

超声刺激对海藻酸钠微球机械特性和释放特性的影响

张丽果¹, 汲振余¹, 赫培远², 赵立群¹, 杨小静¹, 裘一冰¹

(1. 郑州大学 医药科学研究所, 郑州 450052; 2. 郑州大学 生命科学学院, 郑州 450052)

摘要: 为了测量海藻酸钠微球的剪切模量,并检测在超声刺激下海藻酸钠微球的机械特性和释放特性的变化,采用传统挤压方法制备海藻酸钠微球. 在稳定状态下,通过压缩实验技术和 Hertz 理论模型分析得到海藻酸钠微球的剪切模量. 采用不同的超声刺激海藻酸钠微球,通过测量其剪切模量,观察超声刺激对微球的机械特性的影响. 实验对于包埋牛血清蛋白(bovine serum albumin,BSA)的海藻酸钠微球,采用 Higuchi 模型分析其释放特性. 结果表明:海藻酸钠微球的剪切模量为 42.5 kPa,超声刺激对微球的剪切模量无明显影响,而其释放速率受到超声刺激时间和功率的影响.

关键词: 海藻酸钠; 微球; 超声刺激

中图分类号: R 318.08

文献标志码: A

文章编号: 0254-0037(2015)09-1302-06

doi: 10.11936/bjtxb2015020029

Effects of Ultrasonic Stimulation on Mechanical and Release Properties of Alginate Beads

ZHANG Li-guo¹, JI Zhen-yu¹, HE Pei-yuan², ZHAO Li-qun¹, YANG Xiao-jing¹, QIU Yi-bing¹

(1. Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;

2. School of Life Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: The aim of this research is to fabricate alginate beads and measure their mechanical properties; to investigate the changes of mechanical properties and release properties of alginate beads under ultrasonic stimulation. Alginate bead was fabricated with the extrusion method. Centered on bead under stable condition, its shear module was analyzed with the compression test technique and Hertz theory. Alginate bead was sonicated by different ultrasonic stimulations. By measuring the shear module of beads sonicated, effects of ultrasonic stimulation on the mechanical property of alginate beads incorporating bovine serum albumin (BSA) were investigated, and its passive release property was analyzed by Higuchi model. The results show that the shear module of alginate beads is 42.5 kPa, the ultrasonic stimulation has no effect on their mechanical properties, and their release rate can be changed by ultrasonic stimulation power and stimulation time.

Key words: alginate; beads; ultrasonic stimulation

定点药物释放系统是通过药物载体输送药物到达目标组织的药物释放系统. 该系统不仅仅能得到较好的治疗效果,而且使药物毒副作用最小化. 用

持续并且可控的药物释放方式输送诊疗药物到达目标组织的方法是多种多样的. 其中一种就是采用微球作为药物载体输送药物. 微球是大小为纳米甚至

收稿日期: 2015-02-11

基金项目: 河南省教育厅重点资助项目(14A180019)

作者简介: 张丽果(1985—),女,讲师,主要从事微机械力学方面的研究,E-mail: xinxin201403@sina.com

是毫米的球状颗粒。诊疗物质包埋在微球内部网状结构中。作为一种药物载体,微球和微囊相比,更坚固,具有更好的抵抗外力(如压力/剪切力)的能力。因此,微球具有较好的保护被包埋物质不受外力损坏的能力。超声刺激常常用来作为一种外部刺激来控制释放^[1]。已有研究证明超声刺激能控制脂质体^[2]、微泡^[3]及具有软膜^[4]或硬膜^[5]微囊的药物释放,药物的释放可通过声强、声频、超声刺激时间来控制。

对于实心的药物载体,有研究报道在超声刺激作用下圆盘状载体的释放特性。Kost 等^[6]研究了可侵蚀和不可侵蚀聚合物圆盘在超声作用时的释放特性。研究显示,由于超声空化效应,可侵蚀聚合物圆盘和不可侵蚀聚合物圆盘相比具有较高的释放速率,而且二者的释放速率都随声强的增加而增加。Lavon 等^[7]对不可侵蚀的聚合物 EVAc 做了研究。发现超声刺激能提高释放速率,并且较低频率的超声对释放速率有较高的影响效果。42 kHz 超声刺激 EVAc 圆盘 1 h 以后,释放出的包埋物质和无超声刺激的圆盘相比提高了 0.3%。除此之外,未发现其他的关于超声刺激对实心载体的释放特性的研究。据此,针对超声刺激对微球载体的作用进行了研究。超声刺激会形成一定的机械外力,可能会对微球造成一定的损伤。因此,查看了超声刺激对其机械特性的影响。另外,有研究发现实心载体材料的机械特性和包埋物质的释放特性是相关的^[8],因此,为了更好地理解其释放机制,也查看了超声刺激对微球载体释放特性的影响。

