

可逆交联聚电解质微胶囊的制备及表征

刘建军¹,郑世睿²,姚舒婷¹,彭志勤¹,万军民¹,王秉¹,胡智文¹

(1. 浙江理工大学材料与纺织学院,杭州 310018;2. 山东英利实业有限公司,山东潍坊 262700)

摘 要:微胶囊在医药、食品、化妆品、日用品等行业都有重要应用,其中作为缓释载体的智能降解型微胶囊受到人们越来越多的关注。以 MnCO_3 微粒为模板,采用聚烯丙基胺盐酸盐(PAH)作为壁材,通过层层自组装(LBL)方法得到二硫键交联的聚电解质微胶囊,并对该微胶囊的形貌和化学结构进行了表征分析。结果表明:制备得到微胶囊粒径分布均匀,大小在 $2.40\ \mu\text{m}$ 左右,壁厚约为 $55.25\ \text{nm}$;具有一定的机械强度,在高浓度的聚苯乙烯磺酸钠(PSS)溶液中会发生可逆弹性形变;傅里叶红外光谱显示,PAH 中的部分氨基已经与交联剂 3,3'-二硫代二丙酸(DPA)中的羧基在 EDC/NHS 存在的条件下发生了交联反应,从而形成了比较稳定的囊壁结构。

关键词:微胶囊;缓释;模板法;层层自组装;可逆交联

中图分类号: TB34

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2017)04-0587-05

0 引 言

微胶囊是一种以天然或人工合成高分子作为囊壁材料组成的微型中空结构容器或者包装物。微胶囊的内部既可以是中空的,也可以用来填充内容物,所以通常用来包埋小分子药物、多肽、蛋白质、核酸等物质,从而降低外界环境对包埋物的影响^[1-5]。如今,微胶囊作为一种有效载体,在药物控释、基因传递、靶向治疗等方面受到广泛关注^[6-7]。

近年来,微胶囊的新型制备技术不断涌现,例如:多流体复合电喷法、层层自组装法、悬浮聚合法、模板法等^[8-12]。其中,模板-层层自组装法制备得到的微胶囊具有尺寸可控、囊壁材料选择多样、易引入功能基团从而赋予微胶囊智能响应的优点。囊壁材料的选择会影响到微胶囊的缓释、流动、溶解、渗透等性能。根据细胞及生物体内外环境的不同,制备在体外保持结构稳定、在体内 pH 或者酶的作用下可以降解的微胶囊,对于阐明胶囊材料在体内的变化机制,实现药物的有效传递具有重要价值^[7,13-16]。

本文设计和构建一种二硫键可逆交联聚电解质

微胶囊,该胶囊以 MnCO_3 微粒为模板,聚烯丙基胺盐酸盐(PAH)作为壁材,通过层层自组装方法得到。本文利用场发射扫描电子显微镜(FE-SEM)、原子力显微镜(AFM)、激光共聚焦显微镜(CLSM)和傅里叶变换红外光谱(FTIR-ATR)等测试方法系统表征了微胶囊的形貌和化学结构,为其在生物医学领域的应用提供理论指导。

1 实 验

1.1 实验试剂

聚烯丙基胺盐酸盐(PAH, $M_w \approx 65\ \text{kD}$)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、荧光素异硫氰酸酯(FITC)、一水合硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、碳酸氢铵(NH_4HCO_3)、3,3'-二硫代二丙酸(3,3'-Dithiodipropionic acid, DPA)、氯化钠(NaCl)、N-羟基丁二酰亚胺(1-hydroxy-2,5-pyrrolidinedione, NHS)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC)、聚苯乙烯磺酸钠(Poly(sodium-p-styrenesulfonate), PSS, Sigma-Aldrich 公司),试剂

收稿日期:2016-10-30 网络出版日期:2017-01-19

基金项目:国家自然科学基金项目(51603188);浙江省自然科学基金项目(LQ15E030004);浙江理工大学科研启动基金项目(13012141-Y)

