

表面改性羧甲基壳聚糖栓塞微球的制备及性能研究

曹元龙 丁媛媛 桑欣欣 石 刚 张丽萍 倪才华*

(江南大学化学与材料工程学院,食品胶体与生物技术教育部重点实验室,无锡 214122)

摘 要 以羧甲基壳聚糖为原料,聚乙二醇二缩水甘油醚为交联剂,通过反相微悬浮聚合方法,制备出粒径在 300~600 μm 的交联羧甲基壳聚糖微球,再以硝酸铈铵为引发剂,使 2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸在微球表面进行接枝聚合,得到含离子交换基团($-\text{COOH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$)的可载药栓塞微球。该微球对抗癌药物盐酸阿霉素载药率 24h 内可达 34.6%,较纯羧甲基壳聚糖微球提高了 49.8%。该微球在介入疗法治疗肿瘤领域具有很好的应用前景。

关键词 羧甲基壳聚糖,聚乙二醇二缩水甘油醚,2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸,栓塞微球,阿霉素

Study on the preparation and property of surface modified carboxymethyl chitosan embolic microspheres

Cao Yuanlong Ding Yuanyuan Sang Xinxin Shi Gang Zhang Liping Ni Caihua

(The Key Laboratory of Food Colloids and Biotechnology, Ministry of Education, School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122)

Abstract Surface modified carboxymethyl chitosan embolic microspheres were prepared by crosslinking reaction of carboxymethyl chitosan in a reverse suspension system using poly(ethylene glycol diglycidyl ether) (PEGDE) as the crosslinking agent, followed by graft polymerization of 2-acrylamido-2-methyl propanesulfonic acid on the surface of microspheres. The microspheres showed regular spherical shapes with size distribution ranging from 300 μm to 600 μm . The ion exchange groups ($-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$) were introduced into the microspheres which could load doxorubicin with loading rate as high as 34.6% in 24 hours, raising 46.8% compared to that of pure carboxymethyl chitosan microspheres. The product had bright prospect in the field of interventional treatment of tumor.

Key words carboxymethyl chitosan, poly(ethylene glycol diglycidyl ether), 2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid, embolic microsphere, doxorubicin

介入疗法是治疗中晚期肝癌患者的有效方法^[1]。它是经导管将含药微球输入靶组织,阻断肿瘤的供血动脉并缓慢释放药物,从而提高化疗药物的局部浓度,降低了全身的毒副作用。载药栓塞微球(也称洗脱微球)可以同时起到物理栓塞和靶向释放药物的作用,增强疗效^[2]。目前文献报道的壳聚糖微球的制备大都使用对人体有害的醛类交联剂^[3-4]。另外抗癌药物直接包埋于微球之中^[5],没有合适的载药基团,这样既造成了药物的浪费,又使得微球的载药率偏低。

羧甲基壳聚糖(CCN)是壳聚糖的衍生物^[6],是一种水溶性高分子,由于具有良好的生物相容性而被广泛应用于化妆品、食品和医药等行业^[7-10]。为

了降低交联剂对人体细胞的毒害作用,同时提高栓塞微球的载药率和载药速度,本研究以 CCN 为原料,聚乙二醇二缩水甘油醚(PEGDE)为交联剂,合成了一种可生物降解的载药栓塞微球,然后通过对微球表面改性,引入磺酸基团,微球中的负电荷基团与正电荷的药物阿霉素发生离子交换^[11],从而提高载药率和载药速度,对微球合成条件、载药机理及释放动力学等进行了详细研究。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

CCN(脱乙酰度为 91%,取代度为 0.87,分析纯),青岛海伽生物科技有限公司;PEGDE(聚合度

基金项目:江苏省自然科学基金(BK20161128);中央高校基础研究基金(JUSRP51626B)

作者简介:曹元龙(1990-),男,硕士研究生,主要研究方向为生物医用高分子材料。

联系人:倪才华,教授,博士研究生导师,主要从事功能高分子材料研究。

为 5,工业级),无锡惠隆电子材料有限公司;2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸(AMPS,分析纯),上海泰坦科技股份有限公司;盐酸阿霉素(DOX,分析纯),上海颀云化工科技有限公司。

