

反相悬浮聚合法制备交联葡聚糖凝胶微球及其在脂质体与药物分离中的应用

包建民^{1,2}, 王勇尊^{1,2}, 李优鑫^{1*}

(1. 天津市现代药物传递及功能高效化重点实验室, 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072; 2. 天津奥顺达科技有限公司, 天津 300452)

摘要:以葡聚糖 4 万为原料, 环氧氯丙烷为交联剂, 甲苯为有机分散相, 选用合适的分散剂, 利用反相悬浮聚合的原理制备了葡聚糖凝胶微球。以微球的球形度、粒径分布范围以及吸水溶胀度等性能为衡量标准, 考察了有机分散相的种类、搅拌速度、实验温度、反应时间以及分散剂的用量对制备效果的影响, 确定了最优的制备条件。同时, 将所制葡聚糖微球应用于脂质体与药物的分离检测, 以测定其凝胶分离性能。结果表明, 所制交联葡聚糖凝胶微球具有良好的球形度、分散性以及吸水溶胀性, 并具有优良的凝胶过滤分离性能。

关键词:反相悬浮聚合原理; 交联葡聚糖凝胶微球; 分离性能

中图分类号: TQ316.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2014)11-0055-04

Preparation of crosslinked dextran hydrogel microspheres by inverse suspension polymerization and its application in separation of liposome and drug

BAO Jian-min^{1,2}, WANG Yong-zun^{1,2}, LI You-xin^{1*}

(1. Tianjin Key Laboratory for Modern Drug Delivery & High-Efficiency, School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Tianjin ASD Scientific Co., Ltd., Tianjin 300452, China)

Abstract: The crosslinked dextran hydrogel microsphere is prepared by an inverse suspension polymerization method by using dextran 40 000 as raw material, epichlorohydrin as crosslinking agent and toluene as organic dispersed phase. The sphericity, particle size distribution and water swelling properties of the microspheres are chosen as the evaluation criterion to optimize those experimental factors, including the kind of the organic dispersed phase, stirring speed, experimental temperature, the reaction time and amount of dispersant. Meanwhile, the dextran microsphere is used for the separation of liposomes and drugs. The result indicates that the homemade microsphere has good sphericity, distribution, water swelling property and separating performance.

Key words: inverse suspension polymerization; crosslinked dextran gel microspheres; separation performance

交联葡聚糖凝胶过滤介质是由支链葡聚糖分子在碱性条件下与交联剂发生反应, 交联而成的具有多孔网状结构的天然多糖类高分子聚合物。其最早合成及应用始于 20 世纪 50 年代末, 最初用于去除血浆中硫酸铵以及分离相对分子质量在 1 000 ~ 20 000 Da 之间的多糖类物质^[1]。经过几十年的发展, 交联葡聚糖凝胶过滤介质由于其生物相容性好、分辨率高、选择性好、应用成本低、便于储存等优点, 已广泛应用于蛋白质、多肽、氨基酸以及多糖类等生物物质的分离与纯化, 可分离相对分子质量几百到几百万的各种物质^[2-7]。葡聚糖凝胶过滤介质是凝胶过滤层析领域最经典也是用量最大的分离介质, 在生物纯化及工业生产领域有着不可替代的地位。

目前, 国内使用的此类介质多依赖于国外进口, 价格昂贵, 应用成本较高, 国内类似研究产品性能与其相比还存在一定的差距, 亟待提升。因此, 研究和开发该类生化分离介质具有很高的实用价值。

笔者利用反相悬浮凝胶聚合原理, 以环氧氯丙烷为交联剂, 甲苯为有机分散相, 通过筛选分散剂, 制备了交联葡聚糖凝胶微球, 并详细研究了其制备影响因素及过滤分离的性能。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

SZCL-4B 智能磁力加热搅拌器(巩义市予华仪器责任有限公司生产); Eclipse 80i 生物显微镜(日

收稿日期: 2014-06-18; 修回日期: 2014-09-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21375093); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20130032120081); 天津大学自主创新基金资助项目(1102213)

作者简介: 包建民(1961-), 男, 博士, 教授, 博导, 主要研究方向为药物分析和仪器分析等, 022-27892820, bao@tju.edu.cn; 李优鑫(1981-), 男, 博士, 讲师, 主要研究方向为色谱填料的开发及应用等, 通讯联系人, 022-27892820, lyx@tju.edu.cn。

