复合材料学报 Acta Materiae Compositae Sinica
第28卷 第2期 4月 2011年
Vol. 28 No. 2 April 2011

文章编号：1000-3851(2011)02-0117-06

海藻酸钠-胰蛋白酶微球的制备及药物释放性能

崔园园[1]，陈 红[1]，周 丰[2]，冯超阳[1]，邓阳全[1]，张志斌*[1]，陆 群[1]，周先礼[1]
（1. 西南交通大学 生命科学与工程学院，成都 610031；2. 西南交通大学 材料科学与工程学院，成都 610031）

摘 要： 通过离子凝胶法制备出球形完好的海藻酸钠-胰蛋白酶微球。红外分析表明，微球中凝胶基质通过海藻酸钠的—COO^-与Ca^{2+}发生静电作用交联形成。SEM观察显示微球中存在蛋格结构及孔洞。考察了不同因素对微球载药率、包封率和体外释药率的影响。结果表明，海藻酸钠水溶液浓度越高释药率越低，当海藻酸钠与胰蛋白酶质量比为4，海藻酸钠水溶液浓度为4%时呈最大的包封率和载药量；随着海藻酸钠与胰蛋白酶质量比增大，载药率降低，包封率呈先增后降变化趋势。

关键词： 海藻酸钠；胰蛋白酶；微球；载药率；释药率
中图分类号： TB332 **文献标志码：** A

Preparation and drug release of sodium alginate-trypsin microsphere

CUI Yuanyuan[1], CHEN Hong[1], ZHOU Feng[2], FENG Chaoyang[1], DENG Yangquan[1], ZHANG Zhibin*[1], LU Qun[1], ZHOU Xianli[1]
(1. College of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China;
2. College of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Abstract: The spherical alginate-trypsin microcapsules were prepared by the ionotropic gelation method, which formed the microcapsules by adding sodium alginate-trypsin into aqueous solution containing $CaCl_2$. The infrared analysis shows that the matrix in microspheres is cross-linked by electrostatic attraction existed between Ca^{2+} and —COO^- in alginate. The SEM images indicate that "egg-box" structure and holes exist in the microparticles. The experiments were carried out to evaluate the properties of the microparticles such as drug loading rate, encapsulation efficiency rate and in vitro release rate. The results indicate that the in vitro release rate decreases with increasing the sodium alginate concentration, the encapsulation efficiency and the drug loading get the highest point when the mass ratio of sodium alginate to trypsin is 4 and the sodium alginate concentration in water is 4%. As the mass radio of sodium alginate to trypsin increases, the drug loading decreases and the encapsulation efficiency increases at first and then decreases.

Keywords: sodium alginate; trypsin; microsphere; drug loading rate; drug release rate

生物活性药物的稳定性差、易被酶降解、生物半衰期短，而且扩散差、分配系数小使其难以通过生物屏障及脂质膜，故药物利用率低。若生物活性药物可以通过生物降解的微球给药，不仅能够有效防止药物在体内很快降解，还可以将其靶向送达体内有效部位，达到长效缓释目的，从而提高生物活性药物的利用率。海藻酸钠无毒、易降解，低免疫原性，有好的生物相容性，是一种安全的释药基质，被广泛应用在药物的微囊化中。海藻酸钠是由β-D-甘露糖醛酸(M)和α-L-古洛糖醛酸(G)所形成的不规则聚合物，其结构式如图1所示[1]。

收到初稿日期： 2010-03-28；**收到修改稿日期：** 2010-09-05
基金项目： 国家自然科学基金资助项目(50573061)；四川省应用基础研究项目(07JY029-065)；中央高校基本科研业务费专项资金资助(SWJTU09CX062，2010ZT09)
通讯作者： 张志斌，教授，研究方向为生物医用材料 E-mail：zzb183@163.com

