

牛血清白蛋白阳离子微球的制备及体外评价

靳美霞, 蔡欧, 张彦焘, 胡巧红^{*}(广东药学院, 广州 510006)

摘要: 目的 制备牛血清白蛋白(BSA)口服阳离子微球, 考察天然阳离子物质壳聚糖(CHS)的加入对蛋白微球的粒径、电动电势、包封率、载药量及体外释放情况的影响。方法 以乳酸/羟基乙酸共聚物(PLGA)和壳聚糖(CHS)为载体材料, 采用W/O/W复乳-溶剂挥发法制备牛血清白蛋白乳酸/羟基乙酸共聚物-壳聚糖(PLGA/CHS)阳离子微球。通过正交设计优化制备工艺, 确定最佳处方。建立准确而简便的蛋白含量测定方法, 并对微球进行体外评价。结果 最佳处方为: BSA浓度为 $150\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、PLGA浓度为8%、外水相体积为80 mL、壳聚糖浓度为0.2%。制得的微球形态圆整, 平均粒径为 $(6.9\pm 5.5)\mu\text{m}$, 为表面荷正电的阳离子微球[ζ 电势= $(10.0\pm 0.6)\text{mV}$], 包封率为 $(75.4\pm 4.6)\%$, 载药量为 $(9.3\pm 0.2)\%$ 。体外释放结果表明, 在模拟胃液和模拟肠液中, 壳聚糖的加入均能减少突释, 延缓药物的释放。结论 与PLGA微球相比, 制得的PLGA/CHS阳离子微球表面带正电, 具有较高的包封率和载药量, 可以延缓药物释放, 同时减少突释现象。

关键词: 牛血清白蛋白; 壳聚糖; 乳酸/羟基乙酸共聚物; 微球; 体外释放

中图分类号: R943.4

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)07-0567-06

Preparation and *in Vitro* Evaluation of Cationic Microspheres Containing Bovine Serum Albumin

JIN Meixia, CAI Ou, ZHANG Yantao, HU Qiaohong^{*}(Department of Pharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare bovine serum albumin (BSA) cationic microspheres for oral administration, and investigate the influence of natural cationic polysaccharide chitosan (CHS) on size, electrokinetic potential, encapsulation efficiency, loading capacity and *in vitro* release profile of BSA microspheres. **METHODS** PLGA/CHS microspheres were prepared by W/O/W emulsion-solvent evaporation method. Orthogonal design method was used to determine the optimal formulation. A simple and precise method for the determination of the protein content was established. *In vitro* evaluation of PLGA/CHS microspheres was carried out. **RESULTS** The optimal formulation was as follows: $150\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of BSA, 8% PLGA solution, 80 mL of external aqueous phase, 0.2% chitosan solution. The PLGA/CHS microspheres were spherical. The average particle size of the microspheres was $(6.9\pm 5.5)\mu\text{m}$, the electrokinetic potential (ζ potential) was $(10.0\pm 0.6)\text{mV}$. The drug loading capacity and encapsulation efficiency were $(9.3\pm 0.2)\%$ and $(75.4\pm 4.6)\%$, respectively. *In vitro* release studies show that chitosan can decrease the burst release and delay the release of drugs in both simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid. **CONCLUSION** Compared with PLGA microspheres, PLGA/CHS cationic microspheres has higher encapsulation efficiency and loading capacity, and slow-release, while reducing burst release.

KEYWORDS: bovine serum albumin; chitosan; PLGA; microsphere; *in vitro* release

随着生物医药技术的发展, 近年来越来越多的蛋白类药物在诊断、治疗或作为疫苗预防各种疾病方面发挥着重要作用。与小分子药物相比, 此类药物稳定性差、易被酶降解、生物半衰期短, 扩散差、分配系数小, 难以通过生物屏障及脂质膜。如何将这类药物有效的投递到人体相应部位, 一直是制剂研究的热点问题。目前, 生物药物大多以注射用溶液或冻干粉针剂应用于临床, 常需频繁给药, 患者的顺应性差, 治疗费用高, 不能满足日益增长的生