数显机械搅拌器(OS20-Pro),美国赛洛捷克公司;全反射傅里叶红外光谱仪(Nicolet 6700),赛默飞世尔科技中国有限公司;超景深三维显微镜(VHX 1000C 型),基恩士香港有限公司;紫外分光光度计(TU 1901 型),北京普西通用仪器责任有限公司;激光共聚焦显微镜(TCS-SP8 型),德国徕卡公司;恒温水浴振荡器(SHA-B),金坛新航仪器厂。

1.2 CCN 微球的制备

称取 1.0g PEGDE,加入到 10mL 质量浓度为 4% CCN 溶液中,常温下,磁力搅拌 20min。在 250mL 三口烧瓶中加入 40mL 正庚烷,接着加入 0.27g 乳化剂(占油相总质量 1%),其中司班 80 为 0.216g,吐温 60 为 0.054g,机械搅拌,转速为 300 r/min。30min 后,将上述 CCN 混合液滴入到正庚烷中,30℃下交联反应 24h,最后用乙醇破乳、清洗微球,真空干燥后即得交联 CCN 微球。

1.3 微球的表面功能化

称取 300mg 粒径在 300~400μm 的 CCN 微球,放入到 10mL 0.6mol/L 的 AMPS 水溶液中,磁力搅拌,常温下浸泡 10h 后,加入 0.0124g 硝酸铈铵(占单体总质量 1%),通 N₂ 保护,升温至 50℃,反应 8h,反应结束后,用蒸馏水清洗微球数次,最后得到含有磺酸基团的 CCN 微球,即表面功能化可载药的栓塞微球。

精密称量微球反应前后的质量,根据此变化计算出微球的接枝率,并以此探究微球的最佳反应条件,接枝率(G)按照式(1)进行计算。

$$G(\%) = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中,G 为接枝率;W₁ 为接枝后微球质量,g;W₀ 为接枝前微球质量,g。

1.4 载药微球的制备

将 CCN 微球置于不同浓度的 AMPS 溶液中,加入质量浓度为 1% 硝酸铈铵溶液,通 N₂ 保护,磁力搅拌,50℃下反应 8h。然后将清洗干燥后的改性微球放入 2mg/mL 阿霉素溶液中,24h 后即得载药微球。按照式(2)计算微球的载药率(LR)。

$$LR(\%) = \frac{W_D}{W_S} \times 100\% \quad (2)$$

式中,W_D 为微球中药物的质量,g;W_S 为空白微球的质量,g。

1.5 SEM 表征

将改性微球用超薄切片沿中心切开,切面部位向上粘在样品台上,喷金处理后观察微球的表观形貌和切面结构,加速电压为 1kV,高真空条件。

1.6 溶胀性能实验

将改性微球加入到溶胀介质中(分别为 pH=7.4 的 PBS、0.9% 的生理盐水、超纯水),在恒温(37±0.5)℃水浴中振荡。每隔 10min 取样,用滤纸吸干微球表面水分,称量后按式(3)计算溶胀率(Sr)。

$$Sr = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100\% \quad (3)$$

式中,W_s 为微球溶胀态,g;W_d 为微球干燥态质量,g。

1.7 微球载药后不同时间点的形态

称取一定质量的改性微球置于 2mg/mL 的阿霉素溶液中,在恒温(37±0.5)℃水浴中缓慢振荡,分别在载药前、载药后 12h 和 24h,用超景深三维光学显微镜对微球进行取样拍照,观察记录不同时间点载药微球的形态。

1.8 微球内部阿霉素的分布

取数十个载药微球,置于无水乙醇浸泡过的载玻片上,滴加少量清水使微球均匀分散开,盖玻片周围密封,使用激光共聚焦显微镜,氙离子光源,激发波长为 488nm,对微球表层部分由外向内每隔 20μm 逐层拍照,观察荧光强度,分析微球内部药物分布的情况。