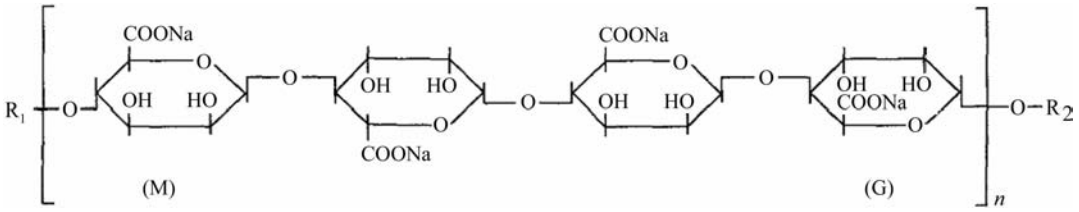

图 1　海藻酸钠化学式

Fig. 1　Chemical formula of sodium alginate

海藻酸钠微球的形成是因为海藻酸钠为电解质聚合物，羧基使其携带负电荷，结构中的古洛糖醛酸可交联二价或三价金属离子（如 Ca^{2+}），形成具有强度又具有弹性的凝胶，由此制得海藻酸钠微球[2]。海藻酸钠微球可用来包埋生物活性肽[3]、蛋白质[4-5]、酶[6]、细胞[7]及抗原[8-9]等活性物质，经口服或注射等方式把活性物质送入体内，从而避免不良 pH、酶环境及免疫系统等对活性物质的破坏和吞噬，以达到免疫、预防及治疗等作用，另外其特有的黏附性可延长微球与上皮细胞及黏膜相关淋巴组织 M 细胞的吸附，提高药物摄取量[10]。关于用海藻酸盐微球包埋胰蛋白酶的文献报道很少，因此本研究中采用离子凝胶法制备海藻酸钠-胰蛋白酶微球，考察了不同因素对微球载药率、包封率和体外释药率的影响。

1　材料和方法

1.1　材　料

海藻酸钠，胰蛋白酶（美国 Sanland 公司），考马斯亮蓝G-250，85%磷酸溶液，无水乙醇，无水 $CaCl_2$，Na_2HPO_4，K_2HPO_4，以上试剂均为分析纯，成都科龙化工试剂厂生产。

1.2　海藻酸钠-胰蛋白酶微球的制备

采用离子凝胶法制备微球。分别配制 5 mL 胰蛋白酶溶液和 20 mL 海藻酸钠溶液，使二者均匀共混，得到 25 mL 海藻酸钠-胰蛋白酶溶液。配制100 mL 5%的 $CaCl_2$ 溶液，在低速搅拌条件下，用注射器将海藻酸钠-胰蛋白酶混合液滴加到 $CaCl_2$ 溶液中，交联反应一段时间后，收集微球，常温干燥 12 h。

1.3　红外光谱测定

取适量干燥微球于液氮中研磨，干燥后，加入 0.2 g 溴化钾研成混合粉末。将粉末倒入压片机中压成片，用 PE2000 型傅里叶变换红外光谱仪测定微球的红外光谱图，扫描波数范围 4000～400 cm^{-1}。

1.4　形态观察

于倒置生物显微镜下初步观察微球形态。用 JSM-5900 SEM（扫描电子显微镜）观察海藻酸钠微球微观表面和剖面形态，样品在 20 kV 电压下喷金后 SEM 成像。剖面样品的制备是在液氮中迅速冷冻后切割所得。

1.5　载药率和包封率的测定

微球从 $CaCl_2$ 溶液中分离后，取含有胰蛋白酶的 $CaCl_2$ 溶液 1 mL 到试管中，对照加入 1 mL $CaCl_2$ 溶液，分别在两支试管中加入 5 mL 考马斯亮蓝G-250 显色液。反应 2 min，在紫外分光光度仪 595 nm 下测定吸光度，测定 $CaCl_2$ 溶液中的胰蛋白酶含量。按照下式计算载药率（D_L）及包封率（E_R）：