物技术药物的临床应用需求。因此, 研究蛋白质非注射给药的制剂, 将有助于进一步拓宽多肽蛋白类药物的应用范围, 其中, 口服是患者最易接受的给药途径。近年来, 有不少文献报道利用聚酯类合成高分子材料^[1-2](如 PLA, PLGA 等)及天然高分子材料^[3-4](如明胶, 海藻酸钠, 壳聚糖)制备蛋白类药物口服给药制剂。壳聚糖这一天然阳离子聚合物因其良好的生物相容性, 生物可降解性, 生物黏附性^[5]和吸收促进作用^[6]而受到人们的广泛关注。

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(302660); 广东药学院科研基金(启动)项目(2005YKX02); 广东药学院师资队伍建设经费资助

作者简介: 靳美霞, 女, 硕士研究生 Tel: (020)39352117 E-mail: jinmeixia1982@163.com *通信作者: 胡巧红, 女, 博士, 教授 Tel: (020)39352117 E-mail: hu_qiaohong@163.com

本试验采用 W/O/W 复乳-溶剂挥发法,将天然阳离子聚合物壳聚糖直接加入外水相中,制得粒径小于 10 μm 的 BSA PLGA/CHS 阳离子微球,以期包裹在微球表面的壳聚糖可与表面带负电荷的细胞膜相互作用,延长微球在体内滞留时间,增强膜通透性,从而增强黏膜对药物的吸收,提高蛋白口服有效性。本研究将为蛋白类药物的口服制剂的研制奠定基础。

1 材料与仪器

S-3000N 型扫描电镜(日本日立公司); COULTER LS230 粒径分析仪(美国贝克曼公司); 721 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); SHZ-D(III) 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); SHZ-82 气浴恒温振荡器(金坛市富华仪器有限公司); 85-2 恒温磁力搅拌器(金坛市富华仪器有限公司); 微量移液枪(大龙医疗设备有限公司); 生物显微镜 B104LBD(重庆奥特光学仪器有限公司), FJ-200 高速分散匀质机(上海标本模型厂)。

牛血清白蛋白(北京鼎国生物技术有限责任公司); PLGA(lactic/glycolic 50 : 50, $M_r = 10\ 000\ \text{Da}$, 山东省医疗器械研究所); 聚乙烯醇 PVA-124(汕头市本西陇化工厂); 壳聚糖[脱乙酰度 95%, 黏度 < 200 $\text{mpa}\cdot\text{s}$ (1%), 山东奥康生物科技有限公司]; 特定分子量壳聚糖(脱乙酰度 90%, $M_r = 100\ 000\ \text{Da}$, 200 000 Da , 250 000 Da , 浙江金壳生物化学有限公司); 考马斯亮蓝 G-250(上海伯奥生物科技有限公司); 水为蒸馏水; 二氯甲烷、乙醇(95%)及其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 试剂配制

2.1.1 1%壳聚糖于 1%醋酸溶液的配制(pH 4)称取壳聚糖(CHS)4.0 g,加入约 300 mL 水,再加入 4 mL 冰醋酸(HAc),加水稀释至 400 mL,配成 pH 4 的 1% CHS 的 1% HAc 溶液。

2.1.2 1%壳聚糖溶液的配制(pH 5.5) 称取三水合醋酸钠 5.4 g,加入约 50 mL 水使其溶解,滴加冰醋酸至 pH 为 5.5,加入壳聚糖 1.0 g,再加水稀释至 100 mL,配成 pH 5.5 的 1% CHS 溶液。

2.1.3 考马斯亮蓝(CBB)溶液的配制^[7] 准确称取 50 mg CBB G-250,溶于 25 mL 95%乙醇溶液中,加 50 mL 85%磷酸混匀,加水至 500 mL。

2.1.4 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸(HCl)溶液的配制^[8]^[16] 量取

9 mL 浓盐酸,加适量水并稀释至 1 000 mL,配成 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl(pH 1.0)溶液。

2.1.5 pH 7.4 磷酸盐缓冲液配制^[8]^[15] 称取磷酸二氢钾 1.36 g,加 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 79 mL,用水稀释至 200 mL,即得。

2.2 PLGA/CHS 微球的制备工艺优化

PLGA/CHS微球采用W/O/W复乳-溶剂挥发法制备,以一定浓度的BSA水溶液200 μL 作为内水相,将内水相分散在4 mL溶有一定浓度PLGA的二氯甲烷溶液中,高速搅拌(12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)1 min 制得W/O初乳,在搅拌(6 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)下将该初乳缓缓注入含2% PVA和一定浓度壳聚糖溶液的外水相中,继续搅拌(6 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)3 min,形成W/O/W复乳液。室温下,在磁力搅拌器上搅拌3 h挥发溶剂;将所得混悬液离心(6 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)5 min,吸取上层液体;沉淀用水洗涤,离心(4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)5 min,吸取上层液体。合并两次上层液体作为收集液,用蒸馏水定容于100 mL 量瓶。将收集到的沉淀真空干燥后于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。同法制备不含BSA的空白微球,并同法制备外水相中不加壳聚糖的载药PLGA微球。

