

# 三种离子物质对壳聚糖/果胶聚电解质复合物 牛血清蛋白释放特性的影响

张立彦, 焦文娟, 包丽坤

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 分别添加氯化钠、硫酸钠、氯化铁制备壳聚糖/果胶聚电解质复合物(PEC), 研究其对牛血清蛋白(BSA)的负载能力及模拟释放行为, 以探讨三种离子物质对壳聚糖/果胶 PEC 在蛋白缓释方面的影响。氯化铁 PEC 对 BSA 的包埋率最大, 其次为硫酸钠、氯化钠, 载药率为氯化钠 PEC 最大、其次为硫酸钠、氯化铁。在单一模拟环境中, 各 PEC 在模拟胃液中的 BSA 累积释放率最小, 在模拟结肠液中最大; 氯化钠会使 PEC 的 BSA 释放率降低, 而硫酸钠与氯化铁则可增大蛋白释放率; 各 PEC 的蛋白释放行为属于 Fick 扩散。在连续模拟环境中, 模拟胃液中 BSA 累积释放率较低, 在模拟肠道环境中 BSA 大量释放, 含有氯化钠的 PEC 累积释放率最低; 在模拟结肠液中含有果胶酶时, 各 PEC 的 BSA 累积释放率可达 98% 以上; 各 PEC 的蛋白释放动力学属于非 Fick 扩散。含有三种离子物质的壳聚糖/果胶 PEC 均具有良好的 pH 敏感性和定点释放特性。

**关键词:** 壳聚糖; 果胶; 聚电解质复合物; 离子; 释放行为

文章编号: 1673-9078(2015)1-37-42

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.008

## The Effects of Three Ionic Species on the BSA Protein Release Properties of Chitosan/Pectin Polyelectrolyte Complexes

ZHANG Li-yan, JIAO Wen-juan, BAO Li-kun

(Collage of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes (PECs) were prepared by adding NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and FeCl<sub>3</sub>, respectively. The bovine serum albumin (BSA) loading efficiency and simulated releasing behavior of PECs were studied and the effects of the three ionic species on the protein release properties of chitosan/pectin PECs were investigated. Results showed that the encapsulation efficiency of FeCl<sub>3</sub> PEC was the highest, followed by Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NaCl; the loading efficiency of NaCl PEC was the highest, followed by Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and FeCl<sub>3</sub>. In single simulation, the BSA accumulative release ratio in the GI tract juices of PECs was the lowest; however, it was the highest in simulated colon juice. The BSA release ratio of PEC was reduced by the addition of NaCl, while the addition of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and FeCl<sub>3</sub> increased the BSA release ratios. The Fick diffusion theory can be used to describe the kinetics of the BSA release behavior of PECs with the three ions. In successive simulations, the BSA accumulative release ratio of PECs in simulated GI tract juices was the lowest, while BSA was released in large quantities in the simulated colon, with NaCl PEC having the lowest accumulative release ratio. The BSA accumulative release ratio of PECs was more than 98% when pectinase was present in simulated colon juice. The release behavior of PECs was the Non-Fick diffusion type. All the chitosan/pectin PECs formed with the three ionic species showed favorable pH sensitivity and site-specific delivery properties.

**Key words:** chitosan; pectin; polyelectrolyte complex; ion; release behavior

聚电解质复合物(PEC)是利用静电作用将聚阳离子化合物和聚阴离子化合物复合而成的一类大分子复合物, 复合方法简单, 成本低廉, 且 PEC 具有良好的亲水性与 pH 敏感特性等特点。由于复合过程无需添加有机试剂或表面活性剂, 尤其适用于高效载 DNA

收稿日期: 2014-06-06

基金项目: 华南理工大学中央高校基本科研业务费项目(2014ZM0070)