1 材料和方法

1.1 海藻酸钠微球及包埋 BSA 的海藻酸钠微球的制备

海藻酸钠微球由传统聚合方法制备得到。聚合后形成的海藻酸钠微球 24 h 后处于稳定状态时对其进行测量。

称量 1 g 分子质量为 66 ku (A3059, Sigma Aldrich, USA) 的 Bovine Serum Albumin (BSA), 配制质量浓度为 0.01 g/mL BSA 的海藻酸钠溶液,通过聚合方法形成微球。在使用微球之前,微球用蒸馏水清洗除去微球表面黏附的 BSA 分子。

1.2 超声刺激装置

30 kHz 的超声发生器 (UP50H, Hielscher, Germany) 连接一 7 mm 的超声探头 (MS7, Hielscher, Germany) 用于超声刺激微球。实验中每次的超声刺激样本都包含有 160 个海藻酸钠微球,测量其释放

质量浓度。在超声刺激过程中,微球被放在一镂空的试管中,镂空的试管保证了超声刺激过程中,微球周围溶液温度不会升高,易于散热。

1.3 微球机械特性测量

微球机械特性采用压缩实验技术获得。2 个平行的平板挤压微球样本并实时记录两平板间距离和压力,依据样本不同的形状采用不同的理论模型分析计算样本的机械特性^[9]。对于遵循胡克定律的实心圆球,其剪切模量采用 Hertz 定律进行计算。Hertz 定律建立的是压力和压缩率之间的关系^[10]。在已知微球材料的泊松系数的情况下,微球的剪切模量最终以微球压缩率为方程的函数计算得到^[11]。海藻酸钠微球的泊松系数在先前的研究中已经得知是 0.5^[12]。

测量海藻酸钠微球剪切模量的实验如图 1 所示,以 0.6 mm/min 的速度压缩微球。微球所受压力 $F(t)$ 在实验过程中以微球压缩率 $\delta(t)$ 为函数记录下来,该函数所成曲线称为压缩曲线。在压缩实验之前,实验采集了微球未压缩之前的图片,笔者发现微球初始宽度 L_0 和初始高度 D_0 有 1% 的不同。假设微球是轴对称的,计算微球的测量体积。微球表观半径 r_0 定义为具有与测量所得体积一样的球的半径。实验制备的海藻酸钠微球的表观半径 r_0 为 (1.12 ± 0.01) mm。

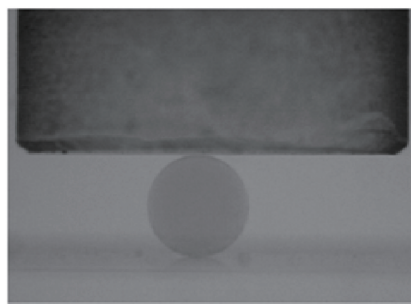


图1 微球压缩实验

Fig. 1 Compression test of a micro-bead

压缩测试之后,采用 Hertz 定律分析压缩曲线。该定律展现了初始半径为 r_0 被两平板挤压的微球所受压力的变化,其方程为

$$F(t) = \frac{8\mu r_0^2 (\delta(t))^{1.5}}{3(1-\nu)}$$

式中 μ 和 ν 分别为微球材料的剪切模量和泊松系数。由于海藻酸钠的泊松系数在先前实验中发现为 0.5,由 Hertz 定律预测的压力 $F(t)$ 的函数方程为

$$F(t) = \frac{16\mu r_0^2 (\delta(t))^{1.5}}{3}$$

式中 r_0 为已知参数. 因此, 根据实验测量得到的每对 $F(t)$ 和 $\delta(t)$, 可算出其剪切模量 $\mu(t)$.