$$D_L=\frac{m_1-m_2}{m_0}\times 100\%$$

$$E_R=\frac{m_1-m_2}{m_1}\times 100\%$$

式中：m_0 为海藻酸钠-胰蛋白酶微球总质量；m_1 为胰蛋白酶总质量；m_2 为 $CaCl_2$ 溶液中所含胰蛋白酶质量。

1.6　释放试验

在恒温式振荡器中调节温度至 37 ℃，转速 120 r/min，称取 6 份相同质量的干燥海藻酸钠-胰蛋白酶微球分别放入 6 个小三角瓶中，再在每个小三角瓶中加入 10 mL pH 7.4 的磷酸缓冲液（Phosphate Buffered Saline，PBS），定时在恒温振荡器中取出一个小三角瓶，吸取 5 mL 浑浊液离心（3000 r/min，20 min）。离心后，吸取1 mL 上清液于试管中，对照试管中加入 1 mL 磷酸缓冲液，在两支试管中加入 5 mL 考马斯亮蓝G-250 显色液，反应 2 min后，在 752 N 紫外可见分光光度仪 595 nm 下测定吸光度，测定其磷酸缓冲液中胰蛋白酶的含量，求得各时间点的累积释药量（D_R）：

$$D_R=\frac{m_i}{m_0\times D_L}\times 100\%$$

式中：m_i 为第 i 个时间点测得的溶液中胰蛋白酶的含量。

2 结果和讨论

2.1 FTIR 分析

从图 2 的海藻酸钠微球的红外光谱图可以看出，海藻酸钠上存在大量的 O—H，游离 O—H 伸缩震动吸收峰一般位于 3640～3610 cm^{-1}，峰形尖锐。O—H 是强极性基团，分子间形成氢键，O—H 伸缩震动吸收峰向低频方向移动，会在 3400～3200 cm^{-1}处出现一个宽而强的吸收峰[11]，说明海藻酸钠中的 O—H 因形成氢键而发生了缔合。海藻酸钠—COO^- 的反对称伸缩震动和对称伸缩震动吸收峰分别位于 1610～1500 cm^{-1}和 1500～1400 cm^{-1}处[12-13]，吸收峰比较强，和 Ca^{2+} 发生交联后，—COO^- 峰形变弱，且向低频位移，说明微球在形成的过程中发生了交联反应。由图 2 海藻酸钠-胰蛋白酶载药微球谱线可见，胰蛋白酶中含有大量的—NH_2，而—NH_2的伸缩振动吸收峰也在 3500～3200 cm^{-1}，加上海藻酸钠缔合羟基在 3400～3200 cm^{-1}处的吸收峰，使在 3500～3200 cm^{-1}处的吸收峰峰型变宽，吸收强度增大，说明胰蛋白酶的存在。另外载药微球谱线相对于海藻酸钠微球在2400 cm^{-1}左右处吸收峰的强度增大，这是 S—H 的伸缩振动吸收峰，说明胰蛋白酶中有半胱氨酸存在。

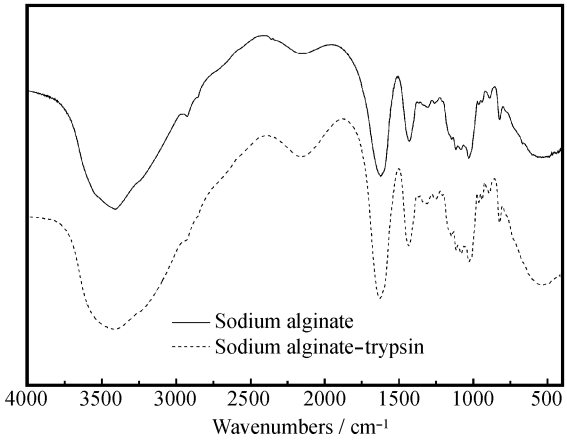

图 2 海藻酸钠微球及海藻酸钠-胰蛋白酶载药微球的红外光谱图

Fig. 2 FTIR of sodium alginate microsphere and sodium alginate - trypsin drug-loaded microsphere

2.2 形态观察

图 3 是在倒置生物显微镜下观察到的微球形态，球形较完好，不同海藻酸钠浓度的微球形态略有不同。随着海藻酸钠浓度的增加，海藻酸钠溶液变得黏稠，得到的微球球形不太完好，甚至出现拖尾现象(图 3(c))。故海藻酸钠浓度应越小越好，2%～4%为最佳，与文献[14]相符。

