

# 拖尾型海藻酸钙凝胶微球可控制备

张正涛, 陈朝会, 宋青元, 何荣祥\*

江汉大学交叉学科研究院, 湖北 武汉  
Email: \*herx@jhun.edu.cn

收稿日期: 2021年6月21日; 录用日期: 2021年7月12日; 发布日期: 2021年7月19日

## 摘要

本文用一种简单的微流控装置在共轴注入条件下制备了大尺寸的海藻酸钠微球。该装置由PDMS铸造而成, 模具由小直径金属和聚四氟乙烯管组成。在硅油中通过该装置生成2%海藻酸钠的液滴, 然后在2% CaCl<sub>2</sub>溶液中交联, 该溶液以0.1%~1.5% (w/v)的浓度混合羟丙基甲基纤维素。结果表明, 产生的海藻酸钠微球的形态取决于羟丙基甲基纤维素的浓度。随着羟丙基甲基纤维素浓度的增加, 由于油与交联溶液界面张力的降低, 海藻酸钠微球的形状从半球形到尾球形。浓度越高, 形成的海藻酸钠微球的尾部愈发尖锐。这些不同形状的海藻酸钠微球对纳米生物医学、生物医用材料等方面的应用有很重要的作用。

## 关键词

微流控, 海藻酸钠微球, 纳米生物医学, 生物医用材料

# Controlled Preparation of Tailed-Type Calcium Alginate Gel Microspheres

Zhengtao Zhang, Chaohui Chen, Qingyuan Song, Rongxiang He\*

Institute for Interdisciplinary Research, Jiangnan University, Wuhan Hubei  
Email: \*herx@jhun.edu.cn

Received: Jun. 21<sup>st</sup>, 2021; accepted: Jul. 12<sup>th</sup>, 2021; published: Jul. 19<sup>th</sup>, 2021

## Abstract

Large size sodium alginate microspheres were prepared by a simple microfluidic device under coaxial injection condition. The device is cast from PDMS and the mold consists of small diameter metal and PTFE tubes. Droplet of 2% sodium alginate was generated by the device in silicone oil

\*通讯作者。

and then cross-linked in a solution of 2% CaCl<sub>2</sub>, which was mixed with hydroxypropyl cellulose at a concentration of 0.1% to 1.5% (w/v). Our results show that the morphology of the resulting sodium alginate microspheres is strongly dependent on the concentration of hydroxypropyl cellulose. With the increase of hydroxyl propyl cellulose concentration, the shape of sodium alginate microspheres changed from hemispherical to tail-shaped due to the decrease of interfacial tension between oil and cross-linked solution. The higher the concentration, the sharper the tail of the sodium alginate microspheres. These different shapes of sodium alginate microspheres play an important role in the application of nanomedicine and biomedical materials.

## Keywords

Microfluidics, Sodium Alginate Microspheres, Nanomedicine, Biomedical Materials

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

海藻酸钠凝胶作为生物材料具有广泛的应用前景。它们被用作组织工程的支架,药物传递的载体[1]、基础生物学中细胞三维培养[2] [3]、生物医用材料应用中的 3D 打印、软体机器人[4]等。这些应用需要凝胶微球具有良好的生物相容性[5]、机械性能[6]、膨胀[7]、降解、细胞附着和生物活性分子的结合释放性能[8]。目前生成凝胶微球的方法较多,包括乳化法[9]、静电淋滴法[10]、挤压法[11]和水动力淋滴法[12]等等。这些方法有很多局限性,例如凝胶微球的尺寸范围过宽,凝胶微球尺寸大以及试剂消耗量多等[13]。在此,我们开发了一种以金属/聚四氟乙烯管为模具的方法,利用简单的微流控芯片装置,通过微流通道中两相混合来生成凝胶微球[14] [15]。这种方法制造成本低,但效率很高,而且可以通过混合不同浓度的羟丙基甲基纤维素来控制 CaCl<sub>2</sub> 混合液的浓度,以生成不同形状和大小的凝胶微球。这些形状各异的微球的研究有助于下一步在细胞三维培养、3D 打印、生物医用材料及其他生物医药领域广泛应用。比如球形的凝胶球可以作为三维培养细胞的支架以及药物的缓释载体。通过进一步控制拖尾型的凝胶微球尾巴里的成分,比如加入磁性颗粒或者具有催化特性的铂纳米颗粒,使其可在磁场力作用或者催化产生气体的反作用力下摆动,进而实现拖尾型凝胶球的可控运动,有助于未来发展凝胶类型的软体机器人。