1.4 微球释放 BSA 测量

将释放的 BSA 质量 $m_r(t)$ 和被刺激样本中初始状态下加载的 BSA 质量 m_0 进行比较. 初始 BSA 质量 m_0 采用如下方法计算得到. 采集用于包埋 BSA 海藻酸钠微球的海藻酸钠溶液于 40 mL 蒸馏水中, 摇匀后, 测量溶液中 BSA 的浓度 C_0 , 进而得到加载在被刺激样本中 BSA 的质量. m_0 的计算方程式为

$$m_0 = C_0 (V_{out} + V_{in})$$

式中: $V_{out} = 40\text{ mL}$; V_{in} 为待测海藻酸钠溶液的总

体积.

2 结果与讨论

2.1 微球剪切模量

压力作用于稳定状态的海藻酸钠微球上, 作用于微球上的压力 $F(t)$ 和微球压缩率 (t) 实时记录下来, 通过 Hertz 定律分析. 压缩率在 5% ~ 15% 时, 其剪切模量相对比较稳定. 剪切模量平均值约为 42.5 kPa. 图 2 显示了微球计算所得理论压缩曲线, 实验压缩曲线 (红色) 和理论压缩曲线 (绿色) 之间具有良好的一致性. Ouwerx 等^[13] 先前已经通过压缩实验查看了海藻酸钠微球的剪切模量, 他们发现由 1.5% 海藻酸钠溶液制备的微球的剪切模量为 53 kPa, 稍大于笔者的测量值. 其不同可能是由于压缩实验操作的不同导致的. Ouwerx 等压缩实验过程中把微球稍微干燥, 这将会引起微球剪切模量的增加. Leroux 等^[14] 采用 2% 的海藻酸钠溶液制备、聚合并存储微球. 该微球的剪切模量为 24 kPa. 其值小于笔者测量值的原因可能与制备微球过程选取的溶液浓度有关.

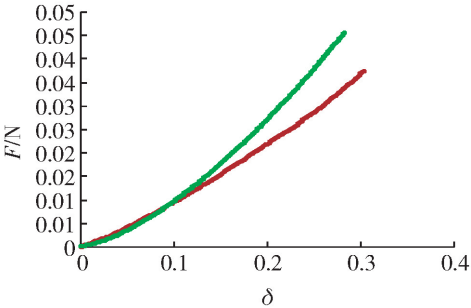


图 2 微球所受压力和压缩率之间关系

Fig.2 Relationship of compression force and compression ratio

2.2 超声刺激对微球剪切模量影响

不同超声刺激条件分别用于不同的海藻酸钠微

球样本, 对受到超声刺激的微球采用压缩实验测量其剪切模量. 实验首先固定超声刺激时间 (t_s) 于 5 min, 超声刺激能量 (P_s) 在 0.48 W, 增加超声脉冲比例 (f_p) 从 0 到 100%; 然后固定超声刺激时间 5 min, 超声脉冲比例为 20%, 增加超声能量到 17.5 W; 最后固定超声能量为 0.48 W, 脉冲比例为 20%, 增加刺激时间到 10 min. 在不同超声条件下刺激微球样本的剪切模量的值和未刺激的微球的剪切模量对比. 其中 $t_s = 0$, $f_p = 0$, $P_s = 0\text{ W}$ 对应于无超声刺激情况下. 随超声刺激参数变化微球剪切模量值如图 3 所示. 所有受刺激微球的剪切模量和未刺激微球的剪切模量的值没有大的差异. 因此, 超声刺激对海藻酸钠微球的物理性质无明显影响. 原因可能是因为在超声刺激过后海藻酸钠凝胶又恢复了它最初的物理特性. 另外, 也可能是由于目前所应用的压缩实验技术不能充分地捕捉到在机械特性上的微小变化.

