

不同形式壳聚糖基水凝胶的微观结构与控释性能对比

梁刚强, 项拓, 梁妍, 司徒文贝

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文采用离子交联和巯基化两种不同方式改性壳聚糖, 制备载有活性蛋白的壳聚糖水凝胶。通过红外光谱、粒径/zeta 电位分析、透射电镜、扫描电镜、模拟消化实验等手段, 探讨了其微观结构和控释性能。实验结果发现, 由于分子间氢键作用, pH 值、CS:TPP 质量比以及 BSA 浓度等对交联壳聚糖水凝胶的蛋白包载率影响明显, 而由于巯基的引入, 使得巯基化壳聚糖水凝胶在酸性环境下具有较小的粒径 (平均 409.61 nm) 和较低的表面电势 (平均 -0.67 mV)。壳聚糖基材料微观结构的变化进而影响其水凝胶的控释性能。模拟消化实验显示, 交联壳聚糖水凝胶在模拟胃液中出现突释现象, 在运送至结肠前, 已有 44.76% 的活性蛋白释放, 而巯基化壳聚糖水凝胶在模拟上消化道环境中释放缓慢, 仅有 8.42% 的活性蛋白释放, 运转至模拟结肠, 活性蛋白释放速度逐渐增加, 呈现持续释放的效果, 约有 34.53% 的 BSA 逐渐释放在结肠中。因此, 巯基化壳聚糖水凝胶具有更好的控释性能, 这对活性蛋白的生物利用改善具有重要作用。

关键词: 水凝胶; 活性蛋白; 交联壳聚糖; 巯基化壳聚糖; 控制释放

文章编号: 1673-9078(2021)07-101-107

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.7.1088

Comparison of Different Chitosan-based Hydrogels in Microstructure and Controlled-releasing Property

LIANG Gang-qiang, XIANG Tuo, LIANG Yan, SITU Wen-bei

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this paper, two different methods of ion cross-linking and sulfhydrylization were used to modify chitosan to prepare chitosan hydrogel with active protein. Through infrared spectroscopy, particle size/zeta potential analysis, transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, and simulated digestion experiments, the microstructure and controlled release performance were discussed. The experimental results found that due to intermolecular hydrogen bonding, pH value, CS:TPP mass ratio, and BSA concentration had significant effects on the protein loading rate of cross-linked chitosan hydrogels, and the introduction of sulfhydryl groups made the sulfhydryl chitosan polymerized. Sugar hydrogel had a smaller particle size (average 409.61 nm) and a lower surface potential (average -0.67 mV) in an acidic environment. The changes in the microstructure of chitosan-based materials further affected the controlled release properties of their hydrogels. The simulated digestion experiment showed that the cross-linked chitosan hydrogel had a sudden release phenomenon in the simulated gastric juice. Before being transported to the colon, 44.76% of the active protein had been released, while the sulfhydryl chitosan hydrogel simulated the environment of the upper digestive tract. The medium release rate was slow, only 8.42% of the active protein was released. When it runs to the simulated colon, the release rate of the active protein gradually increases, showing a sustained release effect. About 30% of BSA is gradually released in the colon. Therefore, sulfhydryl chitosan-based hydrogels have better controlled release performance, which plays an important role

引文格式:

梁刚强, 项拓, 梁妍, 等. 不同形式壳聚糖基水凝胶的微观结构与控释性能对比[J]. 现代食品科技, 2021, 37(7): 101-107, +227

LIANG Gang-qiang, XIANG Tuo, LIANG Yan, et al. Comparison of different chitosan-based hydrogels in microstructure and controlled-releasing property [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(7): 101-107, +227

收稿日期: 2020-11-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31601422); 广州市科技计划项目珠江新星专题 (201806010184)

作者简介: 梁刚强 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然多糖改性及活性物质控释传输

通讯作者: 司徒文贝 (1987-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然多糖改性及活性物质控释传输

in improving the bioavailability of active proteins.

Key words: hydrogel; bioactive protein; crosslinked chitosan; sulfhydryl chitosan; controlled-release

随着人们生活水平的提高,功能食品备受人们的关注,其中活性蛋白由于具有调节人体生理作用、抗衰老、提高免疫力等功能,而备受关注^[1,2]。但由于活性蛋白容易受人体消化道的消化酶、胃酸等降解,需要载体材料对其进行保护,以提高其生物利用度。同时,水凝胶是一种具有三维网络结构的载体,可通过氢键、共价键等与活性蛋白结合,从而对其进行保护^[3]。天然来源的壳聚糖、淀粉、果胶等,具有形成水凝胶的能力,常被用于活性蛋白的包载及递送^[4]。