1.9 药物负载及释放

称取微球样品 20mg,置于含有 10mL 浓度为 2mg/mL 的阿霉素溶液中,磁力搅拌,分别在不同载药时间后测定溶液在 483nm 处的吸光度,计算微球的载药量。在 250mL 烧杯中加入 50mL pH=7.4 的 PBS 溶液,再添加精密称量的 25mg 载药微球,控制水浴温度(37±0.5)℃,慢速磁力搅拌,每隔一定时间取样 5mL,通过紫外分光光度计检测介质中药物的浓度,并加入相同体积的新鲜释放介质以维持其总体积不变。

2 结果与讨论

2.1 CCN 微球制备条件的优化

CCN 分子上含有一NH₂ 基团,与 PEGDE 中的环氧基团在碱催化下发生开环反应,在反相微悬浮聚合条件下交联形成微球。然后在铈离子的引发下,微球表面产生自由基,引发 AMPS 聚合,将磺酸

基团接枝到微球表面,合成路线见图 1。

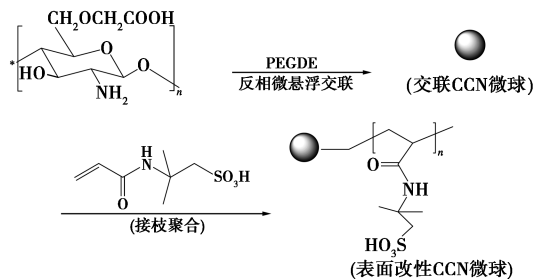


图 1 表面改性 CCN 微球的合成路线

在合成微球的过程中,交联剂的加入量会影响微球的形状和性能。当 PEGDE 加入量为 1.0g 时,微球分散均匀、外观圆整,且载药过程中形貌稳定。而当 PEGDE 加入量小于 0.6g 时,微球外观虽完好,但在载药过程中易塌陷破损,这是由于 PEGDE 用量偏少,导致其交联强度无法维持微球内部的稳定结构。当 PEGDE 用量小于 0.3g 时,微球成球性差,分散性差,大量粘连团聚,这是由于 PEGDE 用量过少,交联度低,不能形成微球。

2.2 红外光谱分析

图 2 是纯 CCN 微球和改性后 CCN 微球的红外光谱图。从图 2 可以看出,在 $3300\sim 3500\text{cm}^{-1}$ 处有强吸收峰,它是 $\text{CCN}-\text{OH}$ 和 $-\text{NH}_2$ 重叠而成的多重吸收峰, 2898cm^{-1} 处为 CHOH 的伸缩振动特征峰, 1067cm^{-1} 和 942cm^{-1} 处为 CCN 糖苷键的特征吸收峰;改性微球中除保留原 CCN 的特征峰外,还增加了 1301cm^{-1} 和 1145cm^{-1} 所对应磺酸基团中 $\text{S}=\text{O}$ 的不对称伸缩振动和对称伸缩振动吸收峰, 1649cm^{-1} 和 1545cm^{-1} 处所对应的酰胺基中的 $\text{C}=\text{O}$ 和 $\text{C}-\text{N}$ 伸缩振动峰,说明含有磺酸基团的 AMPS 已成功接枝到了 CCN 微球上。

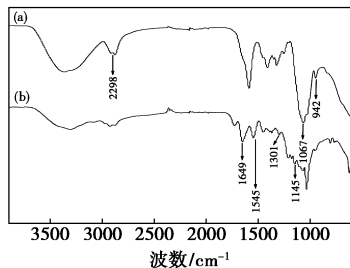


图 2 纯 CCN 微球(a)和改性后 CCN 微球(b)的红外光谱图

2.3 不同浓度 AMPS 对改性微球载药率的影响

称取 0.3g 粒径在 $300\sim 400\mu\text{m}$ 的微球,放入 10mL 不同浓度的 AMPS 水溶液中,在一定条件下接枝改性,通过计算改性微球的载药率,探索出最适