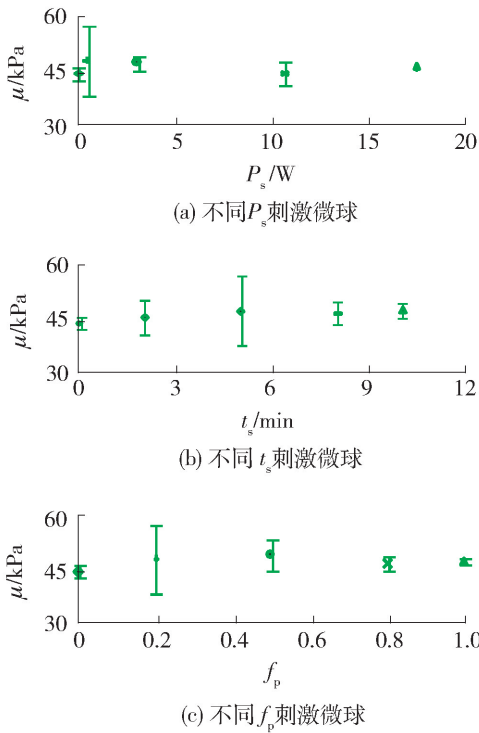


图 3 超声刺激后微球剪切模量

Fig. 3 Shear module of bead subjected to different sonication conditions

2.3 超声刺激对微球释放特性影响

2.3.1 海藻酸钠微球被动释放 BSA 特性

实验首先查看了在无超声刺激时 BSA 的被动释放的特性. 海藻酸钠凝胶的释放特性速率常常遵循 Higuchi 模型^[15]. Higuchi 释放模型方程式为

$$\frac{m_r(t)}{m_0}=kt^{0.5}$$

式中 k 为动力学释放常数. 以 $t^{0.5}$ 为函数,图4绘出了释放速率 m_r/m_0 的图形. 图中显示 BSA 的释放速率与 $t^{0.5}$ 并不是线性关系,即其释放行为并不完全遵循 Higuchi 模型. 释放速率以 $t^{0.5}$ 为函数分2个线性阶段. 在释放的前10 h的动力学释放常数 k_1 大于其后的动力学释放常数 k_2 . 这2个阶段的释放速率分别遵循具有不同动力释放常数的 Higuchi 模型,因此 BSA 从微球中释放可分为两部分:包埋在海藻酸钠微球外表面的 BSA 的释放和包埋在海藻酸钠微球内核的 BSA 的释放. 海藻酸钠微球外表面 BSA 的释放和包埋在海藻酸钠微球内核的 BSA 的释放相比,前者具有较高的释放速率. 该现象是由于包埋在微球外层的 BSA 在释放过程中受到凝胶网络阻力较小而具有较高的释放速率,而微球内核的 BSA 释放时阻力较大而具有较缓的释放速率.

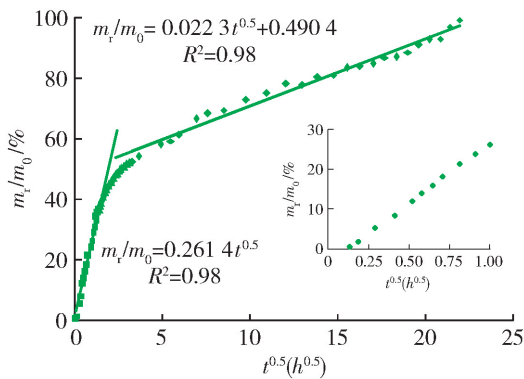


图4 BSA 从海藻酸钠微球中被动释放速率

Fig. 4 Release rate of BSA from alginate beads as a function of $t^{0.5}$

与其他微球释药系统相比,海藻酸钠微球控释系统的释药性和 PLA/CoFe₂O₄载药微球的释药特性具有相似性^[16],缓控释效果优于格列吡嗪控释微球^[17],具有明显的药物缓控释作用.

2.3.2 BSA 在超声刺激中的释放

实验对包埋 BSA 的海藻酸钠微球样本进行刺激的超声在连续模式下进行(超声脉冲百分比为100%),超声刺激功率从0.48 W 增加到3.06 W,超声刺激持续时间从10 min 增加到60 min. 超声刺激中,从被刺激样本中释放出 BSA 的质量分数记为 $[m_r/m_0]$,此处方括号指释放的步进增长. 由于在超声刺激过程中,被动释放的 BSA 质量占全部从微球中释放 BSA 质量的比例很大,实验中计算了纯粹由超声刺激引起的 BSA 的释放质量分数 $[m_r/m_0]_s$.