## 2. 实验

### 2.1. 试剂与仪器

主要试剂:海藻酸钠(国药集团化学试剂有限公司);聚二甲基硅氧烷(美国迈图新材料集团);聚二甲基硅油(国药集团化学试剂有限公司);无水氯化钙(国药集团化学试剂有限公司);羟丙基甲基纤维素(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

主要仪器:倒置荧光显微镜(Nikon Eclipse Ti-s, Japan);实验室微量注射泵(保定兰格恒流泵有限公司, LSP01-3A);表面张力仪(上海方瑞仪器有限公司, BZY 系列);精密天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司, BSA224S)。

### 2.2. 芯片制作

采用同轴法制备海藻酸钙微球。首先,将直径为 0.7 mm 及内径为 0.6 mm 的金属管插入内径为 0.65 mm、

外径为 1.45 mm 的聚四氟乙烯(PTFE)管中, 放置在硅片上, 作为制备海藻酸钠微球微通道的模具。将聚二甲基硅氧烷(PDMS)预聚物 A 和 B 按照 10:1 的比例混合后, 浇注在模具上。在负压下进行脱气处理, 然后在 80℃的烘台上烘烤 2 小时, 使 PDMS 固化。然后将 PDMS 板从模具上剥离, 并打孔。如图 1 所示, 通过此孔, 通入连续相聚二甲基硅油。经过等离子体清洗机处理后, 将该 PDMS 聚合物与载玻片进行键合。为了使器件键合牢固, 将制备的微流控器件在 80℃下烘烤 7 天。最后, 插入金属管, 以及 PTFE 管以获得同轴型结构。本文采用的微流控器件如图 1 所示。

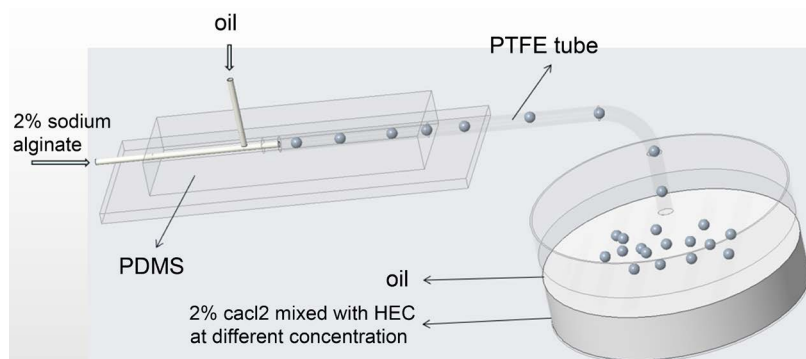


Figure 1. Schematic diagram of gel microsphere preparation device

图 1. 凝胶微球制备装置示意图

### 2.3. 凝胶球的制备

以聚二甲基硅油为连续相, 以 3%海藻酸钠的水溶液(去离子水)为分散相。如图 1 所示, 用注射泵将连续相和分散相注入微芯片。聚四氟乙烯管从出口嵌入微流芯片。为了获得稳定的海藻酸钠微球, 连续相聚二甲基硅油的流量为 250  $\mu\text{l}/\text{min}$ , 分散相海藻酸钠的流量为 11  $\mu\text{l}/\text{min}$ 。当分散相与连续相相遇时, 在水相和油相界面的剪切力作用下, 海藻酸钠溶液被剪切成分散的液滴。海藻酸钠遇到  $\text{Ca}^{2+}$  时形成凝胶。为了控制海藻酸钠凝胶微球的形状, 本文在 2%的  $\text{CaCl}_2$  溶液中加入不同浓度的羟丙基甲基纤维素(HPMC)。羟丙基甲基纤维素的浓度为 0.15%, 0.3%, 0.5%, 1.0%和 1.5%。

