

喷雾法制备载牛血清白蛋白海藻酸钙微球系统研究

张 杰, 张新宇, 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: 采用喷雾法制备了载牛血清白蛋白(BSA)的海藻酸钙微球,通过比较微球的平均粒径和包埋率,优化了喷雾法的制备参数,使微球对 BSA 的包埋率大于 60%、载药率达 8% 以上. 释放液中 BSA 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、Western 免疫印迹以及圆二色光谱显示,该制备方法并没有对被包埋蛋白的相对分子质量、抗原性以及二级结构产生影响. 微球中 BSA 的体外释放曲线表明该给药系统具有 pH 响应特性,尤其在模拟胃液中,BSA 的释放速率最慢、释放量最低,可以保护蛋白类药物免受胃酸等的破坏作用,达到肠部实现控制释放.

关键词: 海藻酸钙微球; 牛血清白蛋白; 喷雾法; 控制释放

中图分类号: R944.9 **文献标志码:** A

0 引言

蛋白质、多肽类药物较传统的化学合成药物具有药效更专一、疗效更显著、见效更迅速等特点,但由于半衰期短、易被体内酶降解等问题,这类药物在口服给药体系中受到极大的限制^[1]. 海藻酸盐可以和阳离子(如 Ca^{2+})以及聚阳离子(如壳聚糖^[2]、聚赖氨酸^[3]等)通过静电相互作用形成微球,适合于包载对温度、pH、搅拌剪切力等条件十分敏感的蛋白、多肽类药物^[4]. 同时,海藻酸盐微球具有较好的生物粘附性,在药物的吸收位点,可以与粘膜间形成紧密的连接,使蛋白类药物(特别是肠道消化酶、抗体与细胞因子类药物)不会因吸收位点的酶降解作用导致其变性失活^[5],进而提高药物的生物活性和体内生物利用度^[2,6].

目前,制备粒径小于 500 μm 的微球,多采用乳化法^[7,8]、静电法^[9,10]以及喷雾干燥法^[11,12]. 乳化法存在操作繁琐、使用有机溶剂以及机械搅拌剪切力大等问题;静电法在规模上有很大的限制,对设备的安全性要求也较高;喷雾干燥法虽然避免了上述问题,具备了成型的仪器设备,便于大规模、规范化生产,但以往的研究多是对工艺的摸索,很少解答喷雾剪切力是否影响被包埋蛋白药物性质这个普遍关心的问题. 因此,本文以牛血清白蛋白(BSA)为模型药物,采用喷雾法制备载药

微球,通过优化制备条件最大限度地提高微球包埋率、降低球内药物的释放速度,并通过各种检测手段以及 BSA 的体外释放曲线,着重研究喷雾法对 BSA 活性的影响,探索该方法用于制备蛋白类药物肠部定点控释微球的可行性.

1 实验部分

1.1 实验仪器与试剂

BSA(相对分子质量 68 kD),北京元享圣马生物技术研究所;海藻酸钙(ALG),北京市旭东化工厂,化学纯;结晶氯化钙(CaCl_2),天津市塘沽邓中化工厂,分析纯;考马斯亮蓝,上海化学试剂公司,进口分装;其他试剂均为分析纯. 721 分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;LS230 激光粒径分析仪,Coulter;双目倒置式生物显微镜 IX-70,Olympus;J-810 圆二色光谱仪,JASCO.

1.2 实验方法

1.2.1 微球的制备 将 ALG 溶解于 45 mL 去离子水中,再加入 5 mL BSA 溶液,搅拌均匀,使最终的混合溶液中 ALG 质量分数为 2% (如未加说明,文中各物质的浓度均用质量分数表示),ALG 与 BSA 的质量比为 3 : 1. 通过蠕动泵将上述原料液加入自制喷枪(图 1)中(气体出口外径 $D=1.56$ mm),在一定速度(G_{gas})气体的作用下,喷入 900 mL CaCl_2 溶液($\text{pH}=4.0$) (用 0.2 mol/L、 $\text{pH}=$