本尼康公司生产);立式冷藏层析柜(河南新飞电器有限公司生产);电热恒温干燥箱(天津市天宇实验仪器有限公司生产);Carry 60 UV-Vis 紫外分光光度计(安捷伦科技公司生产)。

葡聚糖 4 万(国药集团化学试剂有限公司生产);甲苯(天津市江天化工技术有限公司生产);聚乙酸乙烯酯 3 万~5 万(国药集团化学试剂有限公司生产);油酸(国药集团化学试剂有限公司生产);环氧氯丙烷(天津市江天化工技术有限公司生产);达卡巴嗪(武汉拉那白医药化工有限公司生产);胆固醇(北京普博欣生物科技有限公司生产);磷脂(天津希恩思生物科技有限公司生产)。

1.2 交联葡聚糖凝胶微球的制备

将水相 20 mL 20% 葡聚糖溶液加至 250 mL 三口烧瓶中,加入 100 mL 内含 2% 聚乙酸乙烯酯和 0.2% 油酸的甲苯有机相,机械搅拌均匀,加热至 50℃。并向上述溶液中加入 5.0 mL 环氧氯丙烷,反应 16 h 后,停止反应,冷却至室温,过滤,收集到的产物依次经甲苯、乙醇、水、乙醇清洗得到湿态脱水微球,再经 80℃ 干燥,得干粉状微球。

1.3 微球表现性能表征

1.3.1 球形度与粒径

将所制葡聚糖凝胶微球均匀分散于 20% 乙醇水溶液中,用 10 倍光学显微镜观测其球形度及粒径大小,用于判断各条件下制备效果的考察。

1.3.2 溶胀度表征

溶胀度的高低与微球浓度和交联度相关,交联度也影响着微球的孔径。制备出来不同吸水量的微球可以分离不同相对分子质量范围的蛋白或其他生物大分子^[2],因此用吸水溶胀度来表征微球的分离适用范围,测定过程为:称取 1.0 g 微球干粉,置于 25 mL 量筒中。向量筒中加入 10 mL 蒸馏水,室温下溶胀 24 h,期间间歇搅拌,以确保凝胶完全溶胀,并记录其溶胀体积。

1.4 交联葡聚糖凝胶微球应用于脂质体与游离药物的分离

1.4.1 缓冲溶液与样品液的配制

pH 7.4 PBS 缓冲液:称取 6.800 g 磷酸二氢钾至 1 000 mL 容量瓶,加 395 mL 0.1 mol/L NaOH 水溶液溶解,加水稀释定容,得 89.5 mmol/L pH 7.4 PBS 缓冲液。

待测样品液:称取 0.360 g 磷脂与 0.060 g 胆固醇,加适量氯仿溶解并进行旋蒸,静置挥发溶剂。然后将含有约 0.010 g 抗癌药物达卡巴嗪的水相溶液

加入到上述旋蒸瓶中,超声混合即得。

1.4.2 脂质体与游离药物的凝胶过滤分离

分别取所制 20%、40% 葡聚糖凝胶微球和 Sephadex G50 干胶粉各 1.5 g 于小烧杯中,加水浸泡 24 h。将溶胀好的凝胶微球装于 10 mm × 100 mm 含有下挡板的商品化玻璃层析管中,得凝胶层析柱。使用 5 倍柱体积的 pH 7.4 PBS 缓冲液过柱平衡,并保证最后缓冲液面略高于凝胶层面。上样 0.1 mL 待测样品液静置 5 min,使用 pH 7.4 PBS 缓冲液过柱洗脱。每 0.5 mL 洗脱液收集一管。将收集的洗脱液经紫外分光光度计于 330 nm 波长条件下进行吸光度检测,并绘制分离曲线。

2 结果与讨论

2.1 交联葡聚糖凝胶微球的合成原理

反相悬浮聚合法制备交联葡聚糖凝胶微球的原理及过程:直链葡聚糖单体分子与高纯水或者碱性水溶液混合,形成分散均一的多糖溶液。然后在搅拌条件下加入到含有乳化剂的均匀有机油相中,使葡聚糖分子快速均匀地分散。随后加入适量的交联剂,在碱性环境下,葡聚糖分子上的糖羟基与交联剂上的活性官能团反应形成网状交联产物,并在分散剂的作用下聚合成凝胶多孔结构,形成具有网状多孔结构的聚合物微球。其中合适的分散剂能够更好地降低水相分子与有机油相之间的表面张力,并能一定程度上防止乳滴之间的聚合,使水相分子在有机相环境中更好地均匀分散^[8]。笔者分别以甲苯为有机分散相,并与相应的乳化剂配合使用,制得了不同浓度范围的交联葡聚糖凝胶微球。