作者简介:刘建军(1990-),男,江苏南京人,硕士研究生,主要从事生物医用材料方面的研究。

通信作者:胡智文, E-mail: zstu17526@126.com

均为分析纯;实验用水为经 Milli-Q water system (millipore, USA) 过滤的超纯水。

1.2 MnCO_3 微粒模板的制备

将适量的 NH_4HCO_3 和 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶于超纯水中,分别配制成 0.20 mol/L 和 0.02 mol/L 的 NH_4HCO_3 和 MnSO_4 溶液备用。取 400 mL MnSO_4 溶液置于 2 L 烧杯中,向其中加入 80 mL 无水乙醇,用高速磁力搅拌器搅拌使其混合均匀。在磁力搅拌器搅拌下向烧杯中迅速加入 400 mL NH_4HCO_3 溶液,持续搅拌 5 min,然后静置 10 min 使其反应沉淀,直至生成的所有微粒粒子完全沉淀。用高速离心法快速收集微粒粒子,并用超纯水洗涤 3 次,最后按照一定比例分散在超纯水中备用。

1.3 层层自组装法制备中空微胶囊

自组装溶液的配制:准确称取 29.25 g NaCl 溶于适量超纯水中,待溶解完全,转移至 1 L 容量瓶中,定容,得 0.50 mol/L 的 NaCl 溶液,用 NaOH 溶液调节 pH 至 10 备用;称取 2.00 g PAH 溶于适量 NaCl 溶液中,完全溶解后于 1 L 容量瓶中定容,得 2.00 g/L PAH 溶液备用;准确称取 0.41 g 的 DPA,0.37 g 的 EDC 和 0.22 g 的 NHS 加入到加入适量超纯水,搅拌使其完全溶解,转移溶液至 1 L 容量瓶中,定容,得到 0.1% 的 DPA-EDC-NHS 溶液备用。

微胶囊的制备:模板-层层自组装法制备微胶囊示意图如图 1 所示。取适量上述步骤中制备的 MnCO_3 微粒模板(微粒净重约 500~1000 mg)置于 50 mL 离心管中,用超纯水洗涤 3 次,离心后去上清液并收集微粒。向离心管内加入 30 mL 2 mg/mL 的 PAH 溶液,使微粒重新分散,孵育 30 min,然后以 3000 r/min 的转速离心 3 min,去上清,用超纯水洗涤 3 次。将组装有一层 PAH 的微粒重新分散至 30 mL 的 0.1% 的 DPA-EDC-NHS 溶液中,孵育 30 min,然后 3000 r/min 下离心 3 min,去上清,超纯水洗涤 3 次。重复以上自组装过程 4 次,最后得到核壳结构的胶体微粒,其组成为 $\text{MnCO}_3 @ (\text{PAH}/\text{DPA})_4$ 。将此核壳结构的胶体微粒用 0.1 M 的盐酸处理 10 min,期间轻微振荡离心管以保持粒子悬浮。3000 r/min 离心 5 min,去上清。然后加入 0.01 M 的 EDTA 溶液离心洗涤 3 次,除去 Mn^{2+} 。再用超纯水洗涤 3 次,得到组成为 $(\text{PAH}/\text{DPA})_4$ 的微胶囊。

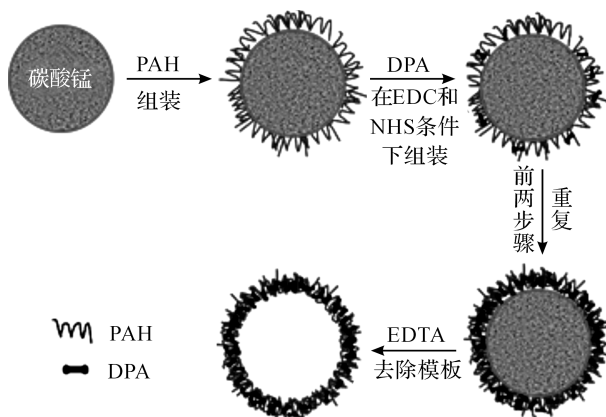


图1 模板-层层自组装法制备微胶囊示意图

1.4 微胶囊的表征

1.4.1 场发射扫描电子显微镜(FE-SEM)分析

将制得的 MnCO_3 模板微粒和微胶囊分别均匀分散在超纯水溶液中(浓度约为 1×10^6 个/mL),用微量移液器吸取 20 μL 悬浮液滴加到洁净的硅片上,在 37 $^\circ\text{C}$ 条件下烘干。采用 FE-SEM (Hitachi, S4800) 在 1 kV 电压下观察模板微粒和微胶囊的表面形貌。