宜的 AMPS 浓度,结果见表 1。由表 1 可知,反应初始,随着单体用量增加,微球的接枝率增大,载药率也随着增加,当 AMPS 用量达到 1.242g,即浓度为 0.6mol/L 时,微球的接枝率和载药率最大。这表明反应初始随单体用量增加,平均每个自由基引发的接枝单体数目增多,AMPS 与微球反应的几率增大,接枝率逐渐升高。但达到一定浓度后,单体自聚反应程度增加,体系黏度逐渐变大,阻碍了 AMPS 分子与微球表面的接枝聚合,因此接枝率逐渐减小。

表 1 表面改性羧甲基壳聚糖微球的合成及载药率

样品	CCN 微球/g	AMPS/g	接枝率/%	载药率/%
A	0.3	0.207	6.8	26.7
B	0.3	0.414	11.3	29.3
C	0.3	0.828	18.8	32.4
D	0.3	1.242	23.1	34.6
E	0.3	1.656	20.5	33.1
F	0.3	2.070	14.6	30.2

2.4 改性微球在不同介质中的溶胀性能

图 3 为微球在不同介质中的溶胀率曲线。由图 3 可知,改性微球在 PBS($\text{pH}=7.4$) 中的溶胀率最大,这是因为弱碱性条件可以促进 $-\text{COOH}$ 和 $-\text{SO}_3\text{H}$ 的电离,使基团具有更好的亲水性,从而得到较高的溶胀率。改性微球在生理盐水中的溶胀度比在蒸馏水中的高,因为改性 CCN 含有磺酸基、羧基和氨基离子,属于两性离子,生理盐水中的 Na^+ 、 Cl^- 离子对反离子产生屏蔽作用,导致聚合物中的异性离子相互作用减弱,溶胀度增大,显示两性离子聚合物的“反电解质效应”。

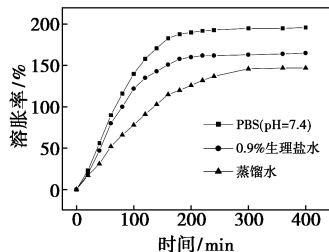


图 3 微球在不同介质中的溶胀率曲线图

2.5 改性微球载药前后的形态

图 4(a)是单个空白微球的显微镜图片,可以看出微球形态非常规整;图 4(b)是空白微球剖面的扫描电镜图,显示凝胶网络结构中存在大量的微孔及通道,由于 PEGDE 与 CCN 两种链段结构互穿,使微球内部结构疏松,产生微孔及通道,有利于药物分子的扩散;图 4(c)和 4(d)是微球载药后的超景深显

显微镜图,分别显示负载阿霉素 12h、24h 后微球形貌,可以明显看到,随着载药时间的延长,微球颜色逐渐加深,最后变为暗红色,表明对药物阿霉素负载率逐渐增加。

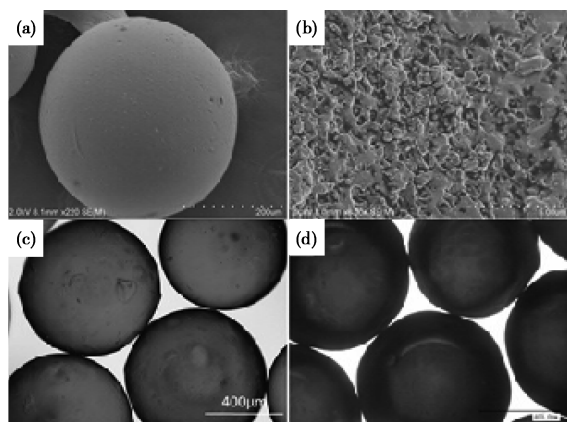


图 4 改性微球的显微镜图

[(a)空白微球;(b)空白微球剖面图;(c)载药后 12h;
(d)载药后 24h]