3.2的醋酸缓冲液调节)中,形成载BSA的微球,继续搅拌0.5 h,使凝胶化反应完全。

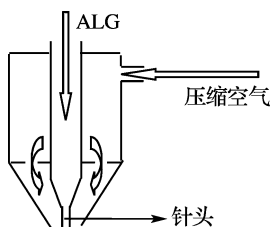


图1 喷枪剖面图

Fig. 1 Profile graph of ejection gun

1.2.2 微球平均粒径(d)的测量 通过LS230激光粒径分析仪自动在线测量微球的平均粒径。粒径分布宽度用单分散性指数 U 来表示, $U =$

$$D_w / D_n, \text{ 其中 } D_w = \frac{\sum_{i=1}^k n_i D_i^4}{\sum_{i=1}^k n_i D_i^3}, D_n = \frac{\sum_{i=1}^k n_i D_i}{\sum_{i=1}^k n_i}, n_i \text{ 表示粒径为 } D_i \text{ 的微球数量。}$$

1.2.3 微球包埋率(E_e)的测定 取凝胶化反应完全的 CaCl_2 溶液1 mL,离心($\times 8\,000g$)10 min后取上清,用考马斯亮蓝法测595 nm下OD值,计算上清的BSA含量,通过下式计算微球的包埋率:

$$E_e = \frac{\text{最初加入的蛋白的量} - \text{上清中蛋白的量}}{\text{最初加入的蛋白的量}} \times 100\%$$

1.2.4 BSA释放曲线的测定 精确称取15 mg湿态微球置于锥形瓶中,加入100 mL释放液(模拟肠液(0.2 mol/L PBS (pH=7.4)) and 模拟胃液(0.1 mol/L HCl)),37℃,120 r/min下培养。每隔2 h取样1 mL,再加入相同体积的新鲜释放液,用考马斯亮蓝法计算出释放液中BSA的浓度。以释放时间为横坐标,绘制微球中BSA的累积释放曲线。

1.2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)^[13] 将上述在不同时间取的液体进行超滤,浓缩6倍后,采用Tris-Tricine系统,进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳实验。

1.2.6 免疫印迹(Western-blot)^[13] 采用湿法转移上述电泳凝胶,硝酸纤维素膜作为免疫印迹膜,得到BSA的免疫印迹结果。

1.2.7 圆二色(CD)光谱^[14] 精确称取经超滤3次后冷干的标准BSA、 CaCl_2 上清溶液中的BSA、模拟肠液释放终点时的BSA,分别加入3个10 mL容量瓶中,并用0.1 mol/L PBS缓冲溶液定容,使最终BSA的浓度为 3.03×10^{-7} mol/L,于波长200~250 nm下进行扫描。

2 结果与讨论

2.1 不同制备条件对微球粒径及包埋率的影响

2.1.1 针头直径对微球平均粒径的影响 实验中固定气速 G_{gas} (0.7 m³/h)、液速 v_{liq} (13 mL/min)不变,仅改变针头直径(D_n),得到微球平均粒径(d)随 D_n 的变化曲线(图2)。从图中可看出,随着针头直径的增大,微球的平均粒径不断减小,但当 D_n 大于一定值后,微球平均粒径反而轻微增加。这是由于喷枪针头直径的变化对最初形成的ALG液滴直径以及气体的喷出面积的影响是完全相反的。当喷枪 D_n 增大时,气体的喷出面积减小、剪切力变大,可以将微球破碎得更小,克服了由于最初ALG液滴体积增大所造成的影响;但当气体的喷出面积减小到一定值后,急剧增大的喷枪出口处的气体速度使喷雾仅在ALG液滴的外边界发生,而无法有效达到喷雾的轴心部分^[15],易在ALG液滴中间形成空心区^[16],使部分微球粒径增大、粒径分布变宽。