壳聚糖是自然界中唯一的聚阳离子碱性多糖,拥有大量的游离氨基,化学性质十分活泼,可引入其他基团对其进行修饰。通过巯基化改性的壳聚糖,由于二硫键的引入,增强了壳聚糖分子链间的作用力,对活性蛋白的控释能力增强。巯基壳聚糖较之未改性的壳聚糖具有更好的细胞黏附性和渗透性,而且巯基壳聚糖溶液在生理 pH 值下具有原位胶凝特性,因此非常适合用于药物控释的载体^[5]。此外可以对壳聚糖进行交联改性,交联改性壳聚糖具有一定的溶胀性能,可形成较容易被人们接受的水凝胶。三聚磷酸钠和六偏磷酸钠等无机试剂,无毒安全,常作为交联剂,用于壳聚糖改性^[6]。不同的改性方法可产生不同的壳聚糖微观结构,进而影响水凝胶的三维网络结构,同时也对活性蛋白的生物利用情况产生影响。

巯基化改性与离子交联改性是常用的壳聚糖基水凝胶制备手段,在活性蛋白包埋递送方面有大量研究,但前人较少对两种水凝胶的结构性质差异进行比较。为此,本文采用离子交联及巯基化两种不同方式对壳聚糖进行改性,以牛血清白蛋白(BSA)为模型活性蛋白,制备壳聚糖基水凝胶,探讨了 pH 值、壳聚糖与交联剂的质量比、BSA 浓度等因素对两种壳聚糖基水凝胶的包载性能影响,同时比较两种壳聚糖基水凝胶的平均粒径、Zeta 电位、表面形貌、链结构,探讨两种壳聚糖水凝胶在模拟消化道环境中对活性蛋白的控释机理,为提高活性蛋白生物利用率提供依据,研究结果对蛋白类功能食品具有一定的促进意义。

1 材料与方法

1.1 原料

壳聚糖(分子量 150000 g/mol):上海楷洋生物技术有限公司;三聚磷酸钠(TPP):天津市大茂化学试剂厂,分析纯;盐酸、氢氧化钠、N-羧基琥珀酰亚胺

(NHS):广州化学试剂厂,分析纯;L-半胱氨酸、Ellman's 试剂:阿拉丁试剂上海有限公司,分析纯;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDAC)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸),上海麦克林生化科技有限公司,分析纯;冰醋酸,上海国药公司,分析纯;牛血清白蛋白,北京博奥拓达科技有限公司;透析袋(截留分子量范围 8000~12000 g/mol):广州市丛源仪器有限公司。

1.2 主要仪器设备

冷冻干燥机(FDU-1200):上海爱朗仪器有限公司;台式高速离心机(H/T16MM):湖南赫西仪器装备有限公司;紫外分光光度仪:上海美谱达仪器有限公司;扫描电镜(Verios 460):Thermo Fisher 公司;纳米粒度及 ZETA 电位分析仪(Zetasizer Nano ZS 90):马尔文仪器有限公司;透射电镜(型号 Talos L120 G2):Thermo Fisher 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 交联壳聚糖及其载有活性蛋白的凝胶微粒的制备

称量一定量的 TPP 和牛血清白蛋白(BSA),按一定的壳聚糖和交联剂的质量比称取壳聚糖,把壳聚糖溶于不同 pH 的乙酸-乙酸钠缓冲液,在磁力搅拌器搅拌的过程中把溶有交联剂和 BSA 的溶液滴加到壳聚糖溶液中,磁力搅拌 2 h,10000 r/min 中离心 30 min,得到载有活性蛋白的交联壳聚糖凝胶微粒。同时,取上清液,通过 BCA 试剂盒测定、计算上清液中 BSA 的含量,进而计算 BSA 的包封率。

未包载有活性蛋白的交联壳聚糖按照上述步骤,不添加 BSA 进行制备,其余条件不变,离心得到交联壳聚糖后,经冷冻干燥得到粉末。

1.3.2 巯基化壳聚糖及其载有活性蛋白的凝胶微粒的制备

精确称量 1.0000 g 壳聚糖粉末,溶解在 1% (V/V) 醋酸溶液中,向其中加入 EDAC 和 NHS 溶液(比例 3:1),使得最终溶液体积为 100 mL,在室温下避光搅拌 15 min,使其充分反应;随后,按照向溶液中加入 2.0 g 半胱氨酸,然后加入 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至 5~6,室温避光反应 5 h。将反应混合物装入透析袋中,用 5 mM 的盐酸透析两次,以除去未反应的 L-半胱氨酸,用 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液透析两次,以

减少阳离子聚合物和阴离子巯基化合物之间的离子交换,再用 1 mM 盐酸透析 3 d,取出透析袋中的液体与 -80 °C 中预冻一天,真空冷冻干燥,得到巯基化壳聚糖粉末。利用 Ellman's 试剂法,对所得巯基化壳聚糖粉末进行测定,所得的巯基化壳聚糖的巯基含量为 558 $\mu\text{mol/g}$ 。

