

复相乳化法制备海藻酸钙微球及其释放行为

张杰, 郭妮妮, 张代佳, 修志龙

(大连理工大学环境与生命学院生物科学与工程系, 辽宁 大连 116024)

摘要: 采用复相乳化法制备了载牛血清白蛋白(BSA)的海藻酸钙微球, 通过正交实验和单因素分析, 以 BSA 包埋率、微球的载药率和平均粒径为考察指标, 优化了该方法的制备参数, 使最终制备的微球平均粒径小于 10 μm , 球形度较好, 包埋率约 70%, 载药率达 4%。随着海藻酸钠质量分数的降低和 BSA 质量的增大, 微球的包埋率下降、载药率升高、平均粒径减小。微囊化 BSA 的体外释放曲线表明, 该系统存在 pH 响应特性, 尤其在磷酸缓冲液中, 被包埋 BSA 的释放速率较快。电泳结果表明, BSA 的分子结构并未受制备过程的影响。因此, 该微囊化方法有望用于蛋白类药物的控释制剂, 使其免受胃酸等的破坏, 达到肠部释药的目的。

关键词: 海藻酸钙微球; 牛血清白蛋白; 复相乳化法; 制备

中图分类号: R944.9

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2006)06-0964-05

1 前言

海藻酸是一类无毒、生物相容性好、可生物降解的天然高分子材料, 可在温和条件下实现对活性物质的包埋^[1], 如药物^[2]、细胞^[3]及酶^[4]等。传统制备微球的方法多采用注滴法^[2,3]、喷雾法^[4]及原位聚合法^[5]等, 由于制得的微球粒径较大, 在一些给药方式上受到了极大的限制。因此, 人们相继把目光转向了可以制备粒径小于 500 μm 的微球的静电法^[6]和乳化法上。

乳化法有多种分类方式, 如按乳化体系可分为单相乳化(W/O 或 O/W)法^[7-9]和复相乳化(W/O/W 或 O/W/O)法^[10]; 按乳化方式可以分为机械搅拌乳化法^[7,10]、超声乳化法^[8,9]及膜乳化法^[11,12]等。传统的乳化法通常需要在较高的搅拌转速(>2000 r/min)或较大的剪切力作用下进行。Lemoine 等^[10]发现太高的搅拌速度很容易破坏药物分子的生物活性, 且难以实现规模化生产; 另外, 有机溶剂的使用与残留对蛋白类药物的活性也存在一定的影响。因此, 超声乳化和膜乳化法越来越受到人们的重视。超声乳化是通过超声波产生的超声空化^[13]作用, 将大块的液滴破碎并分散成粒径很小的乳滴(<50 μm)。多年来, 研究者^[8,9]一直致力于研究超声乳化过程中各参数对单相乳化体系中微球大小、分布及乳化状态等的影响。也有人将超声与复相乳化结合使用, 应用于溶剂蒸发法制备乳酸^[14]和脂质体^[15]微球。

本工作将超声与复相乳化相结合, 采用静电结合法制备载模型药物—BSA 的微球, 以可以代谢并增加药物稳定性的色拉油替换传统的液体石蜡作为油相, 节省后续去除油相的成本。最后, 通过电泳和释放曲线实验研

究了该方法对蛋白类药物性质的影响, 为生物大分子药物的控制释放以及剂型的发展提供实验依据。

2 材料和方法

2.1 实验材料和仪器

海藻酸钠(ALG), 北京市旭东化工厂, 化学纯; 牛血清白蛋白(BSA), 北京元亨圣马生物技术研究所($M_w=68000$); 大豆油, 营口渤海油脂工业有限公司, 食用级; 其余试剂皆为分析纯。RW20 DZM.n 机械搅拌机, IKA Labortechnik; JY92-II 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 721 分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; DYY-2C 电泳仪, 北京市六一仪器厂; 倒置式生物显微镜 IX-70, Olympus。

2.2 实验方法

2.2.1 海藻酸钙微球的制备

向 5 mL 已混合均匀的 ALG 与 BSA 溶液中加入一定体积的大豆油(含 Span85 2%, ϕ), 先磁力搅拌 10 min, 再机械搅拌 5 min, 之后边搅拌边加入 150 mL 2%(ϕ)的 Tween85 水溶液, 先将乳状液超声乳化($\phi 6$ mm 变幅杆, 20~25 kHz, 55 W) 5 min 后, 再继续机械搅拌, 形成稳定的水/油/水(W/O/W)复相乳化体系。最后, 向其中缓慢滴入 CaCl_2 溶液, 使最终乳化体系的外水相含 Ca^{2+} 10%(ω , 如不特殊标注, 以下均为质量分数), 并在 500 r/min 下持续搅拌 90 min。