预实验中初步考察了PLGA浓度、BSA浓度、PVA浓度、CHS浓度、外水相体积、搅拌速度对PLGA/CHS微球特性的影响。在此基础上,选取影响微球包封率和载药量较显著的4个因素即BSA浓度(A)、PLGA浓度(B)、CHS浓度(C)、外水相体积(D)作为正交试验考察因素,以包封率和载药量综合得分作为评价指标。通过 $L_9(3^4)$ 正交试验设计优选最佳的工艺条件。实验设计见表1。

表 1 正交试验因素水平表

Tab 1 Factors and levels in orthogonal experiments

水平	因 素			
	BSA浓度 A/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	PLGA 浓度 B/%	CHS 浓度 C/%	外水相体积 D/mL
1	50	4	0.05	20
2	100	6	0.10	40
3	150	8	0.20	80

按照正交试验设计进行试验, Y_1 表示包封率, Y_2 表示载药量, 综合加权指标 $Y=70\%Y_1+30\%(Y_2 \times 10)$, 正交试验结果见表2。

由表2可知, 各因素对PLGA/CHS微球包封率和载药量的影响顺序为: 外水相体积 > CHS浓度 > PLGA浓度 > BSA浓度。最佳处方为: $A_3B_3C_3D_3$,

表2 正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal experiments

试验号	A	B	C	D	包封率 Y ₁ /%	载药量 Y ₂ /%	综合指 标 Y/%
1	1	1	1	1	16.7	1.4	15.9
2	1	2	2	2	40.6	2.4	35.6
3	1	3	3	3	64.2	2.6	52.7
4	2	1	2	3	32.2	5.4	38.8
5	2	2	3	1	23.2	2.6	23.9
6	2	3	1	2	32.2	2.6	30.5
7	3	1	3	2	26.1	6.7	38.4
8	3	2	1	3	22.9	3.6	42.8
9	3	3	2	1	33.4	3.4	33.5
k ₁	34.75	31.04	29.74	24.46			
k ₂	31.08	34.11	35.99	34.82			
k ₃	38.22	38.90	38.32	44.77			
R	7.15	7.87	8.58	20.30			

即BSA浓度为150 g·L⁻¹, PLGA浓度为8%, 壳聚糖浓度为0.2%, 外水相体积为80 mL。以最佳处方工艺重复制备PLGA/CHS微球3批, 所得微球的粒径为(6.9±5.5)μm, 电动电势为(10.0±0.6) mV, 包封率为(75.4±4.6)%, 载药量为(9.3±0.2)%。

固定BSA浓度、PLGA浓度、外水相体积等其他条件不变, 考察壳聚糖的加入对微球的粒径、电动电势、包封率、载药量的影响。结果见表3。

表3 PLGA微球和PLGA/CHS微球的比较

Tab 3 Comparison of PLGA microspheres and PLGA/CHS microspheres

微球类型	粒径/μm	ζ电势/mV	包封率/%	载药量/%
PLGA微球	15.8±18.8	-10.3±1.1	42.2±5.2	5.4±0.5
PLGA/CHS微球	6.9±5.5	10.0±0.6	75.4±4.6	9.3±0.2

从表3可见, PLGA/CHS微球的粒径小于PLGA微球, 这可能是由于壳聚糖在复乳形成过程中起到了助乳化作用。由于壳聚糖的包裹, 使表面带负电的PLGA微球转变为表面荷正电的阳离子微球。而且, 壳聚糖的加入可以显著提高微球的包封率和载药量($P < 0.05$)。

2.3 微球形态、粒径分布及电动电势

在光学显微镜下初步观察各工艺条件下制得微球的粒径大小及分散状态。对于最佳工艺条件下制得的PLGA/CHS微球, 应用扫描电镜观察表面形态, 并用粒径分析仪测定其粒度分布和ζ电势, 并与相同工艺条件下制得的PLGA微球进行比较。结果见图1和图2。由图1可见, 载药PLGA/CHS微

