

盐溶液调控海藻酸钙微球中的自由羧酸根及其 对阿霉素的装载和释放行为研究*

宋亦超 仝维鋈** 高长有

(教育部高分子合成与功能构造重点实验室 浙江大学高分子科学与工程学系 杭州 310027)

摘 要 采用膜乳化-凝胶化法制备了粒径窄分布的海藻酸钙微球. 用不同浓度的氯化钠溶液处理微球来调控微球中的自由羧酸根的含量. 用原子吸收光谱和红外光谱表征了微球中钙、钠离子以及化学基团的变化, 证明盐处理后海藻酸钙微球内发生了钠离子置换钙离子的过程, 海藻酸中的羧酸根由螯合态转变为自由态. 用盐处理后的微球吸附带正电荷的小分子抗癌药物阿霉素的能力大大提高, 其中用浓度 1.8% 的氯化钠溶液处理后的微球载药量达到 1310 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 是未处理微球的 10 倍. 负载药物的微球具有 pH 敏感的释放行为, 在 pH 5.5 的 PBS 溶液中的释放速率和释放量显著大于在 pH 7.4 的 PBS 溶液中.

关键词 膜乳化, 海藻酸钙微球, 盐处理, 阿霉素, 药物释放

高分子微球是指直径在微米级, 形状为球形的一类高分子材料. 近年来, 由于高分子微球在医药、生化、电子信息等领域潜在的巨大应用价值, 因此被广泛研究. 目前主要的微球制备方法有喷雾干燥法、挤压法、界面和原位聚合法、相分离法和复相乳液法. 这些方法产量大, 但所制得微球的粒径分布大多都很宽, 使得在一些领域的应用受到了限制^[1, 2]. 膜乳化技术是 20 世纪 80 年代后期出现的一种新的乳化方式, 被认为是制备单分散乳液最简单有效的方法. 该技术是通过无机膜微孔将分散相在外加压力的作用下, 压入连续相中形成乳液, 通过控制压力、乳化剂、连续相流速和膜孔径, 实现乳液滴的单分散性, 这是机械搅拌、超声乳化等传统乳化方法所不具备的. 膜乳化法使用多孔质膜, 要求膜孔径均一, 经外加压力作用后, 不会发生变形、破损及孔径变化. 最常使用的是一种无机多孔玻璃膜-SPG 膜 (shirasu porous glass membrane)^[3, 4].

天然多糖高分子微球由于具有生物相容性好及可降解性等优异的性能而受到人们的广泛关注, 在生物医用领域有很好的应用前景. 近年来, 采用膜乳化法成功制备了粒径单分散的天然多糖高分子微球^[5~9]. 海藻酸是一种常用的天然多糖高分子材料, 由古洛糖醛酸和甘露糖醛酸两种单

体构成. 它来源于海洋中储量丰富的海藻类植物, 具有原料丰富易得、生物相容性好等优势. 海藻酸可以与多价金属离子交联形成凝胶, 这一独特的性质被广泛应用于食品、医学等领域^[10~12]. 海藻酸钙微球是药物传递的优良载体, 其多用搅拌乳化法、气体喷雾法或静电液滴生成法制备得到. 微球具有明显的缓释性能, 当药物通过简单共混包埋在海藻酸钙微球中时, 在酸性条件下, 微球中海藻酸形成难溶性凝胶骨架, 释药速度缓慢, 在中性或碱性条件下, 海藻酸钠凝胶溶解加快, 释药速度明显加快^[13]. 目前研究中药物大多是先与海藻酸钠溶液混合, 然后凝胶化形成微球, 这样制得的微球存在载药量和包埋率不高的现象, 并且微球的载药量也不易调控^[14~16], 因此如何简便有效地调控海藻酸钙微球的药物装载同时提高载药量仍然是值得研究的重点.

本文结合 SPG 膜乳化法和乳化-凝胶化法制备得到了粒径窄分布的海藻酸钙微球. 用不同浓度的氯化钠溶液处理微球, 改变了微球内部自由羧酸根的含量, 继而静电吸附药物, 方便有效地调控了微球装载阿霉素的能力. 本文系统地研究了该过程及后续的药物释放, 表明盐处理调节微球载药这一方法简便可控, 为海藻酸钙以及其它微球的药物装载提供了新的途径.

* 2012-01-06 收稿, 2012-03-16 修稿; 浙江省自然科学基金 (基金号 Z4090177, Y4110064) 和科技部中印国际合作项目 (项目号 2010DFA51510) 资助.