2.2.2 微球的分离方法

用 0.8 μm 的微滤膜过滤上述乳状液, 用石油醚和异丙醇洗涤滤饼, 洗掉残留的 Span85 和 Tween85, 并使微球进一步脱水、硬化。

2.2.3 粒径的测定

用倒置显微镜观察微球的外观形态, 并测量 20 个微球的直径, 取平均值.

2.2.4 载药率和包埋率的测定

取一定质量的微球, 放入 0.2 mol/L 的柠檬酸钠溶液中, 直至微球全部溶解. 释放出微球内的 BSA, 用考马斯亮蓝检测法^[16]测定 595 nm 下该溶液的 OD 值, 计算出溶液中 BSA 的浓度, 根据下式求出微球的载药率和包埋率:

$$\text{载药率} = \frac{\text{包埋的 BSA 质量}}{\text{微球质量}} \times 100\%$$

$$\text{包埋率} = \frac{\text{包埋的 BSA 质量}}{\text{加入的 BSA 总量}} \times 100\%$$

2.2.5 释放曲线的测定

取 3 等份微球, 分别放入 25 mL 0.2 mol/L 的 PBS (pH=7.4) 和 0.1 mol/L 的 HCl 及 0.9% (ω) 的 NaCl (pH=7.0) 溶液中, 在 120 r/min 及 37 °C 条件下恒温培养, 每隔 2 h

取样 0.5 mL, 并补充相同体积的新鲜释放液. 测出释放液中 BSA 的浓度, 以释放时间为横坐标, BSA 浓度为纵坐标, 绘制微球中 BSA 的累积释放曲线.

2.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)

将上节中取的释放液超滤 6 倍, 采用 Tris-Tricine 系统, 制备聚丙烯酰胺凝胶电泳^[17].

3 结果与讨论

3.1 微球制备条件的优化

由于微球的粒径大小、球形度、被包埋药物的分布及包埋率等因素都直接影响药物在微球中的释放, 因此有必要首先对复相乳化法制备海藻酸钙微球的工艺条件进行考察.

3.1.1 正交实验设计与结果

用五因素[ALG 浓度(A)及 BSA 质量(B)、油相加入体积(C)、搅拌速度(D)、搅拌时间(E)]四水平的正交实验 L₁₆(4⁵) (表 1) 研究复相乳化法制备载药微球的性能, 以微球的包埋率、载药率及平均粒径为考核指标优化制备条件.

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 The conditions selected for the orthogonal experiments

No.	ALG concentration, A (%)	Amount of BSA, B (mg)	Volume of oil phase, C (mL)	Stirring speed, D (r/min)	Stirring time, E (min)
1	2	20	10	500	10
2	3	40	15	750	15
3	4	60	20	1000	20
4	5	80	30	1400	30

分析实验结果得知, 五因素对微球包埋率的影响顺序为 B>A>D>E>C, 即 BSA 质量的影响最大, 油相体积影响最小. 最优反应条件为 A₄B₁C₃D₂E₂, 即 ALG 溶液浓度 5%, BSA 质量 20 mg, 油相加入体积 20 mL, 搅拌速度 750 r/min, 搅拌时间 15 min. 各因素对微球载药率的影响顺序为 A>B>E>D>C, 对粒径的影响顺序为 D>A>B>C>E. 这与对包埋率的影响基本相似, 只是搅拌速度的影响明显增大.

正交实验表明, ALG 质量分数、BSA 量和搅拌速度是这 5 个因素中最能控制微球性能的因素, 考虑到延长搅拌时间可能对蛋白活性产生影响, 因此实验确定油相加入体积为 20 mL、搅拌时间为 10 min, 并对 ALG 质量分数、BSA 量和搅拌速度进行进一步的考察.

3.1.2 ALG 质量分数对微球性能的影响

如图 1 所示, 随着 ALG 质量分数的增大, 形成的微球数量增多, 包埋在微球内的 BSA 总量也增加, BSA 的包埋率逐渐增大; 但由于微球内 BSA 的增加远没有 ALG 量的增加速度快, 微球的载药率逐渐降低.