1.4.2 原子力显微镜(AFM)分析

将制备得到的 $(\text{PAH}/\text{DPA})_4$ 微胶囊加入到 20% 的 PSS 溶液中,涡旋 30 min 使其分散均匀。用微量移液器吸取 20 μL 悬浮液滴加至洁净硅片上,在 37 $^\circ\text{C}$ 条件下烘干,采用 AFM (PSIA, XE-100E) 观察。

1.4.3 激光共聚焦显微镜(CLSM)分析

量取一定体积的微胶囊悬浮液,与等体积的 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的荧光染料 FITC 溶液混合,振荡反应过夜,以 3000 r/min 的转速离心洗涤 3 次,得到 FITC 标记的微胶囊。取适量 FITC 标记的微胶囊均匀分散于超纯水和 20% (w/w) 的 PSS 溶液中(浓度约为 1×10^6 个/mL),分别取 1 mL 微胶囊滴到两个洁净的 35 mm 培养皿内,采用激光共聚焦显微镜(徕卡,SP5)分别进行观察。

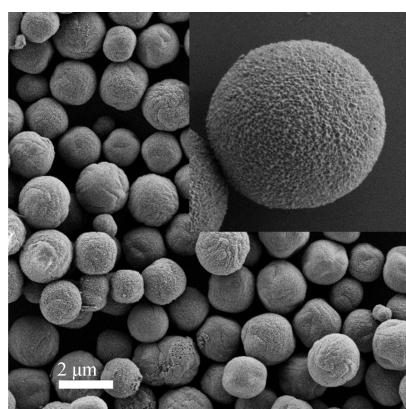
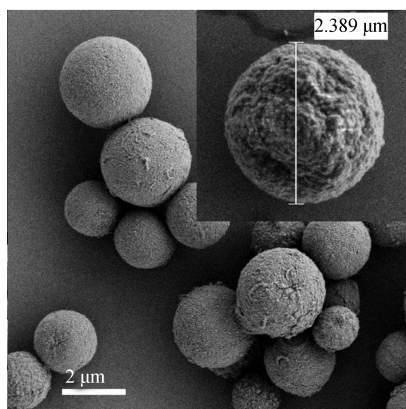
1.4.4 傅里叶变换红外光谱(FTIR-ATR)测定

取适量 PAH 和 DPA 粉末以及冷冻干燥后的 $(\text{PAH}/\text{DPA})_4$ 微胶囊粉末分别和纯溴化钾 (KBr, Sigma) 混合压片,采用傅里叶红外变换光谱仪 (ThermoElectron, Nicolet5700) 对样品进行红外光谱分析,扫描范围为 $4000 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$,分辨率 4 cm^{-1} 。

2 结果与讨论

图 2(a) 为通过模板法制备得到的 MnCO_3 微粒的扫描电镜图。根据 Image J 软件统计测量, MnCO_3 微粒的粒径为 $(1.9 \pm 0.2) \mu\text{m}$ 。微粒呈现规整的球形形

貌,尺寸分布比较均匀,是理想的微胶囊制备模板。从单个 MnCO_3 微粒的放大图可以看出,微粒表面形貌比较粗糙,存在一些尖锥状微结构。图 2(b)为层层自组装并且去除 MnCO_3 微粒模板后得到微胶囊的扫描电镜图。与常见的微胶囊不同, $(\text{PAH}/\text{DPA})_4$ 微胶囊在干态下并未发生塌陷,而是保持良好的球形。由于微胶囊本身呈中空状态,推测该微胶囊的囊壁具有较高的机械强度。此外,与 MnCO_3 微粒模板相比,微胶囊的尺寸略有增大($(2.4 \pm 0.2) \mu\text{m}$),表面呈现凹凸形态,这是由于层层自组装过程中壁材组装不均匀造成的。

