

## 明胶微球/磷酸镁基骨水泥复合药物缓释体系的构建

余素春, 喻莹, 戴红莲

(武汉理工大学 材料复合新技术国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** 采用乳化交联法制备出粒径主要分布在 100~300  $\mu\text{m}$  的载药明胶微球, 分析了交联剂含量、药物含量和转速对载药率和包封率的影响及药物含量和转速对微球粒径的影响。对载药明胶微球与磷酸镁基骨水泥进行复合, 探讨微球降解过程中复合体系孔隙率的变化及其在体外药物释放的规律, 以期获得一种具有药物缓释性能的多孔磷酸镁基复合骨水泥。结果表明, 随着葡萄糖浓度增加, 载药率和包封率先上升再下降; 随着药物含量的增加, 载药率保持上升, 包封率先上升后下降; 随着转速增加, 载药率和包封率均下降。综合分析, 在转速为 400 r/min、葡萄糖浓度为 0.5 g/mL、药物与明胶质量比为 1:2 的条件下制备的载药明胶微球载药量较高, 且粒径合适。将复合不同比例该载药微球的磷酸镁基骨水泥浸泡在 Tris-HCl 缓冲溶液中进行体外药物释放研究, 结果表明: 在释放前期(0~10 h)药物释放速率较快, 之后药物释放明显减缓。7 d 后, 微球几乎降解完全, 药物释放率达到 60%~89%, 达到了一定的药物缓释效果。

**关键词:** 明胶微球; 载药; 磷酸镁基骨水泥; 药物缓释

中图分类号: TB321; R318 文献标识码: A

## Construction of Gelatin Microsphere / Magnesium Phosphate Bone Cement Composite Drug Sustained Delivery System

YU Su-Chun, YU Ying, DAI Hong-Lian

(State Key Laboratory of Advanced Technology for Materials Synthesis and Processing, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Emulsification crosslinking method was applied to prepare drug-loaded gelatin microspheres, of which the particle size was mainly between 100–300  $\mu\text{m}$ . The influence of the crosslinking agent content, drug content and rotation speed on the drug-loading rate and encapsulation efficiency and the influence of the drug content and rotation speed on the microspheres' diameter were analyzed. The drug-loaded gelatin microspheres were deliberately combined with magnesium phosphate cement to produce porous magnesium phosphate composite bone cement with drug slow-release property, and then the changes of porosity of the composite system in the process of microsphere degradation and the drug release characteristics of the composite system *in vitro* were both explored. Results show that with the increase of glucose concentration, both the drug-loading rate and encapsulation efficiency increase firstly and then decrease, while both the drug content and the drug-loading rate increase and the encapsulation efficiency increases firstly and then decreases. Both the drug-loading rate and encapsulation efficiency decrease with the increase of rota-

收稿日期: 2016-10-08; 收到修改稿日期: 2016-11-14

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(81190133); 湖北省自然科学基金(2015CFB551); 湖北省科技支撑计划(2015BAA085); 武汉市应用基础研究计划(2015060101010032)

National Natural Science Foundation of China(81190133); Natural Science Foundation of Hubei Province (2015CFB551); Science and Technology Support Program of Hubei Province(2015BAA085); Wuhan Applied Basic Research Program(2015060101010032)

作者简介: 余素春(1992-), 女, 硕士研究生. E-mail: yscstst@foxmail.com

通讯作者: 戴红莲, 教授. E-mail: daihonglian@whut.edu.cn

tion speed. Comprehensive analysis show that the gelatin microspheres with high drug-loading rate and suitable diameter can be obtained under the condition of rotation speed of 400 r/min, glucose concentration of 0.5 g/mL and the mass ratio of drug to gelatin of 1:2. The drug release characteristics *in vitro* were studied by immersing the magnesium phosphate cement, which was combined with different proportions of drug-loaded microspheres, into the Tris-HCl buffer solution. Results show that in the early releasing stage of 1–10 h, the drug release rate is rapid and then it obviously slows down. After being released for 7 d, microspheres almost degraded completely and the drug release ratio reaches 60%–89%. Drug slow-release property is achieved to some extent.

