

外水相中 NaCl 对 S/O/W 法制备的牛血清白蛋白 PLGA 缓释微球性质的影响

周香莲¹, 贺进田^{1*}, 周志涛¹, 马树芬¹, 姜 杨², 王 英²

(1. 河北师范大学生命科学学院, 河北 石家庄 050016; 2. 华北制药集团金坦生物技术股份有限公司, 河北 石家庄 050000)

摘要: 本文以牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 作为模式蛋白, 用 S/O/W 乳化溶剂挥发法制备载有 BSA 的聚乳酸-羟基乙酸 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 缓释微球, 考察制备过程中影响微球性质的关键因素。用冷冻诱导相分离法制备 BSA 微粒, 采用 S/O/W 乳化溶剂挥发法制备 BSA 微球。用光学显微镜、激光共聚焦显微镜和扫描电子显微镜观察了微滴和微球的形态结构, 以 Bradford 法测定微球的蛋白含量, 并研究微球中蛋白质的体外释放特性。结果发现, 在制备微球过程中外水相中的 NaCl 会抑制微乳内外相的物质交换, 进而影响了微球的结构和渗透性, 使微球的包封率从 60% 提高到 85% 以上, 突释率从 70% 降低到 20% 以下, 粒径从 103 μm 减小到 62 μm ; 并可抑制微乳内蛋白质微粒的再水化, 保护包封过程中 BSA 的稳定性。在体外, BSA 从微球中缓慢释放时间长达 30 天。

关键词: 牛血清白蛋白; 缓释; 微球; 乳酸-羟基乙酸共聚物; 蛋白质稳定性

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 08-1057-07

Effect of NaCl in outer water phase on the characteristics of BSA-loaded PLGA sustained-release microspheres fabricated by a solid-in-oil-in-water emulsion technique

ZHOU Xiang-lian¹, HE Jin-tian^{1*}, ZHOU Zhi-tao¹, MA Shu-fen¹, JIANG Yang², WANG Ying²

(1. College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China;

2. NCPC GeneTech Biotechnology Development Co., Ltd, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: The aim of this study is to investigate the critical factor affecting the properties of PLGA microspheres fabricated by a solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion technique with BSA as a model protein. Prior to encapsulation, the BSA microparticles were fabricated by a modified freezing-induced phase separation method. The microparticles were subsequently encapsulated into PLGA microspheres by S/O/W emulsion method, then Motic BA200 biological microscope, confocal laser scanning microscope, scanning electron microscope were used to observe the structure of S/O/W emulsion and PLGA microspheres. The protein content extracted or released from BSA microspheres was measured by Bradford protein assay method. It was found that NaCl added in the outer aqueous phase effectively suppressed material exchange between the inner and outer phase of S/O/W emulsion. Then, the structure and permeability of obtained microspheres were influenced. As a result, with the increase of NaCl concentration in the outer aqueous phase, the encapsulation efficiency of microspheres significantly increased from 60% to more than 85%, the burst release of microspheres reduced from 70% to 20%, and the particle size decreased from 103 μm to 62 μm . Furthermore, the rehydration of encapsulated protein was also retarded and then integrity of BSA was successfully protected during encapsulation

收稿日期: 2010-03-29.

基金项目: 河北省科技支撑计划项目 (09276418D-3); 河北省教育厅重点资助项目 (200645); 河北师范大学博士基金资助项目 (L2005B23).

*通讯作者 Tel: 86-311-85895276, Fax: 86-311-86268313, E-mail: he_jintian@sina.com

process. *In vitro* release test showed that BSA released from PLGA microspheres in a sustained manner for more than 30 days.

Key words: BSA; sustained release; microsphere; poly(lactic-co-glycolic acid); protein stability

DNA 重组技术的发展使得蛋白质药物的研制速度加快,越来越多的蛋白质药物在世界范围内批准上市。目前蛋白质类药物的主要剂型为冻干粉针剂和水针剂,由于此类药物的半衰期短,需要频繁注射给药,给患者经济和生活带来很大困难。近些年来,蛋白质药物长效剂型的研究取得了很大进展,特别是用聚酯类生物可降解材料 PLGA 将药物包封成微球,通过肌肉或皮下给药,使药物在体内缓慢释放,已成为开发蛋白类药物长效剂型的一个发展方向^[1,2]。目前,黄体生成素释放激素 (luteinizing-hormone-releasing hormone)、人生长激素 (human growth hormone) 等多种多肽和蛋白质的缓释微球制剂已上市销售^[3],还有多种蛋白质类药物的缓释微球制剂正处于实验室研究阶段。

