

交联壳聚糖水凝胶的分子结构差异与其控释性能关系

黄霁璐, 项拓, 梁刚强, 杨婧雯, 吴洁仪, 叶盛英, 司徒文贝*

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510641)

摘要: 为了提高活性物质的生物利用度, 该研究以三聚磷酸钠 (TPP) 或六偏磷酸钠 (SHMP) 为交联剂, 制备具有不同微观结构的壳聚糖水凝胶, 探讨其控释性能, 并通过红外光谱、X-射线衍射和热重分析对水凝胶结构进行分析。热重分析结果表明, 壳聚糖上的氨基与交联剂磷酸基团之间通过氢键进行交联, 提高了壳聚糖水凝胶的热稳定性。同时, 与 TPP 相比, SHMP 为壳聚糖链段与阴离子基团间的结合提供更多静电作用位点, 使得 SHMP 交联壳聚糖水凝胶在 1530 cm^{-1} 附近表现出强的特征峰。此外, TPP 交联水凝胶的溶胀性能优于 SHMP 交联水凝胶, 但在体外模拟消化实验中, 由于胃肠道的生理环境以及交联壳聚糖水凝胶的微观结构随 pH 的改变, SHMP 交联水凝胶的活性蛋白累积释放率 (30.47%~50.27%之间) 小于 TPP 交联水凝胶 (59.90%~76.57%之间)。通过控制交联过程中壳聚糖与交联剂的质量比, 可改变交联壳聚糖水凝胶分子结构, 调控壳聚糖分子链段的溶解/溶胀行为, 从而影响水凝胶的控释性能。该研究结果可为壳聚糖载体材料的选用、缓释及改善活性蛋白类功能因子的生物利用情况提供一定的参考。

关键词: 交联壳聚糖水凝胶; 微观结构变化; 溶胀性能; 缓控释

文章篇号: 1673-9078(2022)01-224-232

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.0460

Relationship between Molecular Structural Differences and Controlled-releasing Properties of Chitosan-based Hydrogel

HUANG Aijun, XIANG Tuo, LIANG Gangqiang, YANG Jingwen, WU Jieyi, YE Shengying, SITU Wenbei*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510641, China)

Abstract: To delivery bioactive compound with good bioavailability, crosslinked chitosan (CS) hydrogel with different microstructure and its controlled-releasing property were investigated. These hydrogel particles were crosslinked by tripolyphosphate (TPP) or sodium hexametaphosphate (SHMP) and analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction (XRD) and thermal gravimetric analysis (TGA). SHMP-crosslinked CS hydrogels showed a stronger peak near 1530 cm^{-1} , which presented the interaction between CS and anionic crosslinkers and related to more binding sites of the crosslinker. From the result of TGA, after crosslinking, the thermal stability of this hydrogel was increased by phosphate group of crosslinker enhancing the intramolecular hydrogen bond force among CS molecules. Moreover, the swelling behavior and controlled-releasing property of these materials were also tested. TPP-crosslinked CS hydrogel had better swelling capacity than SHMP-crosslinked one, but the *in vitro* releasing study revealed that the total cumulative release percentage of bovine serum albumin from SHMP-crosslinked CS hydrogel particle (30.47~50.27%) was lower than those by TPP (59.90~76.57%) because of the reduction of crosslinking strength in acidic environment and compact network structure formed later. With the changes of crosslink processing, the molecular structure of crosslinked chitosan hydrogel was varied, which influenced its swelling ability and controlled-releasing property. The results of this study can provide some reference for the selection of chitosan carrier materials, sustained release and improving the bioavailability of active protein functional factors.