**Key words:** gelatin microspheres; drug loading; magnesium phosphate based bone cement; drug sustained delivery

磷酸钙磷酸镁骨水泥作为一种骨缺损修复材料,具有自固化性、可塑性、良好的生物相容性和生物可降解性,近三十年来受到广泛关注<sup>[1-2]</sup>。虽然这类骨水泥固化后本身是一种多孔结构,但孔径较小,主要是纳米级和亚微米级的微孔,缺少血管长入的微米级孔、促进骨组织向内生长的数百微米大孔及细胞迁移和营养物质运输所需的贯通孔,在一定程度上影响了其实际应用效果<sup>[3-4]</sup>。若要制备包含较大孔隙的骨水泥,可以将可降解有机微球与骨水泥复合,微球降解后可在骨水泥的内部留下大孔,弥补骨水泥本身孔隙微小的缺陷,从而提高骨修复效率<sup>[5-7]</sup>。

骨缺损往往是由于骨肿瘤、骨结核等疾病导致一部分骨被切除,因此单独采用骨水泥填充对骨疾病治疗没有明显的作用。近年来,许多研究者考虑将药物载入骨水泥中实现修复骨缺损和治疗骨疾病的双重效果<sup>[8-9]</sup>。Lopez-Heredia 等<sup>[10]</sup>将紫杉醇载入可注射的磷酸钙骨水泥中并进行细胞实验,得到载药组中骨肉瘤细胞和转移性乳腺癌细胞的活性均比不载药组低,说明在骨水泥中载药可以达到一定的药物治疗效果。但也有学者指出,若将药物与骨水泥粉相或液相直接混合制备载药骨水泥,在水化过程中骨水泥和药物之间会产生相互不利的影响;若通过已固化的骨水泥再进行载药,药物会释放太快而无法达到缓释的效果;而若利用有机微球将药物包裹起来,再复合到骨水泥中,可在避免药物与骨水泥相互作用的同时提高药物缓释性能<sup>[11]</sup>。

为了实现快速修复骨缺损部位和药物治疗的双重效果,本工作拟研制一种复合载药明胶微球的磷酸镁基骨水泥。选择生物相容性及生物降解性好、无毒、无抗原性的明胶为原料<sup>[12]</sup>,常用于术后止痛的对乙酰氨基酚为药物模型<sup>[13]</sup>,利用乳化-交联法制备出载药明胶微球<sup>[14]</sup>,并将得到的最佳载药微球与前期研究的可注射性磷酸镁基骨水泥进行复合<sup>[15]</sup>。分析了交联剂含量、药物含量和转速对载药率、包封率的影响以及药物含量和转速对微球粒径的影响,并探讨

了微球降解过程中复合体系孔隙率、降解率的变化及其在体外的药物释放规律,最终得到一种具有药物缓释性能的多孔磷酸镁基复合骨水泥。

## 1 实验方法

### 1.1 材料与试剂

明胶、氧化镁、磷酸二氢钾、磷酸二氢钙、Span-80、石蜡、葡萄糖、异丙醇、对乙酰氨基酚,均购买自国药集团化学试剂有限公司,分析纯。氧化镁在 1600℃ 下煅烧 1.5 h,湿法球磨 2 h;磷酸二氢钾、磷酸二氢钙均湿法球磨 24 h 后分别过 200 目与 140 目筛。

### 1.2 载药明胶微球的制备

采用乳化交联法制备明胶微球。配制质量浓度为 25% 的明胶水溶液,然后将一定量的对乙酰氨基酚与其混合均匀,并预热至 50℃,作为水相备用。将 30 mL 液体石蜡和 3 mL Span-80 加入圆底烧瓶中,在 50℃ 下以 500 r/min 的转速搅拌 10 min。随后往其中缓慢滴加明胶溶液,以一定的转速搅拌乳化 10 min 后迅速改成冰水浴。当水浴温度降至 10℃ 时,继续搅拌 15 min,然后加入 1 mL 葡萄糖溶液交联 1 h。之后,加入 10 mL 的异丙醇絮凝 10 min,倒出乳液,用异丙醇清洗微球,直至完全去除油相。将得到的微球放在通风处,待异丙醇挥发后即得到最终的成品。