** 通讯联系人, E-mail: tongwj@zju.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2012.11388

1 实验部分

1.1 原料与试剂

海藻酸钠 (sodium alginate, viscosity of 2% solution: 0.25 Pa·s), Sigma 公司; 异辛烷, 分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司; 化学纯司班 85 (Span85) 和吐温 85 (Tween85)、分析纯氯化钙和氯化钠, 国药集团化学试剂有限公司; 异丙醇, 分析纯, 华东医药股份有限公司; 盐酸阿霉素 (doxorubicin hydrochloride), 浙江海正药业股份有限公司。

1.2 海藻酸钙微球的制备

配制 2% 的海藻酸钠溶液 10 mL 作为水相, 配制含 3% 乳化剂的异辛烷 120 mL 作为油相, 乳化剂 Span85 和 Tween85 体积比为 9:1。把 SPG 膜 (shirasu porous glass, 日本 SPG 科技公司) 固定在膜乳化器内 (MG-20, 日本 SPG 科技公司), 具体装置见图 1。因为 SPG 膜不能被分散相润湿, 所以此处使用的是经硅烷偶联剂处理过的疏水化玻璃膜^[17]。将水相和油相分别倒入储存罐和烧杯中, 打开磁力搅拌器, 开启气阀通入氮气, 调节至适当压力使水相被挤过 SPG 膜形成 w/o 乳液。当水相被挤完后, 取出膜乳化器, 加入 20 mL 盐溶液, 其中含 5% 的氯化钙和 20% 的氯化钠, 搅拌 1 h, 然后加入异丙醇 50 mL 继续搅拌 1 h, 分液、离心清洗, 得到海藻酸钙微球, 冻干保存。

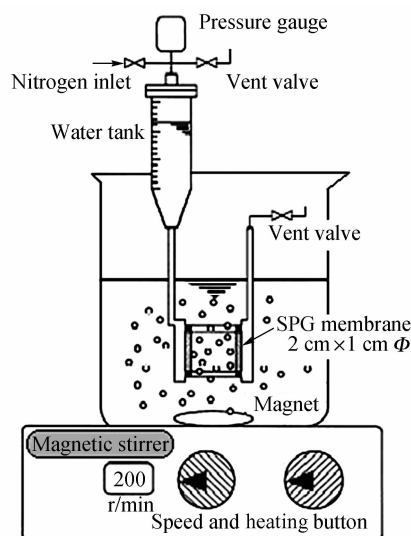


Fig. 1 Schematic diagram of small scale equipment for membrane emulsification

1.3 氯化钠溶液处理微球和装载阿霉素以及药物释放

取 2 mg 微球加入 2 mL 不同浓度的氯化钠溶液, 振荡 2 h, 然后用超纯水离心洗涤数次。将处理后的微球加入 2 mL 阿霉素溶液 (1.5 mg/mL) 中振荡 2 h, 然后离心清洗除去未被吸附的阿霉素。取 1 mg 装载阿霉素的微球, 用 1 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH = 7.4 或 5.5) 将其分散, 移入透析袋中。将透析袋放入盛有 50 mL PBS 溶液的烧杯中, 水浴使其恒温于 37℃。每隔一段时间取出 1 mL PBS 溶液待测, 同时补充 1 mL 新鲜 PBS 溶液。

1.4 微球表征

用光学显微镜 (Axiovert200, 德国 Zeiss 公司) 观察微球形貌, 并统计微球粒径。用临界点干燥仪 (K850, 英国 Quorum Technologies 公司) 干燥微球及微球冷冻切片, 然后用扫描电镜 (S-4800, 日本 Hitachi 公司) 观察微球表面和内部形貌。用激光共聚焦显微镜 (SP5, 德国 Leica 公司) 观察药物在微球内的分布。使用红外光谱仪 (Vector22, 德国 Bruker 公司) 测定微球处理前后的红外光谱, KBr 压片, 考察官能团的变化。用 X 射线衍射仪 (X'Pert Pro, 荷兰 PANalytical 公司) 表征微球结构。将 2 mg 海藻酸钙微球溶于 2 mL 0.1 mol/L 柠檬酸钾溶液中, 然后用原子吸收分光光度计 (180-50, 日本 Hitachi 公司) 测定溶液中钙元素和钠元素的含量。用紫外-可见分光光度计 (UV-2550, 日本 Shimadzu 公司) 测定不同浓度阿霉素溶液在 482 nm 处的吸收, 绘制出标准曲线^[18]; 测定微球吸附药物后剩余阿霉素溶液的吸光度, 根据标准曲线计算出阿霉素的含量, 然后用初始加入量减去剩余含量得到微球的载药量。用该法测定 PBS 中的阿霉素含量, 计算累计释药量, 绘制释放曲线。