## 3. 结果与讨论

### 表面形貌表征及其机理分析

海藻酸钠溶液在 PTFE 管进口处遇到聚二甲基硅油油相。在油相的流动剪切力作用下, 周期性生成海藻酸钠微球。如图 2 所示, 这些微球从聚二甲基硅油进入到含有羟丙基甲基纤维素的  $\text{CaCl}_2$  溶液后开始交联。羟丙基甲基纤维素改变了  $\text{CaCl}_2$  溶液的表面张力, 同时, 当羟丙基甲基纤维素浓度增加时, 交联溶液的密度增加。交联溶液密度越高, 凝胶化过程越慢。因此, 水凝胶微球形成圆锥尾状形貌。图 3(a)~(f) 为海藻酸钠微球在含有不同浓度羟丙基甲基纤维素的  $\text{CaCl}_2$  混合溶液中的凝胶球形貌。

当  $\text{Ca}^{2+}$  扩散到海藻酸钠液滴中时, 海藻酸钠液滴被交联。因此, 在交联过程中, 油相与交联溶液之间的界面是非常重要的。利用表面张力仪, 我们表征了交联溶液的界面张力, 如图 4 所示。结果表明, 当羟丙基甲基纤维素浓度为 0.15% (w/v) 时, 表面张力为 45 mN/m。当混合液中羟丙基甲基纤维素浓度增加到 0.3% 时, 测得表面张力为 44 mN/m; 继续增大羟丙基甲基纤维素浓度为 0.5% 时, 测得表面张力减小为 43.5 mN/m; 当羟丙基甲基纤维素浓度增加为 1% 和 1.5% 时, 对应的表面张力分别为 43.1 mN/m 和 42.5 mN/m。结果表明, 当  $\text{CaCl}_2$  溶液中加入羟丙基甲基纤维素后, 界面张力迅速从 65 降低到 44 附近, 降低了 33%。羟丙基甲基纤维素的浓度增大, 界面张力变化较小, 从 45 降低到 42.5, 降幅不到 1%。

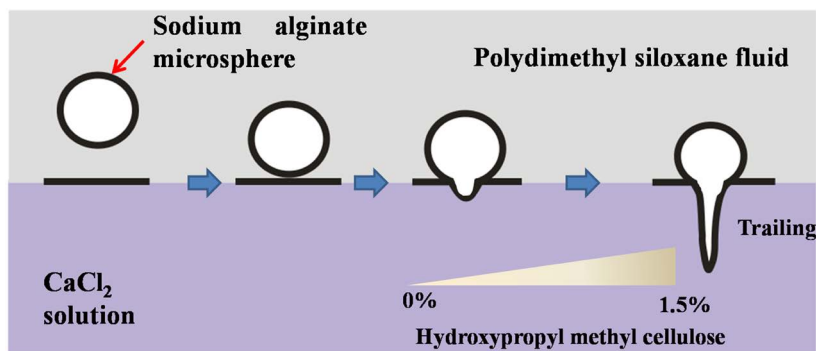


Figure 2. Schematic diagram of formation process of trailing calcium alginate gel microspheres