2.2 有机分散相制备凝胶微球影响因素考察

以甲苯为有机分散相,聚乙酸乙烯酯为分散剂,油酸为乳化剂,环氧氯丙烷为交联剂制备了 20% 葡聚糖凝胶微球,并对搅拌速度、交联固化时间、乳化剂和分散剂用量等影响因素进行了详细地考察。

2.2.1 搅拌速度与固化时间的考察

搅拌速度直接影响着葡聚糖凝胶微球粒径形成的尺寸和分散性,速度越大,所制微球粒径越小且分布越窄,分散性能越好。固化时间对微球球体的形成以及粒径和孔径的大小与分散性都有一定的影响。按照 1.2 实验步骤,考察了搅拌速度和固化时间对制备效果的影响,结果如表 1 所示。

结果表明,搅拌速度越大,固化时间越长,所形成的微球的粒径越小,其微球粒径范围越窄,分散性能越好。按照表 1 中的实验现象,反应体系选择了

表1 搅拌速度及固化时间对葡聚糖微球制备的影响

| 搅拌速度/ ($r \cdot \min^{-1}$) | 固化 时间/h | 实验结果(球体形态) |
|----------------------------------|------------|------------------------------------|
| 1000 | 16 | 粒径太小,无法观测到球体 |
| 800 | 16 | 球体间粘连较为严重,微球粒径在20 μm 左右 |
| 600 | 16 | 球形度较好,微球粒径30~200 μm 居多 |
| 800 | 6 | 微球粒径不足40 μm |
| 600 | 6 | 微球球形度较差,粒径>200 μm |

600 r/min, 固化时间为16 h的反应条件, 该反应条件下制备的微球形态如图1所示。

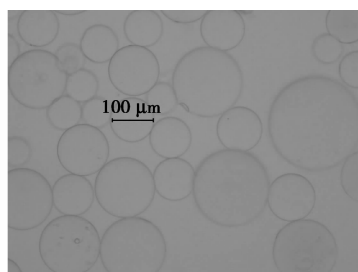
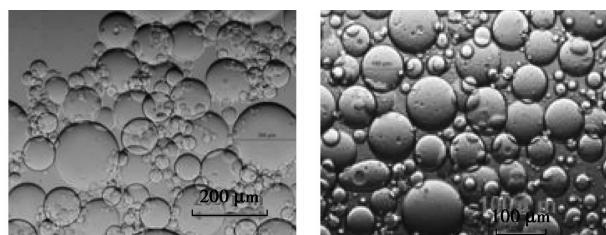


图1 以甲苯为油相制备的葡聚糖微球

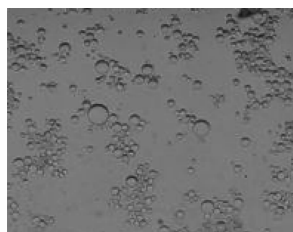
2.2.2 分散剂和乳化剂的影响

良好的分散剂能够较好地降低葡聚糖水相分子与甲苯有机相之间的表面张力, 同时可附着于葡聚糖乳滴表面, 形成一层保护膜, 能有效防止乳滴聚集, 使形成的微球更加稳定且分散, 其量的多少一定程度上也影响乳滴的大小及均匀性。笔者选用聚乙烯醇为分散剂, 油酸为乳化剂, 分别考察了未加入油酸与加入油酸(质量分数为0.2%和0.4%)2种状态下所制微球的效果, 如图2所示。



(a) 不加油酸

(b) 质量分数为0.2%



(c) 质量分数为0.4%

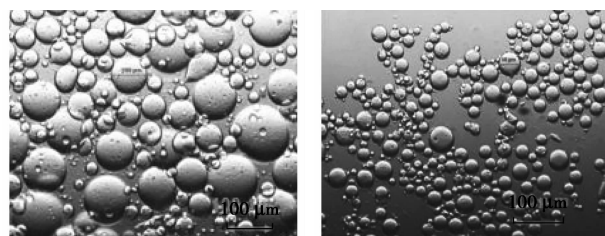
图2 油酸加入对葡聚糖微球制备的影响

结果表明, 不加油酸时, 在现行体系下所形成的微球形度较好, 球体表面光滑, 其粒径在30~200 μm 之间分布; 随着油酸加入量的增加, 微球的球形形态发生变化且微球的粒径在不断地减小。这是由于分散剂与乳化剂都具有降低油水两相表面张力的作用, 在一定程度上聚乙烯醇也可促进乳化, 二者的双重作用导致了球形形态的变化, 随着油酸质量分数的增加, 微球的粒径变化也更加明显。