作者简介: 张立彦(1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品加工与保藏

或蛋白类带电药物分子。

壳聚糖是一种广泛存在于自然界的聚阳离子化合物, 具有无毒性、抑菌性、生物适应性以及生物降解性。国内外曾对壳聚糖与海藻酸钠<sup>[1]</sup>、卡拉胶<sup>[2]</sup>、羧甲基纤维素和羟基磷灰石<sup>[3]</sup>、果胶<sup>[4]</sup>等物质的复合进行了研究。果胶是一种常见的聚阴离子化合物, 具有亲水性、无毒性、生物适应性和生物降解性等特性, 常与其他多糖复合用于药物缓释系统。

目前, 有关壳聚糖/果胶聚电解质复合物的研究逐

渐增多。Kaur 等人以壳聚糖/果胶 PEC 负载制备口服降压药, 研究发现壳聚糖/果胶 PEC 的溶胀度与果胶含量成正比, 壳聚糖与果胶质量比为 1:4 得到的 PEC 具有最好的生物粘度特性, 模拟释放的释放率达到 98.73%, 活体体外实验结果表明壳聚糖/果胶 PEC 释放药物效果好于常规口服降压药<sup>[5]</sup>。Luppi 等人则将壳聚糖/果胶 PEC 应用于神经药物的鼻腔给药体系<sup>[6]</sup>。Ellen Hagesaether 等人研究了果胶酯化度对壳聚糖/果胶 PEC 的粘度、药物渗透的影响, 结果表明 PEC 的药物释放特性与果胶酯化度无明显关系, 果胶与壳聚糖比例为 1:1 时, 高酯果胶/壳聚糖 PEC 与低酯果胶/壳聚糖 PEC 的粘度存在显著差异<sup>[7]</sup>。张立彦与包丽坤研究了不同离子及用量对壳聚糖/果胶 PEC 得量、溶胀性及结构的影响<sup>[8]</sup>。Chen P-H 等人也研究了添加 CaCl<sub>2</sub> 对壳聚糖及果胶复合的影响<sup>[9]</sup>。但尚没有关于不同离子制备得到的壳聚糖/果胶 PEC 负载特性的研究报道。

鉴于上述, 本试验在壳聚糖与果胶复合过程中添加氯化钠、硫酸钠与氯化铁, 以 BSA 为负载蛋白, 研究制备过程中添加不同离子对所得壳聚糖/果胶 PEC 在药物负载与模拟释放等方面的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

果胶, 购于 Sigma-Aldrich 公司, P9135-100G, 半乳糖醛酸含量不少于 74.0%, 酯化度 70%, 粘均分子量 4 万; 壳聚糖, 购于奥兴生物有限公司, 分子量 50 万; BSA 购于上海伯奥生物科技有限公司; 氯化钠、硫酸钠、氯化铁、盐酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠, 购于天津市福晨化学试剂厂, 分析纯; 考马斯亮蓝 R250, 购于 Enox 公司; 冰乙酸, 购于江苏强盛化工有限公司, 分析纯。

### 1.2 主要仪器设备

752 型紫外-可见分光光度计, 上海现科分光仪器有限公司; XW-80A 高速涡旋仪, 上海精科实业有限公司; TGL-16 超速离心机, 上海安科有限公司; LGJ-10 冷冻干燥机, 北京松源华兴科技发展有限公司; BS224S 分析天平, 德国赛多利斯集团。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 PEC 制备

将壳聚糖溶于 1% 醋酸溶液制得 1% 壳聚糖-醋酸

溶液, 果胶溶于蒸馏水中制得 1% 果胶水溶液, 搅拌至充分溶解。采用注滴法将壳聚糖溶液逐滴加入果胶溶液中, 壳聚糖、果胶质量比为 1:1, 并且在滴加过程中分别加入适量离子溶液, 使得壳聚糖与果胶的复合环境中分别含有 20 mmol/L 氯化钠、40 mmol/L 硫酸钠、30 mmol/L 氯化铁。120 r/min 震荡 1 h, 离心分离胶状复合物, 清洗三次后平铺冻干。