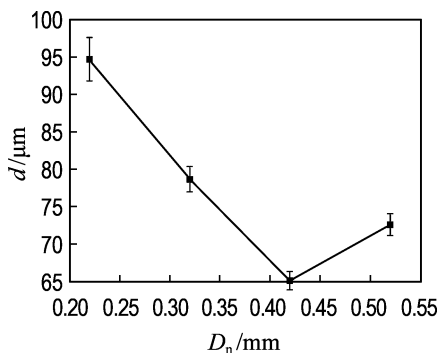


图2 微球平均粒径随针头直径的变化曲线

Fig. 2 Effect of needle diameter on the mean diameter of microspheres

2.1.2 气速对微球平均粒径及包埋率的影响

实验中保持 D_n (0.42 mm)、 v_{liq} (13 mL/min)不变,在不同气速下制备海藻酸钙微球,其平均粒径与包埋率的变化曲线如图3所示。当最初形成的ALG液滴体积和液滴内的BSA量一定时,一定范围内增大 G_{gas} (从0.50 m³/h增加到0.7 m³/h),微球包埋率的减小速度明显低于微球平均粒径的降低速度,这是由于此范围内气体剪切力的增大在将液滴破碎得较小的同时,还较大幅度地保持了微球的完整性,使微球对BSA的包埋率变化不大;但当 G_{gas} 从0.70 m³/h增加到0.85 m³/h时,虽然急剧增大的气体剪切力可以将液滴破碎得更小,但同时也破坏了微球的完整性,使大部分BSA暴露在微球表面,并进入 CaCl_2 溶液中,不利于微球对药

物的包埋. 因此, 实验中选择 G_{gas} 为 $0.70 \text{ m}^3/\text{h}$.

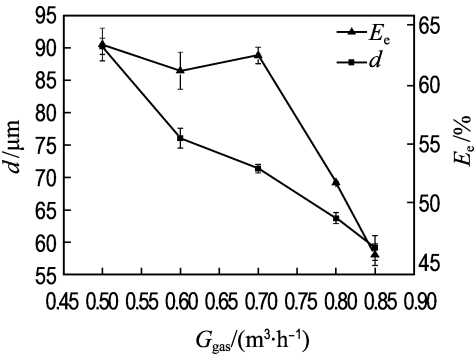


图 3 微球平均粒径及包埋率随风速的变化曲线
Fig. 3 Effect of gas flow rate on the mean diameter and encapsulation efficiency of microspheres

2.1.3 液速对微球粒径及包埋率的影响 ALG 液体是在蠕动泵的驱动下加入到喷枪中的, 由图 4 可知, 当 G_{gas} 一定, 控制 v_{liq} 小于 $15 \text{ mL}/\text{min}$ 时, 微球的平均粒径和包埋率都随 v_{liq} 的增加而增大, 这与文献[16]中所述的微球的平均粒径随气液速度比的减小而增加相一致; 但当 v_{liq} 超过 $15 \text{ mL}/\text{min}$ 后, 蠕动泵的推动作用明显增大, 最初形成的 ALG 液滴发生了形态上的变化, 由球形液面依次变成倒锥形液面和细丝状液柱^[10], 再经气体破碎后, 微球平均粒径减小, 包埋率也随之下降 (图 4). 因此, 综合考虑微球的 d 与 E_e , 确定 v_{liq} 为 $13 \text{ mL}/\text{min}$.

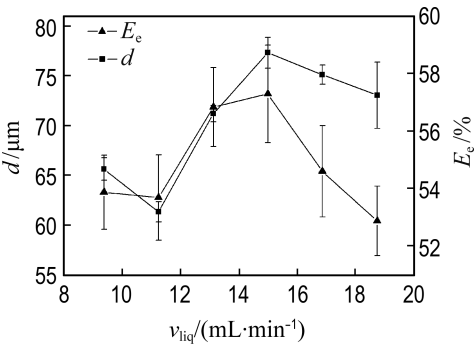


图 4 微球平均粒径和包埋率随液速的变化曲线
Fig. 4 Effect of liquid flow rate on the mean diameter and encapsulation efficiency of microspheres

在上述优化的制备条件下, 采用喷雾法制备载 BSA 微球, 发现所得微球粒径为 $72.71 \mu\text{m}$, 具有典型的高斯分布特性 (图 5), 粒径分布集中 ($U=1.60$). 并且, 具有较高的包埋率 (60%) 和载药率 (8%), 符合口服制剂的基本要求.