球呈球形, 表面光滑, 粘连少。由图2可见, 80%以上的载药PLGA/CHS微球粒径小于10 μm。

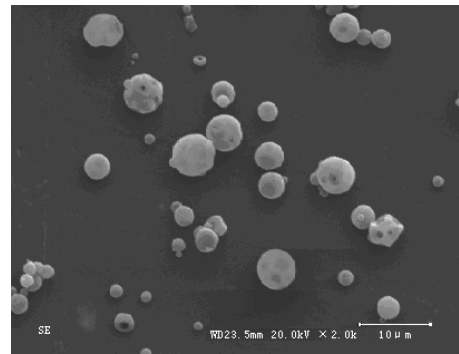


图1 载药PLGA/CHS微球的扫描电镜照片

Fig 1 Scanning electron micrograph of BSA-loaded PLGA/CHS microspheres

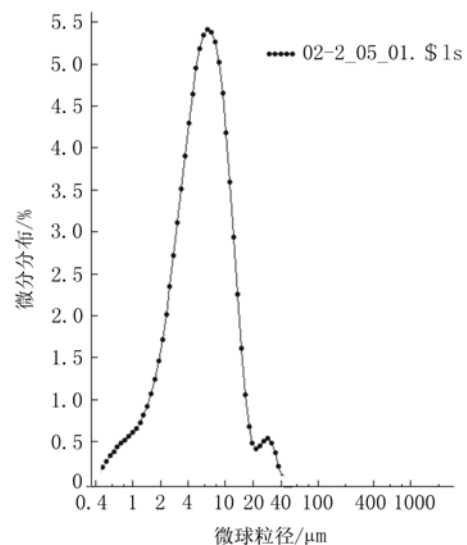


图2 载药PLGA/CHS微球的粒度分布图

Fig 2 Particle size distribution of BSA-loaded PLGA/CHS microspheres

2.4 包封率及载药量的测定

采用考马斯亮蓝染色法^[9]测定微球中的BSA含量。

2.4.1 BSA标准曲线的制作 精密称取BSA 10.0 mg, 加水定容至100 mL, 配成100 μg·mL⁻¹的BSA储备液, 分别吸取50, 100, 200, 300, 400, 500 μL BSA储备液于试管中, 补加水至1 000 μL, 配成浓度为10, 20, 40, 60, 80, 100 μg·mL⁻¹的BSA标准溶液, 以水为空白对照, 各管分别加入CBB试剂5 mL, 混匀, 5 min后, 在波长595.0 nm处测定吸光度A值, 20 min内测完, 以吸光度A对浓度C (μg·mL⁻¹)回归得标准曲线方程: $A = 0.0024C + 0.054$, $r = 0.9998$ 。

2.4.2 样品测定 吸取微球制备中得到的定容后的收集液 5 mL, 离心15 min(转速为15 000 r·min⁻¹),

沉淀除去不溶于收集液中的壳聚糖及未沉淀下来的微球,精密吸取1 000 μL 上清液,加考马斯亮蓝溶液5 mL,静置5 min后,在595.0 nm波长处测定吸收度,20 min内测完。以空白微球取得的收集液同法操作作为空白对照,在595.0 nm波长处无吸收,说明载体材料对含量测定无干扰。按下式计算包封率和载药量。

$$\text{包封率} = \frac{\text{BSA投料量} - \text{收集液中BSA的量}}{\text{BSA投料量}} \times 100\%$$

$$\text{载药量} = \frac{\text{BSA投料量} - \text{收集液中BSA的量}}{\text{微球量}} \times 100\%$$

2.5 体外释放

2.5.1 模拟胃液中的释放 准确称取 40 mg 载药 PLGA/CHS 微球、载药 PLGA 微球、空白微球,分别置于 5 mL 具塞离心管中,加入 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液(pH 1.0)3 mL,旋紧塞子,置于(37±0.5)°C 恒温振荡器中水平振荡,转速 100 r·min⁻¹,于 0.5, 1, 2, 4, 6 h 时取出离心管,离心 3 min(转速 2 000 r·min⁻¹),用移液枪吸取 500 μL 上清液,补加 500 μL 新鲜 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液,继续振摇。上清液用考马斯亮蓝法测定其中 BSA 含量,按下式计算累积释放率。

$$\text{累积释放率} = \frac{\text{模拟胃液中释放的BSA量}}{\text{所用微球的量} \times \text{载药量}} \times 100\%$$