#### 1.3.2 PEC 负载

将冻干的 PEC 膜剪成约 1 cm×1 cm 方块, 精确称重后, 置于 5 mL 浓度为 5 mg/mL BSA 溶液中, 浸泡 5 d 后取出晾干, 采用考马斯亮蓝法测残余 BSA 溶液浓度<sup>[10]</sup>, 并记录残余液体体积。其中, PEC 包埋率与载药率计算公式如下<sup>[11]</sup>:

$$\text{包埋率} = \frac{\text{最初加入蛋白的量} - \text{上清液中蛋白的量}}{\text{最初加入的蛋白的量}} \times 100\%$$

$$\text{载药率} = \frac{\text{最初加入蛋白的量} - \text{上清液中蛋白的量}}{\text{PEC质量}} \times 100\%$$

#### 1.3.3 PEC 模拟释放

将干凝胶装入纤维素透析袋(M 7000~10000 g mol), 置于 50 mL 不同介质中, 在 37 °C、50 r/min 条件下震荡, 每隔半小时取样, 在 280 nm 波长下测溶液中 BSA 浓度。取样后及时补充等体积介质溶液。其中, 释放介质与浸泡时间分别为:

模拟胃液: 0.1 mol/L HCl, pH 1.2, 6 h;

模拟小肠液: 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液, 0.9%, pH 6.8, 6 h;

模拟结肠液: 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.8, 6 h;

模拟口服连续环境: 依次为模拟胃液环境 2 h, 模拟小肠液环境 2 h, 模拟结肠液环境 2 h;

进行连续环境模拟实验时, 在模拟结肠液中添加 100 U/L 的果胶酶, 模拟肠液中的酶水解反应。

#### 1.3.4 动力学分析

对含有三种离子物质的壳聚糖/果胶 PEC 在单一或连续模拟环境中的 BSA 缓释行为进行分析。

#### 1.3.5 数据分析

每组进行三次平行试验。使用 OriginPro 8.0 与 Matlab 7.0 进行图表整理与数据分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PEC 负载

从每种壳聚糖/果胶复合物中随机取 3 个 PEC 膜样品, 测定其对牛血清蛋白的包埋率与载药率。结果

如表 1 所示。

表 1 PEC 包埋率与载药率

Table 1 Encapsulation efficiencies and loading ratios of PECs

添加离子种类	氯化钠	硫酸钠	氯化铁
包埋率/%	76.93±1.61	79.97±1.15	84.12±1.41
载药率/%	13.90±1.71	6.04±1.70	5.54±0.20

由表 1 可知, 三种壳聚糖/果胶 PEC 的包埋率在 75% 至 85% 之间, 添加氯化钠的 PEC 包埋率较低, 添加氯化铁的 PEC 包埋率较高; 添加氯化钠的载药率约是添加氯化铁、硫酸钠的 PEC 载药率的两倍, 氯化铁、硫酸钠的 PEC 载药率相差不明显。说明在同等重量下, 含有氯化钠的壳聚糖/果胶聚电解质 PEC 对牛血清蛋白的负载效果优于添加硫酸钠与氯化铁的。虽然添加氯化钠制得的 PEC 在水中的溶胀度最小, 而氯化铁制得的 PEC 溶胀度远大于添加氯化钠和硫酸钠的 PEC<sup>[8]</sup>, 但可能由于所用氯化钠浓度较低, Cl 对壳聚糖分子中的-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>产生的静电屏蔽作用较小, 利于壳聚糖与带负电的 BSA 结合, 使得载药率较大。包埋率和载药率的差异可能是由于所用 PEC 的质量不同造成的。