生物可降解材料 PLGA 是制备缓释微球最常用的载体材料。溶剂萃取/挥发法制备蛋白质类药物 PLGA 微球包括复乳化溶剂挥发 (water-in-oil-in-water, W/O/W) 法和乳化溶剂挥发 (solid-in-oil-in-water, S/O/W) 法,与 W/O/W 法相比, S/O/W 法制备蛋白质微球可以减少蛋白质与水油界面的接触面积,避免蛋白质的变性^[4]。尽管 S/O/W 法经常被用于制备蛋白质微球,但是对于工艺过程中影响微球的结构形成及其性质的关键性因素却很少见文献报道。本文详细考察了 S/O/W 法制备 BSA 微球时外水相中 NaCl 浓度对微球的结构及其性质的影响,发现在制备微球过程中外水相中的 NaCl 会抑制微乳内外相的物质交换,影响了微球的结构和渗透性,进而影响了微球的包封率、突释率及粒径分布等性质,并可抑制微乳内蛋白质微粒的再水化,保护蛋白质的稳定性。

材料与方法

仪器 高速均质机 (德国 IKA-WERKE T25 basic); 扫描电子显微镜 (日本日立 S-570 型); 激光共聚焦显微镜 (Zeiss 510 Meta); 激光粒度分布仪 (四川轻工业研究设计院 JL-1155)。

药品和试剂 牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Sigma 公司; 聚乙二醇 [poly(ethylene glycol), PEG], 分子质量为 4 000、6 000 和 8 000 Da, 购自华美生物工程

公司; 聚乙烯醇 [poly(vinyl alcohol), PVA], 分子质量为 31 000~50 000 Da, 购于 Sigma-Aldrich; 乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA, lactic/glycolic 75:25, 分子质量 23 000 Da), 购自济南岱罡生物材料有限公司; Bradford protein assay 试剂购自 Bio-Rad 公司; 其他试剂均为分析纯。

牛血清白蛋白微粒的制备 冷冻诱导相分离法^[5] 制备 BSA 微粒: 在 0.02 mol·L⁻¹ pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中加入一定量的 BSA 和 PEG, 形成混合溶液。-80 °C 预冻过夜后, 在 5.0×10⁻³ Pa 压力下真空冷冻干燥 12 h 得到固体粉末。将得到的混合固体粉末用二氯甲烷洗涤, 8 000×g 离心 3 min, 弃上清液。以上操作重复 4 次, 干燥后得到 BSA 微粒。本实验以蛋白质微粒的分散性为指标考察了 PEG/BSA (w/w)、PEG 的分子质量及磷酸盐浓度 3 个因素对蛋白质微粒的影响, 设计表见表 1。

Table 1 Different kinds of protein microparticles

Code	PEG/BSA (w/w)	Phosphate buffer/mol·L ⁻¹	PEG/Da
A	20	0.02	6 000
B	10	0.02	6 000
C	5	0.02	6 000
D	5	0.1	6 000
E	5	0.2	6 000
F	5	0.02	4 000
G	5	0.02	8 000

牛血清白蛋白微球的制备 用 S/O/W 乳化溶剂挥发法^[6]制备 BSA 微球, 本实验室通过单因素实验和正交试验优化微球制备工艺。优化后制备工艺如下: 取 BSA 微粒 20 mg 加入到含 300 mg PLGA 的二氯甲烷溶液中, 用高速均质机将其混匀形成稳定的 S/O 混悬液, 将该混悬液用移液器缓慢注入到 250 mL 2% PVA 的外水相中, 在数显恒温磁力搅拌器上乳化 1 min 形成 S/O/W 微乳, 加入水溶液 250 mL 稀释, 低速搅拌 4 h, 使二氯甲烷挥发干净, 微球得到固化。固化后收集 BSA 微球, 用蒸馏水清洗 3 遍, 收集, -80 °C 冷冻过夜, 在 5.0×10⁻³ Pa 压力下真空冷冻干燥 12 h 得到干燥的 BSA 微球。本实验制备了外水相 NaCl 浓度分别为 0%、1%、2%、3%、4% 和 5% 的 BSA 微球。空白微球不含 BSA。