### 1.3 复合磷酸镁基骨水泥的制备

磷酸镁基骨水泥(MPBC)粉相由质量比为 1:3:1.5 的氧化镁、磷酸二氢钾和磷酸二氢钙均匀混合而成,液相为去离子水。取在转速为 400 r/min,葡萄糖浓度为 0.5 g/mL,药物与明胶质量比为 1:2 的条件下制备的载药明胶微球与骨水泥进行复合。在骨水泥的粉相中分别加入质量比为 2%、4%、6%、8% 的载药明胶微球,制备出的复合骨水泥记为 MPBC-2、MPBC-4、MPBC-6、MPBC-8。未加明胶微球的 MPBC 作为对照组。对液相和粉相以液固比为 1.8 g/mL 进

行调和, 入模成型后取出, 放置在 37℃、100%湿度下固化 24 h。

#### 1.4 微球粒径、载药率和包封率的测量

取 50 mg 的载药明胶微球溶于 50 mL 容量瓶, 混合均匀后取 2 mL 溶液置于 50 mL 容量瓶, 并稀释至刻度, 记录溶液在 245 nm 处的吸光度值, 并带入标准曲线方程( $Y = 0.06545X - 0.02494$ , 偏差  $|R| = 0.99648$ )计算微球中的药物浓度。根据式(1)、(2)计算载药率及包封率。

$$\text{载药率} = \text{微球中药物含量} / \text{微球总质量} \quad (1)$$

$$\text{包封率} = \text{微球中药物含量} / \text{投药量} \quad (2)$$

制备出的载药明胶微球进行过筛, 称量粒径 <100 μm、100~300 μm、>300 μm 范围的微球质量, 并除以总的微球质量, 得出分布在每个粒径范围的微球的百分比。

#### 1.5 复合骨水泥孔隙率、降解率及药物释放的测量

将固化 24 h 后的骨水泥置于离心管中, 以 20 mL/g 的比例加入 pH = 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液, 并放入 37℃、100 r/min 的恒温水浴震荡箱中, 每组三个平行样。

测量降解率时, 将固化 24 h 骨水泥取出后在 60℃烘箱中烘 12 h 并记录其初始质量  $W_0$ , 之后放入上述的 Tris-HCl 缓冲液中, 每天换一次液。在第 1、4、7 d 取出样品并在 60℃烘箱中烘 12 h 得到样品质量  $W_t$ , 样品失重率通过公式  $L = (W_0 - W_t) / W_0 \times 100\%$  计算。

测量孔隙率时, 在 1、7、14、21、28 d 时取出样品, 采用浸泡介质法测量骨水泥的孔隙率。称量样品在空气中的质量  $M_1$ ; 随后将样品浸泡在乙醇中 8 h, 使得乙醇充满在样品的空隙中, 然后擦去样品表面上的酒精, 并称其质量为  $M_2$ ; 将浸满了乙醇的样品放在吊具上, 浸入乙醇时样品和吊具的质量为  $M_3$ ; 而不含样品的吊具悬挂在乙醇中的质量为  $M_4$ 。通过公式  $\theta = (M_2 - M_1) / (M_2 - M_3 + M_4) \times 100\%$  来计算样品的孔隙率。

测量药物释放率时, 在第 1、3、6、10 h 及 1、3、5、7 d 时取样测试。离心后, 每次取 1 mL 上清液, 同时补充 1 mL 的 Tris-HCl 缓冲液, 并将取出的溶液稀释至 10 mL, 在 245 nm 处用紫外可见分光光度计测量吸光度值, 并根据对乙酰氨基酚的标准曲线计算药物浓度, 得到药物缓释曲线。

#### 1.6 复合骨水泥断面形貌

将固化 24 h 后的 MPBC 以及药物释放了 1 d 和 7 d 的 MPBC-8 取出, 用酒精浸泡以阻止水化, 然后在 37℃烘干, 采用扫描电镜(S-4800LV, 日本 Hitachi)