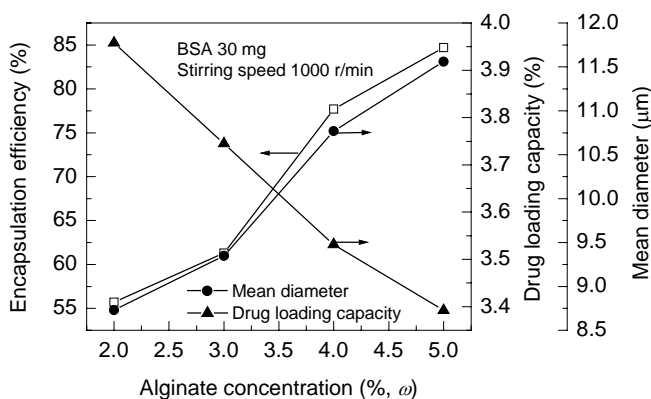


图 1 ALG 质量分数对微球包埋率、载药率和平均粒径的影响
Fig.1 Effect of alginate concentration on encapsulation efficiency of BSA, drug loading capacity and mean diameter of microspheres

与此同时, 提高 ALG 的质量分数将导致 ALG 溶液的粘度急剧增加, 搅拌阻力增大, 较大的乳滴增多, 分布变宽, 固化后的微球粒径增大, 并伴有大量的白色纤维状聚集体出现, 即使提高搅拌速度也未得到改善. 而

ALG 质量分数为 2% 时, 无白色纤维状聚集体产生, 制得的微球球形度较好、分布窄、粒径在 10 μm 左右. 故 ALG 的质量分数确定为 2%.

3.1.3 BSA 质量对微球性能的影响

实验中仅改变 BSA 的量, 发现微球的平均粒径几乎不随 BSA 的变化而变化, 而微球的包埋率和载药率变化如图 2 所示. 当 BSA 质量由 20 mg 提高到 40 mg 时, 微球载药率提高了 1%, 而 BSA 的包埋率则下降了近 27%, 远大于载药率的变化. 即虽然每个微球中包埋的 BSA 量随着加入 BSA 量的增大而增加, 但 BSA 最初加入量的增大速度远大于微球中包埋 BSA 的增加速度, 致使微球包埋率下降. 因此, 在保证微球的载药率不至过低的条件下, 应尽量提高包埋率, 最终选择 BSA 量为 20 mg.

3.1.4 搅拌速度对微球性能的影响

由图 3 可知, 随着搅拌速度的提高, 微球的包埋率和平均粒径都逐渐降低, 而载药率先升高后降低. 当搅拌速度为 500 r/min 时, 由于搅拌力度太小, 乳液不能

均匀分散, 粒径大的乳滴较多, 微球的载药率较低. 而当搅拌速度增大到 1000 r/min 以上时, 剪切力过大, 显微镜下观察发现, 虽然粒径小的微球增多, 但能起有效包埋作用的微球减少, 致使微球的包埋率和载药率反而下降. 因此, 最终选择加入油相后的搅拌速度为 750 r/min.

3.2 最优条件下制备的微球性能表征

通过上述实验可以确定最优的制备条件为 ALG 浓度 2%(ω), BSA 20 mg, 预先磁力搅拌 10 min 后超声乳化 5 min, 油相体积 20 mL, 加入油相后的搅拌速度 750 r/min, 搅拌时间 10 min. 在此条件下采用复相乳化法, 以食用豆油作为油相制备载 BSA 的海藻酸钙微球. 从图 4 可以看出, 所制备的微球分散性和球形度较好, 粒径分布集中(10 μm), 具有较高的包埋率(67.8%)和载药率(3.7%).