引文格式:

黄霁璐, 项拓, 梁刚强, 等. 交联壳聚糖水凝胶的分子结构差异与其控释性能关系[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1): 224-232, +150

HUANG Aijun, XIANG Tuo, LIANG Gangqiang, et al. Relationship between molecular structural differences and controlled-releasing properties of chitosan-based hydrogel [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 224-232, +150

收稿日期: 2021-04-27

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); 华南农业大学 2020 年度省级立项大学生创新创业训练项目 (S202010564063)

作者简介: 黄霁璐 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然多糖改性及活性物质控释传输, E-mail: 310026376@qq.com

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, E-mail: situwenbei@scau.edu.cn

Key words: crosslinked chitosan; microstructure change; swelling capacity; controlled-releasein

随着社会的发展,人们越来越重视食品的营养健康。功能性食品中具有特殊效应活性物质,与诸多慢性疾病预防密切相关,因而受到广泛关注^[1]。但在加工储运及胃肠道运转过程中,活性蛋白类功能因子面临水分、温度、pH 值等条件的不利影响^[2,3],为提高此类功能因子的生物利用度,需要运用一定的载体材料对其进行包载^[4],如纤维素、壳聚糖、玉米醇溶蛋白等^[5,6]。

在众多的天然材料中,壳聚糖是以 β -(1,4)糖苷键连接的带正电荷的多糖,由于其具有良好的生物相容性和降解性,物理、化学性质稳定性,在自组装复合材料、生物聚合物膜和药物递送载体等方面有广泛的应用^[7]。目前,壳聚糖及其衍生物可用作生物活性化合物载体,以克服上消化道中不利的生理条件影响(如:低 pH 值胃酸、各种消化酶),提高药物及活性物质的生物利用率^[8]。此外,在低于 pH 6.5 的酸性水溶液中,CS 主链上的氨基质子化^[9],可与三聚磷酸钠、柠檬酸钠等交联剂形成静电连接,生成水凝胶网络^[10]。交联网络可包载蛋白质、多肽^[11]、小分子药物和 DNA 片段^[12],以保护活性物质,避免外界环境的侵蚀。有研究表明,交联过程中,离子强度对壳聚糖基水凝胶中的活性物质释放有显著影响^[13]。Sang 等^[14]以三聚磷酸钠(tripolyphosphate, TPP)、植酸和六偏磷酸钠(sodium hexametaphosphate, SHMP)为交联剂,制备了可用于粘膜给药的壳聚糖纳米粒。与 TPP 相比,植酸或 SHMP 交联的纳米粒具有更高的包封率和更低的释放率。司徒文贝等^[15]以三聚磷酸为交联剂,对壳聚糖进行改性,获得交联壳聚糖水凝胶骨架片,研究表明改性后的交联壳聚糖可有效抵御胃酸腐蚀,能明显降低模型功能因子在胃液中前期的释放率,显示出对活性物质递送的能力。

壳聚糖经交联后,其微观结构会发生变化,从而影响水凝胶的控释性能。前人的研究多从 pH、离子强度等对水凝胶的包载性能、控释性能进行探讨,较少对水凝胶制备过程中水凝胶的微观结构、控释性能变化进行探讨。因此,本文选择 TPP 和 SHMP 两种常用的离子交联剂,对分子量为 150,000 g/mol 的壳聚糖进行交联,控制交联剂浓度,获得具有不同微观结构的交联壳聚糖水凝胶,对其链结构、结晶结构、热性能、溶胀性能和释放性能等进行测定,探讨在制备过程中壳聚糖水凝胶微观结构变化与其释放性能之间的相互作用规律,为壳聚糖基载体材料在功能食品中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

壳聚糖,上海凯扬生物科技有限公司,分子量 150,000 g/mol;牛血清白蛋白(BSA),西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;三聚磷酸钠(TPP),广州西龙化工有限公司,分析纯;六偏磷酸钠(SHMP),广州西龙化工有限公司,分析纯。

1.2 仪器与设备

磁力搅拌器,金坛市城东新瑞仪器厂,型号 HJ-6;高速离心机,湖南赫西仪器装备有限公司,型号 H/T16MM;EYELA 冷冻干燥机,上海爱朗仪器有限公司,型号 FDU-1200;FT-IR 光谱仪,塞默飞世尔科技有限公司,型号 Thermo Nicolet 380;AXS 衍射仪,德国布鲁克公司,型号 D8;热重分析仪,德国耐驰公司,型号 209 F3;电子扫描显微镜,蔡司公司,型号 EVO 18。