2.2 BSA 的相对分子质量和免疫活性检测

作为蛋白类药物的输送载体, 保持药物的分

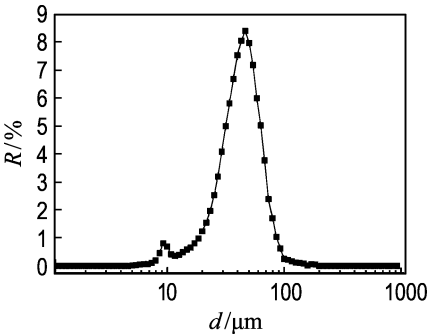
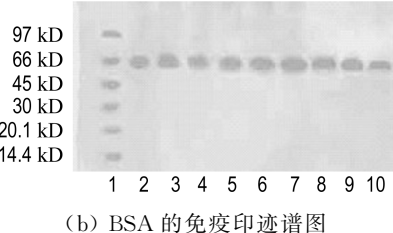
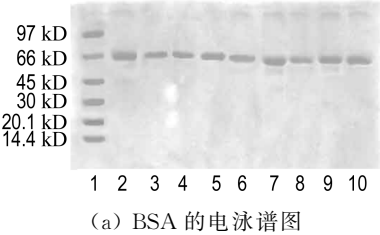


图 5 喷雾法制备的微球典型粒径分布
Fig. 5 Size distribution of microspheres prepared by spraying

子结构、活性或抗原性不变是至关重要的, 其中保证药物的活性或抗原性不受破坏更为关键. 在喷雾法制备载 BSA 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, 例如气体的剪切作用、酸环境的破坏作用等, 这些因素都能引起蛋白相对分子质量的变化以及活性的降低. 因此, 本部分通过电泳实验考察了制备条件对 BSA 相对分子质量的影响以及通过免疫印迹实验考察了对 BSA 抗原性的影响 (图 6). 在图 6(a) 和 (b) 中, 不论是标准 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 的相对分子质量及抗原的决定部位并没有受到制备过程的影响.



1 marker; 2 标准 BSA; 3 CaCl_2 溶液中的 BSA; 4、5、6、7 分别为 PBS 中 2、6、10、24 h 从微球中释放出的 BSA; 8、9、10 分别为 HCl 中 2、10、24 h 从微球中释放出的 BSA

图 6 从微球中释放出的 BSA 电泳和免疫印迹谱图
Fig. 6 Electrophoretic pattern and Western-blot of BSA released from microspheres

由于本文采用的 BSA 为球形蛋白,其分子结构较稳定,可以一定程度上降低制备过程中气体剪切作用等因素的影响,而对于某些分子结构对剪切力较敏感的多肽及蛋白,其分子构象的改变均有可能对蛋白性质产生影响.因此,本文进一步通过包埋前后 BSA 的 CD 光谱对蛋白的二级结构进行检测,以检测蛋白的二级结构是否受制备条件影响.

2.3 BSA 的 CD 光谱

从图 7 中可以看出,标准 BSA 溶液显示出了 208 和 222 nm 处有 BSA 的 α -螺旋的两个负的特征肩峰,在 216 nm 处有 β -折叠的负吸收峰.对于从微球中释放出来的 BSA 溶液,3 处负的特征峰几乎都无明显变化,说明微球中 BSA 的肽键未受到制备条件的影响,BSA 的二级结构未改变.而 CaCl_2 溶液中的 BSA,208、222 和 216 nm 处的负峰振幅都轻微减弱,说明喷雾法制备载药微球过程对暴露在微球外部的 BSA 的二级结构有一定的影响. Ponsart 等^[11]也曾报道喷雾干燥制备载药微球时,在喷雾干燥前,蛋白活性只降低了 2%;但在喷雾干燥后,则有 20% 的蛋白丧失活性,这与本文的研究结果相一致.

