

# 多层海藻酸-壳聚糖聚电解质膜微球的制备与体外释放特性研究

南艳微\*, 郑晓玲#(浙江大学医学院附属妇产科医院, 杭州 310006)

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)17-1581-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.17.17

**摘要** 目的:制备牛血清白蛋白-海藻酸-壳聚糖微球(BSA-ACM),牛血清白蛋白-海藻酸-壳聚糖-海藻酸钠微球(BSA-ACAM),牛血清白蛋白-海藻酸-壳聚糖-海藻酸-壳聚糖-海藻酸钠微球(BSA-ACACAM)。方法:以海藻酸钠和壳聚糖溶液为囊材,对BSA进行反复包裹,采用乳化-交联法制备BSA-ACM、BSA-ACAM、BSA-ACACAM;采用扫描电镜测定微球粒径, Micro-BCA试剂盒测定载药量,考察包封率和24 h体外释药特性,并进行Higuchi方程拟合。结果:BSA-ACM、BSA-ACAM、BSA-ACACAM微球形圆整,分散性好,平均粒径分别为 $(3.79 \pm 1.33)$ 、 $(3.52 \pm 0.96)$ 、 $(3.07 \pm 1.17)$   $\mu\text{m}$ ;载药量分别为 $(17.97 \pm 1.33)\%$ 、 $(16.95 \pm 0.46)\%$ 、 $(16.47 \pm 1.49)\%$ ;包封率分别为 $(65.78 \pm 4.98)\%$ 、 $(63.99 \pm 4.83)\%$ 、 $(55.00 \pm 1.50)\%$ 。微球体外释放速率与聚电解质膜包裹层数呈负相关,均符合Higuchi方程( $r$ 分别为0.978 7、0.986 9、0.980 8),24 h内累积释放量分别为32.15%、25.59%、16.72%,无明显突释现象。结论:多层海藻酸-壳聚糖聚电解质膜微球能减少药物的突释,具有良好的缓释效果。

**关键词** 牛血清白蛋白;海藻酸钠;壳聚糖;微球;制备;体外释放

## Preparation and *in vitro* Release Study of Multilayer-sodium Alginate-chitosan Microspheres with Polyelectrolytes Film

NAN Yan-wei, ZHENG Xiao-ling (Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare Bovine serum albumin-alginate-chitosan microspheres (BSA-ACM), BSA-alginate-chitosan-sodium alginate microspheres (BSA-ACAM) and BSA-alginate-chitosan-alginate-chitosan-sodium alginate microspheres (BSA-ACACAM). METHODS: With sodium alginate and chitosan as package material, BSA was packaged repeatedly and then BSA-ACM, BSA-ACAM and BSA-ACACAM were prepared with emulsion-crosslinking method. SEM was utilized to investigate the particle size of the microspheres, the drug-loading amount was detected by Micro-BCA kit, and entrapment efficiency and 24 h release behavior *in vitro* were also studied. The fitting of Higuchi equation was carried out. RESULTS: BSA-ACM, BSA-ACAM and BSA-ACACAM were spherical in shape and good in dispersibility. The mean diameters were  $(3.79 \pm 1.33)$   $\mu\text{m}$ ,  $(3.52 \pm 0.96)$   $\mu\text{m}$  and  $(3.07 \pm 1.17)$   $\mu\text{m}$  respectively. The drug-loading amount were  $(17.97 \pm 1.33)\%$ ,  $(16.95 \pm 0.46)\%$  and  $(16.47 \pm 1.49)\%$ ; entrapment efficiency were  $(65.78 \pm 4.98)\%$ ,  $(63.99 \pm 4.83)\%$  and  $(55.00 \pm 1.50)\%$ , respectively. Release rate was negatively correlated with the number of polyelectrolytes film layer, which were in line with Higuchi equation. The value of  $r$  were 0.978 7, 0.986 9 and 0.980 8, and 24 h accumulative release amounts were 32.15%, 25.59% and 16.72%. No significant burst release was found. CONCLUSIONS: The burst release of multilayer-sodium alginate-chitosan microspheres with polyelectrolytes film can be decreased, showing sound sustained-release effect.