外水相中 NaCl 浓度对内外相物质交换的影响 采用 S/O/W 法制备外水相 NaCl 浓度分别为 0% 和 5% 的 BSA 微球。在 S/O/W 微乳形成后, 用移液器吸取少量微乳滴在干净的载玻片上, 用盖玻片轻轻盖到乳滴上^[7], 用数码光学显微镜观察微乳, 并拍摄图像。

采用 S/O/W 法制备外水相 NaCl 浓度分别为 0% 和 5% 的 BSA 微球, 从乳化 60 s 形成 S/O/W 微乳后迅速加入水溶液 250 mL 稀释, 从此时起定时吸取外水相 1 mL, 连续取样至 100 min, 将样品离心后取上清液, 用紫外可见分光光度计在 280 nm 处测定外水相的吸收度。外水相中含有 PVA 和 NaCl, 而 PVA 和 NaCl 不会导致外水相在 280 nm 处吸收度的变化。因此, 外水相吸收度的变化可以反映外水相中蛋白质浓度的变化过程。

外水相 NaCl 浓度对微球性质的影响 研究所制备的 BSA 微球性质时, 不仅考察了外水相 NaCl 浓度对内外相物质交换的影响, 还对微球的包封率、突释率及渗透性等性质的影响进行考察。

微球的包封率、载药量和突释率 准确称取 BSA 微球 20 mg, 用二氯甲烷溶解, 8 000×g 离心 2 min, 弃上清液, 沉淀蛋白质, 重复此操作。使沉淀物中的二氯甲烷完全挥发后, 加入含有 6 mol·L⁻¹ 尿素的 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸盐的缓冲溶液 1 mL 溶解蛋白质沉淀, 用 Bradford 法测蛋白质的含量^[8]。计算微球的包封率和载药量。

微球的包封率^[9]=(微球中的蛋白含量/理论上投入的蛋白质量)×100%

微球的载药量=(微球中的蛋白含量/微球的质量)×100%

准确称取 BSA 微球 20 mg, 加入含 6 mol·L⁻¹ 尿素的 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸盐的缓冲液 1 mL, 置于 37 ℃ 恒温摇床, 速率 160 r·min⁻¹, 24 h 后离心取上清液, 用 Bradford 法测定上清液中蛋白质含量, 计算微球的突释率。

微球的突释率^[10]=(24 h 释放蛋白质的量/微球中的蛋白质含量)×100%

微球的表面形态和渗透性 将所制备的微球粘在双面胶上, 贴附于铜板载样台上, HITACHIE-1020 喷金器喷金后用日立 S-570 型扫描电子显微镜观察微球的表面形态。

使用 S/O/W 法制备外水相含不同 NaCl 浓度的 BSA 微球, 待微球固化后向外水相中加入 0.5% 的荧光染料硫磺素-T, 1 h 后收集微球, 在 5.0×10⁻³ Pa 压力下真空冷冻干燥 12 h。取少量干燥的微球均匀分散

在载玻片上, 用激光共聚焦显微镜观察微球内的荧光, 激发波长 440 nm, 发射波长 480 nm。微球内部的荧光分布可以反映外水相中的水扩散进入微球内部的情况, 进而能够体现出微球的渗透性。

微球的粒径分布 用激光粒度分布仪测量微球的粒径及其分布, 取少量制备的各种 NaCl 浓度的微球置于 0.1% PVA 水溶液中, 于激光粒度分布仪中测量微球的粒径及其分布。

微球制备过程中外水相 NaCl 浓度对蛋白质稳定性的影响 取少量蛋白质微粒, 用 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液溶解可溶性蛋白, 8 000×g 离心 3 min, 将上清液移入另一离心管中, 用 6 mol·L⁻¹ 尿素溶液 100 μL 溶解沉淀物, 用 Bradford 法分别测量可溶性及不可溶性蛋白质的含量。

称取干燥的 BSA 微球 20 mg 置于离心管中, 加入二氯甲烷 1 mL 溶解聚合物 PLGA, 8 000×g 离心 2 min, 弃上清液, 此操作重复 3 次。待沉淀中残余的二氯甲烷自然挥发后加入 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 1 mL 溶解可溶性蛋白, 此溶液 8 000×g 离心 3 min, 将上清液移入另一离心管中, 用 6 mol·L⁻¹ 尿素溶液 100 μL 溶解沉淀物, 用 Bradford 法分别测量可溶性及不可溶性蛋白质的含量^[11]。