2.6 改性微球内部阿霉素的分布

用激光共聚焦荧光光谱法研究了阿霉素在微球中的分布,激发波长为 488nm,发射波长为 578nm,阿霉素呈现红色荧光。对微球表层由外向内每隔 20 μm 逐层拍照,通过荧光强度观察了解药物的分布,微球中阿霉素的浓度越高,则图中的红色荧光强度越强。图 5 是载药微球从外向内的药物分布图。图 5 结果显示,红色荧光在微球表层有较强的亮度,向微球中心逐渐变弱,这表明阿霉素在微球表面有较多的分布,而在微球内部含量较少。这是因为微球经改性后,表面上含有大量的一 SO_3H 基团,可有效地负载较多的阿霉素。

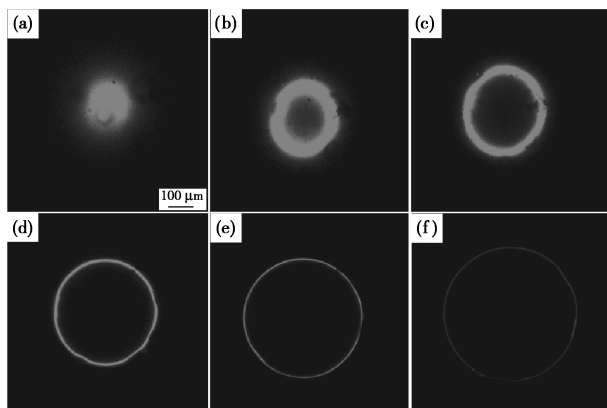


图 5 载药微球从外向内(a)—(f)的药物分布图

2.7 改性微球的载药率随时间的变化

图 6 是微球在阿霉素溶液(2mg/mL)中的载药动力学曲线。由图 6 可知,随着时间的逐渐增加,微

球载药率依次增大,40h 后达到载药平衡。以载药 24h 后为例,纯 CCN 微球的载药率达 23.1%,改性后微球的载药率达 34.6%,较纯 CCN 微球提高了 49.8%。改性微球具有高载药率和载药速度的原因是因为磺酸基是强电离基团,与阿霉素反应较快,在微球中引入了磺酸基团,增加了离子交换载药方式,使更多的阿霉素分子负载到微球上,直接提高了微球的载药率。

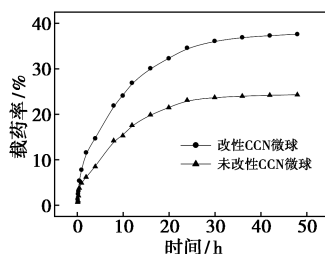


图 6 微球在阿霉素溶液(2mg/mL)中的载药动力学曲线图

2.8 载药微球的释放性能

图 7 为不同微球在 0.01mol/L (pH = 7.4, 37 $^{\circ}\text{C}$) 的 PBS 中累计释放率曲线。由图可以看出,未改性微球在最初的 18h 内药物释放较快,之后慢慢趋于平缓;而改性微球具有明显的缓释性能,在 24h 时,微球的累计释放率只有 32.7%,约 70h 后,微球的释放率逐渐趋于缓慢,最终的释放率达到 66.8%,这表明功能化的改性微球具有良好的缓释效果。其原因主要是 CCN 微球中引入了磺酸基团,磺酸基团通过电荷吸附药物分子,大大消除了微球表面因物理吸附而引起的突释,起到了缓释药物的作用。

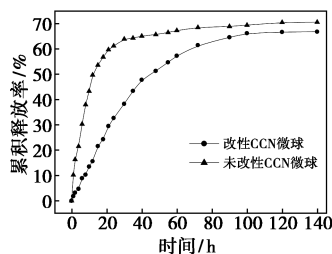


图 7 不同微球在 0.01mol/L (pH=7.4, 37 $^{\circ}\text{C}$) 的 PBS 中累计释放率曲线图

3 结论

以聚乙二醇二缩水甘油醚为交联剂,制备出粒径在 300~600 μm 的交联 CCN 微球。通过接枝聚合在微球表面引入含磺酸基团的 PAMPS,增加了

(下转第 222 页)