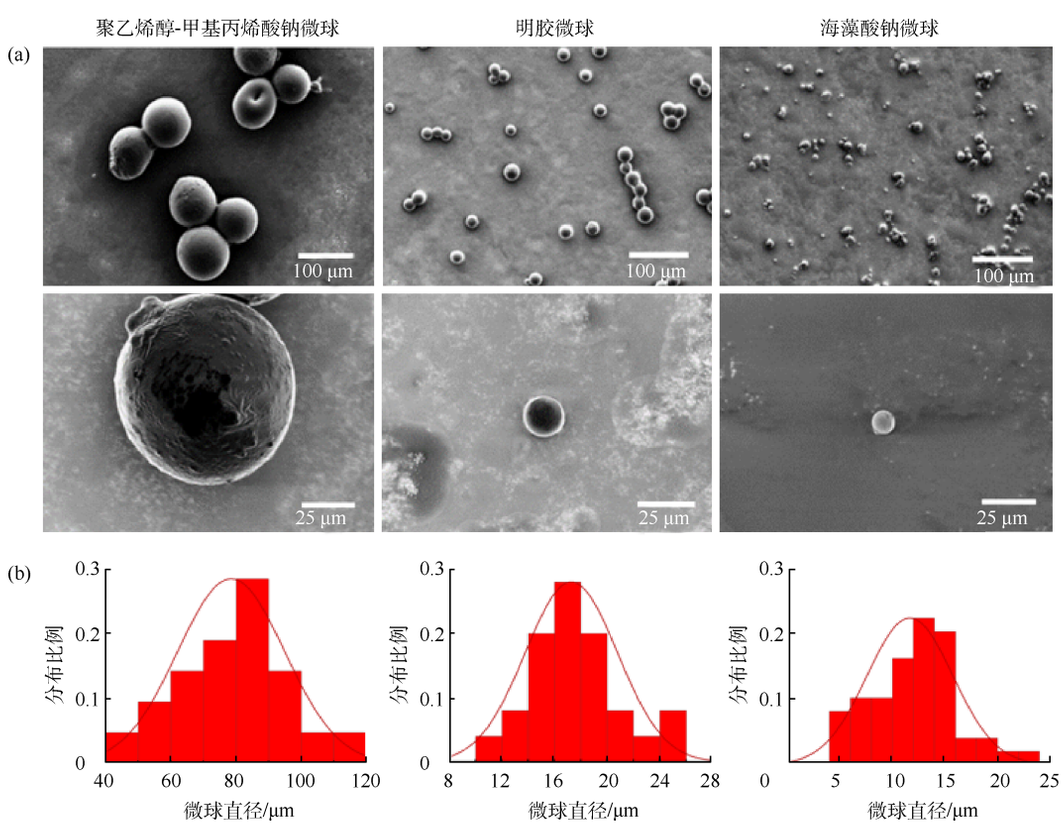


图 2　微球微观结构

(a)微观形态;(b)粒径分布

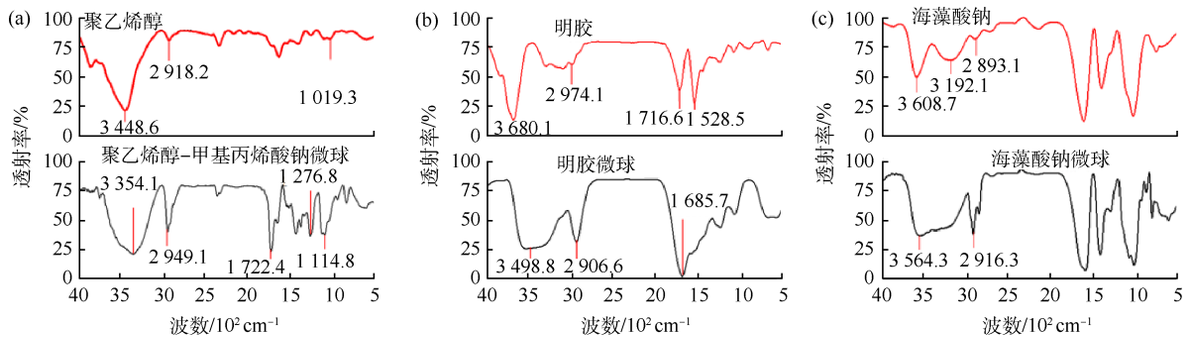


图3　3种高分子微球及其原料的红外光谱

(a)聚乙烯醇-甲基丙烯酸钠微球;(b)明胶微球;(c)海藻酸钠微球

胶,特征吸收峰为酰胺Ⅰ带(1 716.6 cm^{-1})和酰胺Ⅱ带(1 528.5 cm^{-1});明胶微球,1 685.7 cm^{-1}处为—C=N—的伸缩振动峰。海藻酸钠,在3 192.1和3 608.7 cm^{-1}外出现了2个缔合—OH和游离羟基所产生的伸缩振动峰,2 893.1 cm^{-1}为烷基C—H伸缩振动吸收峰;海藻酸钠微球,3 608.7和3 192.1 cm^{-1}为缔合—OH和游离—OH所产生的伸缩振动峰,2 916.3 cm^{-1}为C—H伸缩振动峰。