2.2.3 均匀预分散的影响

预分散是指从葡聚糖水相分子与有机相的均匀分散, 此时葡聚糖水相分子经搅拌在有机相中开始形成乳滴, 该乳滴具有不稳定性, 在搅拌剪切力的作用下也在不断地破碎与合并, 同时, 聚乙烯醇附着于乳滴表面, 也可防止乳滴之间不断地聚合。随着预分散的进行, 乳滴的破碎与聚合以及聚乙烯醇在表面的吸附解析达到平衡, 此时乳滴粒径也趋于稳定^[9]。因此, 预分散时间的长短在一定程度上影响着微球的粒径大小及球形度的好坏和分散均匀性。

考察了1 h和3 h分散时间下, 葡聚糖微球的制备效果, 结果如图3所示。结果表明, 当预分散时间为1 h时, 形成的微球粒径在30~150 μm 之间, 球体较大, 且粒径分布较为宽泛; 预分散时间延长到3 h后, 微球的粒径减小比较明显, 且粒径分布也变得均匀。



(a) 1 h

(b) 3 h

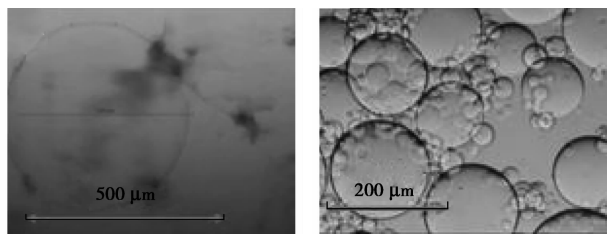
图3 预分散时间对葡聚糖微球制备的影响

2.2.4 交联剂的影响

为了改善葡聚糖凝胶的成球性能及机械稳定性, 需要在反应过程中加入交联剂, 交联反应与葡聚糖的成球同时进行, 交联剂的加入量、加入时间以及加入方式都影响着葡聚糖微球的成球性能。

笔者分别考察了预分散之前将交联剂与有机分散相预先混合和预分散之后加入交联剂对制备效果的影响, 如图4所示。结果表明, 在油水两相预分散之前预先将交联剂加入到有机相中进行反应时, 所制凝胶不成球体或者粒径偏大(500 μm 左右)。预

分散稳定之后加入交联剂环氧氯丙烷所形成的微球的球形度较好,且球体未有粘连现象,分散较为均匀。主要原因是当交联剂与有机分散相预先混合或者在体系未预分散稳定之前加入时,交联剂的加入使体系的黏度增大,乳滴之间的分散能力减弱,易造成乳滴凝集或合并,形成不规则或大粒径的微球。一次性加入交联剂时,易造成足量的交联剂分散的不均匀性,各乳滴间交联度不同,且黏度也相应增加,易造成球体间的黏连现象;若逐滴加入时,使交联剂分散更加均匀,避免了球体间交联反应的不均匀性,所形成的球体分散性更好,粒径分布更窄。



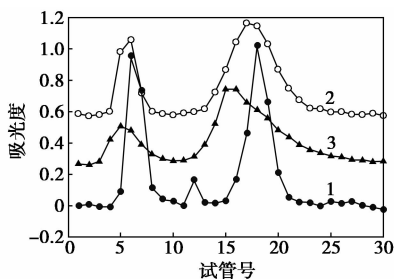
(a) 交联剂预先与有机相混合 (b) 预分散后加入交联剂

图 4 交联剂对实验结果的影响

2.3 载药脂质体与游离药物的分离效果

脂质体是一种非常好的常用药物载体,可以将药物包封于脂质体的囊泡中起到缓释、靶向定位、降低药物毒性及提高药物稳定性的作用。药物包埋于脂质体囊泡的量一般用包封率来表示,其测定需要先将混合后的脂质体与游离的药物进行有效的分离,得到单一组分即可进行含药量的测定。笔者用自制葡聚糖凝胶微球将载药脂质体与游离药物达卡巴嗪进行分离,利用达卡巴嗪的紫外吸光性能测定分离效果,并与 Sephadex G50 比较,检测凝胶性能。