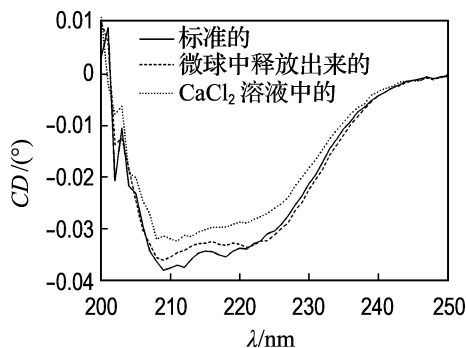


图 7 BSA 的 CD 谱图

Fig. 7 The CD spectra of BSA solutions

2.4 微球中 BSA 的体外释放性能研究

图 8 为微球内的 BSA 在不同介质中的释放曲线(R_{cum} 为累积释放率),可以看出,微球中的 BSA 在酸性条件下的释放比在中性、碱性条件下慢得多,这是微球响应溶胀作用的结果,即微球具有良好的低 pH 收缩、高 pH 溶胀的响应行为^[17].

由于海藻酸盐在低 pH 时不溶于水,载 BSA 微球在模拟胃液(0.1 mol/L HCl 溶液)中处于收缩状态,BSA 的释放很缓慢,但海藻酸钙微球具有高孔隙率的结构以及微球内包埋的蛋白具有高亲水性,因此,10 h 后仍有约 20% 的 BSA 从收缩的微球内部释放出来.

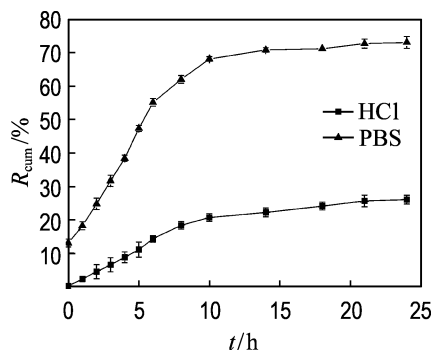


图 8 载 BSA 微球在不同释放介质中的释放曲线

Fig. 8 Release profiles of BSA in different media from BSA loaded alginate microspheres

而在模拟肠液(0.2 mol/L PBS)中,由于磷酸根结合钙离子的能力更强,BSA 呈现更为快速的释放行为,且存在起始时的突释现象($\sim 15\%$),然后持续、快速释放(BSA 释放一半的时间为 4 h).这主要是微球表面蛋白迅速解离以及微球的高孔隙结构共同作用的结果.当这些具有高孔隙结构的微球置于 PBS 中时,微球表面的蛋白快速脱离,形成 BSA 在 PBS 中起始时的非零点突释现象;随着球内部 BSA 的不断解离以及微球交联体系被磷酸根离子的逐步破坏,被包埋在球中的 BSA 就会通过微球的高孔隙结构以及微球的破碎断面快速释放出来.

通过以上实验结果可以看出,采用喷雾法制备的海藻酸钙微球具有一定的缓释特性,能使药物避开胃酸等的破坏作用,制剂中的药物在肠部快速解离,作为肠部定点控释药物载体,而该微囊化药物的释放动力学有待今后进一步分析.

3 结 论

本文采用喷雾法制备了平均粒径 $70\ \mu\text{m}$ 左右、符合高斯正态分布、球形度好的海藻酸钙微球.优化了载药微球的制备条件,使微球对 BSA 的包埋率大于 60%、载药率也达 8% 以上. BSA 的电泳、免疫印迹以及圆二色谱结果显示,该制备过程未对被包埋药物的分子结构和抗原性产生影响.而体内释放曲线表明该微球系统存在 pH 响应特性,在模拟肠液环境中,被微球包埋的 BSA 的释放速率较快;但在模拟胃液环境中,BSA 的释放量最低.因此,该方法制备的载药微球作为蛋白类药物在体内的输送载体,尤其是作为在肠部具有特定作用的药物的一种口服制剂,在技术和理论上均具有可行性.