**KEY WORDS** Bovine serum albumin; Sodium alginate; Chitosan; Microspheres; Preparation; *in vitro* release

海藻酸钠是存在于褐藻的天然高分子,壳聚糖是从贝类、昆虫、细菌细胞壁及蘑菇提取的甲壳质(几丁质)去乙酰化后得到的产物,自然界储量丰富,因其价格低廉,且具有优良的生物相容性、生物降解性和资源可持续性等优点,越来越受到研究者的青睐<sup>[1-2]</sup>。海藻酸钠是荷负电的天然多糖,壳聚糖是荷正电的天然多糖,海藻酸钠分子链上大量的羧基与壳聚

糖分子链上大量的伯氨基通过聚电解质络合反应形成具有一定机械强度、弹性和通透性能的聚电解质复合水凝胶膜,并作为药物控释载体<sup>[3-4]</sup>、酶固定化载体<sup>[5]</sup>等广泛应用于生物医药领域。

以海藻酸钠、壳聚糖为囊材制备的单层聚电解质膜微球已有大量文献<sup>[6-7]</sup>报道,但多层聚电解质膜微球少有报道。为此,本文以牛血清白蛋白(BSA)为模型药物,以海藻酸钠、壳聚糖为囊材,采用乳化-交联法包裹海藻酸钠微球制备BSA-海藻酸-壳聚糖微球(BSA-ACM)、BSA-海藻酸-壳聚糖-海藻酸钠微球(BSA-ACAM)、BSA-海藻酸-壳聚糖-海藻酸-壳聚糖-海藻酸

\*药师。研究方向:药物缓控释制剂。电话:0571-89991139。E-mail: zhangwei2415@sina.com

#通信作者:主管药师,硕士。研究方向:药物缓控释制剂。E-mail: ekwefi678@sina.com

钠微球(BSA-ACACAM),并对其包封率、载药量及其体外释放特性进行研究。

## 1 材料

FJ-200 高速分散均质机(上海标本模型厂);高速离心机(德国 Heraeus 公司)、LGJO 5-II 型冷冻干燥机(军事医学科学院实验仪器厂);ELx 800 酶标仪(美国 Bio-Tek Instruments. INC 公司)。

海藻酸钠[南京化学试剂有限公司,批号:10111021160,黏度: $\geq 0.02 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ (1%溶液,25℃)];壳聚糖(玉环海洋生化有限公司,批号:D03012202,分子质量:80 000,去乙酰度:85%);牛血清白蛋白(BSA,华美生物工程公司,批号:0108);BCA 试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所);吐温、司盘、异辛烷、异丙醇等化学试剂均为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 BSA-ACM 的制备

精密称取 BSA,溶于 1% 海藻酸钠溶液 20 ml 作为水相,以 5% 司盘-异辛烷 40 ml 为油相,两相高速乳匀 3 min 后,滴加适量第二乳化剂 30% 吐温 80,再乳匀 3 min,逐滴加入 8% 氯化钙溶液适量后乳匀 3 min,加入异丙醇后在相同转速下最后乳匀 3 min。离心后收集微球,用 1% 的壳聚糖溶液代替水溶液加入离心后所得微球中,孵育 30 min,离心收集微球后再用同样的壳聚糖溶液清洗 1 次,用水清洗 2 次后冷冻干燥,即得。

### 2.2 BSA-ACAM 的制备

在乳化制得 BSA-ACM 后,用 0.25% 海藻酸钠溶液代替水溶液加入离心后所得的微球中,孵育 30 min,离心收集微球后用水清洗 2 次,冷冻干燥,即得。

### 2.3 BSA-ACACAM 的制备

离心后收集的 BSA-ACAM,用 1% 的壳聚糖孵育 30 min,离心收集,再用 0.25% 海藻酸钠溶液孵育 30 min,离心收集微球后用水清洗 2 次,冷冻干燥,即得。

### 2.4 形态学观察

用显微镜和扫描电镜观察 BSA-ACM、BSA-ACAM、BSA-ACACAM 的形态及表面特征。

### 2.5 包封率和载药量的测定

将一定量的微球分散于磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)中,在 37℃、200 r/min 下恒温振荡 9 h,离心,移取上清液后补充介质,反复提取 3 次后合并上清液,采用 Micro-BCA 法于 570 nm 波长处测定吸光度,以吸光度(A)为横坐标,BSA 质量浓度(c)为纵坐标,进行线性回归,然后计算微球包封率和载药量<sup>[6]</sup>。包封率指微球中药物量占总投药量的百分比;载药量指一定量微球中所含药物的量占总质量的比值。

### 2.6 体外释放研究

分别精密称定约 30 mg 的 BSA-ACM、BSA-ACAM、BSA-ACACAM 至 Eppendorf 管中,各加入 0.9% NaCl 溶液释放介质 3 ml,置 37℃、70 r/min 下振荡器内释放,按一定时间间隔 2 000 r/min 离心 10 min,取上清液 0.5 ml,补充 0.5 ml 新鲜介质<sup>[7]</sup>。Micro-BCA 法测定 BSA 浓度,并按累积释放量(Q)公式计算:

$$Q_i = c_i V + \sum_{j=1}^{i-1} c_{j-1} V_j / Q_0 \times 100\%$$

式中  $Q_i$ :第  $i$  次取样时  $Q$ ;  $c_i$ :第  $i$  次取样时接收液中的药物浓度;  $V$ :接收液体积;  $c_{i-1}$ :第  $(i-1)$  次取样时接收液中的药物浓度;  $V_j$ :每次取样体积;  $Q_0$ :药物释放总量。以  $Q$  为纵坐标,时间  $t$  为横坐标作图,得药物累积释放曲线,考察 24 和 360 h 内的体外释药情况,同时进行 Higuchi 方程拟合。