对水泥的断面形貌进行观察。

## 2 结果与讨论

### 2.1 微球载药率、包封率和粒径

葡萄糖的含量对载药率包封率的影响如图 1 所示, 随着葡萄糖浓度的增加, 载药率、包封率呈先少量降低, 随后增加, 之后又下降。当葡萄糖浓度为 0.5 g/mL 时, 载药率和包封率均最大。在制备过程中, 交联温度大约为 4℃, 此时葡萄糖在水中的溶液度为 0.57 g/mL<sup>[16]</sup>。这是因为在葡萄糖浓度为 0.5 g/mL 时, 明胶微球的交联程度最高, 得到载药率和包封率均最高, 而之后葡萄糖浓度继续增加会导致过饱和而析晶, 使得载药率和包封率下降。

控制葡萄糖溶液为 0.5 g/mL, 药物含量对微球的载药率和包封率的影响如图 2 所示。载药量随药物含量的增加而增加, 但包封率随药物含量的增加先上升后下降。初期随投药量的增加, 明胶溶液中整体药物含量上升, 使得载药率和包封率均增加, 之后继续增加药物含量, 药物在离心力的作用下被分散到溶液导致药物损失增加, 因此微球的载药率虽然增加, 但增加率逐渐减少, 同时包封率下降。从图 3 可以看出, 当药物含量越大时, 微球粒径也呈现增大的趋势。这是由于药物含量越大, 导致溶液的浓度越大, 在相同离心力的作用下分散得到的乳滴越大, 因此固化后得到微球的粒径增大。

当固定葡萄糖溶液浓度为 0.5 g/mL、药物与明胶质量比为 1:2, 而只改变乳化交联时的转速时, 由图 4 和图 5 可以分别看出, 随着转速增加, 载药率和包封率逐渐下降、微球粒径降低。这是由于转速增大造成

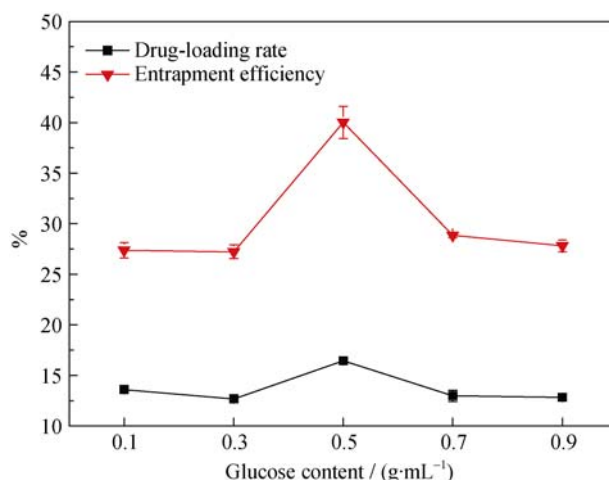


图1 葡萄糖含量对微球载药率和包封率的影响  
Fig. 1 Effects of glucose content on drug-loading rate and entrapment efficiency for microspheres

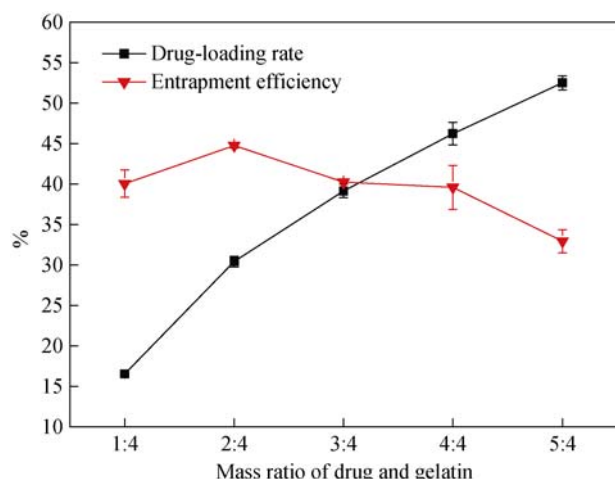


图 2 药物含量对微球载药率和包封率的影响

Fig. 2 Effects of drug content on drug-loading rate and entrapment efficiency for microsphere