2 结果与讨论

2.1 用氯化钠溶液处理前后微球的形貌和成分表征

用膜乳化法制备了粒径窄分布的海藻酸钙微球。由膜乳化首先得到油包水乳液, 此时乳液滴直径大约为膜孔径的 2 倍, 然后加入钙离子交联固化, 液滴缩小超过一半得到海藻酸钙微球。将氯化钠和氯化钙同时加入是为了控制交联速度, 从而使制备得到的微球形状良好, 粒径均一。图 2(a) 显示了用孔径为 15.0 μm 的 SPG 膜制备得到微球的光学显微镜图片, 得到的微球粒径较为均匀。

用氯化钠溶液浸泡微球,然后用超纯水离心清洗.经氯化钠处理过的微球体积增大,颜色变淡,且盐溶液浓度越高,体积增大越多,颜色越淡(图 2(b)~2(f)).表 1 是盐处理后微球的粒径统计,从中

可以清楚地看到微球粒径的增长趋势.当盐浓度为 3.6% 时,已经有少量微球膨胀破裂,当盐浓度达到 7.2% 时,相当多微球破裂,因此以下研究最高只用 1.8% 的 NaCl 处理后微球.

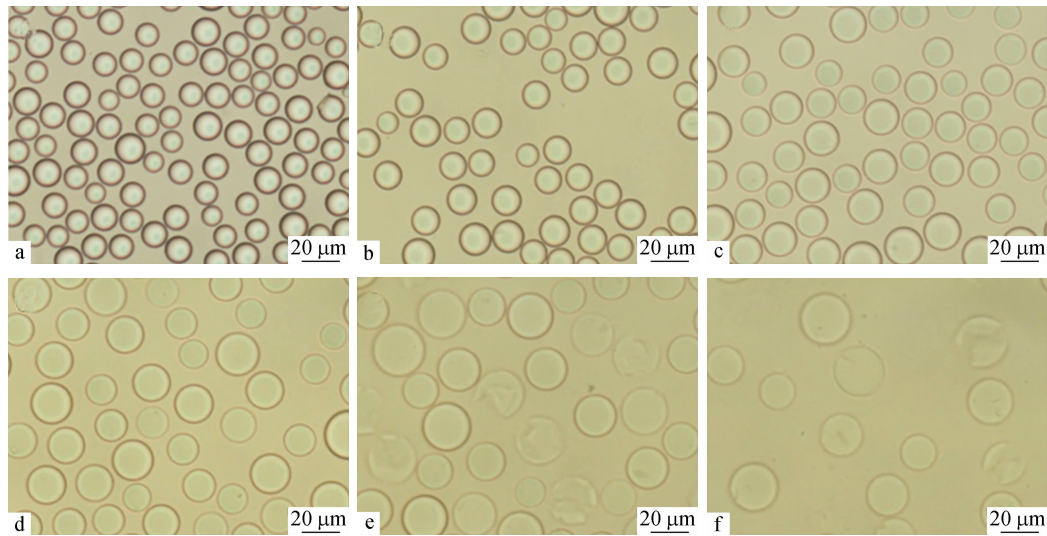


Fig. 2 Optical microscopic photographs of alginate microspheres treated with NaCl solution of different concentrations: (a) 0% , (b) 0.45% , (c) 0.9% , (d) 1.8% , (e) 3.6% and (f) 7.2%

Table 1 Diameter of microspheres treated with NaCl solutions of different concentrations

Concentration of NaCl solution	0%	0.45%	0.9%	1.8%	3.6%	7.2%
Diameter of microspheres (μm)	14.0 ± 1.4	15.2 ± 1.7	17.1 ± 2.3	19.3 ± 2.4	22.2 ± 3.5	23.8 ± 2.7

为更好地保持微球的表面和内部形貌,用冷冻切片法制备了微球切片,并用临界点干燥法对样品进行干燥,防止样品的干燥收缩.从图 3 可以看出,不同浓度盐溶液处理的微球表面形貌区别不大,并且尺寸收缩较小,基本保持了在水溶液中的尺寸.但是微球内部随着处理盐浓度的提高,出