图 4 为微球的表面和剖面 SEM 形貌，微球平均直径约为 800 μm，球形完好，表面形貌均匀连续，有颗粒样物质存在。由图 4(c)、4(d)可以看出，微球内部有孔洞存在，且颗粒样物质更加明显。孔洞估计是 $CaCl_2$ 水溶液在和内部羧基发生交联后水分出去时留下的。另外钙离子在与水溶性的海藻酸钠反应时，会优先与海藻酸钠中的古洛糖醛酸以平面二维方式发生交联，产生所谓的蛋格结构[15]("egg-box" structure)，故微球中会出现小颗粒样物质，而孔洞的存在有利于包埋在海藻酸钠基质中的药物的释放。

2.3 海藻酸钠浓度对微球性能的影响

图 5 为海藻酸钠水溶液浓度对微球载药率和包封率的影响。海藻酸钠浓度小于 4%时，微球的载药率和包封率逐渐增大，大于 4%后随着海藻酸钠浓度的增大载药率和包封率均呈减小趋势。这是由于海藻酸钠浓度过低时，形成的微球结构稀疏，不能对胰蛋白酶起到很好的包埋作用；海藻酸钠浓度过高，海藻酸钠的黏度大，挤出困难，形成的微球结构过于致密，且海藻酸钠对胰蛋白酶的包裹已达到了饱和，包裹效果不好。因此，随着海藻酸钠浓度的继续增大，载药率和包封率都将减小。

图 6 为海藻酸钠浓度对释药率的影响。可以看出，海藻酸钠浓度为 3%时微球在 5 h 时就可达完全释药，海藻酸钠浓度为 5%时释药率最低。随着海藻酸钠浓度增加，微球释药率减慢，这是因为海藻酸钠浓度越大，溶液越黏稠，形成微球的结构越致密，对药物的包埋作用越强，所以药物从微球中释放出来的速度就越慢，释药率就会越低。

所制备的微球属于凝胶类，故在进行释放研究时，微球发生溶胀，微球基质中充满磷酸缓冲液，使得包埋在基质中的胰蛋白酶可以随着缓冲液而扩散出去，另外微球中有一些孔洞存在(如图 4(c)、4(d))，会加速胰蛋白酶的释放，故在较短时间里就可完全释药，这种载药微球适合口服结肠给药。进一步的研究中要制备长效缓释的海藻酸钠-胰蛋白酶微球，可以采取其他的技术对微球制备进行改进，例如可用锌离子代替部分钙离子对微球进行交联固化，将大大降低释药率，并且研究发现，所用的锌离子越多，释药率越低[15]。

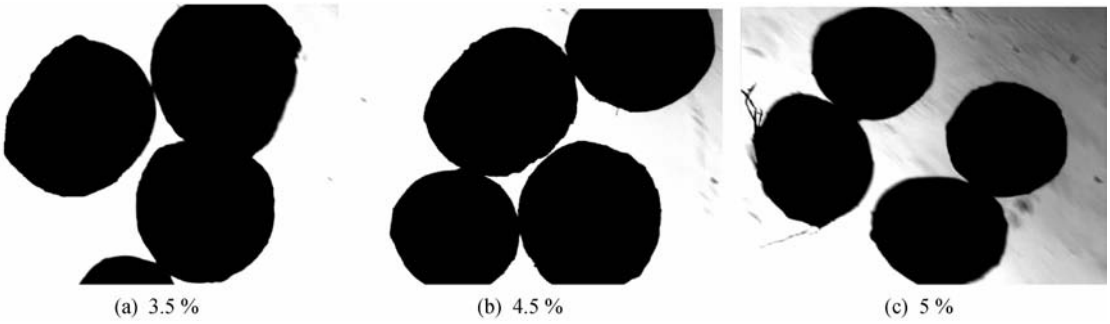

图 3　不同海藻酸钠水溶液浓度的海藻酸钠-胰蛋白酶微球形态

Fig. 3　Morphologies of sodium alginate - trypsin microparticles with different alginate concentration