## 2.2 PEC 模拟释放

### 2.2.1 三种离子物质对各单一模拟环境中 PEC 缓释行为的影响

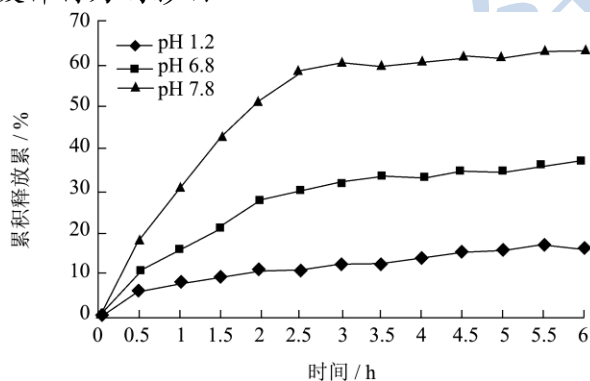


图 1 壳聚糖/果胶 PEC 单一模拟环境中蛋白累积释放率 (氯化钠)

Fig.1 The accumulative release ratios of the chitosan/pectin PEC with NaCl in a single simulated environment

如图 1 至图 3 所示, 三种复合物在模拟胃液 (pH1.2) 中最初半小时内释放速率较快, 但其后逐渐减慢, 虽然在 6h 内一直在持续释放, 但释放率维持在较低的水平; 在模拟小肠液 (pH6.8) 中, 复合物在最初的 2~2.5 h 范围内释放速率较快, 其后变化不大; 而在模拟结肠液 (pH7.8) 中释放速率较快的时间段也是 2.5 h 内, 其后逐渐减慢, 但仍表现缓慢增加的趋势 (除含有氯化钠的复合物外)。总的来说, 各 PEC 在

模拟胃液的累积释放率最小, 在模拟结肠液中的累积释放率最大。这可能是由于在低 pH 环境中, 壳聚糖分子中的氨基 (-NH<sub>2</sub>) 大量质子化而形成较多的 -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, 其与 BSA 发生较强的静电吸附, 即使 PEC 的溶胀度较高也不能促使蛋白质释放。而随着环境中 pH 值升高, 壳聚糖与 BSA 的吸附作用减弱, 释放率增加。所有实验无药物突释现象, 表明壳聚糖/果胶 PEC 适合作为带负电药物结肠定点释放的载体。

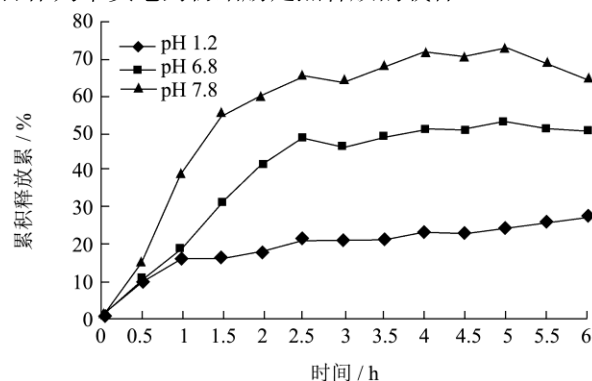


图 2 壳聚糖/果胶 PEC 单一模拟环境中蛋白累积释放率 (硫酸钠)

Fig.2 The accumulative release ratios of the chitosan/pectin PEC with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in a single simulated environment

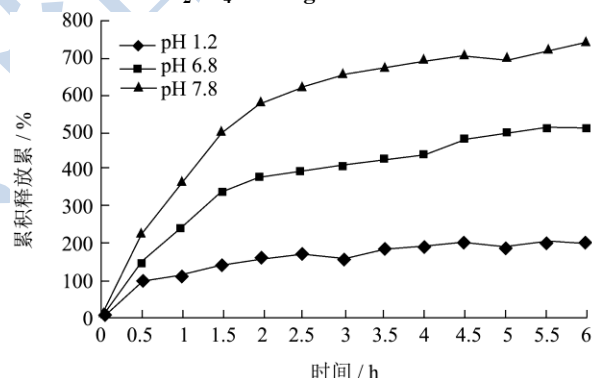


图 3 壳聚糖/果胶 PEC 单一模拟环境中蛋白累积释放率 (氯化铁)