现了一些孔洞,这在盐浓度为 0.9% 和 1.8% 时更为明显(图 3(c) 和 3(d)).由于微球是海藻酸通过钙离子交联形成的,所以钙离子的多少决定了交联程度,而当微球被置于 NaCl 溶液中时,部分钙离子会被钠离子置换,导致交联度下降,微球体积膨胀^[19, 20]. NaCl 的浓度越高,这种效应就越明

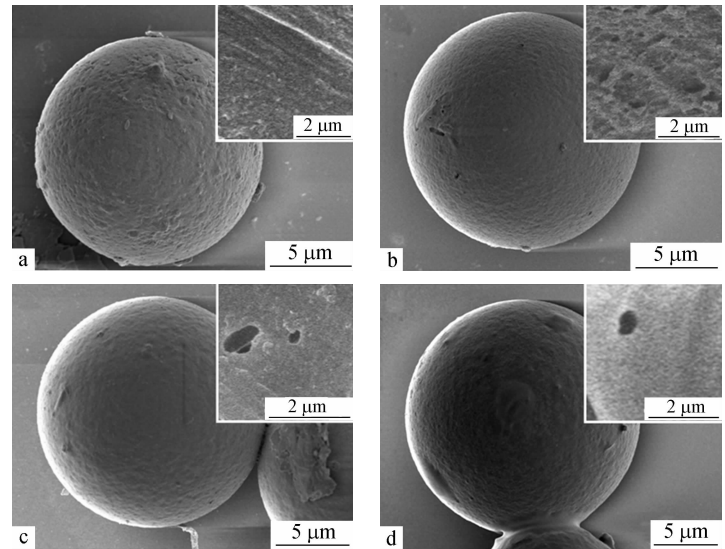


Fig. 3 SEM photographs of alginate microspheres treated with NaCl solution of different concentrations: (a) 0% , (b) 0.45% , (c) 0.9% and (d) 1.8%

显,微球内部结构变得更加疏松多孔.

为验证部分钙离子被钠离子置换,采用原子吸收光谱对微球内的钙元素和钠元素进行定量测定.由表 2 可以看到,随着 NaCl 溶液浓度增高,微球中的钙离子含量逐渐降低,钠离子含量逐渐增加,这说明了微球经盐处理确实是一个钙离子逐渐被钠离子置换的过程.对微球进行了 XRD 表征, 2θ 为 13° 和 23° 处为海藻酸钙的特征衍射峰^[21],在 4 个样品中没有明显区别,并且 2θ 为 23° 处的峰较宽(数据没有给出).表明微球均为非晶态^[22],并且虽然经过盐处理置换了一部分钙离子,微球内部还是存在一定量的相对有序的海藻酸钙的结构.这和原子吸收光谱的结果是一致的.

Table 2 Quantity of calcium and sodium in microspheres after treating with NaCl solutions

Concentration of NaCl solution	Quantity of calcium ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Quantity of sodium ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
0%	49.3	10.0
0.45%	24.8	21.2
0.9%	14.6	28.3
1.8%	8.9	34.7

对微球进行红外光谱表征,比较了盐处理前后微球内的基团变化.如图 4 所示,盐处理前后微球的红外谱图形状很相似,二者之间最大的区别是处理前微球在 1586 cm^{-1} 处的峰经处理后蓝移至 1612 cm^{-1} 处,且峰形变窄.分析可知, 1612 cm^{-1} 处的峰是海藻酸钙微球中羧酸根的反称

伸缩振动峰,并与纯海藻酸钠的峰位相近.未处理的微球中的羧酸根大部分与钙离子形成整合键,从而使得羧酸根基团的分子振动受到较大限制;而处理后微球中相当一部分钙离子被钠离子取代,从而使相当一部分羧酸根从整合态变为自由态,基团振动所受束缚减少,所以振动峰也向高频移动^[23].由此可见,用盐处理使得微球中的主要成分由海藻酸钙变为海藻酸钠,自由羧酸根的含量增加.