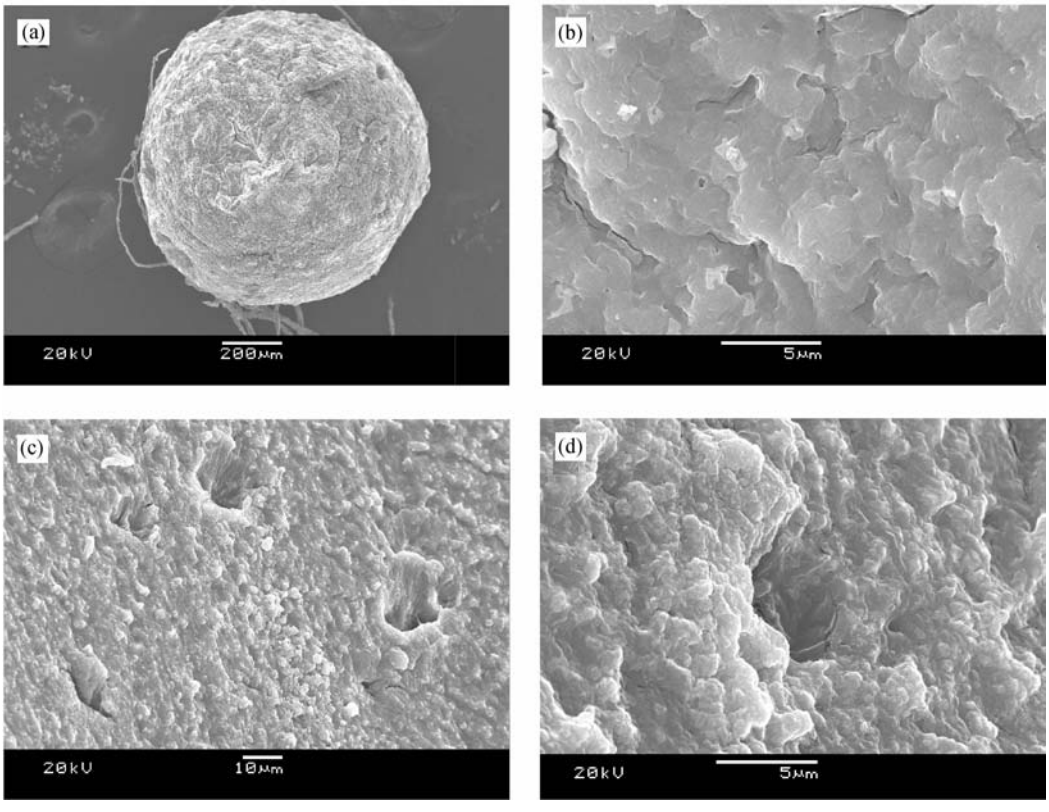

Fig. 4　3.5%海藻酸钠水溶液浓度海藻酸钠-胰蛋白酶微球的 SEM((a)，(b)：表面；(c)，(d)：剖面)

Fig. 4　SEM images of sodium alginate - trypsin microparticles with 3.5% alginate concentration ((a)，(b)：surface morphology；(c)，(d)：cross-section morphology)

2.4　海藻酸钠与胰蛋白酶质量比对微球性能影响

图 7 为海藻酸钠与胰蛋白酶质量比对载药率和包封率的影响。随着海藻酸钠与胰蛋白酶质量比的增大，载药率逐渐减小；包封率呈先增加后减少趋势，当海藻酸钠与胰蛋白酶质量比为 4 时，包封率最大。海藻酸钠与胰蛋白酶质量比的增大，增加了微球基质的致密性，使得所容纳药物的空间减少，故载药率下降。微球致密性增强的同时，使得微球对药物的包埋作用增强，故包封率增大，但微球的包封率达饱和之后，继续增加质量比使微球结构更致密，使得药物的包埋空间减少，故包封率呈下降趋势。

图 8 为海藻酸钠与胰蛋白酶质量比对释药率的影响。海藻酸钠与胰蛋白酶质量比越大，微球的释药率越低。这是因为海藻酸钠与胰蛋白酶质量比越大，相当于海藻酸钠相对浓度增加，溶液黏度增大，微球结构致密性增加，对药物的包埋作用就越强，药物的释放越不易，故释药率减小。