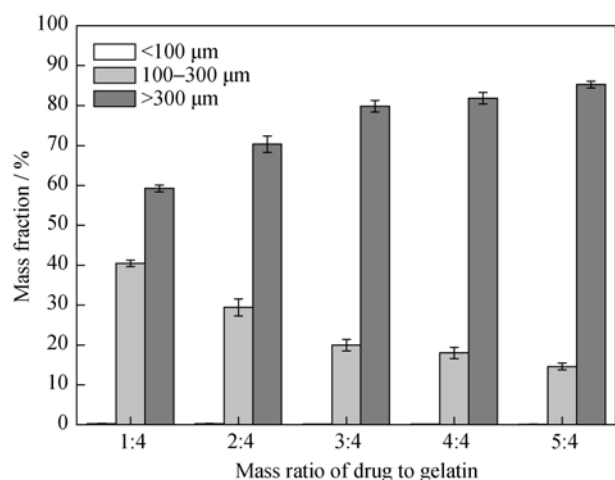


图 3 药物含量对微球粒径的影响

Fig. 3 Effects of drug content on microspheres' diameter

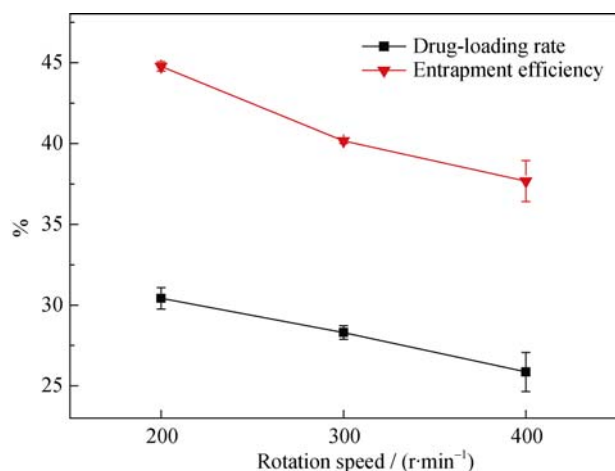


图 4 转速对微球载药率和包封率的影响

Fig. 4 Effects of rotation speed on drug-loading rate and entrapment efficiency

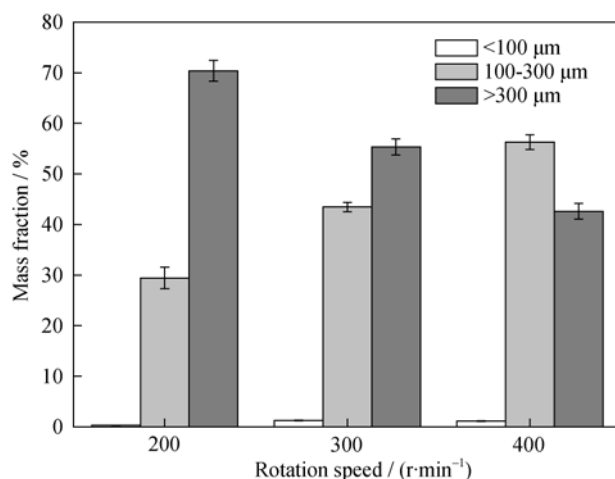


图 5 转速对微球粒径的影响

Fig. 5 Effects of rotation speed on microspheres' diameter

分散在明胶溶液中的药物受到的离心力增大, 更多的药物被分散到油相中而不能与明胶乳液一起成球。

综合以上分析, 在转速为 400 r/min、葡萄糖浓度为 0.5 g/mL、药物与明胶质量比为 1:2 的条件下制备的载药明胶微球较佳, 其载药率与包封率分别为 26.73%、32.86%, 粒径分布在 100~300 μm 的比例为 57.31%。在此条件下得到的载药明胶微球将与磷酸镁基骨水泥进行复合。