3.3　载药微球释药速度

标准溶液线性拟合结果为A=1.293 4ρ,R^2=0.998,式中R为相关系数。3种高分子载药微球释药曲线如图4所示。在8 h内,聚乙烯醇-甲基丙烯酸钠载药微球、明胶载药微球和海藻酸钠载药微球均释放了一定质量浓度的药物,对应3条曲线线性拟合结果分别为:ρ=0.010 89t+0.054,R^2=0.743;ρ=0.016 48t+0.054,R^2=0.765;ρ=0.099 85t+0.197,R^2=0.892。海藻酸钠载药微球、明胶载药微球和聚乙烯醇-甲基丙烯酸钠载药微球的释药速度分别为0.099 85、0.016 48和0.010 89 g/(L·h),最终药物释放的质量浓度分别为0.89、0.17和0.12 g/L。海藻酸钠载药微球释放药物的速度和药物最终质量浓度均高于另外2种高分子载药微球。

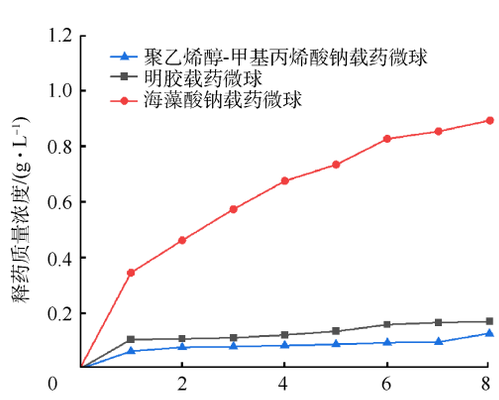


图4　3种高分子载药微球释药曲线

4　讨　论

本文以3种高分子为原料,通过不同交联机理制备了3种高分子载药微球。从整体反应分析,与其他2种微球相比,海藻酸钠微球制备中不需要引发剂和催化剂,反应耗时最短(约3~5 s),但由于金属离子进入微球内部需要通过扩散,因此需要延长搅拌时间让Ca^{2+}充分扩散进入微球内部才能充分交联微球。从微球外形分析,聚乙烯醇-甲基丙烯酸钠微球和明胶微球整体均一性和球形优于海藻酸钠微球,推测与金属离子和海藻酸钠反应速度过快,金属离子在体系内浓度不均一有关。从红外光谱分析,聚乙烯醇制成聚乙烯醇-甲基丙烯酸钠微球后,其在3 354.1 cm^{-1}左右的吸收峰变宽,推测为聚乙烯醇羟基和甲基丙烯酸钠的羧基之间形成氢键所致;在1 722.4 cm^{-1}处C=O伸缩振动特征峰与1 276.8和1 114.8 cm^{-1}处C—O—C键弯曲振动峰吸收强度明显增大,说明了甲基丙烯酸钠和1,2-乙二醇二甲基丙烯酸酯交联形成的高分子与聚乙烯醇形成了互穿网络。明胶制成微球后,1 685.7 cm^{-1}处吸收峰明显增强,这是—C=N的伸缩振动特征峰,表明明胶分子中的氨基与戊二醛的醛基发生了席夫碱反应。海藻酸钠制成微球后,3 564.3 cm^{-1}的—OH伸缩振动峰变宽、变强,可能由于蛋壳结构形成,游离羟基缔合引起,推测由海藻酸钠分子体系变大所导致,其他吸收峰无明显变化,交联未引起其他官能团变化。

海藻酸钠载药微球的释药速度远高于其他2种载药微球,明胶微球和聚乙烯醇微球释药量相差不多,说明天然高分子材料的释药能力高于合成高分子材料,这可能由于天然高分子材料的机械性能较差,在药物的作用下天然高分子降解的更为迅速。本文制备的3种不同释药速率的载药微球可满足不同药物的释放要求。

5 结束语

本文制备了3种高分子载药微球,具有方法绿色安全,尺寸均一和利于工业化生产等优点。但释药实验仅在37 ℃水中进行,不能完全模拟人体环境;且产品未在细胞和动物层面进行实验,下一步计划将本文所制备产品进行细胞及动物实验,在临床上验证本文所制备产品可行性,未来有望通过本方法大批量生产临床医学上所应用的载药栓塞微球。

参 考 文 献

[1] 李勋,韦祎,马光辉,等.缓释微球制剂的研究进展[J].北京化工大学学报(自然科学版),2017,44(6):1-11.