Fig.3 The accumulative release ratios of the chitosan/pectin PEC with FeCl<sub>3</sub> in a single simulated environment

氯化钠不能增大壳聚糖与果胶之间的交联度, 但可使壳聚糖与果胶分子在分子紧缩状态下交联, 形成的复合物结构较为紧密<sup>[12]</sup>, 在模拟胃液和模拟小肠液中溶胀度较低, 复合物网络孔径较小<sup>[8]</sup>, 蛋白释放率低; 在模拟结肠液中, 复合物溶蚀, 蛋白释放率增大。硫酸钠与氯化铁可增大壳聚糖/果胶复合物的交联度, 但在模拟胃液和模拟小肠液中有较大的溶胀度, 在模拟结肠液中发生溶蚀, 因此蛋白释放率较高。有研究表明, 若复合物中有钙离子参与交联, 其在酸性环境中结构稳定, 但在某些生理环境中, 钙离子能够与非交联离子 (如钠离子、钾离子) 发生置换, 在含有磷

酸根的环境下置换反应更加普遍，最终使复合物交联度降低<sup>[13-14]</sup>，增大释药率。同理，三价铁离子在模拟肠液中也容易发生置换反应，加快复合物溶蚀过程，增大蛋白释放率。

### 2.2.2 三种离子物质对连续模拟环境中 PEC 释放行为的影响

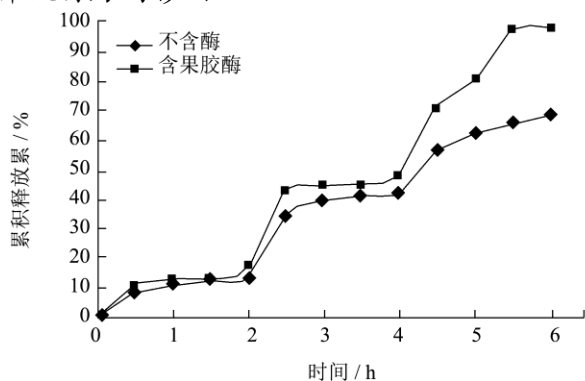


图4 壳聚糖/果胶 PEC 模拟环境中蛋白累积释放率 (氯化钠)

Fig.4 The accumulative release ratios of the chitosan/pectin PEC with NaCl in a continuous simulated environment

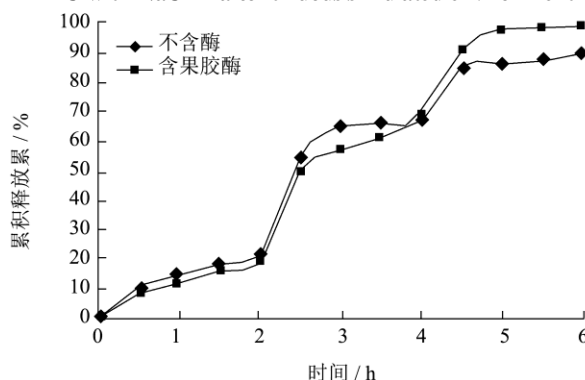


图5 壳聚糖/果胶 PEC 模拟环境中蛋白累积释放率 (硫酸钠)

Fig.5 The accumulative release ratios of the chitosan/pectin PEC with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in a continuous simulated environment

如图4至图6所示，含有氯化钠、硫酸钠、氯化铁的壳聚糖/果胶 PEC 具有 pH 敏感性以及阶段缓释特性。三者模拟胃液、模拟小肠液、模拟结肠液中累积释放率分别为：氯化钠，13.4%、28.8%、26.3%；硫酸钠，22.7%、44.9%、22.9%；氯化铁，20.1%、36.5%、27.1%。模拟结肠环境中存在果胶酶时，果胶被水解，各 PEC 的蛋白累积释放率在 6 h 内增大至 100%。