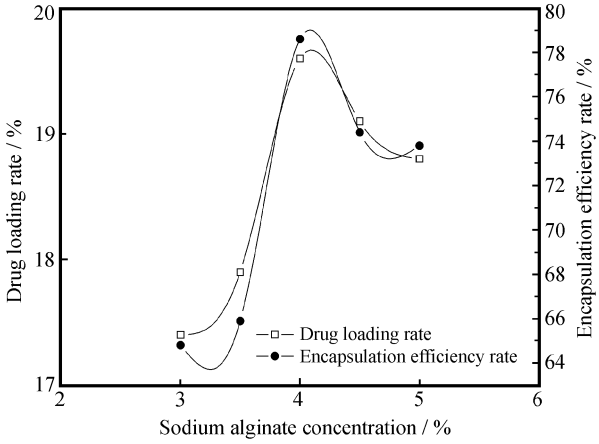

图 5　海藻酸钠浓度对微球载药率和包封率的影响

Fig. 5　Efficiency of sodium alginate concentration on drug loading rate and encapsulation efficiency rate

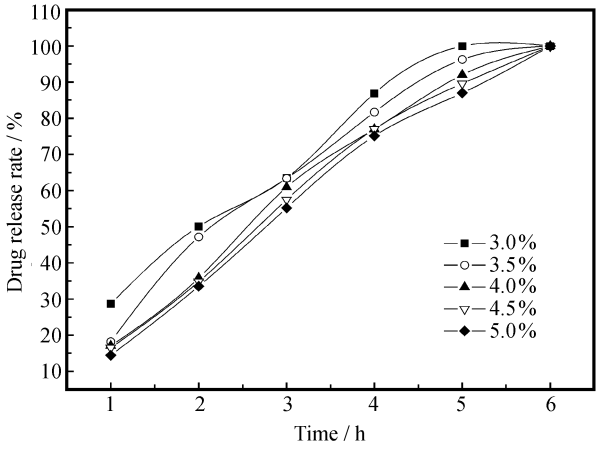

图 6　海藻酸钠浓度对释药率的影响

Fig. 6　Efficiency of sodium alginate concentration on drug release in PBS in vitro

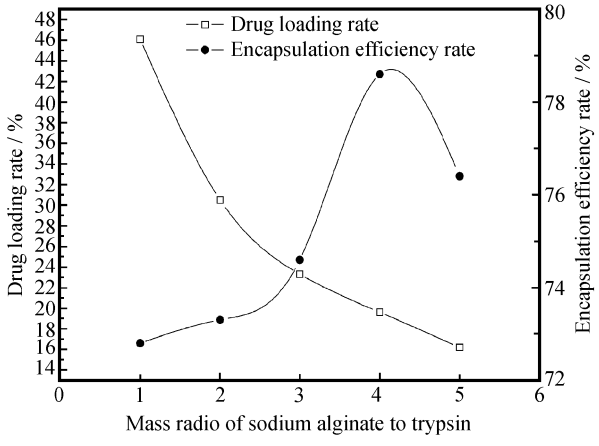

图 7　海藻酸钠与胰蛋白酶质量比对载药率和包封率的影响

Fig. 7　Efficiency of mass ratio of sodium alginate to trypsin on drug loading rate and encapsulation efficiency rate

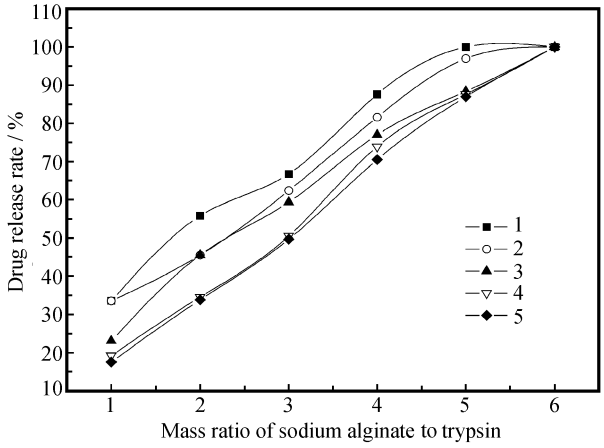

图 8　海藻酸钠与胰蛋白酶质量比对释药率的影响

Fig. 8　Efficiency of sodium alginate to trypsin mass ratio on drug release in PBS in vitro

