

李煦, 储若晴, 刘欣茹, 等. 负载花色苷的抗酸性羧甲基壳聚糖凝胶微球的缓释研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(15): 152–160.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024020076

LI Xu, CHU Ruqing, LIU Xinru, et al. Sustained Release Properties of Acid Resistant Carboxymethyl Chitosan Gel Microspheres Loaded with Anthocyanins[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(15): 152–160. (in Chinese with English abstract).
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024020076

· 研究与探讨 ·

负载花色苷的抗酸性羧甲基壳聚糖凝胶微球的缓释研究

李 煦, 储若晴, 刘欣茹, 刘长霞, 叶 霞, 范小振*
(沧州师范学院化学与化工系, 河北沧州 061000)

摘 要: 为拓宽壳聚糖基水凝胶的应用范围, 构筑可食用的花色苷 (ACNs) 递送体系, 采用反相乳液法, 以玉米油为连续相, 水杨醛 (SA) 为交联剂, 制备了具有抗酸性能的载 ACNs 羧甲基壳聚糖 (CMCS) 凝胶微球 (ACNs/CMCS-SA), 表征了其结构和形貌, 研究了其稳定性、溶胀性能和缓释性能。结果表明, ACNs/CMCS-SA 具有微米级粒径, 表面光滑呈圆形; ACNs/CMCS-SA 在酸性条件下稳定性良好, 溶胀和缓释过程展现 pH 响应性; ACNs 的释放行为符合 Weibull 模型, pH7 和 9 时为扩散和骨架溶蚀复合释放机制控制, pH3 和 5 时为菲克扩散和 Case II transport (0 级-溶胀依赖性释放) 联合释放机制控制。ACNs/CMCS-SA 制备方法简单, 过程绿色; 对 ACNs 展现良好的胃酸保护和肠道释放性能, 为环境友好型药物包封材料的开发和 ACNs 的应用提供了理论和实践参考。

关键词: 花色苷 (ACNs), 释放性能, 动力学, pH 响应, 反相乳液法, 凝胶微球

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)15-0152-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024020076

本文网刊:



Sustained Release Properties of Acid Resistant Carboxymethyl Chitosan Gel Microspheres Loaded with Anthocyanins

LI Xu, CHU Ruqing, LIU Xinru, LIU Changxia, YE Xia, FAN Xiaozhen*

(Department of Chemistry and Chemical Engineering, Cangzhou Normal University, Cangzhou 061000, China)

Abstract: This study was aimed at broadening the application range of chitosan hydrogels and constructing an edible anthocyanins (ACNs) delivery system. The acid resistant carboxymethyl chitosan (CMCS) gel microspheres (ACNs/CMCS-SA) loaded with ACNs were prepared by inversion-phase emulsion method. During the process, corn oil was used as continuous phase and salicylaldehyde (SA) was used as crosslinking agent. The structure and morphology of ACNs/CMCS-SA were characterized. And the stability, swelling ability and sustained release properties were studied. The results showed that ACNs/CMCS-SA had a micron particle size with smooth and round surface. The gel microspheres showed good acid resistance and pH responsiveness during swelling and sustained release experiments. The sustained release behavior of ACNs conformed to Weibull model. In pH7 and pH9 media, the release process of ACNs was controlled by a combination mechanism of diffusion and skeleton dissolution. In pH3 and 5 media, it was controlled by a combination of Fick diffusion and Case II transport (order 0 grade-swelling dependent release). The preparation method of ACNs/CMCS-SA was simple and green, and the sample exhibited good gastric acid protection and intestinal release performance for ACNs. Therefore, this study lays a theoretical and experimental foundation for the development of environmentally friendly drug encapsulation materials and the application of ACNs.

收稿日期: 2024-02-19

基金项目: 河北省高等学校科学研究项目 (ZC2022044); 沧州师范学院 2023 年度大学生科技创新能力培育专项 (DXSZDL2023002); 沧州师范学院科研创新团队资助 (cxtld1901)。

作者简介: 李煦 (1984-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: lixu_2004@163.com。

* 通信作者: 范小振 (1966-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: fxz0315@126.com。

Key words: anthocyanins (ACNs); release properties; dynamics; pH response; inversion-phase emulsion method; gel microsphere

花色苷(anthocyanins, ACNs)是花青素与糖以糖苷键结合形成的一种类黄酮化合物,具有抗氧化、抗癌等多种生理功能^[1-2],在食品、保健品及生物医药领域具有广阔的应用前景。ACNs 通常由小肠上皮细胞吸收^[3],由于其多酚羟基结构,导致其易受酶、pH、温度等因素影响,在胃消化过程中快速降解^[4-5],无法在生理消化过程中保持稳定。药代动力学研究表明,仅有 0.005%~1.2% 的 ACNs 被吸收到血液中^[6]。因此,保证 ACNs 在消化过程中不被提前降解,并能稳定输送到肠道中非常关键。

设计 ACNs 的生物递送体系,如水凝胶^[7]、脂质体^[8]、微胶囊^[9]等是提高其稳定性的有效方法。脂质体本身稳定性较差,长期贮存易聚集、泄露,且胃肠道半衰期较短,限制了其应用^[10];微胶囊的性能受制备条件影响显著,其中喷雾干燥法受限于 ACNs 的热稳定性^[11],分子包埋法受限于 ACNs 与壁材分子疏水区容纳能力的匹配度^[12]。水凝胶具有三维网络结构,通过物理或化学交联形成,具有溶胀性能和多孔结构^[13],制备方法简单、性能优良。水解氧化淀粉基多孔微凝胶能够显著延长 ACNs 的稳定性,37 ℃ 储存 30 d 后 ACNs 保存率为 31%,为相同条件下溶液中游离 ACNs 残留率的约 5 倍^[14]。一种新型肽基凝胶能够提高 ACNs 不同离子环境如 K^+ 、 Na^+ 以及 Cu^{2+} 中的稳定性能;且在常温暴露于光线 72 h,凝胶中 ACNs 的保留率最高为 81.69%±1.71%,而溶液中游离 ACNs 的保留率仅为 17.73%±2.85%^[15]。上述水凝胶体系虽能提高 ACNs 的稳定性能,但其制备过程中均无法避免地使用次氯酸钠、乙腈等物质,由于食品药品领域对安全性和生

物相容性的严格要求,开发全可食用的递送体系对于花色苷的应用至关重要。壳聚糖基亚胺水凝胶具有低细胞毒性和良好的细胞相容性^[16],适合作为 ACNs 的递送体系,已有研究表明,其能够显著提高 ACNs 的热稳定性能,并展现 pH 响应释放性能^[17]。但壳聚糖水溶性较差,通常需要在酸性条件下才能溶解,限制了壳聚糖基亚胺水凝胶的应用;此外,亚胺键在酸性条件下不稳定,pH<2 时亚胺键断裂,凝胶溶胶^[18],因此壳聚糖基亚胺水凝胶无法在强酸条件下使用。

羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMCS)是壳聚糖羧甲基化产物,水溶性优于壳聚糖,具有生物相容性和可生物降解性^[19],其分子链中的氨基能够与醛基化合物发生席夫碱反应交联形成水凝胶^[20]。CMCS 分子中的羧基在碱性介质中去质子化,分子链延展^[21];在酸性条件下质子化,分子链收缩维持凝胶稳定性,有望解决由于亚胺键断裂造成的凝胶不稳定问题,扩大凝胶在酸性条件下的应用范围。凝胶微球是水凝胶的一种特殊形态,其纳微米尺度的粒径,使其在靶向治疗^[22]、经皮给药^[23]、黏膜给药^[24]中具有潜在应用价值,且在相同条件下更易被机体吸收^[25]。为拓宽壳聚糖水凝胶的应用范围,构筑全可食用的 ACNs 递送体系,采用反相乳液法,选择生物安全性能较好的天然醛水杨醛(salicylaldehyde, SA)为交联剂,玉米油为连续相,制备负载 ACNs 的羧甲基壳聚糖凝胶微球(组装机制见图 1),并对其缓释性能、稳定性能、溶胀性能进行评价,以期利用 CMCS 的两性性能提高凝胶的稳定性能,并为壳聚糖基可食用缓释材料的开发提供新的思路。

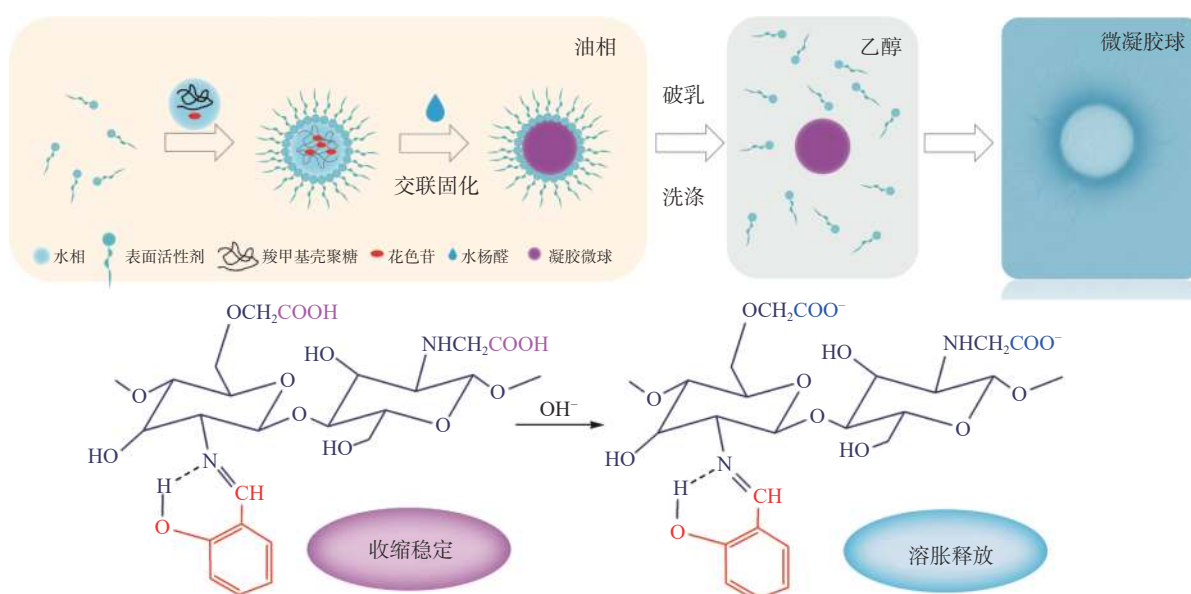


图 1 ACNs/CMCS-SA 的组装及溶胀机理

Fig.1 Assembly and swelling mechanism of ACNs/CSCM-SA

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

羧甲基壳聚糖(总取代度 80%) 上海笛柏生物科技有限公司;水杨醛(98%) 分析纯,北京伊诺凯科技有限公司;玉米油 中粮福临门食品营销有限公司;蓝莓提取物冻干粉(总花色苷含量 25%,矢车菊素-3-O-葡萄糖苷质量分数 6.5%) 西安隆泽生物工程有限公司;矢车菊-3-O-葡萄糖苷标准品(>95%) 色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;磷酸二氢钾、无水乙醇、冰醋酸、氯化钾、无水碳酸钠、醋酸钠、吐温 80 分析纯,天津市永大化学试剂有限公司;磷酸氢二钠 分析纯,天津市化学试剂六厂;浓盐酸 分析纯,天津标准科技有限公司。

FA2004N 型电子天平 上海精密科学仪器有限公司;PHSJ-3F 型实验室 pH 计 上海雷磁仪器厂;RCT basic 型 IKA 磁力加热搅拌器 艾卡(广州)仪器设备有限公司;is5 型傅里叶变换红外光谱仪 赛默飞世尔科技(中国)有限公司;UV-2600 型紫外可见分光光度计 岛津企业管理(中国)有限公司;TM3030 型台式扫描电镜 日本株式会社日立高新技术那珂事业所;TD3000 型 X-射线衍射仪 丹东通达科技有限公司;S90 型纳米粒度及 Zeta 电位仪 英国马尔文仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 凝胶微球的制备 采用反相乳液法^[26]制备凝胶微球。

CMCS-SA 的制备:取 15 mL 玉米油,加入 0.6 mL 吐温 80,室温下磁力搅拌 8 min,转速 1500 r/min。滴入 15 mL 1.0wt% 的羧甲基壳聚糖(CMCS)水溶液,滴加速度 2 d/s,滴加完成后继续搅拌 10 min。继续加入 0.6 mL 水杨醛(SA),室温下磁力搅拌 1.5 h,充分交联。然后在上述乳液中加入 70 mL 无水乙醇,在冰水浴中破乳 30 min,转速 1500 r/min。离心,保留凝胶层,用无水乙醇洗涤 3 次,得到羧甲基壳聚糖-水杨醛凝胶微球(CMCS-SA)。

ACNs/CMCS-SA 的制备:称取 0.0700 g 蓝莓提取物冻干粉,溶解于 15 mL 1.0wt% 的 CMCS 水溶液中,制得含有 ACNs 的 CMCS 溶液。取 15 mL 玉米油,加入 0.6 mL 吐温 80,室温下磁力搅拌 8 min,转速 1500 r/min。滴入含有 ACNs 的 CMCS 溶液,滴加速度 2 d/s,滴加完成后继续搅拌 10 min。继续加入 0.6 mL SA,室温下磁力搅拌 1.5 h,充分交联。然后在上述乳液中加入 70 mL 无水乙醇,在冰水浴中破乳 30 min,转速 1500 r/min。离心,保留凝胶层,用无水乙醇洗涤 3 次,得到载花色苷羧甲基壳聚糖-水杨醛凝胶微球(ACNs/CMCS-SA)。