### 2.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计学软件处理数据,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,样本均数间比较采用  $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 微球形态及粒径

微球形态及大小分布见图 1。

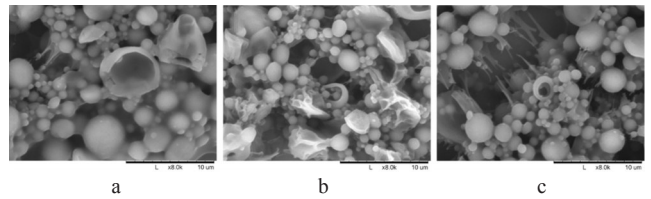


图 1 3 种微球的扫描电镜图

a. BSA-ACM; b. BSA-ACAM; c. BSA-ACACAM

Fig 1 SEM photograph of 3 kinds of microspheres

a. BSA-ACM; b. BSA-ACAM; c. BSA-ACACAM

结果,BSA-ACM、BSA-ACAM、BSA-ACACAM 均呈球形,表面光滑,不粘连,平均粒径分别约为  $(3.79 \pm 1.33)$ 、 $(3.52 \pm 0.96)$ 、 $(3.07 \pm 1.17) \mu\text{m}$ 。

### 3.2 包封率和载药量的测定

3.2.1 Micro-BCA 法。回归方程为  $c = 0.714 7A + 0.012 3$  ( $r = 0.999 2, n = 3$ )。结果,BSA 检测质量浓度在 10~500  $\mu\text{g/ml}$  之间呈现良好的线性关系。

3.2.2 包封率和载药量。BSA-ACM、BSA-ACAM、BSA-ACACAM 包封率分别为  $(65.78 \pm 4.98)\%$ 、 $(63.99 \pm 4.83)\%$ 、 $(55.00 \pm 1.50)\%$ ,载药量分别为  $(17.97 \pm 1.33)\%$ 、 $(16.95 \pm 0.46)\%$ 、 $(16.47 \pm 1.49)\%$ 。

3.2.3 体外释放试验。体外释放行为均符合 Higuchi 方程,方程拟合结果见表 1。图 2 和图 3 分别为 BSA-ACM、BSA-ACAM、BSA-ACACAM 在 24 h 和 360 h 内的体外释放曲线。

表 1 BSA-ACM、BSA-ACAM、BSA-ACACAM 体外释放方程拟合结果

Tab 1 Results of equation fitting of BSA-ACM, BSA-ACAM, BSA-ACACAM release *in vitro*

微球类别	拟合方程	$r$
BSA-ACM	$Q = 3.870 2t^{1/2} + 11.82 4$	0.989 3
BSA-ACAM	$Q = 3.936 8t^{1/2} + 1.844 3$	0.993 4
BSA-ACACAM	$Q = 3.873 2t^{1/2} + 0.094 5$	0.990 4

结果可见,BSA-ACM、BSA-ACAM、BSA-ACACAM 在 24 h 内  $Q$  分别为 32.15%、25.59%、16.72%,无明显突释现象。微球的体外释放速率与聚电解质膜的层数呈负相关,BSA-ACACAM 前 24 h 体外释放速率低,与 BSA-ACM、BSA-ACAM 有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),BSA-ACM 与 BSA-ACAM 的体外释