该值由全部释放的 BSA 质量减去无超声时被动释放的质量比率得到. 以超声刺激时间为函数,对于不同的超声功率,纯粹由超声刺激导致的 BSA 释放如图5(a)所示. 由超声刺激导致的 BSA 的释放遵循指数方程为

$$\left[\frac{m_r}{m_0}\right]_s=a(t_s)^b$$

式中: a 为常数,是超声功率的指数函数(图5(b)); b 为指数常数,是超声功率的线性函数(图5(c)). 由超声刺激导致的释放与超声刺激时间和超声功率相关,并随二者的增加而增加.

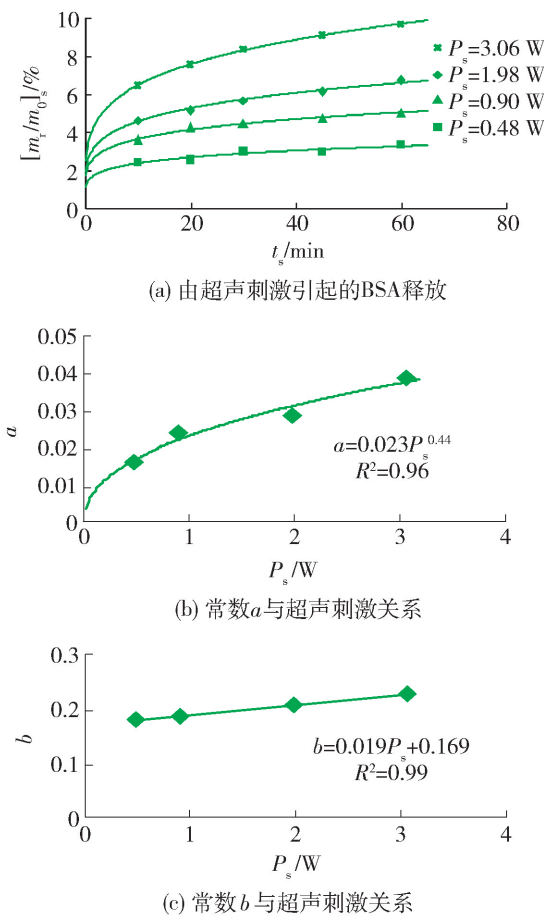


图5 超声刺激中微球释放特性

Fig. 5 Release properties of alginate beads during the sonication

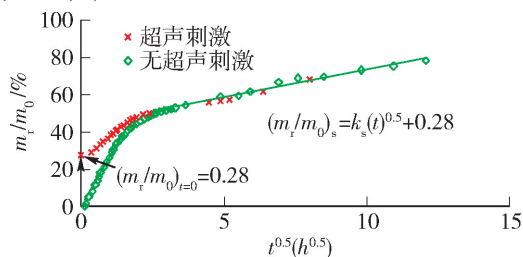
微球释放 BSA 在超声刺激下比率的增加可能是由于超声声流和超声空化效应引起的^[18]. 超声声流效应使加载 BSA 的微球在溶液中运动,提高了 BSA 从微球中扩散出来的速率. 较高的超声功率会提高超声声流的速率进而使加快了 BSA 的扩散速率. 较高的超声功率也会在液体中引起较多的超声空化效应. 空化核的破裂在微球周围形成超声微

流,这一现象会加速 BSA 的扩散速率. 在 Scott 等的研究中,也证明了和无超声刺激相比超声声流效应促使物质释放质量的增加^[19]. 超声刺激时间引起的 BSA 释放增加很容易理解. 在较长的刺激时间下,超声声流效应和超声空化效应作用于微球的时间增加,进而导致高的释放率. 由于超声刺激时间和超声刺激功率引起的物质释放的增加在 Lavon 和 Kost 的研究中也获得了证明^[20].

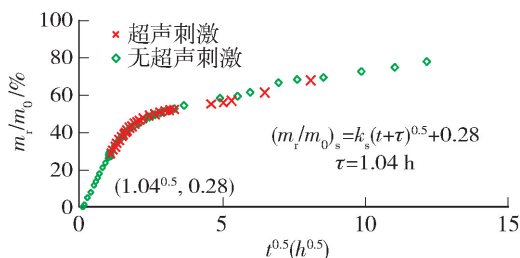
另外,在低频超声下,海藻酸钠微球内包埋的 BSA 的释放速率高于 EVAc 内包埋的 BSA^[7],这可能是由于海藻酸钠凝胶的材料孔径大大高于 EVAc^[21]. 包埋材料孔径的增大能够提高被包埋物质的释放速率^[22].