## 2.2 骨水泥降解率、孔隙率及微观断面形貌

图 6 为磷酸镁基骨水泥固化 24 h 后的断面形貌照片, 可以看出固化后的 MPBC 本身就是一个多孔材料, 其内分布了许多小于 200 nm 的不规则孔, 包含相互连通孔和独立的闭气孔。这些孔隙主要是调制浆体时由浆体的充水空间造成的毛细孔、搅拌时夹杂的空气或者内部反应产生的气泡等导致的。磷酸钙骨水泥内部的小孔隙率大约在 40%~50%<sup>[5,17]</sup>。

图 7 和图 8 分别表示骨水泥降解过程中失重率和孔隙率的变化。由图 7 可知, 在相同降解时间下复合磷酸镁基骨水泥(MPBC-2~MPBC-8)比 MPBC 降解快, 并且随着明胶微球含量的增加失重越大。从图 8 可以看出, 降解 1 d 后复合骨水泥孔隙率均比 MPBC 小, 这是由于还未降解的明胶微球填充了骨水泥内部的一些孔隙。随着降解时间的延长, 微球和骨水泥都逐渐降解, 材料的孔隙率也逐渐增大。图 9(a)所示为降解 1 d 后的 MPBC-8 的断面形貌, 可以看出已有部分微球坍塌, 降解已经开始。降解 7 d 后, 加入 8wt%微球的 MPBC-8 比 MPBC 失重率高 6%, 可知大部分的微球已经降解。同时 MPBC 孔隙率为 50%, 而 MPBC-8 孔隙率高达 71%, 可见 MPBC-8 中至少有 20%是微球降解留下的大孔, 如图 9(b)所示。这



些大孔可以为细胞迁移及骨组织向内生长提供通道, 为加快修复骨缺损提供有利条件。降解 7 d 后复合微球和未复合微球的骨水泥孔隙率增加速度相近, 说明微球大部分已经降解, 之后的孔隙主要为骨水

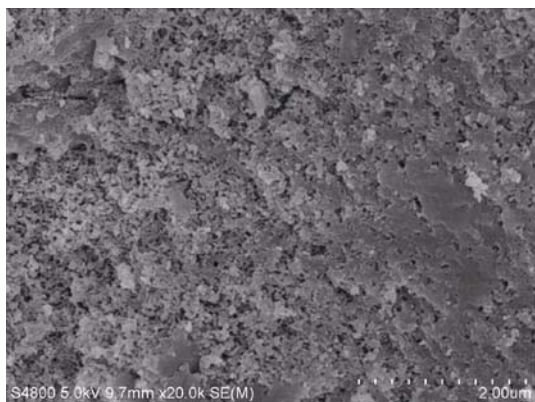


图6 MPBC 骨水泥固化 24 h 后的 SEM 照片

Fig. 6 SEM image of MPBC bone cements hardened for 24 h

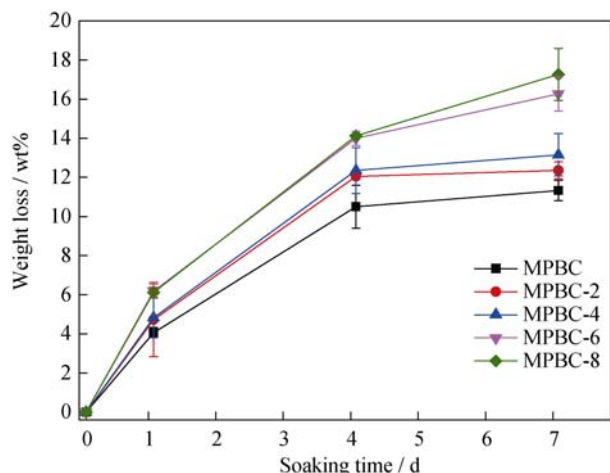


图7 载药明胶微球对骨水泥降解率的影响

Fig. 7 Effect of drug-loaded gelatin microspheres on bone cement degradation rate