3.3 微球中 BSA 的体外释放性能

图 5 显示, 在最优条件下制备的微球中药物的释放曲线较平滑, 各时间段的释放量较稳定. BSA 在酸性条

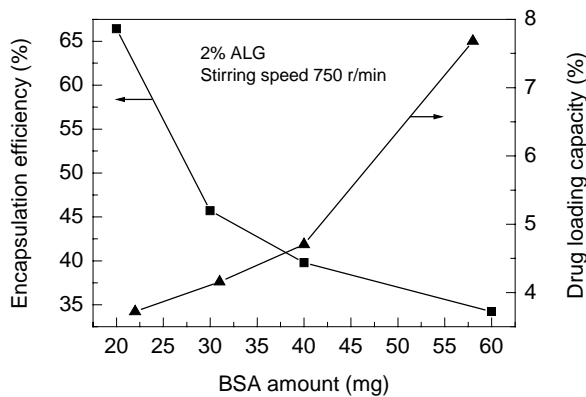


图 2 BSA 质量对微球包埋率、载药率和平均粒径的影响
Fig.2 Effect of BSA amount on encapsulation efficiency of BSA, drug loading capacity and mean diameter of microspheres

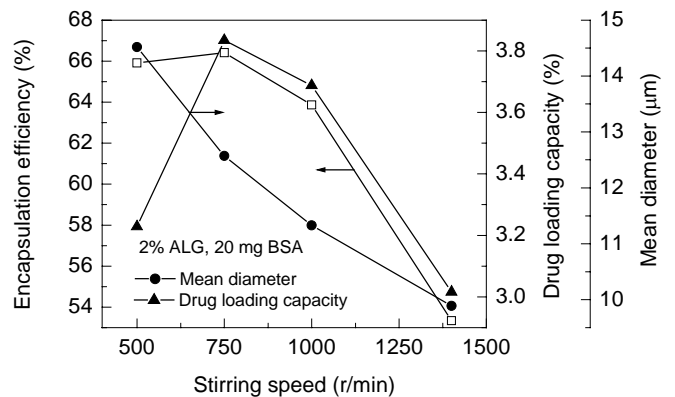


图 3 搅拌速度对微球包埋率、载药率和平均粒径的影响
Fig.3 Effect of stirring speed on encapsulation efficiency of BSA, drug loading capacity and mean diameter of microspheres

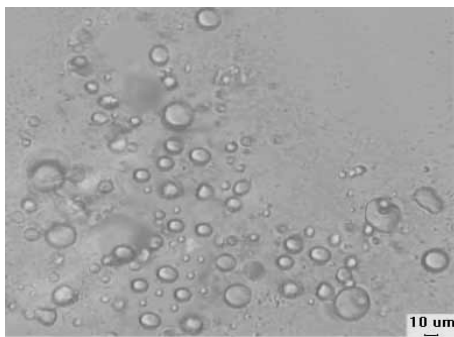


图 4 复相乳化法制备的微球形态
Fig.4 Morphology of microspheres prepared by emulsification

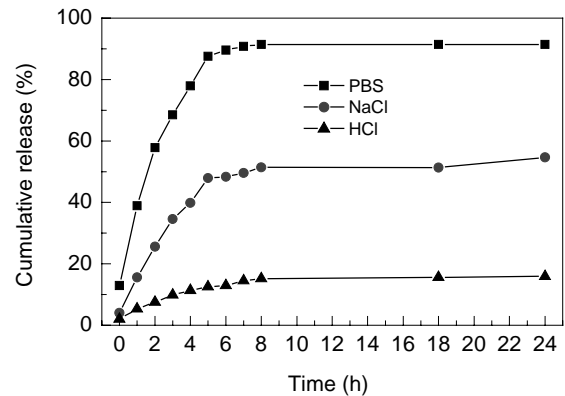


图 5 最优条件下制备微球的药物释放曲线
Fig.5 Release profiles of BSA in different media from alginate microspheres prepared under optimum conditions

件下的释放比在中性、碱性条件下慢得多,这是微球 pH 响应溶胀的结果,即微球具有良好的低 pH 值收缩、高 pH 值溶胀的响应行为^[18]。

在 0.1 mol/L 的 HCl 中,微球处于收缩状态,BSA 的释放很缓慢,但由于海藻酸钙微球具有高孔隙率的结构,因此,仍有约 15% 的 BSA 从收缩的微球内部释放出来。而 BSA 在 NaCl 中的释放则要快一些。这是由于溶液中的 Na⁺逐步取代部分 Ca²⁺^[1],导致交联网络的部分解离,BSA 才以一定速度从微球中释放出来。