1.2.2 ACNs 包埋率的测定 按 1.2.1 中方法,保持其他制备条件不变,制得油水比(v:v)分别为 0.5:1、1:1、1.5:1、2:1、2.5:1 的 ACNs/CMCS-SA,按式(1)计算 ACNs 包埋率^[27]。

$$\text{包埋率}(\%) = \left(1 - \frac{C_{\text{上}} \times V_{\text{上}}}{m \times n}\right) \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: $C_{\text{上}}$ 为第一次破乳、离心后的上清液中矢车菊-3-O-葡萄糖苷的浓度,mg/mL; $V_{\text{上}}$ 为第一次破乳、离心后的上清液体积,mL; m 为蓝莓提取物冻干粉添加质量,mg; n 为蓝莓提取物冻干粉中矢车菊-3-O-葡萄糖苷的质量分数(6.5%);其中 $C_{\text{上}}$ 利用标准曲线测定。

标准曲线的绘制方法:将 0.005 g 的矢车菊-3-O-葡萄糖苷粉末溶于无水乙醇,定容于 25 mL 容量瓶,分别稀释到 0.02、0.04、0.08、0.12、0.20 mg/mL。使用紫外分光光度计进行紫外-可见光扫描,得到矢车菊-3-O-葡萄糖苷最大吸收波长为 536 nm;在此波长下进行标准曲线的绘制。标准曲线回归方程式为 $y = -0.20976 + 20.33876x$, $R^2 = 0.99965$ 。

1.2.3 表征方法 SEM 表征:分别取适量不同油水比的 ACNs/CMCS-SA 均匀分散在无水乙醇中,使用硅片分别蘸取上述凝胶微球样品,自然干燥,粘贴到导电胶上,喷金 60 s,观察形貌。

粒度及 Zeta 电位测定:取适量 ACNs/CMCS-SA 均匀分散在蒸馏水中,测定平均粒径和 Zeta 电位,测试温度 25 ℃,分散相为水(折射率 1.33),每个样品自动测定 3 次。

FT-IR 表征:分别取适量 CMCS-SA 和 ACNs/CMCS-SA,加入少量无水乙醇,用磁力搅拌器搅拌至均匀溶液后倒入聚四氟乙烯模具,自然干燥成薄膜^[17];将 ACNs、CMCS、SA 分别与 KBr 粉末以 1:100 的质量比混合研磨至均匀粉末,装入模具,15 MPa 下保持 30 s 压成薄片。在 4000~500 cm^{-1} 范围内扫描,分辨率 4 cm^{-1} ,测绘上述样品的 FT-IR 图谱。

UV-Vis 表征:分别取适量 CMCS-SA、ACNs/CMCS-SA 滴入 0.1 mm 石英比色皿中;取 2 mL ACNs 水溶液于 1 cm 石英比色皿中,在波长 200~700 nm 范围测绘上述样品 UV-Vis 图谱。

XRD 表征:分别取适量 CMCS-SA、ACNs/CMCS-SA,少量多次均匀涂于载玻片上,自然干燥成膜^[18];取适量 CMCS 充分研磨、压片。采用 Cu-ka ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) 辐射,扫描范围 3°~50°,电压 30 kV,电流 20 mA,扫描速率 0.01°/s,测绘上述样品 XRD 图谱。

1.2.4 稳定性能测定方法 分别取适量 CMCS-SA 和 ACNs/CMCS-SA 均匀分散在蒸馏水中,常温、日常光照条件,每间隔 5 d 测定粒径和 Zeta 电位。

1.2.5 溶胀性能测定方法 将 ACNs/CMCS-SA 置于培养皿中,自然干燥 48 h,制得 ACNs/CMCS-SA 干凝胶。分别取 20 mL pH3、5、7、9 的溶液于烧杯中,准确称取一定质量的 ACNs/CMCS-SA 干凝胶,分别放入上述不同 pH 溶液中,每隔一段时间取出,用滤纸擦干表面水分,称重,按式(2)计算溶胀率 SR。

$$SR(\%) = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中: m_0 为干凝胶质量, g; m_1 为溶胀之后凝胶质量, g。

1.2.6 缓释性能测定方法及释放动力学研究 分别取多份 ACNs/CMCS-SA 干凝胶, 称重; 将干凝胶分别浸于 50 mL pH3、5、7、9 的溶液中, 取 2 mL 溶液于石英比色皿中, 测定释放时间为 0~1440 min 内的溶液吸光度, 并利用标准曲线(见表 1), 计算溶液浓度, 按式(3)计算 ACNs 累计释放率 Q 。

$$Q(\%) = \frac{c_n \times V}{m} \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

式中: c_n 为第 n 次溶液中 ACNs 的浓度, mg/mL; V 为浸泡溶液的体积, mL; m 为凝胶微球中负载的 ACNs 质量, mg。

表 1 标准曲线及线性相关度

Table 1 Standard curve and linear correlation

pH	标准曲线	R^2
3	$y=34.7385x+0.0321$	0.99927
5	$y=3.189x+0.0320$	0.99938
7	$y=4.437x+0.0146$	0.99903
9	$y=5.841x+0.0129$	0.99959

释放动力学方程拟合: 分别利用不同方程拟合释放过程, 见式(4)~(8), 研究不同 pH 对 ACNs/CMCS-SA 中 ACNs 释放行为的影响。

$$\text{准一级动力学方程: } \ln(1 - Q/Q_e) = -kt \quad \text{式 (4)}$$

$$\text{准二级动力学方程: } \frac{t}{Q} = \frac{1}{kQ_e^2} + \frac{t}{Q_e} \quad \text{式 (5)}$$

$$\text{Higuchi方程: } Q = kt^{1/2} + b \quad \text{式 (6)}$$

$$\text{Weibull方程: } Q/Q_e = 1 - \exp(-kt^d) \quad \text{式 (7)}$$

$$\text{Pepaas方程: } Q = kt^n \quad \text{式 (8)}$$

式中: Q 为 t 时刻 ACNs 的累计释放率; Q_e 为平衡时 ACNs 的累计释放率; t 为释放时间, min; k 为动力学常数; b 为参数; d 为形状参数; n 为表征扩散机制的指数。