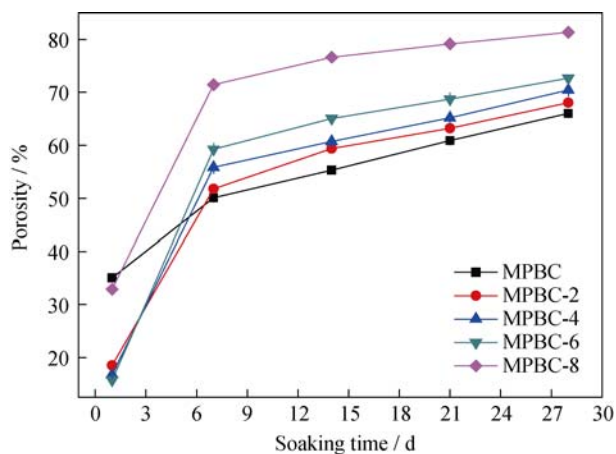


图8 载药明胶微球对骨水泥孔隙率的影响

Fig. 8 Effect of drug-loaded gelatin microspheres on bone cement porosity

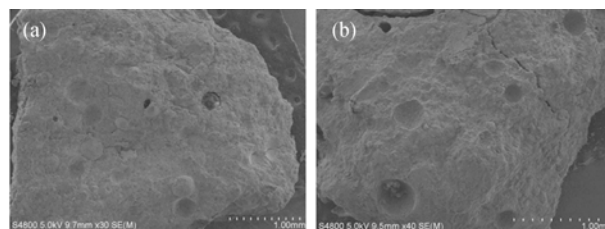


图9 降解 1 d(a)、7 d(b)的 MPBC-8 的断面 SEM 照片

Fig. 9 Cross-sectional SEM images of MPBC-8 bone cements on the 1 d (a) and 7 d (b) of degradation

泥降解产生的。

## 2.3 释药曲线

复合磷酸镁基骨水泥的药物释放曲线如图 10 所示。在初期(0~10 h)药物释放速率很快, 这是由于在骨水泥表面和浅层的载药微球在缓冲液的作用下降解较快, 因此出现了药物的暴释现象。随着时间的延长, 骨水泥内部的明胶微球也开始逐渐降解。从图9(a)可以看出, 降解 1 d 后骨水泥内部已有部分微球降解, 不同于聚三亚甲基碳酸酯微球表面层层降解, 明胶的降解过程是整体降解<sup>[6]</sup>。在降解过程中, 被包裹在明胶微球内部的药物逐渐释放出来, 然后通过磷酸镁基骨水泥中的孔隙释放到外部, 此时的药物释放速率比较缓慢且稳定。释药 7 d 后, 大部分微球已经降解, MPBC-8 的药物释放率达 89%。剩余药物主要分布在骨水泥中, 后期会通过骨水泥内的孔隙逐渐释放出来。总体来说, 药物达到了一定的缓释效果, 为实现药物持久治疗提供可能。

## 3 结论

1) 采用乳化交联法制备出载药明胶微球。当转

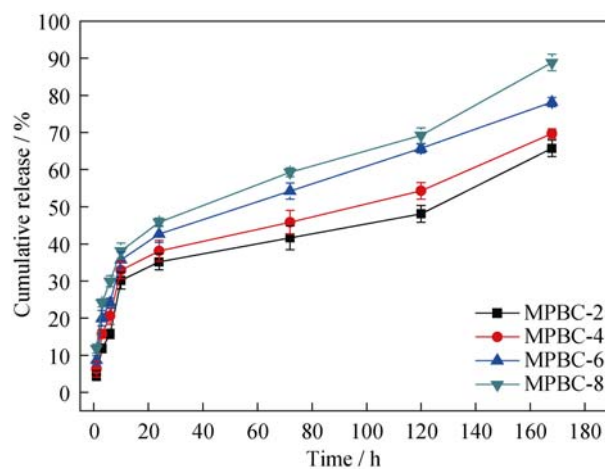


图10 复合磷酸镁基骨水泥的药物释放曲线

Fig. 10 Drug release profile of the complex magnesium phosphate bone cement

速 400 r/min, 葡萄糖浓度为 0.5 g/mL, 药物与明胶质量比为 1:2 时, 得到的明胶微球最佳, 其载药率与包封率分别为 26.73%、32.86%, 粒径分布在 100~300  $\mu\text{m}$  的比例为 57.31%。