在磷酸缓冲液中,由于磷酸根结合钙离子的能力更强,导致 BSA 呈现更为快速的释放行为。例如 7 h 时 BSA 在 PBS 中的释放率为 91%,而在 NaCl 中只有 50%。且 BSA 在 PBS 中的释放存在起始时的轻微突释现象(约 13%),然后持续、快速释放(BSA 释放一半的时间不足 2 h)。这主要是微球的高孔隙率与结构的不均匀性共同作用的结果。本实验中的微球是通过非均匀凝胶化机理制备的,具有非均匀结构,小球致密的表面层聚合物浓度比球心聚合物浓度高很多^[18]。当这些非均匀结构的微球置于 PBS 中时,球心快速解离,而表面层的解离速度相对慢一些,因此球内部先解离的 BSA 的释放受到了表面层的限制,但随着表面层的逐步解离,这些被包埋在球中的早已解离的 BSA 就会快速释放出来。

3.4 被包埋蛋白的分子量检测

作为蛋白类药物的输送载体,保持药物的分子结构不变是至关重要的。在复相乳化法制备海藻酸钙微球的过程中,BSA 极有可能受到一些剧烈条件的影响,例如搅拌导致的剪切力、有机溶剂的影响等,这些因素都能引起蛋白分子结构的变化。因此,通过电泳实验考察制备条件对 BSA 的分子量的影响(图 6)。从图看出,尽管乳化过程中机械搅拌产生较大的剪切力,但不论是原始的 BSA 溶液还是从微球中释放出来的 BSA 均只看到唯一一条特征谱带,这表明 BSA 的分子量并没有受到制

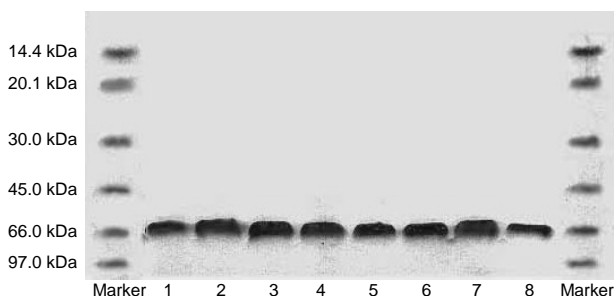


图 6 从微球中释放出的 BSA 电泳谱图

Fig.6 Electrophoretic patterns of BSA released from microspheres (1. Native BSA; 2~5. BSA released from alginate microspheres in PBS at 3, 6, 9, 18 h; 6~8. BSA released from alginate microspheres in HCl at 3, 9, 18 h)

备过程的影响。综上所述,复相乳化法用作载蛋白类药物微球的制备是可行的,它可以有效地保护蛋白,使药物避开胃酸等的破坏。

4 结论

本研究采用超声复相乳化法,以色拉油为油相,制备了平均粒径 10 μm 左右、表面性能及球形度好、无聚集的海藻酸钙微球。通过正交实验和单因素分析,优化了载药微球的制备条件:ALG 质量分数 2%,BSA 20 mg,预先磁力搅拌 10 min,油相体积 20 mL,加入油相后先超声乳化 5 min,再于 750 r/min 下机械搅拌 10 min,制得的微球对 BSA 的包埋率接近 70%,载药率也达 4%。随着 ALG 浓度的增大及 BSA 质量的增加,微球的包埋率升高、载药率下降、平均粒径增大。微球的体外释放曲线表明,该系统存在 pH 响应特性,尤其在磷酸缓冲液中,被微球包埋的 BSA 的释放速率较快,随着搅拌速度的增大,微球的释放速度变快、突释现象增强。电泳实验结果表明,制备过程未对被包埋药物的分子结构产生影响。因此,该方法制备的载药微球作为蛋白、多肽类药物在体内的输送载体具有一定的可行性。

参考文献:

- [1] Wayne R, Gombot Z, Siow F W. Protein Release from Alginate Matrices [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998, 31: 267-285.
- [2] Onal S, Zihnioglu F. Encapsulation of Insulin in Chitosan-coated Alginate Beads: Oral Therapeutic Peptide Delivery [J]. *Artif. Cells, Blood Substitutes, Immobilization Biotechnol.*, 2002, 30(3): 229-237.
- [3] De Vos P, Van Hoogmoed C G, Van Zanten J, et al. Long-term Biocompatibility, Chemistry, and Function of Microencapsulated Pancreatic Islets [J]. *Biomaterials*, 2003, 24: 305-312.
- [4] Coppi G, Iannucelli V, Bernabei M T, et al. Alginate Microparticles for Enzyme Peroral Administration [J]. *Int. J. Pharm.*, 2002, 242: 263-266.
- [5] Shozo M, Wataru K, David A. Oral Sustained Delivery of the Ophylline Using *In-situ* Gelation of Sodium Alginate [J]. *J. Controlled Release*, 2000, 67: 275-280.
- [6] 曲蓓蓓, 于炜婷, 刘袖洞, 等. 高压静电法制备单分散性的海藻酸钙微胶珠 [J]. *化工学报*, 2005, 56(8): 1547-1551.
- [7] Gheorghe F, Elisabetta E, Doina M, et al. Preparation and Characterization of Ca-Alginate Microparticles by a New Emulsification Methods [J]. *Biomaterials*, 1998, 170: 11-21.
- [8] Nagaich S, Khopade A J, Jain N K. Lipid Gifts of Egg-box Complex: A New Supramolecular Biovector for 5-Fluorouracil Delivery [J]. *Pharm. Acta Helveticae*, 1999, 73: 227-236.
- [9] 郑彩虹, 梁文权, 虞和水. 海藻酸-壳聚糖-聚乳酸羟乙醇酸复合微球的制备及其对蛋白释放的调节 [J]. *药学学报*, 2005, 40(2): 182-186.
- [10] Lemoine D, Wauters F, Bouchend'homme S, et al. Preparation and Characterization of Alginate Microspheres Containing a Model Antigen [J]. *Int. J. Pharm.*, 1998, 176: 9-19.
- [11] Nakagawa K, Iwamoto S, Nakajima M, et al. Microchannel Emulsification Using Gelatin and Surfactant-free Coacervate

- Microencapsulation [J]. *J. Colloid Interface Sci.*, 2004, 278: 198–205.
- [12] Wang L Y, Ma G H, Su Z G. Preparation of Uniform Sized Chitosan Microspheres by Membrane Emulsification Technique and Application as a Carrier of Protein Drug [J]. *J. Controlled Release*, 2005, 106: 62–75.
- [13] Abismail B, Canselier J P, Wilhelm A M, et al. Emulsification by Ultrasound: Drop Size Distribution and Stability [J]. *Ultrason. Sonochem.*, 1999, 6: 75–83.
- [14] 刘海峰, 常津, 张爽男, 等. 明胶-聚乳酸载药纳米微球的制备及其体外释药研究 [J]. *中国生物医学工程学报*, 2003, 22(2): 178–182.
- [15] 肖超菊, 齐宪荣, 艾尼瓦尔, 等. 顺铂缓释多囊脂质体的制备和体外释放性能研究 [J]. *药学学报*, 2003, 38(2): 133–137.
- [16] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册, 第2版 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 66–178.
- [17] 郭尧军. 蛋白质电泳实验技术, 第4版 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 123–141.
- [18] Shu X Z, Zhu K J. The Release Behavior of Brilliant Blue from Calcium-Alginate Gel Beads Coated by Chitosan: The Preparation Method Effect [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2002, 53: 193–201.

Preparation and Release Behavior of Alginate Microspheres Containing BSA by Emulsification

ZHANG Jie, GUO Ni-ni, ZHANG Dai-jia, XIU Zhi-long

(Dept. Biosci. & Biotechnol., Sch. Environ. & Biolog. Sci. & Technol., Dalian Univ. Technol., Dalian, Liaoning 116024, China)

Abstract: Alginate (ALG) microspheres containing bovine serum albumin (BSA) were prepared by an emulsification technique. Soybean salad oil used widely in food industry was chosen as an oil phase. Orthogonal experimental design was used to find the optimal preparation conditions by comparing the encapsulation efficiency of BSA, loading capability and average diameter of microspheres. The fine spherical alginate microspheres with an average diameter of 10 μm were obtained under the appropriate conditions. The encapsulation efficiency of BSA and the BSA loading capability were 70% and 4% (ω), respectively. As the concentration of ALG increased and the amount of BSA decreased, the encapsulation efficiency of BSA increased, however, BSA loading capability decreased. The *in vitro* release profile showed a fast release rate of encapsulated BSA, particularly in phosphate buffered saline solution, owing to the excellent pH responsive properties of alginate microspheres. Finally, electrophoresis experiment illustrated that the process of encapsulation had no effect on the molecular weight of the entrapped protein.

Key words: alginate microspheres; bovine serum albumin; emulsification; preparation