1.3 数据处理

性能测定实验重复 3 次, 数据结果用“平均值±标准差”表示; 通过 SPSS 27 软件采用事后比较 Duncan 法进行单因素方差分析, $P < 0.05$, 认为差异显著; 采用 Origin 2018 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 油水比对凝胶包埋率的影响

油水比对 ACNs 包埋率的影响如图 2 所示, 油水比对 ACNs 包埋率有显著影响($P < 0.004$)。随油水比增加, ACNs 包埋率呈先增加后下降的趋势, 油水比 1:1 时 ACNs 包埋率最高, 为 $46.84\% \pm 1.46\%$ 。

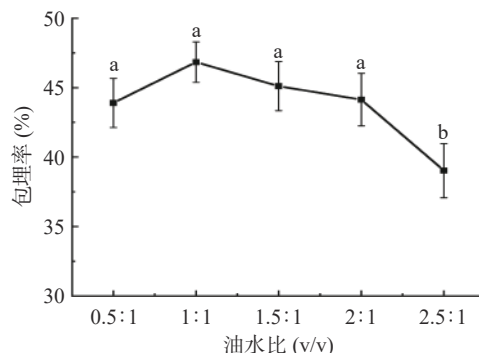


图 2 油水比对 ACNs 包埋率的影响

Fig.2 Effect of oil-water ratio on the embedding rate of ACNs
注: 图中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 图 4、图 8 同。

2.2 油水比对凝胶微球形态的影响

不同油水比 ACNs/CMCS-SA 的形态表征结果如图 3、图 4 所示。图 3 中 ACNs/CMCS-SA 均呈现圆球形态, 尺寸较为均匀, 油水比 1:1、1.5:1、2:1 时 ACNs/CMCS-SA 表面更加光滑、饱满。由图 4 可以看出, 油水比对 ACNs/CMCS-SA 粒径有高度显著影响($P < 0.001$)。油水比为 0.5:1 时, 由于油相体积较小, 无法实现对水相微滴的很好包覆; 油水比 $> 1:1$ 时, 随油相体积的增加, 单个水相微滴越小, 水相微滴碰撞长大的机会也越少^[28]。油水比 1:1 时 ACNs/CMCS-SA 粒径最大, 其大小为 931.80 ± 61.67 nm, 可能为 ACNs 的包埋提供了更大的空间, 正如 2.1 中油水比 1:1 时 ACNs/CMCS-SA 具有最高的包埋率。

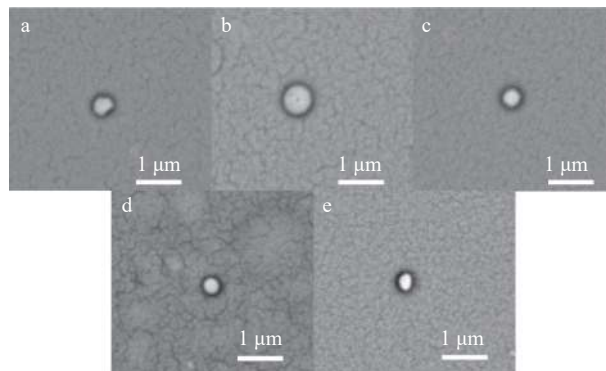


图 3 不同油水比 ACNs/CMCS-SA 的 SEM 表征

Fig.3 SEM characterization results of ACNs/CMCS-SA with different oil-water ratio

注: a~e 分别为油水比为 0.5:1、1:1、1.5:1、2:1、2.5:1 的 ACNs/CMCS-SA。

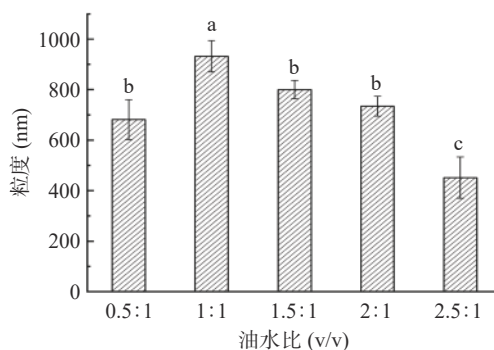


图 4 油水比对 ACNs/CMCS-SA 粒度的影响

Fig.4 Effect of oil-water ratio on particle size of ACNs/CMCS-SA

2.3 FT-IR 表征

SA、CMCS、CMCS-SA、ACNs/CMCS-SA、ACNs 的 FT-IR 见图 5。图 5a 中 2847 cm^{-1} 和 2750 cm^{-1} 处为 SA 醛基 C-H 伸缩振动峰。由 CMCS-SA、ACNs/CMCS-SA 的 FT-IR 表征(图 5c、d)可知,形成凝胶微球后,醛基 C-H 伸缩振动峰消失, 1627 cm^{-1} 处出现亚胺键 C=N 伸缩振动峰,说明 SA 与 CMCS 发生缩合反应生成了亚胺键。图 5d 中 1275 cm^{-1} 和 1152 cm^{-1} 处特征峰分别归于酚羟基面内弯曲振动特征峰和 ACNs 上 C-O-C 对称伸缩振动特征峰^[29],说明 ACNs 被有效包埋在 CMCS-SA 中。此外图 5b、c、d 上 1410 cm^{-1} 处羧基 O-H 面内弯曲振动特征峰逐渐减小,是由于凝胶微球的形成和 ACNs 的负载使体系中羧基含量减少的结果。

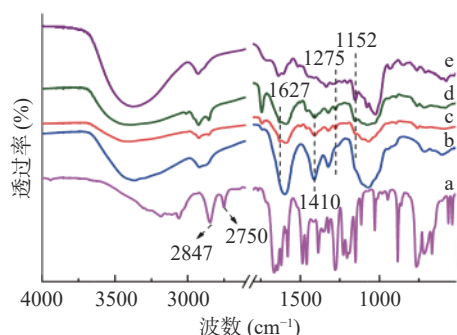


图 5 SA、CMCS、CMCS-SA、ACNs/CMCS-SA 和 ACNs 的 FT-IR 表征

Fig.5 FT-IR spectra of SA, CMCS, CMCS-SA, ACNs/CMCS-SA, and ACNs

注: a: SA; b: CMCS; c: CMCS-SA; d: ACNs/CMCS-SA; e: ACNs。

2.4 UV-Vis 表征

图 6a 中, ACNs 在波长 537 nm 处出现多羟基黄酮类化合物特征吸收峰^[30]。图 6b 中 CMCS-SA 在 322 nm 处吸收峰归属于苯环, 392 nm 处吸收峰归属于 SA-亚胺的酮胺。图 6c 中上述特征峰均出现红移,说明 CMCS-SA 负载 ACNs 过程中, SA 结构中的苯环和 ACNs 黄烊盐发色团(糖苷配基发色团)错位平行排布,即发生了 J-聚集^[14]。