称量一定量的 TPP 和 BSA,按照质量比称取巯基化壳聚糖并溶于不同 pH 的乙酸-乙酸钠缓冲液,磁力搅拌 2 h, 10000 r/min 中离心 30 min,取上清液,通过 Bradford 试剂盒的方法准确测量上清液中 BSA 的含量。在 595 nm 处测定 BSA 的紫外吸光度值,代入相应的标准曲线计算 BSA 浓度,按照下列公式,计算 BSA 的包封率。

$$B/\% = \frac{W_0 - A_t \times V_t}{W_0} \times 100\%$$

式中: B 为 BSA 的包封率,%; W_0 为称取的 BSA 的质量, g; A_t 为上清液中 BSA 的浓度, g/L; V_t 为上清液体积, L。

1.3.3 傅里叶红外光谱分析

取适量改性壳聚糖粉末,与溴化钾粉末混合并充分研磨,在 20 MPa 下压片成型。称取适量的待测样品,将其在红外光下照射干燥后,与 KBr 在研钵中充分研磨 2~5 min,置于自动压片装置中压片后进行测试。设置分辨率为 4 cm^{-1} ,利用 DTGS 检测器先扫去空气的空白,扫描波数在 4000~400 cm^{-1} 范围内,扫描 64 次后仪器取平均值显示的即为测试样品的红外特征光谱图。

1.3.4 形貌分析

取少量样品置于相应的缓冲液中,在 40 MPa 的条件下均质,使其均匀分布在溶液中。进行透射电镜分析时,将溶液滴加在 400 目普通碳支持膜的电镜铜网上,将样品置于 40~50 °C 的烘箱中进行干燥处理后,滴加 2% 的磷钨酸溶液进行染色处理,90 s 后将染色液吸干,静置风干。将铜网固定于样品杆,置于电镜,进行样品形貌观察,拍照记录。进行扫描电镜分析时,将溶液滴在导电胶上,静置风干后镀金,置于电镜,进行样品形貌观察,拍照记录。

1.3.5 平均粒径分析

称取一定量的载有活性蛋白的壳聚糖基凝胶微粒分别溶于不同 pH 值的缓冲液中,在 40 MPa 的条件下高压均质,使其均匀分布在溶液中,再取适量溶液润洗样品池后加入待测样品,将其置入测试槽中进行测试,平衡 2 min,温度为 25 °C。采用粒度仪测定壳聚糖基凝胶微粒在不同 pH 值条件的平均粒径大小及数量分布。

1.3.6 Zeta 电位分析

称取一定量的交联壳聚糖凝胶微粒分别溶于不同 pH 值的缓冲液中,在 40 MPa 的条件下高压均质,使其均匀分布在溶液中,取适量溶液润洗带电极的样品池,再将样品溶液用注射器注入样品池中,确保样品池内无气泡,擦干电极部分,并保持干燥,将样品池置入测试槽中,平衡 2 min,采用 Zeta 电位分析仪测定壳聚糖基凝胶微粒在不同 pH 值条件下的 Zeta 电位。

1.3.7 载有活性蛋白的壳聚糖基凝胶微粒的体外模拟消化

参考相关文献^[7],将上述制备的两种微粒,置于 200 mL 溶出介质中,在 37 °C、100 r/min 条件下进行搅拌,微粒在模拟人工胃液中运转 2 h,然后在模拟小肠液中运转 6 h,最后在模拟结肠液环境中运转 42 h,并每隔一定时间对溶出介质进行取样,取样后的溶出介质。取出的溶出液通过 Bradford 试剂盒测量其中 BSA 的含量,进而得到壳聚糖基凝胶微粒在模拟消化过程中释放曲线。

1.3.8 数据统计

采用 SPSS 21.0 软件分析实验数据,数据差异性采用单因素方差分析处理, $p < 0.05$ 表示具有显著差异,实验重复三次。

2 结果与讨论

2.1 改性壳聚糖的链结构分析

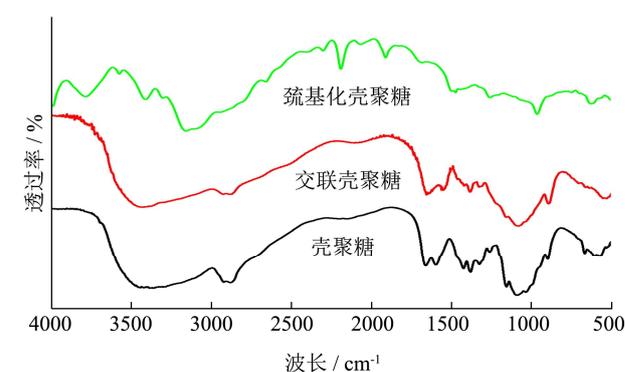


图 1 不同壳聚糖材料的红外光谱图

Fig.1 FT-IR of chitosan-based materials

图 1 是未改性壳聚糖、交联改性壳聚糖和巯基化改性壳聚糖的红外光谱,未改性壳聚糖在 3420 cm^{-1} 处的宽峰为羟基和氨基的伸缩振动峰,是多糖特征峰。在 2750~3000 cm^{-1} 附近为 C-H 伸缩振动峰,1560~1650 cm^{-1} 为酰胺 I 带的 -NH₂ 振动,1280~1450 cm^{-1} 为酰胺 II 带的 -NH₂ 振动,1050 cm^{-1} 和 1100 cm^{-1} 为 C-OH 的振动峰^[8]。与未改性壳聚糖相比,交联改性壳聚糖在 3400 cm^{-1} 附近的吸收谱带变宽,说明交联后增加了壳聚糖的氢键作用力,1148 cm^{-1} 附近产生了典型的 TPP