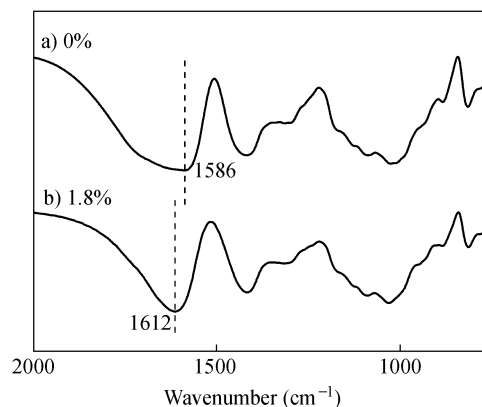


Fig. 4 FTIR spectra of alginate microspheres treated with (a) 0% and (b) 1.8% NaCl solutions

2.2 微球装载阿霉素

抗癌药盐酸阿霉素是带有氨基的小分子药物,在水中带正电.海藻酸钙微球中的海藻酸钠在水中电离,从而使得微球带负电,因此阿霉素可以通过静电吸附装载入海藻酸钙微球中^[24].图 5 显示了不同盐浓度处理的微球装载阿霉素后的照

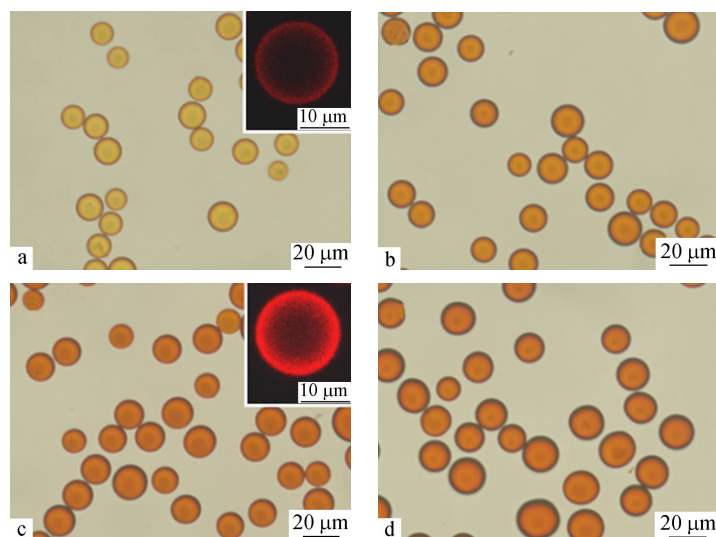


Fig. 5 Optical microscopic photographs and confocal images (insets) of alginate microspheres treated with NaCl solutions after loading doxorubicin, concentration of NaCl solutions: (a) 0%, (b) 0.45%, (c) 0.9% and (d) 1.8%

片. 由于阿霉素显红色, 所以可以在显微镜下直接观察到有颜色的微球. 用盐处理过的微球载药后颜色较深, 并且随着盐浓度增加, 颜色逐渐加深, 这说明盐处理后的微球可以吸附更多的阿霉素. 通过共聚焦显微镜可以看到, 靠近微球表面的部分颜色较深、中心较浅, 说明阿霉素在微球内部吸附的量要少于微球表面. 与未处理的微球相比, 盐处理后的微球内部能装载更多的药物.

图 6 显示了不同盐浓度处理后微球的载药量. 可以看到, 原始微球的载药量为 $125 \mu\text{g}/\text{mg}$, 而经盐处理后微球的载药量明显提高, 1.8% 盐溶液处理后微球的载药量达到 $1310 \mu\text{g}/\text{mg}$, 这几乎是处理前微球的 10 倍. 由原子吸收光谱和红外光谱表征可知, 经过氯化钠处理后的海藻酸钙微球中的部分羧酸钙转变为羧酸钠. 因为微球主要通过静电作用吸附阿霉素, 而只有处于自由态的羧酸根才能在溶液中电离呈负电从而具备吸附阿霉素的能力. 海藻酸钙中海藻酸根和钙离子配位形成螯合物, 该笼状结构在溶液中很稳定, 不能电离成自由离子. 而海藻酸钠可以电离为游离的海藻酸根和钠离子, 盐酸阿霉素含有氨基, 因此可以与海藻酸根结合^[25]. 氯化钠浓度升高, 微球中有更多的羧酸根从螯合态变为自由态, 因此就可以吸附更多的阿霉素. 同时, 钙离子的含量降低导致交联密度降低, 凝胶结构变得更为松散, 这也有利于药物向微球内部扩散, 提高载药量.