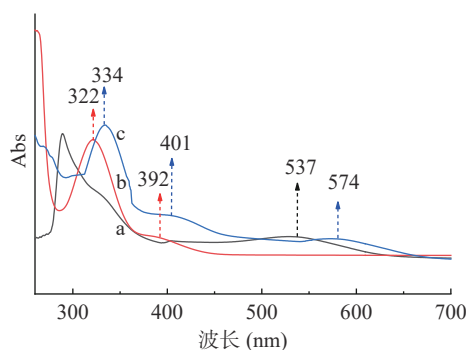


图 6 ACNs、CMCS-SA 和 ACNs/CMCS-SA 的 UV-Vis 表征

Fig.6 UV-Vis spectra of ACNs, CMCS-SA, and ACNs/CMCS-SA
注: a: ACNs; b: CMCS-SA; c: ACNs/CMCS-SA。

2.5 XRD 测定

由 CMCS 的 XRD 图谱(图 7a)可知, $2\theta=20.2^\circ$ 处衍射峰对应相邻糖链的规则排布。由 CMCS-SA 的 XRD 图谱(图 7b)可知,凝胶微球形成后, SA 的苯环进入糖链间,影响了 CMCS 分子链排布,衍射峰消失。由 ACNs/CMCS-SA 的 XRD 图谱(图 7c)可知,包埋 ACNs 后,在 $2\theta=17.9^\circ$ 处出现新的相邻糖链衍射峰,这是由于花色苷母核苯并吡喃环与 SA 的苯环间隔有序排布,且 ACNs 的包埋使得糖链间的距离增大,正如 UV-Vis 表征(图 6)发现, SA 结构中的苯环和 ACNs 黄烊盐发色团发生了 J-聚集。

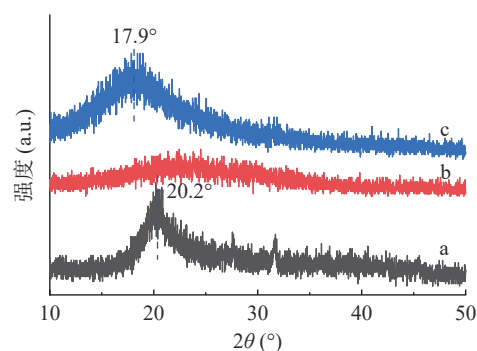


图 7 CMCS、CMCS-SA 和 ACNs/CMCS-SA 的 XRD 表征
Fig.7 X-ray diffraction patterns of CMCS, CMCS-SA, and ACNs/CMCS-SA

注: a: CMCS; b: CMCS-SA; c: ACNs/CMCS-SA。

2.6 胶体稳定性

CMCS-SA 和 ACNs/CMCS-SA 的 Zeta-电位和粒径随储存时间变化情况见图 8。由图 8 可知,随储

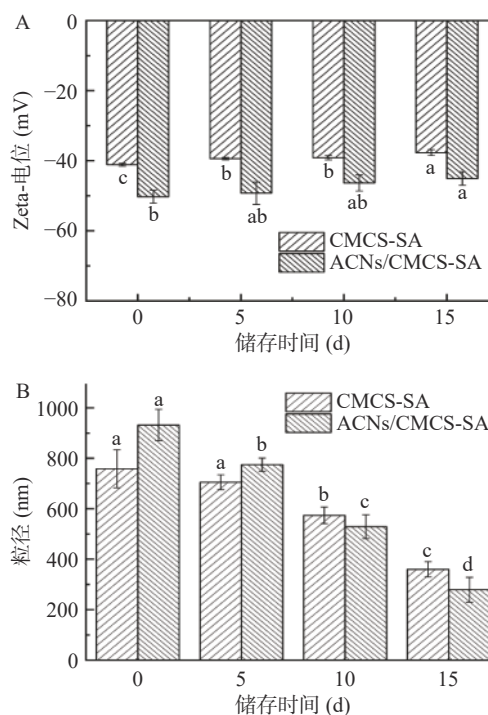


图 8 CMCS-SA 和 ACNs/CMCS-SA 的 Zeta-电位(A)、粒径(B)随时间变化情况

Fig.8 Changes in Zeta-potential (A) and particle size (B) of CMCS-SA and ACNs/CMCS-SA over time

存时间增加,分散在蒸馏水中的 CMCS-SA 和 ACNs/CMCS-SA Zeta-电位绝对值和平均粒径均呈现下降趋势。由图 8A 可知,新制 CMCS-SA 和 ACNs/CMCS-SA 的 Zeta-电位分别为 -41.1 ± 0.4 mV 和 -50.3 ± 1.9 mV; 15 d 后降低为 -37.7 ± 0.86 mV 和 -45.1 ± 1.90 mV, 呈负电体系,说明凝胶微球在水中稳定存在且分散均匀。由图 8B 可知,新制 CMCS-SA 和 ACNs/CMCS-SA 的平均粒径分别为 758.57 ± 75.37 nm 和 931.80 ± 61.67 nm, 储存 15 d 后显著降低 ($P < 0.05$) 为 360.07 ± 30.25 nm 和 278.60 ± 49.21 nm, 这可能由于凝胶球在水溶液长期储存溶胀破裂。此外,CMCS-SA 在储存过程中没有明显颜色变化,呈乳黄色,但 ACNs/CMCS-SA 的颜色随储存时间增加逐渐褪色,呈现由粉色到淡黄色的变化,这可能由于 ACNs 在光照条件下不稳定,凝胶微球在水中逐渐破裂对 ACNs 保护作用减弱,导致 ACNs 逐渐降解所致^[31]。

2.7 溶胀性能

凝胶微球的溶胀性能与其稳定性能密切相关,且是其应用于食药领域的关键性能指标之一。在 pH3、5、7、9 介质环境中对 ACNs/CMCS-SA 进行溶胀性能测定,见图 9。由图 9 可知,ACNs/CMCS-SA 的溶胀性能展现 pH 响应性,ACNs/CMCS-SA 在 pH3、5、7、9 介质环境中 132 min 的溶胀率分别为 $20.16\% \pm 8.08\%$ 、 $26.68\% \pm 3.71\%$ 、 $46.85\% \pm 10.08\%$ 和 $350.96\% \pm 79.76\%$ 。ACNs/CMCS-SA 的溶胀性能受亚胺键的 pH 响应性和 CMCS 的两性作用共同影响。碱性介质(pH9)中,亚胺键保持凝胶微球结构稳定,CMCS 分子中的羧基去质子化,凝胶网络膨胀,此时溶胀率较大^[21];强酸性介质(pH3)中,亚胺键部分断裂,但 CMCS 分子中的羧基质子化,分子链收缩,疏水作用占主导,保持凝胶微球的结构稳定,此时溶胀率最小;中性介质(pH7)中,亚胺键稳定性较强,且 CMCS 分子中的羧基难以电离出氢离子,因此,此时凝胶稳定性较强,溶胀率较小。