图 2. 拖尾型海藻酸钙凝胶球形成过程示意图

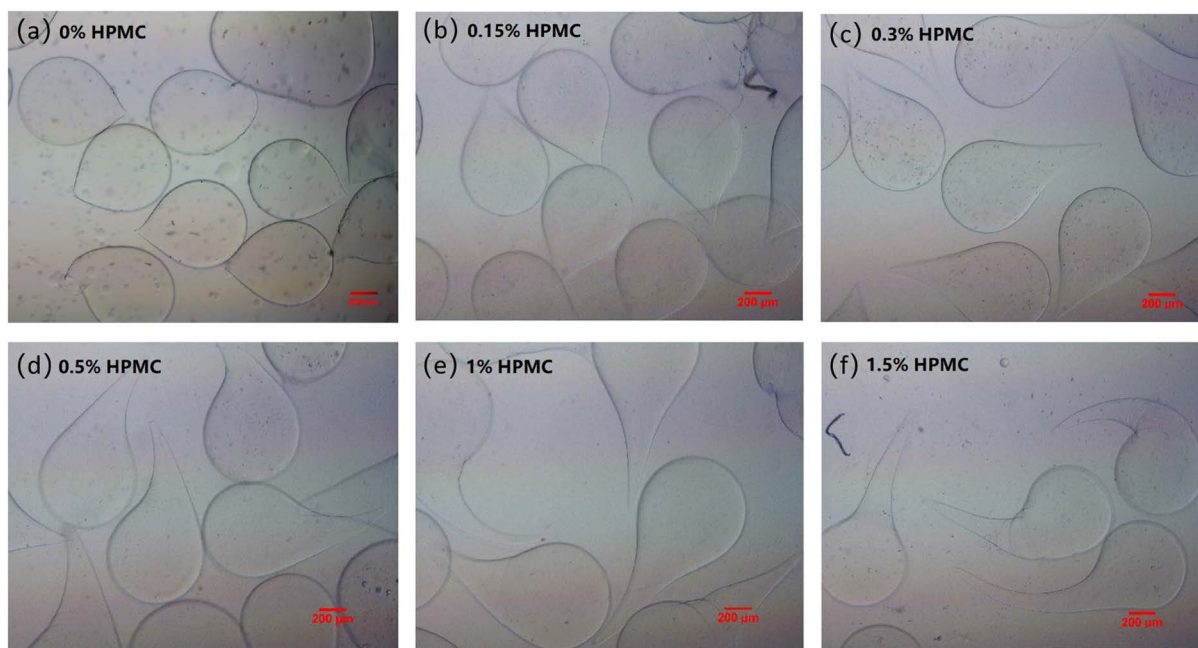


Figure 3. (a)~(f) shows the morphology of gel spheres of sodium alginate microspheres in  $\text{CaCl}_2$  mixed solutions containing different concentrations of hydroxypropyl methyl cellulose

图 3. (a)~(f)所示分别为海藻酸钠微球在含有不同浓度羟丙基甲基纤维素的  $\text{CaCl}_2$  混合溶液中的凝胶球形貌

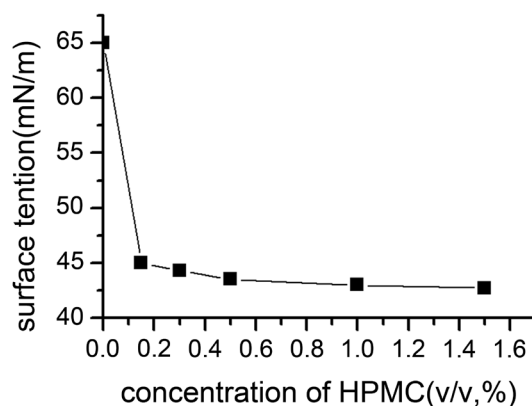
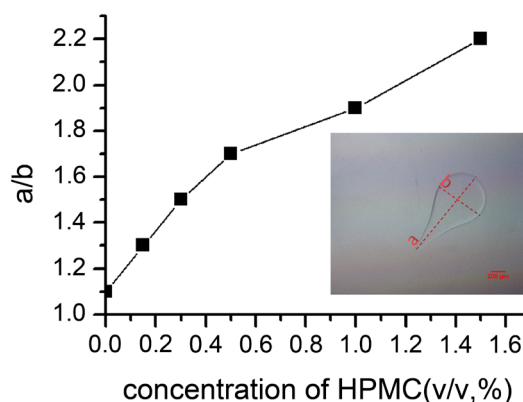