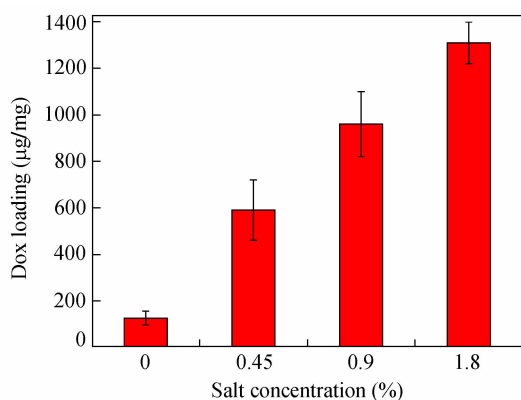


Fig. 6 Drug loading capacity of alginate microspheres treated with NaCl solutions of different concentrations

2.3 药物释放

装载阿霉素的海藻酸钙微球在 PBS 中的释放曲线见图 7. 由图可见, 高浓度氯化钠溶液处理的微球药物释放速率更慢, 当达到一定释药量时释放速率皆趋于停滞. 需要注意的是, 此处的释药

量是指占微球总载药量的百分数. 对于不同盐浓度处理的微球, 如 1.8% 和 0.45% , 1.8% 组微球的绝对释药量更多, 但是由于 1.8% 组微球的总载药量要远大于 0.45% 组微球, 所以比较相对释药量 1.8% 组微球反而少于 0.45% 组微球. 对比两图可以看到, 当释放介质 PBS 的 pH 值为 7.4 时, 除 0% 组微球释药量达到 80% 外, 其它几组微球的释药量都只在 20% 到 40% 之间; 而当 PBS 的 pH 值为 5.5 时, 微球释药量和释药速率都大大提高, 其中 0% 组微球释药量达到 100% , 1.8% 组微球也达到 66% . 由于肿瘤部位和细胞内部溶酶体中的 pH 值显弱酸性, 可有效触发这类载体中药物的释放, 提高药物的利用率和疗效. 此外如果将微球应用于体内, 时间延长海藻酸钠也会被溶蚀微球内阿霉素可被全部释放出来.

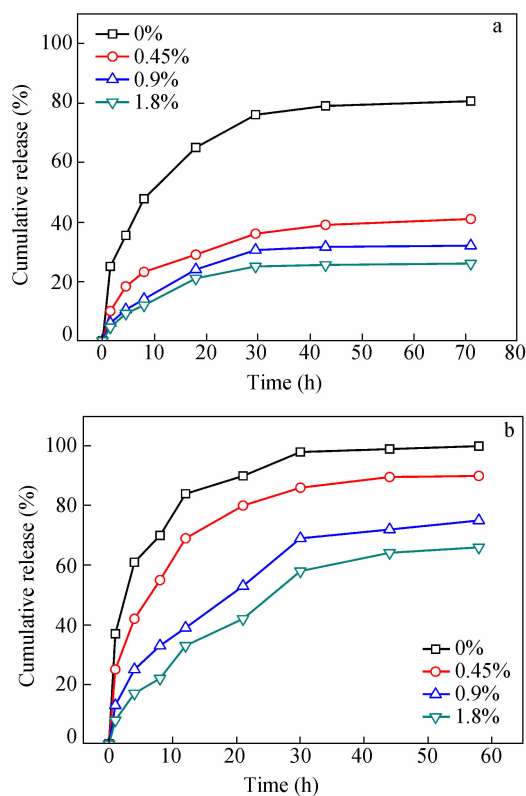


Fig. 7 Cumulative release of doxorubicin from the microspheres treated with different NaCl solutions in PBS at (a) pH = 7.4 and (b) pH = 5.5

海藻酸钙微球在不同 pH 值环境中对包埋药物的释放行为与此前的研究结果相似^[26,27]. 当释放介质 pH 值为 7.4 时, 微球中带负电的羧酸根强有力地与阿霉素结合, 导致药物的释放速率较慢且大部分药物留存在微球内; 而当释放介质 pH 值为 5.5 时, 微球中羧酸根倾向于质子化为羧基,

这样负电性降低导致其与阿霉素的结合力下降,从而使得释药量和释药速率增大.盐处理前后微球的载药能力不同,未用 NaCl 处理的微球大部分药物都吸附在其表面,扩散比较容易,并且物理吸附的比例相对较大,所以释放较快且较不易受 pH 值影响.