振动峰^[9], 1070 cm^{-1} 附近产生了新峰, 对应于 P=O 的拉伸和变形, 这表明壳聚糖分子链通过 TPP 发生了交联^[10]。而对于巯基化改性壳聚糖则在 2570 cm^{-1} 附近有 -SH 的伸缩振动峰, 说明改性后的壳聚糖中含有自由巯基^[11], 在 1380 cm^{-1} 和 1480 cm^{-1} 处两峰合并, 说明形成了更多的酰胺键。两种不同的改性方式对壳聚糖分子链的影响, 将影响后续壳聚糖水凝胶的各项性能。

2.2 不同因素对两种壳聚糖水凝胶的包载性能影响

2.2.1 pH 值的影响

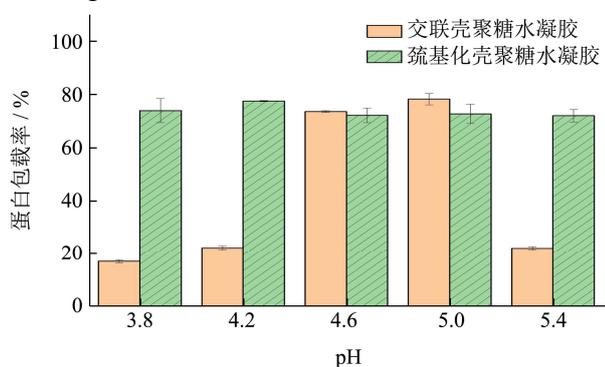


图2 pH对壳聚糖水凝胶蛋白包载率的影响

Fig.2 Effect of pH on protein entrapment efficiency of chitosan-based hydrogel

如图所示, 交联壳聚糖水凝胶的蛋白包载率随着 pH 的增加呈现先增后减的趋势, 并在 pH 为 5 时达到最大值 78.30%; 巯基化壳聚糖水凝胶的蛋白包载率随着 pH 的增加呈现先增后减的趋势, 并在 pH 为 4.2 时达到最大值 77.54%。

在相同 pH 条件下, 交联壳聚糖水凝胶蛋白包载率受 pH 影响更加剧烈, 最小包载率为 16.97%, 最大包载率为 78.30%; 巯基化壳聚糖水凝胶蛋白包载率受 pH 影响不大, 包载率稳定在 72.04%~77.54%之间。参考有关文献可知, 酸性条件下, 壳聚糖氨基与交联剂离子基团之间的静电相互作用受到破坏, 壳聚糖分子链中未参与交联的氨基发生质子化, 氢键发生解离^[12], 交联壳聚糖凝胶稳定性降低, 蛋白包载率降低; 而巯基化壳聚糖包载蛋白过程中, 有部分牛血清蛋白与巯基化壳聚糖分子上的二硫键结合, 从而形成凝胶^[13], 因此凝胶稳定性提高, 在 pH 3.8~5.4 之间变化对其蛋白包载率影响不大。

2.2.2 壳聚糖与 TPP 质量比的影响

如图 3 所示, 交联壳聚糖水凝胶的蛋白包载率随着 CS:TPP 质量比的增加呈现先增大后减小的趋势, 并且在 CS:TPP 值为 8 时, 包载率达到最大值为 95.66%;

巯基化壳聚糖水凝胶的蛋白包载率随着 CS:TPP 值的增加呈现先增大后减小的趋势, 并且在 CS:TPP 值为 8 时, 包载率达到最大值为 71.07%。

在相同条件下, 交联壳聚糖水凝胶蛋白包载率受 CS:TPP 质量比影响较大, 最小包载率为 10.88%, 最大包载率为 95.66%; 巯基化壳聚糖水凝胶蛋白包载率受 CS:TPP 质量比影响较小, 蛋白包载率稳定在 62.12%~71.07%。参考有关文献可知, 因为交联剂中磷酸根离子可以与壳聚糖上的氨基结合, 随着交联剂浓度的不同, 交联反应程度不同, 从而影响到蛋白的包载率^[12], 而巯基化壳聚糖水凝胶受交联剂影响小, 因此蛋白包载率变化较小。

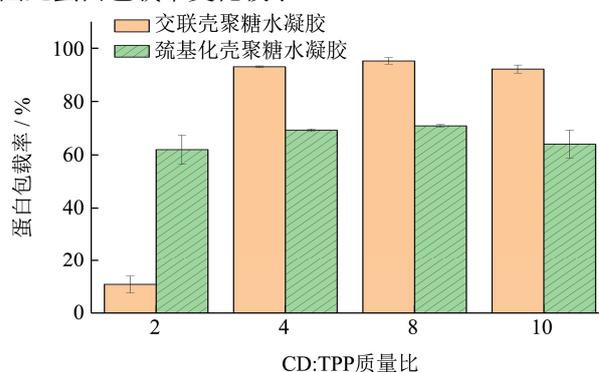


图3 CS:TPP 质量比对壳聚糖水凝胶蛋白包载率的影响

Fig.3 Effect of CS:TPP mass ratio on protein entrapment efficiency of chitosan-based hydrogel