微球制备过程中外水相 NaCl 浓度对微球释放过程的影响 称取外水相 NaCl 浓度分别为 0%、3% 和 5% 的 BSA 微球 20 mg, 分别加入含 0.01% NaN₃ 的 0.02 mol·L⁻¹ pH 7.4 磷酸盐缓冲液 1 mL, 置恒温摇床中, 温度 37 ℃, 速率 160 r·min⁻¹, 定时取样品, 离心, 取上清液, 再加入新鲜的磷酸盐缓冲液, 连续取样 4 周。用 Bradford 法测定释放的样品中蛋白质浓度^[12], 并用 Excel 绘制这 3 种微球的体外累积释放曲线。

结果与讨论

1 蛋白质微粒的表现及粒度

研究冷冻诱导相分离的方法制备蛋白质微粒的工艺过程, 发现 PEG/BSA (w/w)、PEG 的分子质量及磷酸盐浓度这 3 个因素对微粒的形成及粒径产生明显影响。部分按表 1 制备的蛋白质微粒的扫描电子显微镜照片见图 1。通过扫描电镜观察到, 微粒制备过程中 PEG/BSA 为 20 时, 蛋白质微粒的团聚非常严重(图 1A)。随着 PEG 量的减少, 蛋白质微粒的分散性趋于良好。PEG/BSA 为 5 时, 蛋白质微粒的粒径分布均匀、分散性良好(图 1B)。因此选取 PEG/BSA (w/w) 实验参数最低值为 5; PEG 的分子质量也影响蛋白质

微粒的状态, 用 PEG4000 制备的蛋白微粒粒度不均匀, PEG8000 制备的蛋白微粒粘连性较大, 而且 PEG8000 的黏度太大不易清洗, 选取 PEG6000 作为实验参数; 溶液中磷酸盐浓度对微粒形成有明显影响, 溶液中不含磷酸盐, 冷冻过程不能导致相分离的发生, 微粒不能形成; 溶液中磷酸盐浓度为 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 所形成的微粒粒径均匀、分散性良好; 当磷酸盐浓度增大到 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 通过扫描电镜可观察到蛋白质微粒中间含有大量的磷酸盐结晶 (图 1C), 故选取 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸盐为参数制备蛋白质微粒。优化后制备的蛋白微粒粒度均匀、分散性良好, 通过扫描电镜图片测量不少于 100 个微粒的粒径, 计算出微粒的平均粒径为 $(0.38 \pm 0.084) \mu\text{m}$, 适合进一步封装。

2 外水相中 NaCl 浓度对内外相物质交换的影响

S/O/W 法制备 BSA 微球过程发现内外相之间存在明显的物质交换。S/O/W 微乳形成后的光学显微镜照片见图 2A。从图中可见, 微球内部有透明的“水泡”状结构, 聚合物骨架结构比较疏松; 在外水相 NaCl 浓度为 5% 时, 微球中没有发现“水泡”状的结构, 聚合物骨架结构比较致密 (图 2B)。推测图 2A 中的“水泡”是外水相中的水扩散进入微球内部, 使固态的蛋白质水化, 形成了蛋白质溶液的“水

泡”。同时, “水泡”中的蛋白质也应该可以通过扩散的方式进入外水相, 因而, 检测了微球固化过程中外水相中蛋白质浓度的变化, 结果如图 3 所示。微球制备过程中, 外水相中蛋白质浓度随着微球固化时间的延长而不断升高, 支持了上述推断。

在外水相中加入 5% NaCl 后微球中没有出现“水泡”, 说明 NaCl 可以抑制水扩散进入微球内部, 抑制了微乳中蛋白质的水化。同时也应该抑制蛋白质从内相扩散进入外水相。通过紫外可见分光光度计测得不同时间外水相的吸收度 (图 3), 结果发现外水

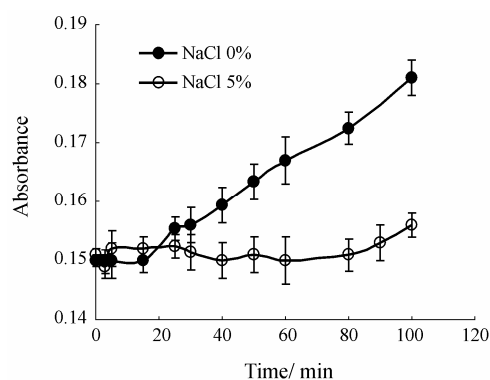


Figure 3 The plot of absorbance change at 280 nm versus time with 0% NaCl (●) and 5.0% NaCl (○) in outer water phase of S/O/W emulsion. Data are presented as averages $\pm$ SD, $n = 3$