3　结　论

（1）通过离子凝胶法制备出球形完好的海藻酸钠-胰蛋白酶微球，红外分析表明，微球中凝胶基质是通过海藻酸钠的—COO^- 与 Ca^{2+} 发生静电作用交联形成的。

（2）海藻酸钠浓度水溶液在 2%～4%为宜，且浓度越低球形越完好，SEM 观察显示微球中存在蛋格结构及孔洞。

（3）海藻酸钠浓度越高释药率越低，当海藻酸钠浓度为 4%时呈最大的包封率和载药量。

（4）随着海藻酸钠与胰蛋白酶质量比的增加，微球的载药量降低，包封率呈先增后减趋势。

随着生物和制剂技术的发展，海藻酸钠作为多肽及蛋白质等生物活性类药物的控释材料还需进一步开发和研究。

参考文献：

[1]　Wu Kai, Xu Zhenliang, Wei Yongming. Sodium alginatr - polyvinyl alcohol/polysulfone (SA-PVA/PSF) hollow fiber composite pervaporation membrane for dehydration of ethanol-water solution [J]. J Shanghai Univ: Engl Ed, 2008, 12(2): 163-170.

[2]　Li Sha, Wang Xiangtao, Zhang Xiaobin. Studies on alginate-chitosan microcapsules and renal arterial embolization in rabbits [J]. Journal of Controlled Release, 2002, 84: 87-98.

[3]　Hurteaux R, Edwards-L'evy F, Laurent-Maquin D, Marie-Christine L. Coating alginate microspheres with a serum albumin-alginate membrane: Application to the encapsulation of a peptide [J]. European Journal of Pharmaceutical

Sciences, 2005, 24: 187-197.

[4] Jang-Wook L, Cheau-Yih T, Sang-Kyung L, Yong-Hee K, L Kuen-Yong. Controlled delivery of heat shock protein using an injectable microsphere/hydrogel combination system for the treatment of myocardial infarction [J]. Journal of Controlled Release, 2009, 137: 196-202.

[5] Wells L A, Sheardown H. Extended release of high pI proteins from alginate microspheres via a novel encapsulation technique [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007, 65: 329-335.

[6] Coppi G, Iannuccelli V, Bernabei M T, Cameroni R. Alginate microparticles for enzyme peroral administration [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2002, 242: 263-266.

[7] Hori Y, Winans A M, Huang C C, Horrigan E M, Irvine D J. Injectable dendritic cell - carrying alginate gels for immunization and immunotherapy [J]. Biomaterials, 2008, 29: 3671-3682.

[8] Bowersocka T L, HogenEsch H, Suckow M, Guimond P, Martin S. Oral vaccination of animals with antigens encapsulated in alginate microspheres [J]. Vaccine, 1999, 17: 1804-1811.

[9] Bowersock T L, HogenEsch H, Suckow M, Porter R E, Jackson R. Oral vaccination with alginate microsphere systems [J]. Journal of Controlled Release, 1996, 39: 209-220.

[10] Lemoine D, Wauters F, Bouchend′ homme S, Pre′ at V. Preparation and characterization of alginate microspheres containing a model antigen [J]. International Journal of Pharmaceutics, 1998, 176: 9-19.

[11] 邓芹英，刘　岚，邓慧敏. 波普分析教程 [M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，2007：55.

[12] Dong Zhanfeng, Wang Qun, Du Yumin. Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release [J]. Journal of Membrane Science, 2006, 280: 37-44.

[13] Ant′onio J R, Catarina S, Domingos F. Chitosan - reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005, 25: 31-40.

[14] Fundueanu G, Esposito E, Mihai D. Preparation and characterization of Ca - alginate microspheres by a new emulsification method [J]. International Journal of Pharmaceutics, 1998, 170: 11-21.

[15] Chan L W, Jin Y, Heng P W S. Cross-linking mechanisms of calcium and zinc in production of alginate microspheres [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2002, 242: 255-258.