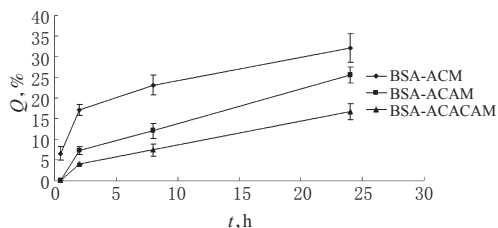


图2 3种微球24 h的体外释放曲线

Fig 2 24 h release profiles of 3 kinds of microspheres *in vitro*

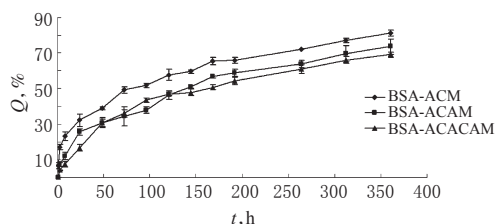


图3 3种微球360 h的体外释放曲线

Fig 3 360 h release profiles of 3 kinds of microspheres *in vitro*

放无显著性差异( $P>0.05$ )。在随后24~360 h内BSA从微球中的释放量呈缓慢增长趋势,表明3种载药微球缓释效果明显。

#### 4 讨论

海藻酸钠是聚阴离子多糖,在水溶液中带负电荷;壳聚糖是聚阳离子多糖,在酸性溶液中带正电荷,两者发生静电聚合反应形成微囊膜。这两者都是亲水性材料,具有良好的生物相容性,在药物制剂方面的应用日益增加。有文献<sup>[8]</sup>报道,海藻酸-壳聚糖膜和海藻酸-壳聚糖-海藻酸钠膜对BSA向海藻酸钠(钙)微球中的扩散有明显的阻碍作用,前者通透性强于后者,说明包裹不同层次的海藻酸-壳聚糖聚电解质膜对药物的扩散有一定程度的影响,这一点在本试验中也得到了证实。微球的通透性由交联程度、膜厚、膜孔径和孔分布决定<sup>[9]</sup>。海藻酸-壳聚糖聚电解质膜主要由多糖链的交联构成,3类微球的包封率无显著性差异( $P>0.05$ )。但是BSA在ACACAM中前24 h内的释放速率要比在ACM、ACAM中低( $P<0.05$ ),提示BSA主要包裹在ACM中。文献<sup>[10]</sup>提示反复包裹ACM只是增加微球膜的紧密性,使得微球表面细孔部分关闭,导致多层膜渗透性下降,从而延缓药物的释放。

BSA-ACM、BSA-ACAM、BSA-ACACAM载药量分别为 $(17.97 \pm 1.33)\%$ 、 $(16.95 \pm 0.46)\%$ 、 $(16.47 \pm 1.49)\%$ ,表明随包覆层数的增加,载药量有所下降,可能是操作过程的反复进行,离心、水洗及转移损失了一定的药物,但三者数据比较无显著性差异( $P>0.05$ )。

试验中发现孵育中所需海藻酸钠的浓度十分重要。对

0.15%、0.25%、1.0%海藻酸钠溶液进行比较后发现,0.15%海藻酸钠溶液强度不够,制备的ACACAM释放与ACAM、ACM无显著性差异( $P>0.05$ );1.0%的海藻酸钠溶液黏度太大,ACM在其中分散性差,聚结成团状;0.25%为比较合适的浓度,ACM在其中分散性良好。

改变海藻酸钠和壳聚糖的组成和成膜条件可调节膜厚、膜孔径大小和膜孔分布,改变微球的通透性。本次试验只对单一海藻酸钠浓度、单一分子量及浓度的壳聚糖浓度制备的微球进行了研究,对药物在多层海藻酸-壳聚糖聚电解质膜微球中特性有一定的提示作用,但仍有很多因素值得进一步考察研究。

#### 参考文献

- [1] Raveendran S, Poulose AC, Yoshida Y, *et al.* Bacterial exopolysaccharide based nanoparticles for sustained drug delivery, cancer chemotherapy and bioimaging[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 91(1):22.
- [2] Nagarwal RC, Kumar R, Pandit JK. Chitosan coated sodium alginate-chitosan nanoparticles loaded with 5-FU for ocular delivery: in vitro characterization and in vivo study in rabbit eye [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47(4):678.
- [3] 向艳,杨红.壳聚糖在药物缓释载体中的应用[J]. *中国生化药物杂志*, 2005, 26(1):62.
- [4] 王昌红,孙晓飞.壳聚糖及其衍生物在医药领域的应用研究进展[J]. *中南药学*, 2007, 5(3):258.
- [5] Taqieddin E, Amiji M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(10):1937.
- [6] 郑彩虹,梁文权,虞和永.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.
- [7] Zheng CH, Liang WQ, Yu HY, *et al.* Evaluation of different methods to determine the loading of proteins in PLGA microspheres[J]. *Pharmazie*, 2004, 59(3):232.
- [8] 刘映薇,于炜婷,刘袖洞,等.海藻酸-壳聚糖-海藻酸钠(ACA)微胶囊的蛋白质通透性研究[J]. *中国微生物医学工程学报*, 2006, 25(3):370.
- [9] 胡振华,袁伟恩,吴飞,等.氢氧化镁对利培酮微球释放速率的调整[J]. *医药导报*, 2008, 27(11):1374.
- [10] 李华,史国齐,万昌秀.壳聚糖/海藻酸钠自组装微球的制备及释药性能[J]. *华西药学杂志*, 2008, 23(3):249.

(收稿日期:2012-12-12 修回日期:2013-01-24)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