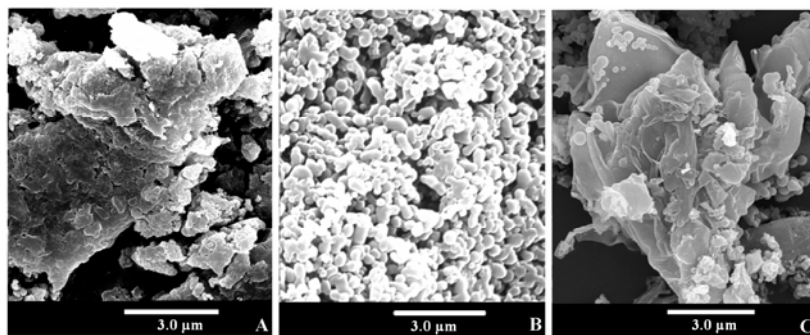


Figure 1 Scanning electron microscopic images of BSA microparticles. A: PEG6000/BSA (w/w) 20, Phosphate buffer $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; B: PEG6000/BSA (w/w) 5, Phosphate buffer $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C: PEG6000/BSA (w/w) 5, Phosphate buffer $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

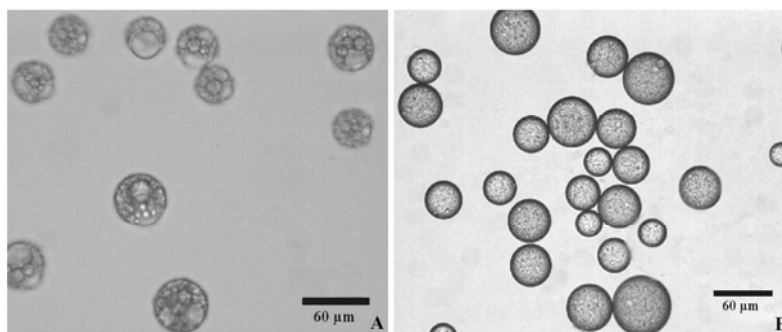


Figure 2 The pictures of S/O/W emulsion droplets with 0% NaCl (A) and 5% NaCl (B)

相 NaCl 为 5% 时其吸收度随时间延长基本保持不变。

3 外水相 NaCl 浓度对微球性质的影响

外水相 NaCl 浓度影响了内外相之间的物质交换, 进而对微球的各种性质产生了明显的影响。

3.1 微球的包封率、载药量和突释率 通过 Bradford 法测定蛋白质微球的包封率、载药量和突释率, 结果如表 2 所示。外水相中不加 NaCl 时微球的包封率仅有 64%, 随着外水相 NaCl 浓度的提高, 微球的包封率也逐渐增加, 外水相 NaCl 浓度提高到 5% 时, 微球的包封率增加到 85% 以上; 微球的载药量随着外水相 NaCl 浓度的提高也同样呈现了增加的趋势, 而微球的突释率与外水相中加入 NaCl 的浓度大小成反比, 外水相不含 NaCl 时微球的突释率高达 73%, 随着外水相 NaCl 浓度的提高, 微球的突释率逐渐降低, 当外水相中 NaCl 浓度提高到 5% 时, 微球的突释率降低到 20%。

通过考察外水相中 NaCl 浓度对微球内外相物质交换的影响, 发现用 S/O/W 乳化法制备 BSA 微球时, 外水相中不加 NaCl 时, 外水相中的水能够扩散进入微乳内部, 并将其中的蛋白质水化, 同时蛋白质也能扩散进入外水相, 而 NaCl 可以抑制水扩散进入微球内部, 抑制微乳中蛋白质的再水化, 同时也抑制蛋白质扩散进入外水相。使微球的包封率随外水相 NaCl 浓度的增大而增加, 同时微球的载药量也会增加。推测内外相的物质交换是通过某种“通道”进出微球, 在微球释放的过程中也会从同样的“通道”释放出来。因此测定了不同微球的突释率。结果发现, 微球的突释率随着外水相中 NaCl 浓度的增加而逐渐降低。这些结果支持了上述的推断。