2.2.3 BSA 浓度的影响

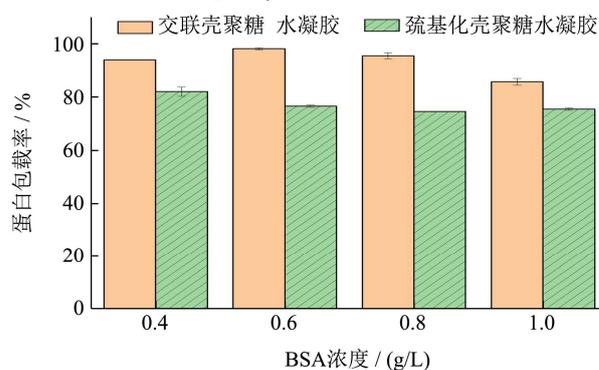


图4 BSA 浓度对壳聚糖水凝胶蛋白包载率的影响

Fig.4 Effect of BSA concentration on the encapsulation efficiency of chitosan-based hydrogel

如图所示, 交联壳聚糖水凝胶的蛋白包载率随着 BSA 浓度的增大呈现先增大后减小的趋势, 并且在 BSA 浓度为 0.6 g/L 时, 包载率达到最大值为 98.38%; 巯基化壳聚糖水凝胶的蛋白包载率随着 BSA 浓度的增大呈现先减小后增大的趋势, 并且在 BSA 浓度为 0.4 g/L 时, 包载率达到最大值为 82.22%。在相同的 BSA 浓度下, 交联壳聚糖水凝胶蛋白包载率总是大于巯基化水凝胶。如前所述, 巯基化壳聚糖包载蛋白过

程中，部分蛋白以二硫键与巯基化壳聚糖结合形成凝胶，新生成的凝胶层对未参与反应的壳聚糖链段的移动形成阻碍，从而降低了活性蛋白的包载率。

综合上述结果，pH 值、CS:TPP 质量比以及 BSA 浓度对交联壳聚糖水凝胶的蛋白包载率影响明显。交联壳聚糖水凝胶通过壳聚糖上的氨基与交联剂中的磷酸基团形成氢键，进而包络在活性蛋白外，而氢键容易受周围环境中 pH 值、离子种类/强度等影响。因此，改变制备条件，交联壳聚糖水凝胶的蛋白包载率变化明显。而对于巯基化壳聚糖水凝胶，巯基的引入减少了壳聚糖上氨基的数目，避免了壳聚糖链段相互作用，可提高壳聚糖水凝胶稳定，从而不易受到周围环境的影响，后续水凝胶的电位分析结果将进一步印证。

2.3 两种壳聚糖水凝胶的形貌分析

图 5a 为包载有 BSA 的交联壳聚糖水凝胶的透射电镜图，图片中浅灰色的物质是交联之后的壳聚糖，其中的黑色的颗粒为染色后的 BSA，交联后的壳聚糖水凝胶对 BSA 形成有效包埋。图 5b 为包载有 BSA 的巯基化壳聚糖水凝胶的透射电镜图，载蛋白的巯基化壳聚糖水凝胶呈现球状，与交联壳聚糖水凝胶相比，BSA 集中包载在水凝胶的中心，凝胶微粒结构紧凑。这与巯基的引入、壳聚糖链段相互作用减少和巯基化壳聚糖水凝胶稳定性提高有关。此外，图 5c 和 d 分别为包载有 BSA 的交联壳聚糖水凝胶和巯基化壳聚糖水凝胶的扫描电镜图，图中两种凝胶微粒呈球状。另外，根据扫描电镜配套软件测定，交联壳聚糖水凝胶尺寸在 830 nm 左右，巯基化壳聚糖水凝胶尺寸在 150 nm 左右。

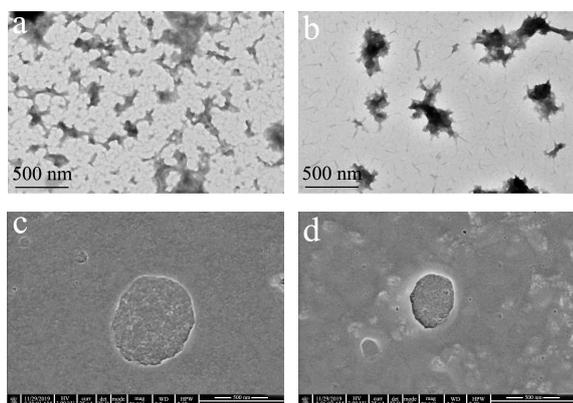


图 5 两种壳聚糖水凝胶的透射电镜图 (a, b) 和扫描电镜图 (c, d)