参考文献:

- [1] JOSEPH A F. Oral controlled release technology for peptides; status and future prospects [J]. **Pharmaceutical Research**, 1996, **13**(12):1760-1764
- [2] WITTAYA-AREEKUL S, KRUEENATE J, PRAHSARN C. Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone [J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2006, **312**(1-2):113-118
- [3] 何 洋, 谢玉冰, 王 勇, 等. APA 微球扩散数学模型的改进[J]. 高等学校化学学报, 2000, **21**(2):278-282
- [4] WAYNE R G, SIOFWONG W. Protein release from alginate matrices [J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 1998, **31**(3):267-285
- [5] ANDREAS B S. The use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administered therapeutic peptides and proteins [J]. **Journal of Controlled Release**, 1998, **52**(1-2):1-16
- [6] CHICKERING D E, MATHIOWITZ E. Bioadhesive microspheres. I: A novel electrobalance-based method to study adhesive interactions between individual microspheres and intestinal mucosa [J]. **Journal of Controlled Release**, 1995, **34**(3):251-261
- [7] 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]. **Journal of Controlled Release**, 2005, **106**(1-2):62-75
- [8] CHAN L W, LEE H Y, HENG P W S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method [J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2002, **242**(1-2):259-262
- [9] 陈益清, 孙多先, 苏 晶, 等. 海藻酸钙凝胶微球粒径的理论计算与实验 [J]. 高等学校化学学报, 2003, **24**(3):481-484
- [10] BUGARSKI B, LI Q, GOOSEN M, *et al.* Electrostatic droplet generator; Mechanism of polymer droplet formation [J]. **AIChE Journal**, 1994, **40**(6):1026-1031
- [11] PONSART S, BURGESS D J. Microencapsulation of β -glucuronidase by spray-drying [J]. **European Journal of Pharmaceutical Science**, 1996, **4**(Suppl. 1):S76
- [12] HE P, DAVIS S S, ILLUM L. Chitosan microspheres prepared by spray drying [J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 1999, **187**(1):53-65
- [13] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [14] 王燕铭, 宋 瑜, 孔德领, 等. 荧光法研究聚酰胺-胺型树枝状高分子及其衍生物与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 科学通报, 2005, **50**(17):1839-1844
- [15] KUFFERATH A, WENDE B, LEUKEL W. Influence of liquid flow conditions on spray characteristics of internal-mixing twin-fluid atomizers [J]. **International Journal of Heat and Fluid Flow**, 1999, **20**(5):513-519
- [16] 刘广文. 喷雾干燥实用技术大全[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001
- [17] 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**(2):193-201

A systematic study of preparing alginate microspheres containing BSA by spraying

ZHANG Jie, ZHANG Xin-yu, ZHANG Dai-jia, XIU Zhi-long*

(Department of Bioscience and Biotechnology, School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: The alginate microspheres containing bovine serum albumin (BSA), chosen as a model protein, was prepared by spraying. The conditions of preparation were optimized by comparing the mean diameter of particles and the encapsulation efficiency of BSA. The results indicate that the encapsulation efficiency of BSA and the BSA loading are high (60% and 8%, respectively). The process of encapsulation has no effect on relative molecular mass, the molecular structure and the antigenicity of BSA by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), Western-blot and circular dichroism (CD) spectrum. The in vitro release profile shows a controlled release of encapsulated BSA owing to the excellent pH responsive properties of alginate microspheres. Particularly in simulated gastric fluid, the release ratio and release amount of encapsulated BSA are low. Therefore, alginate microspheres are useful in intestinal-specific protein drugs delivery by protecting them from the destruction of gastric environment.

Key words: alginate microspheres; bovine serum albumin; spraying; controlled release