2.3.3 BSA 在超声刺激后的释放

海藻酸钠凝胶是海绵状的多孔材料. 其孔隙大小对包埋在海藻酸钠微球中的 BSA 的释放速率起到决定性作用. 因此,试验通过查看超声刺激后微球被动释放 BSA 的特性来检测超声刺激对微球材料孔隙的状态是否有残余的影响. 微球被功率为 3.06 W 的超声刺激 30 min 后,及时地测量其被动释放 BSA 的量,并和无超声刺激的微球的被动释放相比. 30 min、3.06 W 的超声刺激使 28% 的 BSA 释放,以此点为超声刺激后微球被动释放 BSA 的初始点,图 6(a)显示了其以 $t^{0.5}$ 为方程 BSA 释放率.



(a) 二者被动释放曲线对比



(b) 平移超声刺激后微球被动释放曲线和无超声刺激微球被动释放曲线对比

图 6 3.06 W 超声刺激 30 min 后微球和无超声刺激微球的释放特性

Fig. 6 Release properties of the passive release curve of beads sonicated for 30 min at 3.06 W and the non sonicated beads

微球 BSA 释放速率是和微球内外部 BSA 浓度差及材料孔径相关的. 超声刺激后微球内外部 BSA 浓度差和无超声刺激微球内外部 BSA 浓度差在 $t = 0$ 时刻不同. 把超声刺激后微球 BSA 释放曲线平衡到和无超声刺激微球内外部 BSA 浓度差相同的点, 即 $t = 1.04$ h. 发现平移后的曲线和无超声刺激微球的 BSA 释放曲线完全重叠, 如图 6(b) 所示. 微球内外 BSA 质量浓度差相同时, 超声刺激后微球的释放速率和无超声刺激微球的释放速率完全一致. 因此, 可认为超声刺激撤销后, 超声刺激对海藻酸钠材料孔径的状态没有残余影响.

3 结论

1) 采用传统的挤压方法制备海藻酸钠微球, 其剪切模量为 42.5 kPa.

2) 当微球受到不同条件的超声刺激后, 被超声刺激过后的微球的剪切模量无明显变化.

3) 包埋 BSA 的海藻酸钠微球, 其被动释放由 Higuchi 模型分析可分为 2 个阶段: 释放的前 10 h 为第 1 阶段, 其 BSA 释放速率高; 其后的释放为第 2 阶段, 具有较低的 BSA 释放速率.

4) 海藻酸钠微球具有较好的药物缓控释作用. 包埋 BSA 的微球受到超声刺激时, BSA 的释放速率提高. 释放速率与超声刺激时间和超声刺激功率相关.

5) 超声刺激过后, 超声刺激对海藻酸钠凝胶的材料孔隙无残余影响.

参考文献:

- [1] 包敏, 周宇峰, 周祺惠, 等. 超声可控释药物体系研究进展[J]. 中国生物医学工程学报, 2013, 32(6): 731-740.
BAO Min, ZHOU Yu-feng, ZHOU Qi-hui, et al. Recent advances in the ultrasound-mediated drug delivery system [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2013, 32(6): 731-740. (in Chinese)
- [2] SCHROEDER A, KOST J, BARENHOLZ Y, et al. Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes [J]. Chem Phys Lipids, 2009, 162(1/2): 1-16.
- [3] 董虹美, 王志刚, 冉海涛, 等. 超声辐照载 10-HCPT 微泡在小鼠 H22 肝癌移植瘤的定位释放研究[J]. 中国超声医学杂志, 2010, 26(7): 592-596.
DONG Hong-mei, WANG Zhi-gang, RAN Hai-tao, et al.