1.3 实验方法

1.3.1 交联壳聚糖水凝胶制备

称取 1.0000 g 壳聚糖,溶于 100 mL 1% (V/V) 冰醋酸中,25 °C 下磁力搅拌 1 h,随后按壳聚糖/交联剂质量比(1、1.667 和 3.333, m/m),加入相应的交联剂(交联剂浓度 1% m/V)进行交联。交联结束后,溶液 pH 调至 pH 4.8~5.0,10000 r/min 离心 10 min,得到沉淀物,水洗 3 次,得到不同的交联壳聚糖水凝胶。部分水凝胶经冷冻干燥、研磨和粉碎,用于后续表征实验。

1.3.2 交联壳聚糖水凝胶的表征

利用傅里叶红外光谱仪,采用溴化钾压片法进行制样,以空气为背景,对样品的相关官能团及化学键进行测定,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,取平均值^[16]。

利用粉末 X 射线衍射仪,在 Cu-K α 辐射($\lambda=0.1542$ nm)、40 kV、40 mA、范围 5°~45°、步长 0.033° 的条件下,对样品粉末的晶体结构进行测定^[17]。

采用热重分析仪对样品的热性能进行分析。精确称取 4 mg 样品粉末置于铝盘中,在氮气氛围下,以 10 °C/min 的速度,从 30 °C 升温至 650 °C,记录样品的重量变化^[18]。

采用液氮对交联壳聚糖水凝胶进行脆断, 获得水凝胶断面, 通过导电胶将断面粘在样品台上, 喷金后, 通过电子扫描显微镜, 在 10.00 kV 下进行观察。

另外, 参考文献提及方法^[19,20], 称取 0.5000 g (精确到 0.0001 g) 样品粉末于离心管中, 分别加入 20 mL pH 2.2、4.0 和 7.0 的缓冲液, 混合后, 置于 37 °C 水浴 100 r/min, 2 h 后取出, 10000 r/min 离心 20 min, 弃去上清液, 称溶胀沉淀重量 (扣去管重), 每个样品平行两次, 测定其溶胀率, 溶胀率计算公式如下:

$$\text{溶胀率} = \frac{w_1 - w_2}{w_3 - w_2} \quad (1)$$

式中:

w_1 ——溶胀后沉淀与离心管的总重量, g;

w_2 ——离心管重量, g;

w_3 ——溶胀前称入的粉末重量, g。

1.3.3 体外模拟释放实验

将 1.3.1 中所述方法, 制备壳聚糖-交联剂溶液 (pH 4.8), 然后将一定量的牛血清白蛋白 (BSA) 滴入溶液中, 搅拌 2 h, 10000 r/min 离心 30 min, 获得包载有 BSA 的壳聚糖水凝胶。并用 BCA 试剂盒对上清液中的游离 BSA 进行测定, 按照文献中提及的方法对壳聚糖水凝胶中的 BSA 包载率进行计算。

另外, 参考文献提及方法^[21], 将上述包载有 BSA 的壳聚糖水凝胶置于 200 mL 溶出介质中, 37 °C 水浴 100 r/min。水凝胶在模拟胃液 (pH 1.2) 中运转 2 h, 然后在模拟小肠液 (pH 6.8) 中运转 6 h, 最后在模拟结肠液 (pH 7.0) 中运转 38 h。BSA 的释放量通过 BCA 试剂盒测定。

1.4 统计分析

采用 SPSS 22.0 软件分析实验数据, 数据差异性采用单因素方差分析及 *Duncan* 检验, 显著性水平设为 $p < 0.05$, 实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 交联壳聚糖水凝胶的链结构分析

未改性的壳聚糖在 3400 cm^{-1} 有羟基和氨基的联合非对称伸缩振动, 在 1650 cm^{-1} 和 1560 cm^{-1} 的特征峰表征酰胺 I 带的 C=O 键的伸缩振动和酰胺 II 带的 N-H 键振动峰^[22]。壳聚糖上的 $-\text{NH}_3^+$ 与交联剂中的磷酸基团, 通过氢键进行交联, 因此, 交联后的壳聚糖水凝胶在 1650 cm^{-1} 附近的峰向 1635 cm^{-1} 方向发生红移, 这与壳聚糖上 N-H 弯曲振动以及处于缔合态的酰胺 II 带有关。而交联壳聚糖水凝胶中的磷酸基团在