按照 1.4 实验步骤,所制葡聚糖凝胶微球与 GE Sephadex G50 对载药脂质体与游离药物的分离效果如图 5 所示。

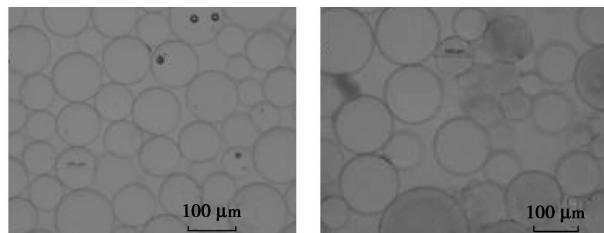


1—GE Sephadex G50; 2—自制质量分数为 40% 葡聚糖微球;
3—自制质量分数为 20% 葡聚糖微球

图 5 脂质体和达卡巴嗪在不同类型葡聚糖凝胶介质中的分离结果

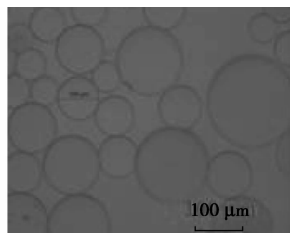
由于载药脂质体与游离药物的相对分子质量或者分子尺寸大小不同,依据分子排阻理论^[10],在凝胶过滤过程中分子尺寸较大的载药脂质体优先被分离出来,分子较小的达卡巴嗪药物单体后被分离出来。实验中使用 2 种类型的葡聚糖凝胶过滤介质均可得到 2 个分离峰。与国外进口 Sephadex G50 相比,使用自制葡聚糖凝胶微球对于载药脂质体与游离药物的分离均可得到较为满意的分离度,但在分离柱效方面存在不足,这与微球的粒径和孔径的分布范围及球形度有关。多孔凝胶微球的粒径和孔径大小越均一,介质的分辨率就越高,得到的分离峰越窄,柱效越高;反之,当微球的粒径和孔径分布较宽时,就会造成分辨率降低,分离峰变宽甚至呈不对称分离曲线。同时,大粒径的凝胶微球,在柱层析时,阻滞作用较小,流速较快,利于操作,但分辨率较低,分离峰较宽;小粒径的微球分辨率高,出峰效果好,但流速慢,柱反压大。

实验用 3 种凝胶微球的光学显微图如图 6 所示。



(a) GE Sephadex G50

(b) 自制质量分数为 40% 葡聚糖微球



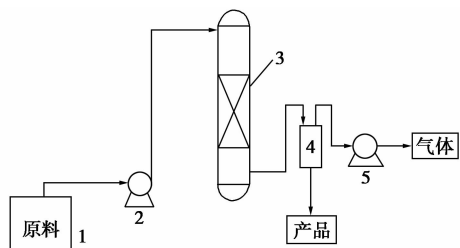
(c) 自制质量分数为 20% 葡聚糖微球

图 6 实验用 3 种葡聚糖凝胶介质光学显微图

其中国外进口产品粒径较均一且溶胀后球形度完好,自制质量分数为 20% 的葡聚糖凝胶微球经过初筛后粒径多分布在 30 ~ 150 μm,溶胀后球形度较好。

总之,自制葡聚糖微球在脂质体与药物分离上有较好的分离度,能够满足一般生物分子或化合物的分离。但目前与国外进口产品相比在产品性能上尚有一定的差距,还需进一步的优化,提升自制葡聚糖凝胶微球的整体质量。

(下转第 60 页)



1—原料罐;2—泵;3—反应器;4—产品分离罐;
5—湿式气体流量计

图 1 加氢改质反应装置

加助剂的催化剂对均四甲苯有很好的脱除效果,结果如表 2 所示。

表 2 不同分子筛的催化性能

| 催化剂 | $w(\text{苯})$ | $w(\text{均四甲苯})$ | 均四甲苯转化率/% |
|--------------------------------|---------------|------------------|-----------|
| 商品 Cr/ Al_2O_3 | 7.80 | 3.02 | 91.3 |
| $\text{MoO}_3/\text{HZSM}-5$ | 4.80 | 8.55 | 75.3 |
| ZSM-11 | 3.10 | 20.20 | 41.8 |
| H β | 5.60 | 16.10 | 53.6 |
| 分子筛 M | 0.36 | 4.95 | 85.7 |
| La-X/分子筛 M | 0.34 | 2.65 | 92.3 |
| Mo/分子筛 M | 0.38 | 4.05 | 88.3 |