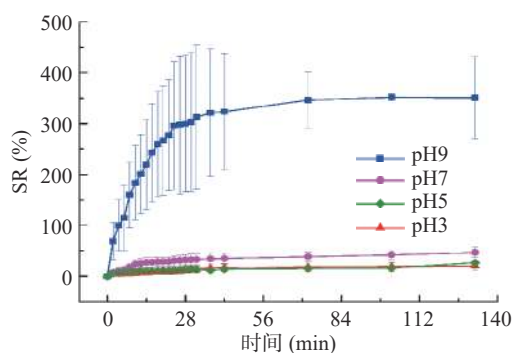


图 9 不同 pH 介质中 ACNs/CMCS-SA 的溶胀性能
Fig.9 Swelling performance of ACNs/CMCS-SA with different pH

2.8 缓释性能

ACNs/CMCS-SA 的缓释性能通过 ACNs 的累

计释放率表征,见图 10。由图 10A 可知,ACNs/CMCS-SA 累计释放率随 pH 增加而增加,在 pH3、5、7 和 9 介质中,24 h 累计释放率分别为 $16.21\% \pm 8.06\%$ 、 $58.99\% \pm 1.25\%$ 、 $81.07\% \pm 6.52\%$ 和 $86.58\% \pm 6.05\%$, 展现了 pH 响应性能。随时间延长,ACNs 累计释放率呈现先增大后趋于平衡的规律。考虑到胃肠中的食物留存时间,比较了不同介质中 140 min 内 ACNs/CMCS-SA 累计释放率,见图 10B。pH3 介质中 ACNs 2 h 累计释放率较低,说明 ACNs/CMCS-SA 在胃 pH 条件下能够较好保护 ACNs。pH9 介质中 ACNs 140 min 快速释放,说明 ACNs 在肠 pH 条件下能够较好释放,对 ACNs 的肠道吸收有利。此外,pH7 时 ACNs/CMCS-SA 的缓释性能较强,而溶胀率仅为 $46.85\% \pm 10.08\%$ (图 9),说明 ACNs/CMCS-SA 在中性条件下稳定存在的同时,具有较强的释放性能。

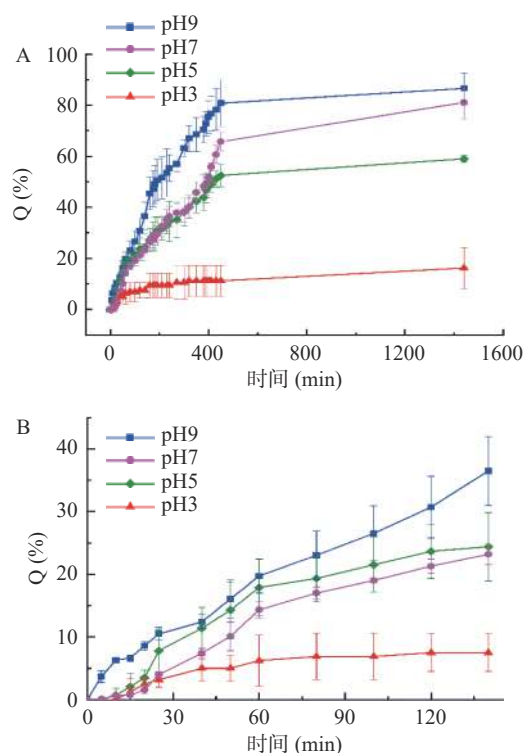


图 10 不同 pH 介质中 ACNs/CMCS-SA 24 h 累计释放性能 (A)、140 min 累计释放性能(B)

Fig.10 Sustained release performance of ACNs/CMCS-SA with different pH in 24 h (A) and in 140 min (B)

为进一步阐明 ACNs/CMCS-SA 中 ACNs 的释放机制,采用准一级动力学方程、准二级动力学方程、Higuchi 模型、Weibull 模型以及 Peppas 模型对不同 pH 条件下 ACNs/CMCS-SA 中 ACNs 释放行为进行拟合,结果见表 2。其中,Weibull 模型方程对于不同 pH 介质条件下 ACNs/CMCS-SA 的释放行为有较好拟合结果 ($R^2 = 0.96 \sim 0.98$), 这说明 Weibull 模型最适合描述 ACNs/CMCS-SA 的释放行为。Weibull 模型具有扩展指数的形式,常用于药物释放和溶出研究^[32],其释放机制与 d 值相关。d 值大于

1.0 时,说明包埋药物为扩散和骨架溶蚀复合释放机制; d 值在 0.75~1.0 时,说明包埋药物为菲克扩散和 Case II transport 联合释放机制^[33],其中 Case II transport 表示药物释放为 0 级-溶胀依赖性释放^[34]。

表 2 不同 pH 介质中 ACNs/CMCS-SA 的释放动力学拟合
Table 2 Fitting of release kinetics of ACNs/CMCS-SA in different pH media

模型	pH	动力学方程	R ²
准一级动力学	3	$Q = 16.42859 \times [1 - \exp(-0.00341t)]$	0.85529
	5	$Q = 60.10736 \times [1 - \exp(-0.00375t)]$	0.98782
	7	$Q = 87.09679 \times [1 - \exp(-0.00225t)]$	0.96131
	9	$Q = 92.63497 \times [1 - \exp(-0.00385t)]$	0.98620
准二级动力学	3	$Q = 1/(0.06522 + 8.20357/t)$	0.97157
	5	$Q = 1/(0.013127 + 3.60852/t)$	0.98274
	7	$Q = 1/(0.01095 + 5.5337/t)$	0.95342
	9	$Q = 1/(0.01093 + 2.8222/t)$	0.92891
Higuchi	3	$Q = 0.49999x^{1/2} + 1.27631$	0.88889
	5	$Q = 2.13893x^{1/2} - 0.51062$	0.90484
	7	$Q = 2.72027x^{1/2} - 6.9491$	0.93998
	9	$Q = 3.3087x^{1/2} - 0.48994$	0.87031
Weibull	3	$Q = 16.02433[1 - \exp(-0.00383 \times t^{0.75938})]$	0.96857
	5	$Q = 61.23770[1 - \exp(-0.00361 \times t^{0.95239})]$	0.98795
	7	$Q = 83.63356[1 - \exp(-0.00249 \times t^{1.10303})]$	0.98388
	9	$Q = 88.78055[1 - \exp(-0.00419 \times t^{1.2779})]$	0.98854
Peppas	3	$Q = 1.20615t^{0.37321}$	0.93407
	5	$Q = 2.80277t^{0.45177}$	0.91248
	7	$Q = 1.6066t^{0.56213}$	0.92322
	9	$Q = 4.46135t^{0.44780}$	0.87933