- Targeted release of 10-HCPT-loaded microbubbles in mice with H22 tumor with ultrasound irradiation[J]. Chinese Journal of Ultrasound in Medicine, 2010, 26(7): 592-596. (in Chinese)
- [4] SHCHUKIN D G, GORIN D A, MOHWALD H. Ultrasonically induced opening of polyelectrolyte microcontainers[J]. Langmuir, 2006, 22(17): 7400-7404.
- [5] ZHANG L, SALSA C A-V. Can sonication enhance release from liquid-core capsules with a hydrogel membrane[J]. J Colloid Interface Sci, 2012, 368(1): 648-654.
- [6] KOST J, LANGER R S. Ultrasound enhancement of membrane permeability[J]. J Acoust Soc Am, 1989, 86(1): 855-855.
- [7] LAVON I, KOST J. Mass transport enhancement by ultrasound in non-degradable polymeric controlled release systems[J]. J Control Release, 1998, 54(1): 1-7.
- [8] MOREAU J L, XU H H. Fluoride releasing restorative materials: effects of pH on mechanical properties and ion release[J]. Dent Mater, 2010, 26(11): 227-235.
- [9] TUNG M A, ROGERS M D H. General compressive measurements[M]. New York: John Wiley and Sons, Inc, 2001: 967.
- [10] JOHNSON K, KENDALL L K, ROBERTS A D. Surface energy and the contact of elastic solids[J]. Proc R Soc Lond: A Math Phys Sci, 1971, 324(1558): 301-313.
- [11] DAVID B, DORE E, JAFFRIN M Y, et al. Mass transfers in a fluidized bed bioreactor using alginate beads for a future bioartificial liver[J]. Int J Artif Organs, 2004, 27(4): 284-293.
- [12] SALSAC A-V, ZHANG L, GHERBEZZA J, et al. Measurement of mechanical properties of alginate beads using ultrasound [C] // 19^{eme} Congres de Mecanique. Marseille: University of Aix-Marseille, 2009.
- [13] OUWERX C, VELINGS N, MESTDAGH M M, et al. Physico chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations[J]. Polym Gels Networks, 1998, 6(1): 393-408.
- [14] LEROUX M, GUILAK A F, SETTON L A. Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration[J]. J Biomed Mater Res, 1999, 47(1): 46-53.
- [15] HIGUCHI T. Mechanism of sustained-action medication theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices[J]. J Pharm Sci, 1963, 52(12): 1145-1149.
- [16] 甄卫军, 袁龙飞, 李先进, 等. PLA/CoFe₂O₄ 载药微球的制备、表征及释药性能[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(2): 123-127.
- ZHEN Wei-jun, YUAN Long-fei, LI Xian-jin, et al. Preparation, characterization and drug release propertiry for PLA/CoFe₂O₄ drug-loaded microsphere[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2010, 35(2): 123-127. (in Chinese)
- [17] 江田民, 谭丰苹, 杜佳丽, 等. 格列吡嗪控释微球的制备及体外释药性质[J]. 清华大学学报: 自然科学版, 2004, 44(6): 732-735.
- JIANG Tian-min, TAN Feng-ping, DU Jia-li, et al. Preparation and in vitro release of glipizide loaded controlled release microspheres[J]. Journal of Tsinghua University: Science and Technology, 2004, 44(6): 732-735. (in Chinese)
- [18] 梁士利, 韩冬, 徐美玲, 等. 超声药物释放空化动力学行为研究[J]. 发光学报, 2012, 32(2): 182-187.
- LIANG Shi-li, HAN Dong, XU Mei-ling, et al. Investigation of microbubble dynamics in drug release by ultrasound cavitation [J]. Chinese Journal of Luminescence, 2012, 32(2): 182-187. (in Chinese)
- [19] SCOTT F, KASPER L. Acoustically augmented diffusional transport[J]. J Acoust Soc Am, 1973, 53(1): 59-64.
- [20] LAVON I, KOST J. Ultrasound and transdermal drug delivery[J]. Drug Discov Today, 2004, 9(15): 670-676.
- [21] 马萍, 祝力, 孙淑英, 等. 海藻酸钙凝胶微球的制备和 pH 依赖性溶胀[J]. 中国海洋药物杂志, 2003(5): 35-38.
- MA Ping, ZHU Li, SUN Shu-ying, et al. Preparation and pH-sensitive reswelling of calcium alginate gel beads [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2003(5): 35-38. (in Chinese)
- [22] ASCHKENASY C, KOST J. On-demand release by ultrasound from osmotically swollen hydrophobic matrices [J]. J Control Release, 2005, 110: 58-66.

(责任编辑 吕小红)