单独壳聚糖在酸性溶液中易溶胀，载药性差，蛋白类及肽类物质易在胃液中变性，且壳聚糖在小肠中可以被蛋白酶或淀粉酶水解，造成药物释放，从而被小肠内的酶类水解或破坏，损失药性或活性。果胶在酸中也易溃散，造成突释，但在小肠中不易受到蛋白酶的水解，而在结肠中则可以被存在的果胶酶水解，释放大量负载物，实现结肠释放，利于胃及小肠中保持负载物的活性。将壳聚糖与果胶复合后形成的 PEC

在酸液中的溃散和溶胀程度显著降低，在结肠液中则可以大量释放负载物。

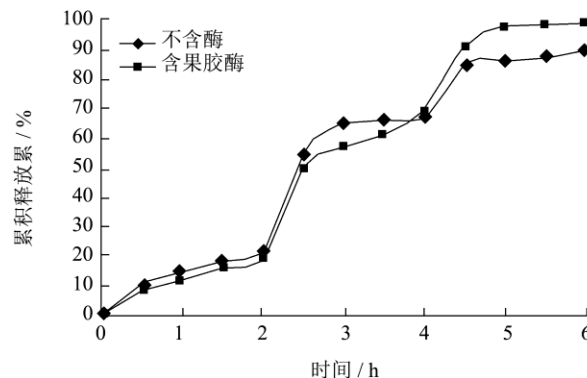


图6 壳聚糖/果胶 PEC 模拟环境中蛋白累积释放率 (氯化铁)

Fig.6 The accumulative release ratios of the chitosan/pectin PEC with FeCl<sub>3</sub> in a continuous simulated environment

### 2.4 PEC 模拟释放动力学

选取六种常用动力学模型对壳聚糖/果胶 PEC 在两种模拟环境中的蛋白释放行为进行拟合，动力学模型参见表 2，其中，F 为 t 时刻复合物累积释放率；k 为各公式累积释放率参数；n、a、b 为释放指数。拟合结果见表 3 和表 4。

表 2 释放动力模型

Table 2 Kinetic models of drug release	
动力学模型	方程
Pappas	$F=kt^n$
Weibull	$F=1-\exp(-at^b)$
Baker and Lonsdale	$2/3[1-(1-(F/100))^{2/3}]-F/100=kt$
First order	$F=100(1-\exp(-kt))$
Higuchi	$F=kt^{0.5}$
Hixson and Crowell	$F=kt^3$

由表 3 和表 4 结果可以看出，各动力学模型中 Weibull 方程的拟合度最好。

研究表明，在 Weibull 方程中，聚合物的药物释放机理与参数 b 密切相关。当 b 小于 0.75 时，为 Fick 扩散，此时，药物浓度及扩散难易程度为释放的主要因素；当 b 值介于 0.75 和 1 之间时，说明药物释放主要受 Fick 扩散和聚合物吸水溶胀影响；当 b 值大于 1 时，药物释放的影响因素较为复杂，受聚合物吸水溶胀、溶蚀以及药物扩散等因素共同作用影响。结合表 3 可知，在单一模拟环境下，各 PEC 在模拟环境中的蛋白释放行为均属于 Fick 扩散。表 4 中，各复合物 Weibull 拟合曲线的 b 值均大于 1，说明三种壳聚糖/果胶 PEC 在连续环境中的药物释放行为较为复杂，受壳聚糖与 BSA 静电吸附作用、壳聚糖/果胶 PEC 溶胀与溶蚀、牛血清蛋白浓度及扩散等多方面因素的影