对释放行为用 Peppas 模型方程^[28]进行拟合,公式如下:

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad (1)$$

其中 M_t/M_∞ 是指药物在 t 时间内的累计释放百分数, k 是释放速率常数, n 为溶出参数,是表示释放机制的特征参数.对于载药微球,当 $n \leq 0.43$ 时,药物通过 Fick 扩散释放;当 $n \geq 0.85$ 时,药物通过骨架溶蚀方式释放;当 $0.43 < n < 0.85$ 时,药物释放方式为 Fick 扩散和骨架溶蚀协同作用^[29].将释放数据用公式(1)拟合,拟合得到的 n 和 k 值见表 3.数据分析可知,对于未用盐处理以及用 0.45% 氯化钠溶液处理的微球,其释药机制主要是 Fick 扩散,而对于用 0.9% 和 1.8% 氯化钠处

理的微球,其释药机制是 Fick 扩散和骨架溶蚀相结合的方式.该结果的原因是对于未用盐处理的微球,海藻酸钙微球的骨架保持完整,所以阿霉素主要通过扩散释放,而用较高浓度盐溶液处理的微球,交联程度降低,微球结构变得较为松散,在释放时介质中的阳离子与微球中的钙离子交换,从而使得微球骨架溶蚀,所以其释药是通过扩散和骨架溶蚀两种方式共同进行的.

3 结论

采用膜乳化法制备了粒径窄分布的海藻酸钙微球.用不同浓度的氯化钠溶液对微球进行后处理,可以观察到微球的膨胀,并且微球膨胀度随着盐浓度升高而增大.通过表征可知钠离子和钙离子在微球内部的置换是这一过程的关键,同时微球内大部分羧酸根由螯合态转变为自由态.自由羧酸根可通过静电作用吸附阿霉素.当盐浓度为 1.8% 时,微球载药量可达到 1310 $\mu\text{g}/\text{mg}$,是未经处理微球的载药量的 10 倍.载药微球在 pH 值为 5.5 的 PBS 中的释药量和释放速率明显大于在 pH 值为 7.4 的 PBS 中,载药量较多的微球相对释药量较小,用盐处理后的微球释药机制由单一的扩散向扩散和骨架溶蚀相结合的方式转变.本实验制备得到的海藻酸钙微球,通过不同浓度盐溶液处理可以方便地调控微球的载药量,并且具有 pH 值敏感的释放行为,使其在生物医药领域有潜在的应用价值.

Table 3 Parameters of doxorubicin release from alginate microspheres fitted with Peppas formula

	Salt concentration	n	k	Adj. R-Square
pH = 7.4	0%	0.401	0.204	0.99
	0.45%	0.384	0.098	0.96
	0.9%	0.592	0.043	0.99
	1.8%	0.620	0.035	0.99
pH = 5.5	0%	0.346	0.378	0.97
	0.45%	0.387	0.251	0.99
	0.9%	0.463	0.128	0.99
	1.8%	0.567	0.075	0.98

REFERENCES

- Ma Guanghui(马光辉), Su Zhiguo(苏志国). Polymeric Microspheres Material(高分子微球材料). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2005. 1~6
- Freiberg S, Zhu X X. Int J Pharm, 2004, 282: 1~18
- Nakashima T, Shimizu M, Kukizaki M. Adv Drug Delivery Rev, 2000, 45: 47~56
- Tragardh G, Joscelyne S M. J Membr Sci, 2000, 169: 107~117
- You J O, Park S B, Haam S J. Microencapsulation, 2001, 18(4): 521~532
- Lin Nan(林楠), Ma Guanghui(马光辉). The Chinese Journal of Process Engineering(过程工程学报), 2009, 9(5): 953~961
- Akamatsu K, Chen W, Suzuki Y. Langmuir, 2010, 26(18): 14854~14860
- Liu X D, Bao D C, Ma X J. J Appl Polym Sci, 2003, 87: 848~852
- Zhang Y L, Wei W, Ma G H. Eur J Pharm Biopharm, 2011, 77: 11~19
- Gu Qisheng(顾其胜), Xi Tingfei(奚廷斐). Alginate-based Biomaterials in Clinical Medicine(海藻酸与临床医学). Shanghai(上海): Second Military Medical University Press(第二军医大学出版社), 2006. 6~22
- Qin Y M. Polym Adv Technol, 2008, 19: 6~14
- Qin Yimin(秦益民). Alginate(海藻酸). Beijing(北京): China Light Industry Press(中国轻工业出版社), 2008. 99~106
- Lu Lu(鲁路), Liu Xinxing(刘新星), Tong Zhen(童真). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2010, (12): 1351~1358