3.2 微球的表面形态和渗透性 通过扫描电子显微镜观察到用不同外水相 NaCl 浓度所制备的微球表面

特征存在很大的差异, S/O/W 乳化法制备 BSA 微球的扫描电镜照片见图 4A。从图中可见, 微球表面有很多孔洞。外水相 NaCl 浓度为 1% 时, 制备的微球表面孔洞明显减少。随着 NaCl 浓度的提高, 微球表面的孔洞呈逐渐减少的趋势。外水相 NaCl 浓度为 3% 时, 微球表面仅有少许孔洞 (图 4B); 当 NaCl 浓度提高到 5% 时, 微球表面几乎看不到孔洞 (图 4C)。推测微球表面的孔洞就是在微球固化过程中内外相物质交换留下的“通道”。外水相中的水可以通过这种“通道”扩散进入微球内部; 微球内部的蛋白质也可以通过这些“通道”扩散进入外水相。外水相的 NaCl 抑制微球内外相的物质交换, 进而抑制微球表面及内部“通道”的形成, 导致微球表面的孔洞明显减少。

为了进一步确认微球内部内外相物质交换“通道”的存在, 在微球固化完成后, 外水相中加入荧光染料硫磺素-T, 观察荧光染料进入微球内部的情况。结果发现, 不加 NaCl 时微球内部有大量的荧光 (图 5A), 随着外水相 NaCl 浓度的提高, 微球内部的荧光呈逐渐减少的趋势。当外水相 NaCl 浓度为 3% 时, 硫磺素-T 极少进入微球内部 (图 5B); 当外水相 NaCl 浓度达到 5% 时, 硫磺素-T 几乎不能进入微球内部 (图 5C)。这些变化趋势与上述表面形态的变化一致, 支持了内外相物质交换“通道”的存在。

3.3 微球的粒径 通过激光粒度分布仪测量蛋白质微球的平均粒径及其分布, 发现外水相 NaCl 浓度明显影响了微球的粒径大小和分布。不同外水相 NaCl 浓度所制备微球的平均粒径及其分布见表 2。结果发现, 外水相不加 NaCl 时微球粒径明显大于外水相添加 NaCl 所制备的微球, 随外水相 NaCl 浓度的提高, 微球的平均粒径降低。当外水相 NaCl 浓度提高到 5%

Table 2 The characteristics, insoluble protein and particle size distribution of BSA-loaded PLGA microspheres. Data are presented as averages $\pm$ SD, $n = 3$. A to F: Salt concentration in outer water phase are 0%, 1%, 2%, 3%, 4% and 5%, separately; EE: Encapsulation efficiency of microspheres; LE: Loading efficiency of microspheres; BR: Percent of BSA released from PLGA microspheres in the first 24 hours; IPr: Percent of insoluble protein in BSA microspheres; d 10, d 50, d 90: 10%, 50%, 90% of the particle size is smaller than the stated diameter; Vmd: Volume mean diameter of BSA-loaded PLGA microspheres

Code	EE/%	LE/%	BR/%	IPr/%	particle size distribution / μm			
					d 10	d 50	d 90	Vmd
A	63.8 $\pm$ 8.3	2.5 $\pm$ 0.8	72.5 $\pm$ 4.5	0.84 $\pm$ 0.1	13.4	99.5	145.5	103.9 $\pm$ 19.3
B	72.1 $\pm$ 6.5	2.8 $\pm$ 0.9	68.4 $\pm$ 4.3	0.66 $\pm$ 0.1	14.6	92.7	132.3	87.2 $\pm$ 21.2
C	76.2 $\pm$ 5.8	3.1 $\pm$ 0.7	61.7 $\pm$ 4.7	0.49 $\pm$ 0.1	15.1	91.3	127.2	83.2 $\pm$ 19.6
D	78.8 $\pm$ 6.7	3.2 $\pm$ 0.8	41.4 $\pm$ 5.2	0.42 $\pm$ 0.1	15.9	88.2	122.1	81.2 $\pm$ 19.5
E	83.9 $\pm$ 7.5	3.3 $\pm$ 0.6	23.5 $\pm$ 2.8	0.35 $\pm$ 0.1	15.7	75.1	107.9	69.7 $\pm$ 16.7
F	85.8 $\pm$ 8.4	3.4 $\pm$ 0.7	20.4 $\pm$ 4.5	0.26 $\pm$ 0.1	16.8	73.9	107.1	62.4 $\pm$ 13.2