注: X 代表某种金属。

2 结果与讨论

2.1 分子筛种类筛选及改性

重芳烃改质催化剂主要有商品化的 Cr 基催化剂和分子筛类催化剂。Detol 工艺中的 Cr 基催化剂是由 ABB Lummus Crest 公司开发^[2], 一般使用温度比较高(550~650℃), 对设备及催化剂稳定性要求高。UOP 公司^[3]开发了一种以丝光沸石为载体负载 Re 为活性组分的催化剂, 该分子筛催化剂使用条件温和、转化率高。分子筛通过添加助剂可以提高催化剂的活性, 改善催化剂的耐热性、抗毒性、机械强度和使用寿命等性能。在选择助剂上要考虑 2 方面因素: ①金属在催化剂载体上的分散形式; ②2 种金属之间的相互作用程度。助剂改性直接影响催化剂的使用效果, 从实验中可知, 分子筛催化剂及添

从表 2 可知, 商品 Cr 基催化剂和分子筛 M 对均四甲苯的转化率比较高, 但 Cr 基催化剂会生成苯, 不满足调和汽油对苯质量分数 < 1% 的要求; 而用分子筛 M 作为活性组分避免了 Cr 基催化剂的缺点, 在较低的温度下就能有好的活性。这是由于分子筛 M 具有合适的酸中心, 控制了 C—C 键的裂解能力, 使 C—CH₃ 不至于过多的裂解。用 La-X 改性后的 M 对均四甲苯具有更高的活性, 其他助剂对活性也有所改善。说明添加助剂改变了主催化剂的表面结构, 增加了其表面的活性中心数, 从而提高了均四甲苯的转化活性。

2.2 粘结剂筛选

分子筛类催化剂需要选择合适的粘结剂以便成型, 不同粘结剂对催化活性有较大的影响。采用硅

(上接第 58 页)

3 结论

以甲苯为有机分散相, 聚乙酸乙烯酯为分散剂, 环氧氯丙烷为交联剂制备了葡聚糖凝胶微球, 并系统考察了搅拌速度、固化时间、预分散时间、交联剂加入方式、分散剂用量等对所制备微球的影响。

同时, 用自制葡聚糖凝胶微球将载药脂质体与游离药物达卡巴嗪进行分离, 利用达卡巴嗪的紫外吸光性能测定分离效果, 并与 Sephadex G50 比较。自制葡聚糖凝胶微球与国外进口产品相比, 在粒径与孔径分布方面尚存在不足, 但仍具有较好的凝胶过滤性能。

参考文献

- [1] Porath J, Flodin P. Gel filtration: A method for desalting and group separation[J]. Nature, 1959, 183: 1657-1659.
- [2] 上海医药工业研究院技术情报站. 国外交联葡聚糖凝胶应用的动态[J]. 医药工业, 1997, 7: 37-54.

- [3] Glad G, Johansson B L, Maloisel J L. Separation medium for chromatography of various biomolecules; US, 20130153499[P]. 2013-06-20.
- [4] Yao R S, Gao W X, Sun J, et al. Preparation and adsorbability of dextran microspheres with uniform diameter[J]. Chin J Polym Sci, 2005, 23(4): 401-405.
- [5] 徐伟, 王芝祥. 葡聚糖凝胶介质及其制备方法: 中国专利, 1868577[P]. 2006-12-11.
- [6] Lawrence A, Richard L. Sephacryl gels: Physical properties and evaluation of performance in gel filtration[J]. J Liq Chromatogr, 1959, 183: 1657-1659.
- [7] 王佳兴, 苏志国, 马光辉. 生物分离介质的制备与应用[J]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 58-58.
- [8] 杨振平, 韩杰. 交联葡聚糖凝胶微球的制备: 微球表面形态的影响因素与控制[J]. 华东化工学院学报, 1990, 16(4): 375-380.
- [9] 杨振平, 韩杰. 交联葡聚糖凝胶微球的制备: 微球表面形态的影响因素与控制[J]. 华东化工学院学报, 1990, 16(4): 381-385.
- [10] Wang Y, Teraoka I, Hansen F Y, et al. A theoretical study of the separation principle in size exclusion chromatography[J]. Macromolecule, 2010, 43: 1651-1659. ■