2) 将该粒径分布在 100~300  $\mu\text{m}$  的载药明胶微球以不同的质量比加入骨水泥中得到多孔复合磷酸镁基骨水泥。在释药过程中, 随着微球的降解, 空隙率逐渐增加。在释放前期(0~10 h), 药物释放速度较快, 之后药物释放明显减缓; 释药 7 d 后, 微球几乎降解完全, 药物释放率达到 60%~89%, 达到了一定的药物缓释效果。

3) 构建的磷酸镁骨水泥明胶微球复合药物缓释体系可在药物缓释的同时形成多孔结构, 不仅可提高药物利用率, 亦可为细胞迁移及骨组织生长提供通道, 有望成为一种兼具药物缓释功能和加速骨修复的新型骨修复材料。

## 参考文献:

- [1] GINEBRA M P, ESPANOL M, MONTUFAR E B, *et al.* New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomaterialia*, 2010, **6(8)**: 2863–2873.
- [2] WU F, WEI J, GUO H, *et al.* Self-setting bioactive calcium-magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 2008, **4(6)**: 1873–1884.
- [3] BOHNER M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*, 2000, **31(S4)**: D37–D47.
- [4] KARAGEORGIU V, KAPLAN D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 2005, **26(27)**: 5474–5491.
- [5] GIROD FULLANA S, TERNET H, FRECHE M, *et al.* Controlled release properties and final macroporosity of a pectin microspheres-calcium phosphate composite bone cement. *Acta Biomaterialia*, 2010, **6(6)**: 2294–2300.
- [6] HABRAKEN W J E M, LIAO H B, ZHANG Z, *et al.* In vivo degradation of calcium phosphate cement incorporated into biodegradable microspheres. *Acta Biomaterialia*, 2010, **6(6)**: 2200–2211.
- [7] FÉLIX LANA O R P, LEEUWENBURGH S C G, WOLKE J G C, *et al.* Bone response to fast-degrading, injectable calcium phosphate cements containing PLGA microparticles. *Biomaterials*, 2011, **32(34)**: 8839–8847.
- [8] VERRON E, KHAIROUN I, GUICHEUX J, *et al.* Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review. *Drug Discovery Today*, 2010, **15(13)**: 547–552.
- [9] HABRAKEN W J E M, WOLKE J G C, JANSEN J A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, **59(4)**: 234–248.
- [10] LOPEZ-HEREDIA M A, KAMPHUIS G J B, THUNE P C, *et al.* An injectable calcium phosphate cement for the local delivery of paclitaxel to bone. *Biomaterials*, 2011, **32(23)**: 5411–5416.
- [11] GINEBRA M, CANAL C, ESPANOL M, *et al.* Calcium phosphate cements as drug delivery materials. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, **64(12)**: 1090–1110.
- [12] TAJIMA S, TABATA Y. Preparation and functional evaluation of cell aggregates incorporating gelatin microspheres with different degradabilities. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2013, **7(10)**: 801–811.
- [13] ZHANG X H, WANG G N. Application of acetaminophen in post-operative analgesia. *J. Clin. Anesthesiol.*, 2016, **32(2)**: 198–200.
- [14] HABRAKEN W J E M, DE JONGE L T, WOLKE J G C, *et al.* Introduction of gelatin microspheres into an injectable calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008, **87A(3)**: 643–655.
- [15] YU Y, XU C, DAI H. Preparation and characterization of a degradable magnesium phosphate bone cement. *Regenerative Biomaterials*, 2016, **3(4)**: 231–237.
- [16] ALVES L A, ALMEIDA E SILVA J B, GIULIETTI, *et al.* Solubility of D-glucose in water and ethanol/water mixtures. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2007, **52(6)**: 2166–2170.
- [17] HABRAKEN W J E M, WOLKE J G C, MIKOS A G, *et al.* Porcine gelatin microsphere/calcium phosphate cement composites: An in vitro degradation study. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2009, **91B(2)**: 555–561.