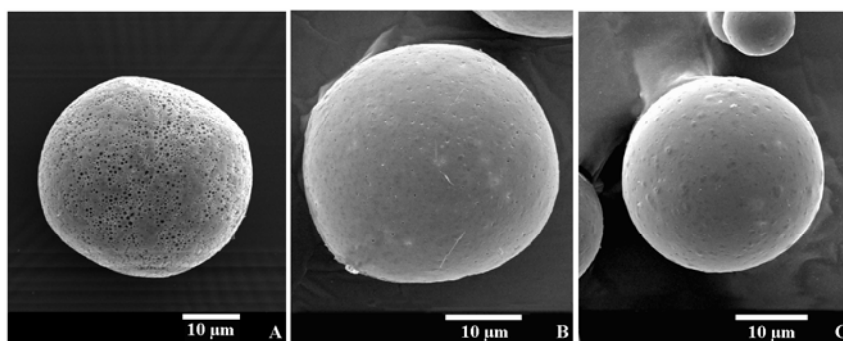


Figure 4 Scanning electron microscopic pictures of microspheres prepared with 0% NaCl (A), 3% NaCl (B), 5% NaCl (C) in external water phase

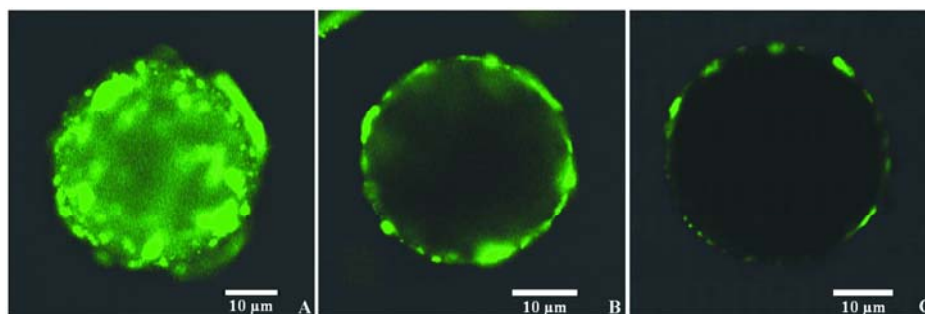


Figure 5 Laser scanning confocal microscope photos of microspheres prepared with 0% NaCl (A), 3% NaCl (B), 5% NaCl (C) in outer water phase which were fluorescently labeled with thioflavin T during late period of preparation

时, 50%的微球粒径低于 70 μm , 微球的粒径分布跨度最小, 并且平均粒径仅为 62 μm , 这种微球较易于注射; 外水相 NaCl 浓度为 4%与 NaCl 浓度为 5%的微球粒径没有显著性差异; 而其他几种微球的平均粒径及其分布跨度均较高。这种结果可能是由于在制备微球时外水相中的水扩散进入到微球内部, 使微球结构膨胀疏松。而随外水相 NaCl 浓度的提高, 制备微球过程中内外相的物质交换逐渐减弱, 从外水相进入微球中的水逐渐减少, 微球的聚合物结构越来越致密, 导致微球的平均粒径降低。

4 微球制备过程中外水相 NaCl 浓度对蛋白质稳定性的影响

用 S/O/W 乳化法制备蛋白质微球过程中, 蛋白质的稳定性是一个不容忽视的问题。因此在研究外水相 NaCl 浓度对微球性质和结构影响的同时, 考察了微球制备过程中外水相 NaCl 浓度对蛋白质稳定性的影响。

通过 Bradford 法测定不溶性蛋白的含量, 发现冷冻诱导相分离法所制备的蛋白质微粒中不溶性蛋白质的百分含量为 0.28%, 不同外水相 NaCl 浓度所制备的微球中不溶性蛋白的百分含量均小于 1% (表 2)。随着外水相 NaCl 浓度的提高, 微球中的不溶性

蛋白含量逐渐减少。制备微球时, 外水相中不加 NaCl, 其中的水可以进入微球内部, 使固态的蛋白质再水化, 微球中大量蛋白质就会暴露于水油界面, 这样的蛋白质容易发生变性。而 NaCl 可以抑制外水相中的水进入微球内部, 抑制蛋白质再水化, 明显减少了微球内部的蛋白质与水油界面的接触面积, 减少变性蛋白质。