[2] NOF M, SHEA L D. Drug-releasing scaffolds fabricated from drug-loaded microspheres [J]. Journal of Biomedical Materials Research, 2002, 59(2): 349-356.

[3] KETTENBACH J, STADLER A, KATZLER I V, et al. Drug-loaded microspheres for the treatment of liver cancer: review of current results [J]. Cardiovascular and Interventional Radiology, 2008, 31(3): 468-476.

[4] CHIANG P F, PENG C L, SHIH Y H, et al. Biodegradable and multifunctional microspheres for treatment of hepatoma through transarterial embolization [J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2018, 4(9): 3425-3433.

[5] QI X, XIANG Y, CAI E, et al. All-in-one: harnessing multifunctional injectable natural hydrogels for ordered therapy of bacteria-infected diabetic wounds [J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 439: 135691.

[6] HAN Y, YANG J, ZHAO W, et al. Biomimetic injectable hydrogel microspheres with enhanced lubrication and controllable drug release for the treatment of osteoarthritis [J]. Bioactive Materials, 2021, 6(10): 3596-3607.

[7] XIE X, HU Y, YE T, et al. Therapeutic vaccination against leukaemia via the sustained release of co-encapsulated anti-PD-1 and a leukaemia-associated antigen [J]. Nature Biomedical Engineering, 2021, 5(5): 414-428.

[8] YU W, SUN T W, QI C, et al. Strontium-doped amorphous calcium phosphate porous microspheres synthesized through a microwave-hydrothermal method using fructose 1, 6-bisphosphate as an organic phosphorus source: application in drug delivery and enhanced bone regeneration[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(4): 3306-3317.

[9] ZHAO Z Y, WANG Z, LI G, et al. Injectable microfluidic hydrogel microspheres for cell and drug delivery [J]. Advanced Functional Materials, 2021, 31(31): 2103339.

[10] SHI N Q, ZHOU J, WALKER J, et al. Microencapsulation of luteinizing hormone-releasing hormone agonist in poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres by spray-drying [J]. Journal of Controlled Release, 2020, 321: 756-772.

[11] 董灵光.反相乳液聚合合成聚丙烯酰胺[J].应用化工,2011,40(6):1029-1031+1034.

[12] XIANG X M, SHEN N M, WANG X F, et al. Effect of solvent on the microstructure of polyvinyl alcohol [J]. Polymer Engineering and Science, 2022, 62(3): 687-693.

[13] ZHU L, FENG L, LUO H X, et al. Characterization of polyvinyl alcohol-nanocellulose composite film and its release effect on tetracycline hydrochloride [J]. Industrial Crops and Products, 2022, 188: 115723.

[14] DEVI G V D, ASHWINI P, SUKUMARAN A, et al. Preparation and characterization of dexamethasone loaded sodium alginate-graphene oxide microspheres for bone tissue engineering [J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2021, 64: 102624.

[15] DONG Z X, FAN C J, DENG W S, et al. Porous gelatin microsphere-based scaffolds containing MC3T3-E1 cells and calcitriol for the repair of skull defect [J]. Biomaterials Advances, 2022, 138: 212964.

[16] 赵大庆,谭金权.聚乙烯醇微球的制备与研究[J].中国新药杂志,2005(2):181-184.

[17] 王朝辉,陈文斐,王妮,等.双氯芬酸钠/海藻酸钠微球的制备与体外释药行为考察[J].海峡药学,2013,25(3):5-7.

[18] 任泽宇,姜宏,许燕,等.甲氨蝶呤PLGA微球制备工艺及体外释药性能考察[J].石河子大学学报(自然科学版),2020,38(6):767-772.

[19] 邓阳全,邵丽,杨银,等.乳化交联法在载药微球制备中的应用及研究进展[J].世界科技研究与发展,2009,31(1):36-39.

[20] SARKER B, PAPAGEORGIOU D G, SILVA R, et al. Fabrication of alginate-gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2014, 2(11): 1470-1482.

[21] SUN J, XIAO Y M, FAN H S, et al. Effect of hydroxyapatite on the preparation and properties of alginate hydrogel [J]. Journal of Inorganic Materials, 2010, 25(10): 1087-1091.

(责任编辑:王 媛)