(a) MnCO_3 微粒

(b) 微胶囊

图2 MnCO_3 微粒和微胶囊的场发射扫描电镜图

图3为 $(\text{PAH}/\text{DPA})_4$ 微胶囊分散于20%的PSS溶液中干燥后所得样品的原子力显微图像。从图3中可以看出,微胶囊表面呈现褶皱形貌,这是由于在高渗透压条件下,囊壁的机械强度无法支撑胶囊结构产生形变,进而在干燥后塌陷,并且塌陷后的微胶囊直径有所增加,同时也说明微胶囊内部的 MnCO_3 微粒模板已被除去。通过AFM图像的剖面图中最低处与基底之间的高度差,可以得到微胶囊壁厚为 $(55.25 \pm 1.62) \text{ nm}$ 。相比光滑平面上 PAH/DPA 多层膜的厚度有所增加,这是因为 MnCO_3 模板粗糙表面可以吸附聚电解质的量更多,从而生成更厚的膜^[17]。

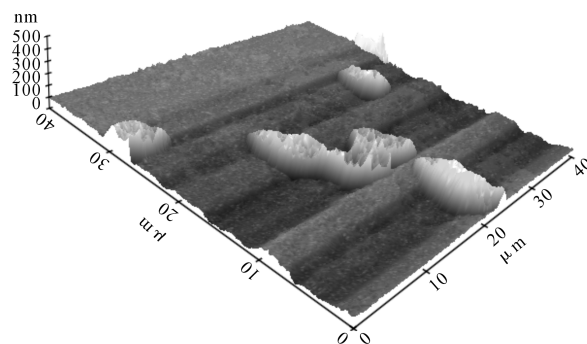
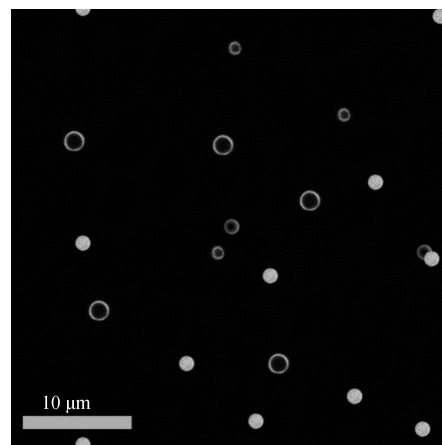
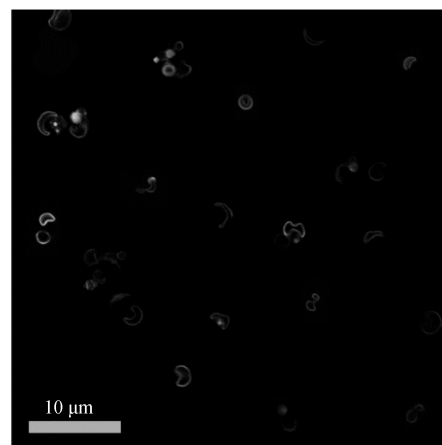


图3 微胶囊的原子力显微镜图

图4为FITC荧光标记的 $(\text{PAH}/\text{DPA})_4$ 微胶囊的荧光共聚焦显微镜图。从图4(a)可以看出 $(\text{PAH}/\text{DPA})_4$ 微胶囊在超纯水中具有良好的分散性,没有明显团聚的现象。由于在水中存在一定的溶胀,使得水溶液中的微胶囊粒径比干燥状态下粒径略大。图4(b)是微胶囊在20%浓度的PSS溶液中的图像,对比图4(a)可以证明微胶囊在高浓度的PSS溶液中存在明显的形变现象,这是由于PSS溶液渗透压较大,使得微胶囊受到压迫而变形,同时也佐证了原子力显微图像得出的假设。