模拟胃液中 PLGA 微球、PLGA/CHS 微球的累积释放曲线见图 3。从图中可以看出,PLGA 微球中药物的释放较快,0.5 h 时释放即达 32.8%,2 h 释放达到 45.2%,突释明显,6 h 释放 46.3%。而 PLGA/CHS 微球能显著减少突释,延缓药物的释放,0.5 h 时的累积释放率为 6.8%,2 h 为 9.3%,6 h 累积释放不到 10%。

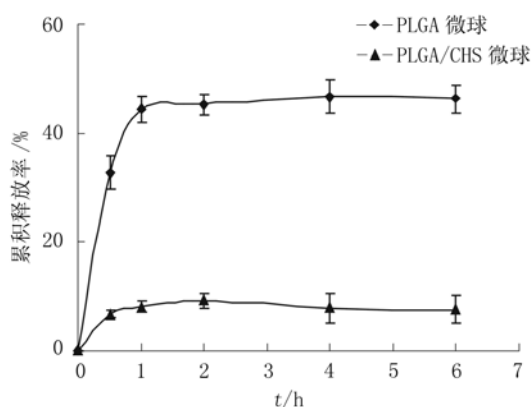


图3 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液(pH 1.0)中 BSA 微球的释放曲线
Fig 3 Release profiles of BSA from microspheres in 0.1 mol·L⁻¹ HCl solution(pH 1.0)

2.5.2 模拟肠液中的释放 准确称取 40 mg 含药 PLGA/CHS 微球、含药 PLGA 微球、空白微球,分别置于 5 mL 具塞离心管中,加入 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 3 mL,旋紧塞子,置于(37±0.5)°C 恒温振荡器中水平振荡,转速 100 r·min⁻¹,于 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 144 h 时取出离心管,离心 3 min(转速 2 000 r·min⁻¹),用移液枪吸取 500 μL 上清液,补加 pH 7.4 磷酸缓冲液 500 μL ,继续振摇。上清液用考马斯亮蓝法测定其中 BSA 含量,按下式计算累积释放率。

$$\text{累积释放率} = \frac{\text{模拟肠液中释放的BSA量}}{\text{所用微球的量} \times \text{载药量}} \times 100\%$$

模拟肠液中 PLGA 微球、PLGA-CHS 微球的累积释放曲线见图 4。从图中可以看出,PLGA 微球在模拟肠液中的释放速度比在模拟胃液中快,0.5 h 时释放即达 57.8%,2 h 释放达到 61.0%,8 h 时达到 64.6%,而后累积释放率略有下降,48 h 后基本保持不变。而 PLGA-CHS 微球能显著减少突释,2 h 时的累积释放率仅为 8.1%,壳聚糖的加入可延缓药物的释放,24 h 的累积释放率仅为 11.2%。

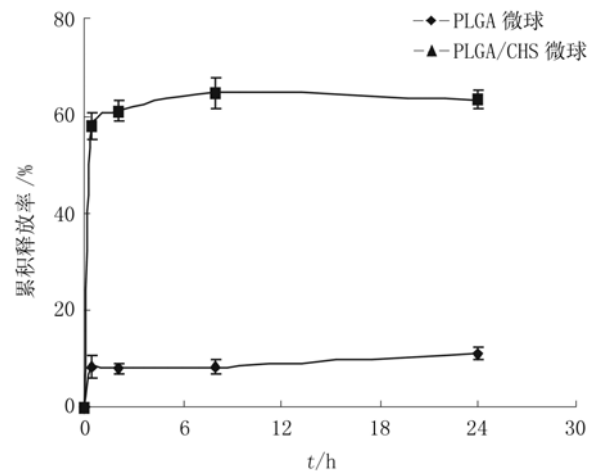


图4 pH 7.4 PBS 中 BSA 微球的释放曲线
Fig 4 Release profiles of BSA from microspheres in pH 7.4 PBS

2.5.3 不同分子量的壳聚糖对 PLGA/CHS 微球中 BSA 体外释放的影响 保持 BSA 浓度、PLGA 浓度、外水相体积及其他条件不变,应用不同分子量的壳聚糖($M_r = 100\ 000$ Da, 200 000 Da, 250 000 Da)制备载药 PLGA/CHS 微球。按“2.5.1”和“2.5.2”项下方法进行载药 PLGA/CHS 微球在模拟胃液和模拟肠液中的释放实验,结果见图 5 和图 6。