5 微球制备过程中外水相 NaCl 浓度对微球释放过程的影响

外水相 NaCl 浓度分别为 0%、3%和 5%的 BSA 微球 30 天内体外累积释放曲线见图 6。从图中可以

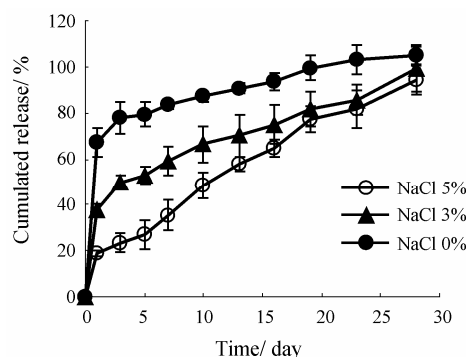


Figure 6 The cumulated *in vitro* release of different formations. The external water phase salt concentration (●) 0%; (▲) 3%; (○) 5%. Data are presented as averages $\pm$ SD, $n = 3$

看出, 外水相 NaCl 浓度明显影响了微球的释药行为。外水相不加 NaCl 时, 突释率超过 60%; 外水相加入 NaCl 后, 突释率明显减少; 外水相 NaCl 浓度为 5%, 突释率降低到大约 20%。3 种微球的蛋白质释放总量均较完全, 超过了包封蛋白质总量的 90%。当外水相不加 NaCl 时, 微球中存在内外相物质交换留下的“通道”, 包封的蛋白质很容易从这些通道扩散出去, 导致包封蛋白质的快速释放; 当外水相加入 NaCl 时, 微球中存在内外相物质交换的“通道”减少, 包封的蛋白质不会通过“通道”快速扩散, 导致包封的蛋白质得到缓慢释放。

结论

S/O/W 乳化溶剂挥发法制备蛋白质微球的过程中, 外水相添加不同浓度的 NaCl 对微球性质和结构有明显的影 响。制备微球过程中在外水相加入 NaCl, 会抑制外水相中的水扩散进入微球内部, 抑制包封过程中微乳内的蛋白质再水化, 进而保护了包封过程中蛋白质的稳定性。同时外水相加入 NaCl 还可以抑制微球中的蛋白质扩散到外水相, 减少了微球内外相的物质交换, 从而提高了微球的包封率, 并改善了微球的体外释放行为, 明显降低了突释率, 体外缓慢释放时间长达 30 天。

References

- [1] Stolnik S, Shakesheff K. Formulations for delivery of therapeutic proteins [J]. *Biotechnol Lett*, 2009, 31: 1–11.
- [2] Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC, et al. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57: 391–410.
- [3] Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery [J]. *J Control Release*, 2003, 90: 261–280.
- [4] Castellanos IJ, Crespo R, Griebenow K. Poly(ethylene glycol) as stabilizer and emulsifying agent: a novel stabilization approach preventing aggregation and inactivation of proteins upon encapsulation in bioerodible polyester microspheres [J]. *J Control Release*, 2003, 88: 135–145.
- [5] Morita T, Horikiri Y, Yamahara H, et al. Formation and isolation of spherical fine protein microparticles through lyophilization of protein-poly(ethylene glycol) aqueous mixture [J]. *Pharm Res*, 2000, 17: 1367–1373.
- [6] Morita T, Sakamura Y, Horikiri Y, et al. Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant [J]. *J Control Release*, 2000, 69: 435–444.
- [7] Rosca ID, Watari F, Uo M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation [J]. *J Control Release*, 2004, 99: 271–280.
- [8] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254.
- [9] Castellanos IJ, Al-Azzam W, Griebenow K. Effect of the covalent modification with poly(ethylene glycol) on alpha-chymotrypsin stability upon encapsulation in poly(lactic-co-glycolic) microspheres [J]. *J Pharm Sci*, 2005, 94: 327–340.
- [10] Emami J, Hamishehkar H, Najafabadi AR, et al. A novel approach to prepare insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microcapsules and the protein stability study [J]. *J Pharm Sci*, 2009, 98: 1712–1731.
- [11] He JT, Tao XM, Mo W, et al. Preparation and characterization of PLGA microspheres containing a staphylokinase variant (K35R) [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 12–18.
- [12] Castellanos IJ, Carrasquillo KG, López JD, et al. Encapsulation of bovine serum albumin in poly(lactide-co-glycolide) microspheres by the solid-in-oil-in-water technique [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53: 167–178.