(a) 分散在超纯水中



(b) 分散在20%的PSS溶液中

图4 微胶囊的激光共聚焦显微镜图像

图5是PAH、DPA和(PAH/DPA)₄成型微胶囊的红外谱图,其中:谱线a是PAH;谱线b是DPA;谱线c是(PAH/DPA)₄。从PAH的谱线中可以看出,PAH的O—H吸收带和C—H吸收带比较复杂,其伸缩振动峰分别出现在3444 cm⁻¹和2973 cm⁻¹附近,且峰宽较宽。1604 cm⁻¹和1511 cm⁻¹处分别为C—C键的伸缩振动峰和C—H键的变形振动峰;从DPA的谱线中可以看出,在3216 cm⁻¹和2927 cm⁻¹处分别为O—H和C—H的伸缩振动峰,1747 cm⁻¹处为C=O的伸缩振动峰,1180 cm⁻¹处为CH₂的非平面摇摆振动峰,1376 cm⁻¹处出现COO⁻对称伸缩振动峰,871 cm⁻¹处为C—C的伸缩振动峰,750 cm⁻¹和667 cm⁻¹处分别为C—S和S—S的伸缩振动峰;(PAH/DPA)₄微胶囊的谱线,结合DPA和PAH的谱线可以看出,在微胶囊中部分振动峰的位置发生偏移,这是因为PAH中的氨基发生交联和微环境的改变导致。其中,在3430 cm⁻¹和2921 cm⁻¹处分别出现O—H和C—H的伸缩振动峰,1510 cm⁻¹处为酰胺键的伸缩振动峰,1402 cm⁻¹为C—N的伸缩振动峰,748 cm⁻¹处为C—S伸缩振动峰,说明PAH中的部分氨基已经与DPA中的羧基在EDC和NHS存在的条件下发生了反应相结合,从而形成了比较稳定的囊壁结构。

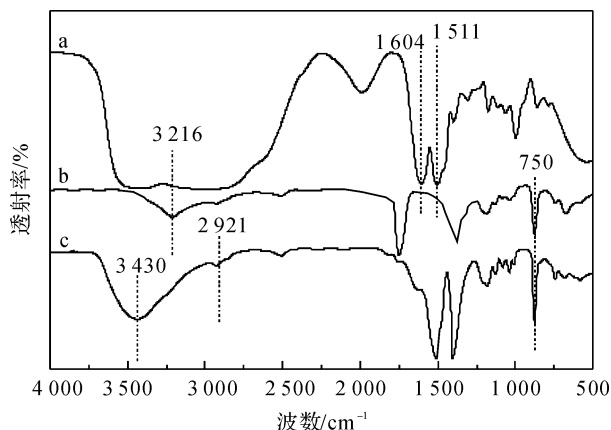


图5 微胶囊及囊壁材料的红外图谱

3 结论

采用模板-层层自组装法制备了一种可逆交联的聚电解质微胶囊。研究表明,以MnCO₃微粒作为模板,PAH和DPA通过交联反应可制得具有稳定囊壁结构的(PAH/DPA)₄微胶囊。该微胶囊尺寸大约为2.40 μm,壁厚约为55.25 nm,且在水中具有良好的分散性;具有一定的机械强度,在高浓度的聚苯乙烯磺酸钠(PSS)溶液中会发生弹性形变;

傅里叶红外光谱结果表明该微胶囊形成了比较稳定的囊壁结构。该微胶囊大小适宜,所用囊壁材料具有良好的生物相容性,而且交联反应具有可逆性,在药物传递载体及控制释放等生物医用领域具备良好的应用前景。

参考文献:

- [1] ROSE R D, ZELIKIN A N, JOHNSTON A P R, et al. Binding, internalization, and antigen presentation of vaccine-loaded nanoengineered capsules in blood [J]. *Advanced Materials*, 2008, 20(24): 4698-4703.
- [2] SIVAKUMAR S, BANSAL V, CORTEZ C. Degradable, surfactant-free, monodisperse polymer-encapsulated emulsions as anticancer drug carriers [J]. *Advanced Materials*, 2009, 21(18): 1820-1824.
- [3] ZELIKIN A N, BECKER A L, JOHNSTON A P R, et al. A general approach for DNA encapsulation in degradable polymer microcapsules [J]. *ACS Nano*, 2007, 1(1): 63-69.
- [4] KOKER S D, GEEST B D, SINGH S K. Polyelectrolyte microcapsules as antigen delivery vehicles to dendritic cells: uptake, processing, and cross-presentation of encapsulated antigens [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(45): 8485-8489.
- [5] SEXTON A, WHITNEY P G, CHONG S. Protective vaccine delivery system for in vivo T cell stimulation using nanoengineered polymer hydrogel capsules [J]. *ACS Nano*, 2009, 3(11): 3391-3400.
- [6] YANG X L, JU X J, MU X T, et al. Core-shell chitosan microcapsules for programmed sequential drug release [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(16): 10524-10534.
- [7] LI H, ZHANG W, TONG W, et al. Enhanced cellular uptake of bowl-like microcapsules [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(18): 11210-11214.
- [8] PARK C H, LEE J. Alternating encapsulation of water-soluble components in a one-dimensional structure [J]. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2010, 295(1): 22-25.
- [9] GAO W Y, WANG S J, MA H Q, et al. Combined situ polymerization and thermal cross-linking technique for the preparation of ammonium polyphosphate microcapsules with composite shell [J]. *Journal of Physical Chemistry C*, 2015, 119(52): 28999-29005.
- [10] 刘小萌, 乐园. 同轴气喷法制备海藻酸钠-十六烷相变微胶囊[J]. *高校化学工程学报*, 2014, 28(5): 1105-1111.
- [11] 王飞俊, 陆方姝, 邵自强. 静电喷雾法制备羧甲基纤维素/壳聚糖液芯微胶囊[J]. *高分子材料科学与工程*,

- 2014,30(9):117-121.
- [12] 陈洪燕,赵勇,江雷.一种有效的多室结构微胶囊制备方法:多流体复合电喷技术[J].科学通报,2009,54(10):1338-1343.
- [13] QIAO P Y, LI F F, DONG L M, et al. Delivering MC3T3-E1 cells into injectable calcium phosphate cement through alginate-chitosan microcapsules for bone tissue engineering [J]. Journal of Zhejiang University: Science B, 2014, 15(4):382-92.
- [14] XU W, STEINSCHULTE A A, PLAMPER F A, et al. Hierarchical assembly of star polymer polymersomes into responsive multicompartmental microcapsules [J]. Chemistry of Materials, 2016, 28(3):975-985.
- [15] GAO H, SAPELKIN A V, TITIRICI M M, et al. In situ synthesis of fluorescent carbon dots/polyelectrolyte nanocomposite microcapsules with reduced permeability and ultrasound sensitivity [J]. ACS Nano, 2016, 10(10):9608-9615.
- [16] KIM M, DOH J, LEE D. pH-induced softening of polyelectrolyte microcapsules without apparent swelling [J]. ACS Macro Letters, 2016, 5(4):487-492.
- [17] ANTIPOV A A, SHCHUKIN D, FEDUTIK Y, et al. Carbonate microparticles for hollow polyelectrolyte capsules fabrication [J]. Colloids and Surfaces A, 2003, 224(1-3):175-183.

Preparation and Characterization of Reversible Crosslinked Polyelectrolyte Microcapsules

LIU Jianjun¹, ZHENG Shirui², YAO Shuting¹, PENG Zhiqin¹, WAN Junmin¹, WANG Bing¹, HU Zhiwen¹

(1. College of Materials and Textiles, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Shandong Yingli Industrial Co., Ltd., Weifang 262700, China)

Abstract: Microcapsules have been widely used in medicine, food, cosmetics and daily necessities. Especially, the smart degradable microcapsules which served as carriers for controlled release of drugs, DNA, RNA and proteins have got more and more attentions. In this paper, a novel disulfide bond cross-linking degradable polyelectrolyte microcapsule was prepared via layer-by-layer (LBL) method. MnCO_3 microparticles and 3,3'-Dithiodipropionic acid (DPA) were employed as templates and wall materials, respectively. The results show that the microcapsules have uniform shape; the size is approximately 2.40 μm while the wall thickness is 55.25 nm. The SEM and AFM results show that the microcapsules have mechanical strength to some extent and occurred reversible deformation. The FTIR results also indicate that the amino groups of PAH can partially cross-link with carboxy groups of DPA in the presence of EDC/NHS, leading to the formation of stable walls of microcapsules.

Key words: microcapsule; controlled-release; template method; layer-by-layer self-assembly; reversible crosslinked

(责任编辑:唐志荣)