pH7 和 9 时, ACNs/CMCS-SA 的 Weibull 模型方程 d 值均大于 1.0,说明此时 ACNs 的释放为扩散和骨架溶蚀复合释放机制控制,正如图 9 中所示, pH7 和 9 介质中凝胶球溶胀率较大。此时影响 ACNs 释放的主要因素包括凝胶微球表面 ACNs 的释放扩散、凝胶微球内外浓度差引起的以渗透压为驱动力的扩散;以及由于凝胶微球骨架松弛、溶胀破裂导致的 ACNs 由内向外转移。

pH 3 和 5 时, ACNs/CMCS-SA 的 Weibull 模型方程 d 值均在 0.75~1.0 范围之间,说明此时 ACNs 的释放为菲克扩散和 Case II transport(0 级-溶胀依赖性释放)联合释放机制控制。此时 ACNs 以均匀的速率稳定释放,其主要影响因素为介质渗入凝胶微球导致其松弛溶胀^[35]和凝胶微球内外浓度差。

此外,通过 Weibull 模型也可求出平衡时 ACNs 的累计释放率,在 pH3、5、7 和 9 介质中,平衡时 ACNs 的累计释放率分别为 16.02%±1.15%、61.24%±2.03%、83.63%±3.36% 和 88.78%±2.64%。

有研究表明,ACNs 水凝胶在给药系统中的应用几乎没有毒性^[36];ACNs 抗炎、促进伤口愈合等生理活性在其负载于水凝胶体系时依然存在,且有动物实验表明,ACNs 水凝胶在细胞或动物模型中表现出比游离 ACNs 更好的生物活性^[37]。在课题组的前期研

究中构筑了壳聚糖-水杨醛 pH 响应水凝胶包埋 ACNs^[17],凝胶在酸性条件下不稳定,ACNs 的释放主要受扩散作用影响。本文中 ACNs/CMCS-SA 在较宽 pH 范围内稳定,尤其对 ACNs 展现良好的胃酸保护和肠道释放性能,有望为 ACNs 应用提供新思路。

3 结论

采用反相乳液法,制备了抗酸性载 ACNs 凝胶微球 ACNs/CMCS-SA。ACNs/CMCS-SA 具有均匀的微米级粒径,通过物理作用实现对 ACNs 的有效包埋;在酸性条件下稳定性良好,溶胀和缓释过程展现 pH 响应性;ACNs/CMCS-SA 的溶胀性能受亚胺键的 pH 响应性和 CMCS 的两性作用共同影响;ACNs/CMCS-SA 对 ACNs 的释放行为符合 Weibull 模型, pH7 和 9 时,ACNs 的释放为扩散和骨架溶蚀复合释放机制控制,其主要影响因素既包括凝胶微球表面 ACNs 的释放扩散、凝胶微球内外浓度差引起的以渗透压为驱动力的扩散,又包括由于凝胶微球骨架松弛、溶胀破裂导致的 ACNs 由内向外转移; pH3 和 5 时,ACNs 的释放为菲克扩散和 Case II transport(0 级-溶胀依赖性释放)联合释放机制控制,其主要影响因素为介质渗入凝胶微球导致其松弛溶胀和凝胶微球内外浓度差。

ACNs/CMCS-SA 展现了良好的胃酸保护和肠道释放性能,解决了壳聚糖基亚胺水凝胶耐酸性能差的问题;制备过程绿色,所用原料无毒、易得,为环境友好型药物包封材料的开发和 ACNs 的应用提供了理论和实践参考。但本研究仅对 ACNs/CMCS-SA 在胃、肠 pH 条件下的释放性能进行了探索,其体内释放性能仍需进一步研究。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] CHEN L Z, ZHONG J J, LIN Y Y, et al. Microwave and enzyme co-assisted extraction of anthocyanins from purple-heart radish: Process optimization, composition analysis and antioxidant activity[J]. LWT, 2023, 187: 115312.
- [2] 李煦,白雪晴,刘长霞,等.天然花青素的抗氧化机制及功能活性研究进展[J].食品安全质量检测学报,2021,12(20):8163-8171. [LI X, BAI X Q, LIU C X, et al. Research progress on antioxidant mechanism and functional activity of natural anthocyanins[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(20): 8163-8171.]
- [3] FARIA A, PESTANA D, AZEVEDO J, et al. Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells-putative involvement of GLUT₂[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2009, 53(11): 1430-1437.
- [4] HUANG Y X, ZHOU S Y, ZHAO G H, et al. Destabilisation and stabilisation of anthocyanins in purple-fleshed sweet potatoes: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 116: 1141-1154.
- [5] YUAN Y T, FAN Q, XU X Y, et al. Nanocarriers based on