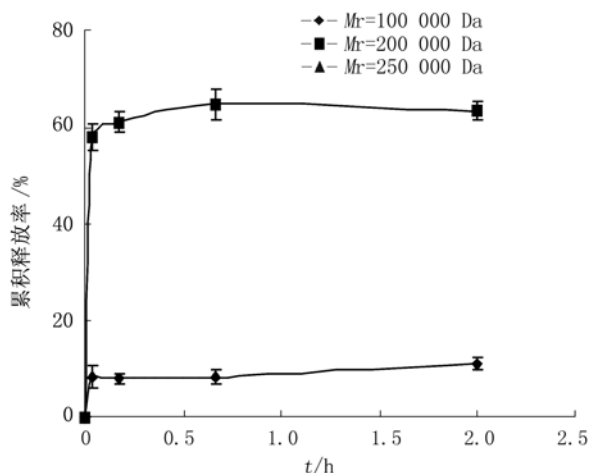


图5 不同分子量的壳聚糖制得的载药 PLGA/CHS 微球在 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液(pH 1.0)中的释放曲线

Fig 5 Release profiles of BSA-loaded PLGA/CHS microspheres prepared with different molecular weight of chitosan in $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl solution(pH 1.0)

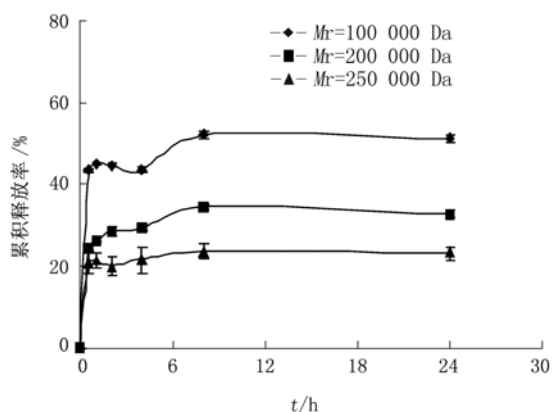


图6 不同分子量的壳聚糖制得的载药 PLGA/CHS 微球在 pH 7.4 PBS 中的释放曲线

Fig 6 Release profiles of BSA-loaded PLGA/CHS microspheres prepared with different molecular weight of chitosan in pH 7.4 PBS

由图 5 和图 6 可知,随着壳聚糖分子量增大,在模拟胃肠液中 BSA 的突释减少,释放变慢。当壳聚糖分子量较小时($M_r=100\ 000$ Da),后续释放变得明显。

2.5.4 壳聚糖溶液的 pH 对 PLGA/CHS 微球中 BSA 体外释放的影响 保持 BSA 浓度、PLGA 浓度、外水相体积、壳聚糖分子量($M_r=100\ 000$ Da)、壳聚糖浓度(0.2%)及其他条件不变,应用不同 pH 的壳聚糖溶液制备载药 PLGA/CHS 微球。考察壳聚糖溶液的 pH 对所制得的载药 PLGA/CHS 微球在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中释放的影响,结果见图 7。应用 pH 5.5 的壳聚糖溶液制备的载药 PLGA/CHS 微球中 BSA 的释放速率慢于 pH 4 的壳聚糖溶液制得的微球。

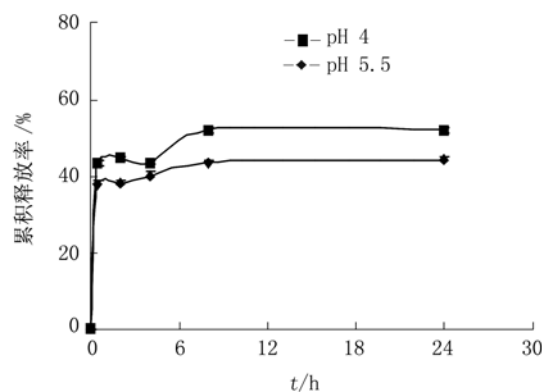


图7 不同 pH 的壳聚糖溶液制得的载药 PLGA/CHS 微球在 pH 7.4 PBS 中的释放曲线

Fig 7 Release profiles of BSA-loaded PLGA/CHS microspheres prepared with different pH of chitosan solution in pH 7.4 PBS