- 14 Rajaonarivony M, Vauthier C, Couarraze G, Couvreur P. *J Pharm Sci*, 1993, 82(9): 912 ~ 917
- 15 Sangeetha S, Deepika K, Damodharan N. *Int J Pharm*, 2010, 2(4): 1 ~ 3
- 16 Li S, Wang X T, Zhang X B, Yang R J, Hou X P. *J Controlled Release*, 2002, 84(3): 87 ~ 98
- 17 Wang L Y, Ma G H, Su Z G. *J Controlled Release*, 2005, 106: 62 ~ 75
- 18 Duan Shaojun(段韶军). *Shanxi Medical Journal(山西医药杂志)*, 2010, 39(2): 163 ~ 164
- 19 Li Hongbing(李红兵). On the Physicochemical Properties of Sodium Alginate and Preparation of Its Special Specimens(海藻酸钠理化性质研究和特种品种制备). Doctoral Dissertation of Tianjin University(天津大学博士学位论文), 2005. 59 ~ 67
- 20 Qin Y M. *Polym Int*, 2008, 57: 171 ~ 180
- 21 Li L B, Fang Y P, Vreeker R, Appelqvist I. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 464 ~ 468
- 22 Ren Li(任丽), Chen Xiaofeng(陈晓凤). *Fine Chemicals(精细化工)*, 2008, 25(12): 1175 ~ 1178
- 23 Su Keman(苏克曼), Pan Tieying(潘铁英), Zhang Yulan(张玉兰). *Interpretation of Spectroscopy(波谱解析学)*. Shanghai(上海): East China University of Science and Technology Press(华东理工大学出版社), 2002. 90 ~ 103
- 24 Zhu H G, McShane M J. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 2221 ~ 2228
- 25 Cao Xizhang(曹锡章), Song Tianyou(宋天佑), Wang Xingqiao(王杏乔). *Inorganic Chemistry(无机化学)*. 3rd ed(第3版). Beijing(北京): Higher Education Press(高等教育出版社), 1993. 898 ~ 914
- 26 Wakasugi A, Asakawa M, Kogiso M, Maitani Y. *Int J Pharm*, 2011, 413: 271 ~ 278
- 27 Zhang X K, Meng L J, Lu Q H, Dyson P J. *Biomaterials*, 2009, 30: 6041 ~ 6047
- 28 Ritger P L, Peppas N A. *J Controlled Release*, 1987, 5(1): 23 ~ 26
- 29 Sun Jiali(孙佳丽), Lin Ying(林莹), Jiang Guoqiang(蒋国强), Zan Jia(咎佳), Ding Fuxin(丁富新). *Journal of Tsinghua University (Science & Technology)(清华大学学报(自然科学版))*, 2008, 48: 395 ~ 398

REGULATION OF FREE CARBOXYLATE GROUPS OF ALGinate MICROSPHERES WITH NaCl SOLUTION AND ITS EFFECT IN DOXORUBICIN LOADING AND RELEASE

Yi-chao Song, Wei-jun Tong, Chang-you Gao

(MOE Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization, Department of Polymer Science and Engineering,
Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract Narrow-dispersed calcium alginate microspheres were prepared by a membrane emulsification-gelation method. The microspheres were treated with NaCl solutions of different concentrations to control the amount of free carboxylate groups. The size of the microspheres increased simultaneously after salt treatment. The quantity of calcium and sodium ions in the microspheres was measured by atomic absorption spectrometer, and the change of functional groups was determined by Fourier transform infrared spectroscopy. During the treatment process calcium ions in the microspheres were replaced by sodium ions, and the carboxylate groups were converted from a chelate to a free state. As doxorubicin hydrochloride was positive in water while alginate was negative, doxorubicin was loaded into the alginate microspheres via electrostatic interaction. The loading capacity of microspheres was enhanced greatly after treatment with NaCl solution. When the microspheres were treated with 1.8% NaCl solution, the drug content increased remarkably to 1310 $\mu\text{g}/\text{mg}$, which was nearly 10 times the amount of the untreated ones. In vitro release tests confirmed that relative smaller percentage of drug was released from the microspheres containing more drug. The release behavior of the drug-loaded microspheres was pH-sensitive, *i. e.* slower at pH 7.4 but faster at pH 5.5. After salt treatment, the drug release mechanism was transformed from diffusion alone to the combination of diffusion and matrix erosion.

Keywords Membrane emulsification, Alginate microsphere, Salt treatment, Doxorubicin, Drug release