Fig.5 Morphology of two chitosan-based hydrogels by TEM (a, b) and SEM (c, d)

注：a, c 为交联壳聚糖水凝胶；b, d 为巯基化壳聚糖水凝胶

2.4 两种壳聚糖水凝胶的粒径与表面电位

2.4.1 粒径分析

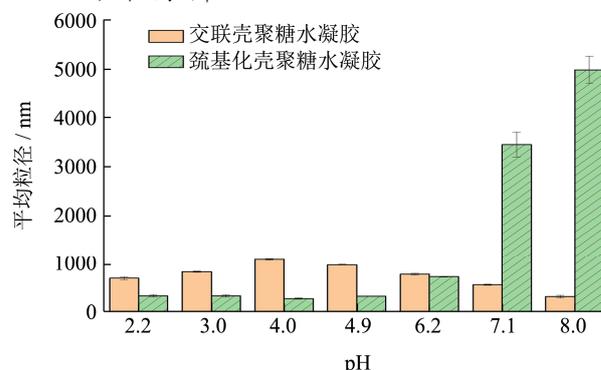


图 6 两种壳聚糖水凝胶在不同 pH 下的粒径比较

Fig.6 Comparison of the particle size of two chitosan-based hydrogels at different pH

图 6 为两种壳聚糖水凝胶在不同 pH 下的粒径比较，从图中可以看出交联壳聚糖水凝胶的粒径随着 pH 的增大先增大后减小，pH 为 4 时，粒径最大为 1085 nm。巯基化壳聚糖水凝胶的粒径随着 pH 的增大先减小增大，pH 为 8 时，粒径最大为 4987 nm。结果与参考文献的结果接近^[14]。

2.4.2 Zeta 电位

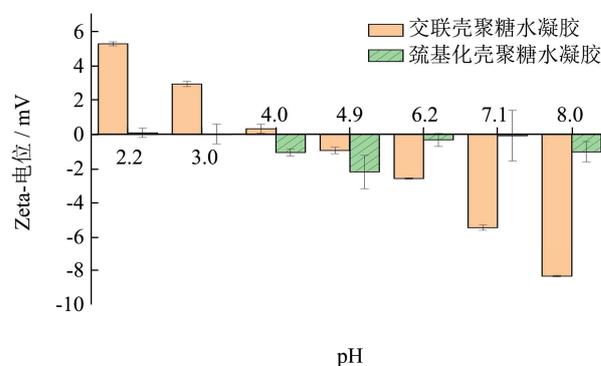


图 7 两种壳聚糖水凝胶在不同 pH 下的表面电荷比较

Fig.7 Comparison of the surface charges of two chitosan-based hydrogels at different pH

图 7 为两种壳聚糖水凝胶在不同 pH 下的表面电荷比较，从图中可以看出，交联壳聚糖水凝胶表面电荷随着 pH 的增大由正值变为负值，当 pH 为 8 时，表面电荷绝对值达到最大为 8.29 mV。巯基化壳聚糖水凝胶表面电荷在强酸环境下，基本接近 0，之后随着 pH 的增大，表面电荷均变为负值。

综合图 6 和图 7，不同 pH 条件下交联壳聚糖水凝胶平均粒径和 Zeta 电位信息可知，当 pH=2.或 3.0 或 4.0 时，Zeta 电位为正值，此时壳聚糖呈质子化，易于与交联剂进行交联。随着 pH 的增加，BSA 表面带电荷越少，壳聚糖交联所形成的凝胶层包覆在 BSA 表面，

溶液中由于正负离子的 Zeta 电位减小, 平均粒径增加, 这主要与 BSA 的等电点有关。当溶液 pH 接近等电点时, BSA 相互斥力减弱, 包载后 BSA 的交联壳聚糖水凝胶微粒间相互聚集, 从而增大平均粒径。当溶液 pH 远离等电点的时候, 由于溶液离子间的斥力增加, 交联壳聚糖水凝胶微粒间相互排斥, 进而降低平均粒径^[4]。

对于巯基化壳聚糖水凝胶, 当 pH=3.0 或 4.0 时, Zeta 电位为正值, 此时壳聚糖呈质子化, 巯基降低了质子化氨基的排斥作用, 使壳聚糖链变得柔顺并收缩, 有利于通过静电作用形成球状结构, 导致了较小粒径的形成。另外, 巯基的引入减少了壳聚糖上氨基的数目, 导致表面电势的降低, 而且巯基在 pH=5.3~5.6 时能够部分去质子化形成 S⁻, 同样引起了表面电势的降低。当 pH 为 7.1 或 8.0 时, 溶液中 OH⁻ 离子增加, 与壳聚糖水凝胶中巯基互相排斥, 造成粒子结构松散, 粒径增大^[15]。这也是在水凝胶制备过程中, pH 值在酸性条件下变化对巯基化壳聚糖水凝胶蛋白包载率影响较小的原因。