响。

表 3 单一模拟环境释放行为拟合结果

Table 3 Fitting results of release behavior in a single simulated environment

释放模型	氯化钠			硫酸钠			氯化铁			
	pH 1.2	pH 6.8	pH 7.8	pH 1.2	pH 6.8	pH 7.8	pH 1.2	pH 6.8	pH 7.8	
Pappas	r <sup>2</sup>	0.9723	0.9367	0.8717	0.9554	0.8346	0.7608	0.9487	0.9464	0.9153
	k	0.0786	0.1867	0.3583	0.1464	0.2617	0.4217	0.1236	0.2600	0.4104
	n	0.4280	0.4085	0.3661	0.3275	0.4388	0.3330	0.2932	0.3978	0.3578
Weibull	r <sup>2</sup>	0.9725	0.9459	0.9080	0.9563	0.8636	0.8216	0.9507	0.9587	0.9543
	a	0.0816	0.2042	0.4288	0.1580	0.2927	0.5226	0.1317	0.2965	0.5090
	b	0.4560	0.4867	0.5539	0.3660	0.5943	0.5667	0.3208	0.5153	0.5899
Baker and Lonsdale	r <sup>2</sup>	0.9462	0.8351	0.7244	0.8966	0.7044	0.5860	0.8726	0.8351	0.7780
	k	0.0001	0.0003	0.0004	0.0001	0.0004	0.0004	0.0001	0.0003	0.0004
First order	r <sup>2</sup>	0.1950	0.0451	-0.3093	-0.8025	0.2008	-0.6157	-1.4810	-0.0240	-0.4046
	k	-0.0003	-0.0008	-0.0014	-0.0006	-0.0011	-0.0016	-0.0004	-0.0001	-0.0016
Higuchi	r <sup>2</sup>	0.9540	0.9046	0.7921	0.7784	0.8233	0.1299	0.6318	0.9040	0.8170
	a	0.0714	0.1653	0.3002	0.1167	0.2412	0.3383	0.0942	0.2271	0.3401
Hixson and Crowell	r <sup>2</sup>	-3.8880	-4.2320	-5.1960	-7.1940	-3.1700	-5.6920	-9.5550	-4.4780	-5.7260
	k	0.0011	0.0025	0.0045	0.0018	0.0036	0.0049	0.0035	0.0035	0.0051

表 4 连续模拟环境释放拟合结果

Table 4 Fitting results of release in a continuous simulated environment

释放模型		氯化钠	硫酸钠	氯化铁
Pappas	r <sup>2</sup>	0.9598	0.9545	0.9507
	k	0.1080	0.0412	0.1435
	n	1.0600	1.0980	1.0020
Weibull	r <sup>2</sup>	0.9631	0.9589	0.9612
	a	0.0892	0.0391	0.1088
	b	1.4510	1.2180	1.5470
Baker and Lonsdale	r <sup>2</sup>	0.9516	0.9564	0.9298
	k	0.0578	0.0274	0.0644
First order	r <sup>2</sup>	0.9581	0.9504	0.9508
	k	-0.0012	-0.0005	-0.0014
Higuchi	r <sup>2</sup>	0.7659	0.7461	0.7778
	a	0.2356	0.0948	0.2875
Hixson and Crowell	r <sup>2</sup>	0.3384	0.3758	0.2299
	k	0.0043	0.0017	0.0051

### 3 结论

3.1 通过对添加有氯化钠、硫酸钠、氯化铁的壳聚糖/果胶 PEC 进行 BSA 吸附, 并考察其在模拟胃肠环境中的缓释效果。三种壳聚糖/果胶聚 PEC 的包埋率在 75%至 85%之间, 载药率在 5%至 15%之间, 含氯化钠的 PEC 包埋率最低, 而载药率最高; 含氯化铁的 PEC 包埋率最高, 但载药率最低。

3.2 在单一模拟环境中, 三种壳聚糖/果胶聚电解质 PEC 的蛋白释放具有良好的 pH 敏感性和缓释特性, 释放率在模拟胃酸环境中一直处于较低水平, 在模拟肠液环境中较高。经动力学分析, PEC 在单一模拟环境中的蛋白释放行为属于 Fick 扩散, 蛋白浓度及扩散速率为此释放行为的主要影响因素。