Figure 4. Surface tension of 2%  $\text{CaCl}_2$  solution at different concentrations of hydroxypropyl methyl cellulose

图 4. 不同羟丙基甲基纤维素浓度下的 2%  $\text{CaCl}_2$  溶液表面张力

另一方面,随着羟丙基甲基纤维素浓度的增加,交联溶液的密度增加。因此,海藻酸钠液滴从聚二甲基硅油中经过界面进入到交联溶液的时间增加。当羟丙基甲基纤维素浓度从 0.15%增加到 0.3%时,通过倒置荧光显微镜可以观察到凝胶球的尾部相对尖锐,有比较明显的拖尾现象。当羟丙基甲基纤维素浓度从 0.3%增加到 1.5%时,凝胶球的拖尾现象随着浓度的增加变得更加明显,凝胶球尾部变得更加细长。如图 5 所示,我们测量了不同浓度下水凝胶球的尺寸, a 和 b 分别表示凝胶球的最长部分和最宽部分。当海藻酸钠液滴在 2%  $\text{CaCl}_2$  中交联时, b/a 的值约为 1.1,这意味着水凝胶球是球形的。当加入羟丙基甲基纤维素的浓度从 0.15%逐渐增加到 1.5%时, b/a 的值可以从 1.3 增加到 2.2。这个结果与前期工作相比,最大值从 1.6 提高到了 2.2 [16]。结果表明,形成凝胶球的形状尺寸随着纤维素浓度的增加变化很大,即海藻酸钙凝胶球具有更长的尾巴,有助于后期制备软体机器人。



**Figure 5.** The a/b ratio varies with the cellulose concentration. Insert photographs to show the definitions of a and b  
**图 5.** a/b 比值随纤维素浓度的变化而变化, 插入照片表示 a 和 b 的定义

#### 4. 结论

本文提出了一种制备具有尾巴的海藻酸钙凝胶微球的方法。该方法以金属/PFTE 管为模具, 无需进行光刻, 低成本高效。在 2% 的  $\text{CaCl}_2$  溶液中通过添加不同浓度的羟丙基甲基纤维素来控制凝胶球的交联过程。随着羟丙基甲基纤维素浓度的增加,  $\text{CaCl}_2$  溶液中表面张力变小, 而凝胶球的形貌由球形变为有尾巴的形状。随着羟丙基甲基纤维素浓度的增加, 凝胶微球的尾部逐渐变得尖锐、细长, 最后形成特殊形状的凝胶球。这种形状的凝胶微球有助于我们下一步开展软体机器人在生物医用领域的研究和应用。

#### 致 谢

感谢武汉市科技局应用基础前沿项目(2019020701011440)的支持。

#### 参考文献

- [1] Augst, A.D., Kong, H.J. and Mooney, D.J. (2010) Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, **6**, 623-633. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600069>
- [2] Yu, L., Ni, C., Grist, S.M., Bayly, C. and Cheung, K.C. (2015) Alginate Core-Shell Beads for Simplified Three-Dimensional Tumor Spheroid Culture and Drug screening. *Biomedical Microdevices*, **17**, Article No. 33. <https://doi.org/10.1007/s10544-014-9918-5>
- [3] Xu, X., Urban, J., Tirilapur, U.K. and Cui, Z. (2010) Osmolarity Effects on Bovine Articular Chondrocytes during Three-Dimensional Culture in Alginate Beads. *Osteoarthritis and Cartilage*, **18**, 433-439. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.10.003>
- [4] Williams, A., Roh, S., Jacob, A., Stoyanov, S., Hsiao, L. and Velev, O. (2020) Printable Homocomposite Hydrogels