2.5 两种壳聚糖水凝胶的消化性能比较

图8为两种载有 BSA 的壳聚糖水凝胶在体外模拟消化道中的释放情况。其中, 在模拟胃液中 (运转 2 h), BSA 分别从交联壳聚糖水凝胶和巯基化壳聚糖水凝胶中释放了 6.36% 和 5.73%; 在模拟小肠液中 (运转 6 h), BSA 分别从交联壳聚糖水凝胶和巯基化壳聚糖水凝胶中释放了 44.76% 和 8.42%; 在体外模拟消化结束时 (运转 41 h), BSA 分别从交联壳聚糖水凝胶和巯基化壳聚糖水凝胶中释放的累积释放率为 50.34% 和 42.96%。

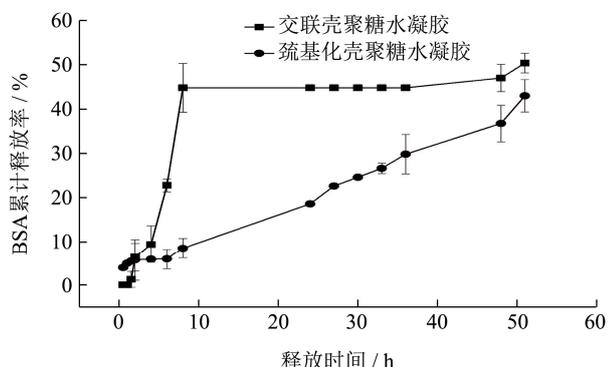


图8 两种壳聚糖水凝胶在模拟人体消化道环境中的释放情况

Fig.8 Releasing proterty of two chitosan-based hydrogels in a simulated human digestive tract environment

对比两种壳聚糖水凝胶, 交联壳聚糖水凝胶在消化前 2 h 已经出现突释的现象, 并持续到 6 h 后释放

速度减缓, 上消化道释放率达到 44.76%, 后续结肠部位仅有 5.58% 释放; 巯基化壳聚糖水凝胶在消化的前 8 h 内释放缓慢, 释放率仅为 8.42%, 转运至模拟结肠液 (10 h 后), 释放速度逐渐增加, 呈现持续释放的效果, 约有 34.53% BSA 释放在结肠中, 与参考文献研究结果接近^[16]。其原因在于交联壳聚糖水凝胶在胃液酸性环境下壳聚糖分子中氢键被破坏, BSA 被快速释放出来; 而巯基化壳聚糖包载蛋白过程中, 会有部分 BSA 与巯基化壳聚糖上的二硫键结合, 而被包载到水凝胶骨架上 (图 9), 酸性环境下不被破坏, 因此可以实现缓慢持续释放。当释放环境转变成偏中性的模拟小肠液 (pH 6.8) 和中性的模拟结肠液 (pH 7.0), 水凝胶中的巯基先经质子化形成 S⁻, 随后由于溶液中 OH⁻ 离子增加, 而使得分子链段相互排斥, 从而使所包载的蛋白质释放。水凝胶粒径与 zeta 电位的结果也显示, 当 pH 增大至 7.0~8.0 之间, 巯基化水凝胶表面电位增加, 粒径增大, 粒子结构松散, 这也将进一步增大蛋白质的释放。

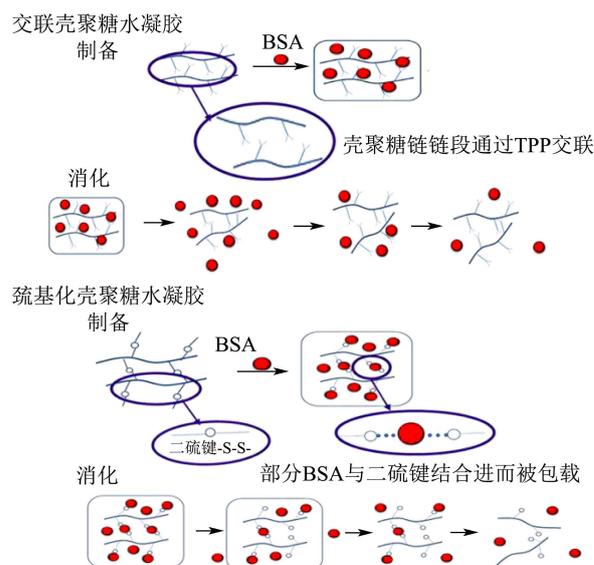


图9 两种壳聚糖水凝胶对 BSA 包埋及控释机理图

Fig.9 BSA embedding and controlled-releasing mechanism of two chitosan-based hydrogel

3 结论

本文采用离子交联及巯基化两种不同方式对壳聚糖进行改性, 制备不同形式的载有活性蛋白的壳聚糖水凝胶, 由于通过离子交联形成氢键, pH 值、CS:TPP 质量比以及 BSA 浓度等对交联壳聚糖水凝胶的蛋白包载率影响明显。而巯基的引入减少了壳聚糖上氨基的数目、在低 pH 环境, 可降低壳聚糖上质子化氨基的相互排斥作用, 增加壳聚糖链段的柔顺性, 使得在酸性环境下, 巯基化壳聚糖水凝胶具有较小的