3.3 在连续模拟环境中, 三种壳聚糖/果胶 PEC 具有良好的 pH 敏感性, 在模拟胃液中蛋白累积释放率小于 23%, 而含有氯化钠的 PEC 累积释放率最低。BSA 能够在模拟肠道环境中大量释放, 尤其在果胶酶的存在下, 复合物网络结构破坏程度加剧, 蛋白释放速度快速增大, PEC 适合作为药物或蛋白质、肽类等物质的结肠定点释放载体。经动力学分析, PEC 在连续模拟环境中的蛋白释放行为为受溶胀溶蚀、药物扩散等多种因素共同影响。

### 参考文献

[1] Cárdenas A, Argüelles-Monal W, Goycoolea FM, et al. Diffusion through membranes of the polyelectrolyte complex of chitosan and alginate [J]. Macromolecular Bioscience, 2003, 3(10): 535-539

[2] Hugerth A, Caram-Lelham N, Sundelöf L-O. The effect of charge density and conformation on the polyelectrolyte complex formation between carrageenan and chitosan [J]. Carbohydrate Polymers, 1997, 34(3): 149-156

[3] Jiang L, Li Y, Zhang L, et al. Preparation and characterization

- of a novel composite containing carboxymethyl cellulose used for bone repair [J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2009, 29(1): 193-198
- [4] Kim TH, Park YH, Kim KJ, et al. Release of albumin from chitosan-coated pectin beads in vitro [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, 250(2): 371-383
- [5] Kaur A, Kaur G. Mucoadhesive buccal patches based on interpolymers of chitosan-pectin for delivery of carvedilol [J]. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2012, 20(1): 21-27
- [6] Luppi B, Bigucci F, Abruzzo A, et al. Freeze-dried chitosan/pectin nasal inserts for antipsychotic drug delivery [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2010, 75(3): 381-387
- [7] Hagesaether E, Hiorth M, Sande SA. Mucoadhesion and drug permeability of free mixed films of pectin and chitosan: An in vitro and ex vivo study [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009, 71(2): 325-331
- [8] 张立彦,包丽坤.离子对壳聚糖/果胶聚电解质复合物溶胀性及微观结构的影响研究[J].*现代食品科技*,2013,10(29): 2353-2357  
ZHANG Li-yan, BAO Li-kun. Effects of ions on swelling properties and microstructure of chitosan and pectin polyelectrolyte complexes [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 10(29): 2353-2357
- [9] Chen P-H, Kuo T-Y, Kuo J-Y, et al. Novel chitosan-pectin composite membranes with enhanced strength, hydrophilicity and controllable disintegration [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 82(4): 1236-1242
- [10] 南亚,李宏高.考马斯亮蓝 G-250 法快速测定牛乳中的蛋白质[J].*饮料工业*,2007,10(12):41-44  
NAN Yan, LI Hong-gao. Coomassie brilliant blue G-250 method for rapid determination of protein in milk [J]. *Beverage Industry*, 2007, 10(12): 41-44
- [11] 张杰.蛋白类药物海藻酸盐微胶囊的制备及体外释放行为的研究[D].大连:大连理工大学,2007  
ZHANG Jie. The study on preparation of protein drug alginate microcapsules and release behavior in vitro [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2007
- [12] Metz G, Bour J, Toniazzo V, et al. Deposition of polyelectrolyte multilayer films made from poly (diallyldimethyl ammonium chloride) and poly (4-styrene sulfonate): Influence of the NaCl concentration for films obtained by alternated spraying and alternated dipping [J]. *Colloids and Surfaces A-physicochemical and Engineering Aspects*, 2012, 415: 77-85
- [13] Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64: 194-205
- [14] Lee D, Hwang S, Park J, et al. Preparation and release characteristics of polymer-coated and blended alginate microspheres [J]. *Journal of Microencapsulation*, 2003, 20(2): 179-192