- with Synergistically Reinforced Molecular-Colloidal Networks. *Nature Communications*. (Preprint) <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-110699/v1>
- [5] Hillgrtner, M., Zimmermann, H., Rothmund, M., Zimmermann, U., Mimietz, S., Jork, A., *et al.* (2015) Immunoisolation of Transplants by Entrapment in 19F-Labelled Alginate Gels: Production, Biocompatibility, Stability, and Long-Term Monitoring of Functional Integrity. *Materialwissenschaft Und Werkstofftechnik*, **30**, 783-792.
- [6] Drury, J.L., Dennis, R.G. and Mooney, D.J. (2004) The Tensile Properties of Alginate Hydrogels. *Biomaterials*, **25**, 3187-3199. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.002>
- [7] Bonino, C.A., Efimenko, K., Jeong, S.I., Krebs, M.D., Alsberg, E. and Khan, S.A. (2012) Three-Dimensional Electrospun Alginate Nanofiber Mats via Tailored Charge Repulsions. *Small*, **8**, 1928-1936. <https://doi.org/10.1002/sml.201101791>
- [8] Jani, M.S., Veetil, A.T. and Krishnan, Y. (2020) Controlled Release of Bioactive Signaling Molecules. *Methods in Enzymology*, **638**, 129-138. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.02.018>
- [9] Partap, S., Rehman, I., Jones, J. and Darr, J. (2006) "Supercritical Carbon Dioxide in Water" Emulsion-Templated Synthesis of Porous Calcium Alginate Hydrogels. *Advanced Materials*, **18**, 501-504. <https://doi.org/10.1002/adma.200501423>
- [10] Nikoo, A.M., Kadkhodae, R., Ghorani, B., Razzaq, H. and Tucker, N. (2018) Electrospray-Assisted Encapsulation of Caffeine in Alginate Microhydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, **116**, 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.167>
- [11] Zhou, L., Lian, Q., Huyan, Y., He, X., He, J., Xu, F., *et al.* (2019) Study of Extrusion Three-Dimensional Cell Printing Based on Gelatin-Alginate Hydrogels. *Electromachining & Mould*, No. 1, 56-59.
- [12] Yar, M., Shahzad, S., Siddiqi, S.A., Mahmood, N., Rauf, A., Sabieh, A.M., *et al.* (2015) Triethyl Orthoformate Mediated a Novel Crosslinking Method for the Preparation of Hydrogels for Tissue Engineering Applications: Characterization and *in Vitro* Cytocompatibility Analysis. *Materials Science & Engineering C*, **56**, 154-164. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.06.021>
- [13] Gasperini, L., Maniglio, D., Motta, A. and Migliaresi, C. (2015) An Electrohydrodynamic Bioprinter for Alginate Hydrogels Containing Living Cells. *Tissue Eng Part C: Methods*, **21**, 123-132. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2014.0149>
- [14] Braschler, T., Valero, A., Colella, L., Pataky, K., Brugger, J. and Renaud, P. (2010) Fluidic Microstructuring of Alginate Hydrogels for the Single Cell niche. *Lab on a Chip*, **10**, 2771-2777. <https://doi.org/10.1039/C004988C>
- [15] Wu, J., Kong, T., Yeung, K., Shum, H.C., Cheung, K.M., Wang, L., *et al.* (2013) Fabrication and Characterization of Monodisperse PLGA-Alginate Core-Shell Microspheres with Monodisperse Size and Homogeneous Shells for Controlled Drug Release. *Acta Biomaterialia*, **9**, 7410-7419. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.022>
- [16] Zhang, Z., Ruan, M., Liu, H., Cao, Y. and He, R. (2017) Fabrication of Large Size Alginate Beads for Three-Dimensional Cell-Cluster Culture. *AIP Conference Proceedings*, **1864**, Article No. 020138. <https://doi.org/10.1063/1.4992955>