- polysaccharides for improving the stability and bioavailability of anthocyanins: A review[J]. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2023, 6: 100346.
- [6] HE J, MAGNUSON B A, LALA G, et al. Intact anthocyanins and metabolites in rat urine and plasma after 3 months of anthocyanin supplementation[J]. *Nutrition and Cancer*, 2006, 54(1): 3–12.
- [7] ZHOU X, NIE S, LIU L, et al. Compound hydrogels derived from gelatin and gellan gum regulates the release of anthocyanins in simulated digestion[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 127: 107487.
- [8] GHREAGHAJLOU N, HALLAJ-NEZHADI S, GHASEMPOUR Z. Nano-liposomal system based on lyophilization of monophasic solution technique for encapsulating anthocyanin-rich extract from red cabbage[J]. *Dyes Pigments*, 2022, 202: 110263.
- [9] THIECLA K O R, SILVA M P D, LOURENO F R, et al. Nanoencapsulation of anthocyanins from blackberry (*Rubus* spp) through pectin and lysozyme self-assembling[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 114: 106563.
- [10] IRMAK O S, NESLIHAN A D, KUBRA U, et al. Lyophilized nano-liposomal system for red onion (*Allium cepa* L.) peel anthocyanin: Characterization, bioaccessibility and release kinetics[J]. *Food Bioscience*, 2023, 53: 102702.
- [11] SANTIAGOGARCÍA A P, LEÓN MARTÍNEZ M F, GUTIÉRREZ C M, et al. Microencapsulation of strawberry juice in *Agave angustifolia* fructans: Effect of spray-drying conditions on the anthocyanin content and physicochemical properties[J]. *International Journal of Food Science Technology*, 2023, 58(12): 6725–6735.
- [12] LIU R R, WANG X H, YANG L X, et al. Coordinated encapsulation by β -cyclodextrin and chitosan derivatives improves the stability of anthocyanins[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 242: 125060.
- [13] WU C L, JULIAN M D, MA B H, et al. Composite hydrogels formed from okara cellulose nanofibers and carrageenan: Fabrication and characterization[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 258(P2): 129079.
- [14] YING J. Synthesis of porous starch microgels for the encapsulation, delivery and stabilization of anthocyanins[J]. *Journal of Food Engineering*, 2021, 302: 110552.
- [15] LI W J, LINLI F Z, YANG W Y, et al. Enhancing the stability of natural anthocyanins against environmental stressors through encapsulation with synthetic peptide-based gels[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253: 127133.
- [16] 曹亚婵, 刘坤坤, 党奇峰, 等. 基于壳聚糖的抗菌可注射自愈性水凝胶的制备及其生物相容性研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2024, 54(3): 60–69. [CAO Y C, LIU X K, DANG Q F, et al. Preparation and biocompatibility of antibacterial injectable chitosan-based hydrogel for self-healing biomaterials[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2024, 54(3): 60–69.]
- [17] 李煦, 董翠芳, 刘长霞, 等. 负载花色苷的壳聚糖-水杨醛水凝胶的制备及性能[J]. 食品工业科技, 2023, 44(9): 111–118. [LI X, DONG C F, LIU C X, et al. Preparation and properties of chitosan salicylaldehyde hydrogel loaded with anthocyanins[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(9): 111–118.]
- [18] LIU C X, DONG C F, LIU S H, et al. Multiple chiroptical switches and logic circuit based on salicyl- imine- chitosan hydrogel[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 257: 117534.
- [19] FATEMEH K, SAEED S S. Synthesis and characterization of a novel hydrogel based on carboxymethyl chitosan/sodium alginate with the ability to release simvastatin for chronic wound healing[J]. *Biomedical Materials*, 2023, 18(2): 025001.
- [20] GUO F B, LIU Y, CHEN S Q, et al. A schiff base hydrogel dressing loading extracts from *Periplaneta americana* for diabetic wound healing[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 230: 123256.
- [21] YU R, ZHANG Y, BARBORU M, et al. Biobased pH-responsive and self-healing hydrogels prepared from O-carboxymethyl chitosan and a 3-dimensional dyanmer as cartilage engineering scaffold[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 244: 116471.
- [22] 李俊杰, 贾鹏, 刘功稳, 等. 一种口服骨靶向微/纳水凝胶微球制备及对雌性去势小鼠骨质量影响的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(11): 1581–1586, 1597. [LI J J, JIA P, LIU G W, et al. Preparation of an oral bone-targeting micro/nano hydrogel microsphere and its effect on bone quality in ovariectomized mice[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2023, 29(11): 1581–1586, 1597.]
- [23] GIULBUDAGIAN M, YEALLAND G, HNZHE S, et al. Breaking the barrier-Potent anti-inflammatory activity following efficient topical delivery of etanercept using thermoresponsive nanogels[J]. *Theranostics*, 2018, 8(2): 450–463.
- [24] ZHU C, WANG S, WANG D, et al. Novel nano-micro-macro multiple-nested hydrogel with gradient ciliary neurotrophic factor distribution induces directional axon regeneration of retinal ganglion cells[J]. *Colloids and Surfaces-A Physicochemical and Engineering Aspects*, 2023, 675: 131904.
- [25] LI X, WU X L. The microspheres/hydrogels scaffolds based on the proteins, nucleic acids, or polysaccharides composite as carriers for tissue repair: A review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253: 126611.
- [26] SATOMI T, ANDREA C, SUZUKA S, et al. Preparation of ultrasmall cyclodextrin nanogels by an inverse emulsion method using a cationic surfactant[J]. *Chemical Communications*, 2023, 59(27): 4071–4074.
- [27] 刘长蛟, 郑霞, 熊湘炜, 等. 分光光度法测定黑米花青素方法的建立[J]. 粮食与油脂, 2019, 32(1): 73–77. [LIU C J, ZHENG X, XIONG X W, et al. Establishment of a spectrophotometric method for the determination of anthocyanins in black rice[J]. *Food and Oil*, 2019, 32(1): 73–77.]
- [28] 戴文, 王晓东, 黄培, 等. 乳液模板法制备聚酰亚胺中空微球及其形貌调控[J]. 高分子材料科学与工程, 2023, 39(7): 25–32. [DAI W, WANG X D, HUANG P, et al. Morphology control and preparation of polyimide hollow microspheres by emulsion template method[J]. *Polymer Materials Science & Engineering*, 2023, 39(7): 25–32.]
- [29] ZHANG B, WANG Q, ZHOU P P, et al. Copigmentation evidence of oenin with phenolic compounds: A comparative study of spectrographic, thermodynamic and theoretical data[J]. *Food Chemistry*, 2020, 313: 126163.
- [30] 薛宏坤, 李鹏程, 钟雪, 等. 高速逆流色谱分离纯化桑葚花色苷及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2020, 41(15): 96–104. [XUE H S, LI P C, ZHONG X, et al. Separation and purification of anthocyanins from mulberry fruit by high-speed counter-current chromatography and their antioxidant activity[J]. *Food Science*, 2020, 41(15): 96–104.]
- [31] WU X H, LIN Q W, BELWAL T, et al. Effect of advanced/hybrid oxidation process involving ultrasonication and ultraviolet radiation (sonophotolysis) on anthocyanin stability: Degradation kinetics and mechanism[J]. *Food Chemistry*, 2022, 370: 131083.
- [32] KOSMIDIS K, MACHERAS P. On the dilemma of fractal or

fractional kinetics in drug release studies: A comparison between Weibull and Mittag-Leffler functions[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 543(1-2): 269–273.

[33] PAPADOPOULOU V, KOSMIDIS K, VLACHOU M, et al. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 309(1-2): 44–50.

[34] NAZIM N, STEFAN K. Fundamental advances in hydrogels for the development of the next generation of smart delivery systems as biopharmaceuticals[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2023, 633: 122634.

[35] 李凌冰, 谭业邦. 亲水聚合物凝胶系统中药物控制释放两类

特殊情况的数学模型[J]. *生物医学工程学杂志*, 2003, 20(1): 17–21. [LI L B, TAN Y B. Two sorts of problems on drug controlled release from swellable polymer[J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2003, 20(1): 17–21.]

[36] LIU L Y, ZHANG D D, SONG X X, et al. Compound hydrogels derived from gelatin and gellan gum regulates the release of anthocyanins in simulated digestion[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 127(6): 107487.

[37] GHAZAL S, KORDESTANI S S, TAHRIRI M, et al. Evaluation of L929 cell morphology on anthocyanin-containing gelatin-based hydrogel for early detection of infection[J]. *Bio-Design and Manufacturing*, 2019, 2(3): 181–186.