粒径和较低的表面电势。壳聚糖基水凝胶结构的改变也影响其消化性能,其中交联壳聚糖水凝胶在模拟胃液中已出现突释现象,在运送至结肠前,已有44.76%的活性蛋白释放,而巯基化壳聚糖水凝胶在模拟上消化道展现良好的控释性能,仅有8.42%的活性蛋白释放,当运送至模拟结肠环境,释放速度逐渐增加,呈现持续释放的效果,约有30%的BSA逐渐释放在结肠中,这对活性蛋白的生物利用改善具有重要作用。

参考文献

- [1] 李志勇,凌莉,王菊芳.功能食品中的功能因子[J].食品科学,2005,26(9):622-625
LI Zhi-Yong, LING Li, WANG Ju-fang. The functional components in functional foods [J]. Food Science, 2005, 26(9): 622-625
- [2] 张辉,王文月,段玉清,等.我国功能食品创新发展趋势、重点及政策建议[J].食品工业科技,2015,36(8):361-364
ZHANG Hui, WANG Wen-yue, DUAN Yu-qing, et al. My country's functional food innovation development trend, focus and policy recommendations [J]. Food Industry Science and Technology, 2015, 36(8): 361-364
- [3] 曾敬,贝翠翠,梁爽,等.壳聚糖基水凝胶的制备及溶胀性能研究[J].沈阳师范大学学报(自然科学版),2016,34(3):271-275
ZENG Jing, BEI Cui-cui, LIANG Shuang, et al. Preparation and swelling performance of chitosan-based hydrogels [J]. Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition), 2016, 34(3): 271-275
- [4] 唐奚敏.新型壳聚糖凝胶体系的研究及在药剂中的应用[D].上海:上海交通大学,2009
TANG Xi-min. Research on a new type of chitosan gel system and its application in pharmaceuticals [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2009
- [5] Hornof M. *In vitro* evaluation of the viscoelastic properties of chitosan-thioglycolic acid conjugates [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2003, 55(2): 185-190
- [6] 司徒文贝,梁妍,陈晓玲,等.交联壳聚糖薄膜及其水凝胶骨架片的制备与控释性能探讨[J].现代食品科技,2017,33:155-160,57
SITU Wen-bei, LIANG Yan, CHEN Xiao-ling, et al. Preparation and study of the controlled release properties of crosslinked chitosan film and its hydrogel matrix tablet [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33: 155-160, 57
- [7] 梁妍.兼具短期储藏稳定及结肠靶向的双层壳聚糖微粒制备及其释放研究[D].广州:华南农业大学,2018
LIANG Yan, Preparation and release of double-layer chitosan microparticles with short-term storage stability and colon targeting [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018
- [8] Sun Y, Zhu C, Sun W, et al. Plasma-initiated polymerization of chitosan-based CS-g-P (AM-DMDAAC) flocculant for the enhanced flocculation of low-algal-turbidity water [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 164: 222-232
- [9] Józwiak T, Filipkowska U, Szymczyk P, et al. Effect of ionic and covalent crosslinking agents on properties of chitosan beads and sorption effectiveness of reactive black 5 dye [J]. Reactive and Functional Polymers, 2017, 114: 58-74
- [10] Babakhani A, Sartaj M. Removal of cadmium (II) from aqueous solution using tripolyphosphate cross-linked chitosan [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2020, 8(4): 103842
- [11] Sudhakar S, Chandran SV, Selvamurugan N, et al. Biodistribution and pharmacokinetics of thiolated chitosan nanoparticles for oral delivery of insulin *in vivo* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 281-288
- [12] 易文清,李新法,陈金周,等.壳聚糖水凝胶微球的制备与溶胀性能[J].功能高分子学报,2010,23(4):396-399
YI Wen-qing, LI Xin-fa, CHEN Jin-zhou, et al. Preparation and swelling properties of chitosan hydrogel beads [J]. Journal of Functional Polymers, 2010, 23(4): 396-399
- [13] 李义,余英奇,朱和康,等.二硫键交联的巯基化壳聚糖水凝胶对蛋白质还原响应的控制释放[J].精细化工,2017,34(1):28-33
LI Yi, SHE Ying-qi, ZHU He-kang, et al. Synthesis of redox-responsive thiolated chitosan hydrogel with disulfide cross-links for controlled release of a model protein [J]. Fine Chemicals, 2017, 34(1): 28-33
- [14] Yang Y, Zhu H, Wang J, et al. Enzymatically disulfide-crosslinked chitosan/hyaluronic acid layer-by-layer self-assembled microcapsules for redox-responsive controlled release of protein [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(39): 33493-33506
- [15] 王鑫,毋中明,张新歌,等.壳聚糖/乙酰半胱氨酸纳米粒子的性质及体外释药性[J].高等学校化学学报,2008,4:851-857
WANG Xin, WU Zhong-ming, ZHANG Xin-ge, et al. Properties of chitosan/acetylcysteine nanoparticles and drug release *in vitro* [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2008, 4: 851-857