3 讨论

近年来,大量文献报道利用聚酯类合成高分子材料 PLGA 制备蛋白类药物的口服微球。仅以 PLGA 为载体材料制得的微球存在包封率低,突释明显,口服摄入困难等不足。将天然阳离子聚合物壳聚糖加入外水相中制得的 PLGA/CHS 微球,与 PLGA 微球相比具有以下优势:①微球表面带正电,更易接近表面带负电的肠壁,延长在胃肠道滞留时间,提高口服有效性。②溶剂的挥发会使 PLGA 微球表面存在大量孔隙,药物从孔隙扩散导致包封率下降和突释明显。相比之下,PLGA/CHS 微球由于在最外层包裹带正电的亲水凝胶壳聚糖,使大量微球表面的孔隙大部分处于闭合状态,能显著减少药物在制备过程中的渗漏及突释现象。

虽然壳聚糖在模拟肠液 pH 下不溶,但 PLGA/CHS 微球在模拟肠液释放中仍存在不同程度的突释,其可能原因是:①微球表面吸附蛋白被溶解;②壳聚糖分子量越低,突释越严重。壳聚糖的分子量较低时可能使微球表面形成的膜连续性较差,部分蛋白仍可从开放的孔隙中流出。

从体外释放实验中可以看出,改变壳聚糖的分子量可以调节药物的释放速率。随着壳聚糖的分子量增大,释放速率延缓。而改变壳聚糖溶液的 pH 可以一定程度上改变 BSA 的释放速率,这是因为 BSA 的等电点为 4.8,壳聚糖的 pK_a 为 6.3,在 pH 5.5 的条件下,BSA 带负电,壳聚糖带正电,BSA 和壳聚糖之间的静电吸附作用可能会延缓 BSA 的释放;而在 pH 4 的条件下,BSA 和壳聚糖都带正电,不存在这种静电吸附作用,因此释放较快。

PLGA微球和PLGA/CHS微球都存在累积释放不完全的情况,这可能是由于在体外释放过程中:①PLGA降解产物是酸性的,这样可引起微球内部和释放介质pH下降,引发蛋白质的肽键水解和非共价聚集。②水分通过微孔进入微球内部,可加速蛋白质的化学降解。③壳聚糖对蛋白的吸附作用将延缓蛋白的释放。

REFERENCES

- [1] PERUGINI P, GENTA I, CONTI B, et al. PLGA microspheres for oral osteopenia treatment: preliminary “*in vitro*”/“*in vivo*” evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2003, 256(1-2): 153-160.
- [2] OSTERA C G, KIMB N, GRODEB L, et al. Cationic microparticles consisting of poly (lactide-co-glycolide) and polyethylenimine as carriers systems for parental DNA vaccination [J]. *J Control Rel*, 2005, 104(2): 359-377.
- [3] SOHEILA A, FARAMARZ D, MOHAMMAD T, et al. Oral administration of BCG encapsulated in alginate microspheres

induces strong Th1 response in BAL-B /c mice [J]. *Vaccine*, 2007, 25(23): 4595-4601.

- [4] RODRIGUES A P, HIRSCH D, FIGUEIREDO H C P, et al. Production and characterization of alginate microparticles incorporating *Aeromonas hydrophila* designed for fish oral vaccination [J]. *Process Biochem*, 2006, 41(3): 638-643.
- [5] CHAYEDA S, WINNIK F M. *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of polysaccharide-based nanoparticulate oral drug delivery systems [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 65(3): 363-370.
- [6] DODANE V, AMIN K M, MERWIN J R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure [J]. *Int J Pharm*, 1999, 182(1): 21-32.
- [7] CAO W G, ZHAO H Q, JIAO Q C. Mechanism of the interaction between Coomassie Brilliant Blue and Bovine Serum Albumin [J]. *Acta Laser Biol Sin(激光生物学报)*, 2008, 17(1): 32-37.
- [8] Ch.P (2005) Vol II (中国药典 2005 年版. 二部) [S]. 2005: Appendix 161;158.
- [9] LOPEZ J M, IMPERIAL S, VALDERRAMA R, et al. An improved Bradford Protein assay for collagen proteins [J]. *Clin Chim Acta*, 1993, 220(1): 91-100.

收稿日期: 2008-10-14