1215~1280 cm^{-1} 处有 P=O 的振动吸收峰, 且随着壳聚糖与交联剂质量比的降低, 峰强度有所上升, 说明更多的磷酸基团参与交联反应^[23,24], 这结果与参考文献相近。另外, 交联后, 由于磷酸基团的反对称伸缩振动, TPP 交联壳聚糖水凝胶在 800~900 cm^{-1} 有强吸收峰出现, 这是 P-O-C 键的伸缩振动。而 SHMP 交联壳聚糖水凝胶则 1036 cm^{-1} 有吸收峰出现, 这是交联剂 SHMP 中 P-OH 键的吸收峰^[23,25]。

比较两种交联剂, TPP 中带有 PO_3^- 磷酸基团, 而 SHMP 带有 PO_4^{3-} 磷酸基团, 在交联反应中, 壳聚糖分子链段可相互间形成交联结构, 也可以在分子链段内进行交联^[11], 而 SHMP 中可形成更多的作用位点^[26], 参与壳聚糖的交联反应^[23], 因此, 在 SHMP 交联壳聚糖水凝胶中, N-H 键在 1530 cm^{-1} 附近的峰强度明显增加^[15], 这与交联反应过程中壳聚糖上 $-\text{NH}_3^+$ 的构象转变以及水凝胶内部交联程度上升形成紧密的网络结构有关。参考文献中曾提及, 在 SHMP 交联壳聚糖水凝胶中有复杂的分子内和分子间交联, 使壳聚糖中 C2、C3、C5 和 C6 位在 ^{13}C 固体核磁谱图中向低场轻微移动^[16]。这与本论文的研究结果一致, 交联剂 SHMP 具有较多的作用位点, 通过壳聚糖的分子内和分子间交联, 形成复杂的网络结构。

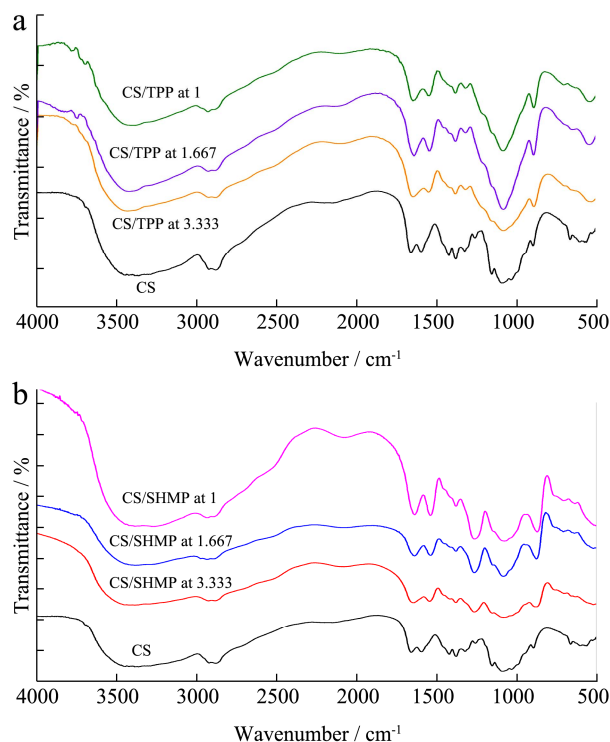


图1 壳聚糖水凝胶的红外光谱图

Fig.1 FT-IR spectra of CS-based hydrogel

注: a: TPP 交联壳聚糖水凝胶; b: SHMP 交联壳聚糖水凝胶。

2.2 交联壳聚糖水凝胶的结晶结构分析

未改性的壳聚糖在 10.26 °和 19.83 °附近出现宽泛的衍射峰, 分别代表壳聚糖中结晶区和非晶区^[27], 同时结晶区域也与壳聚糖中酰胺键的形成、氨基和羟基之间氢键有关^[28]。从图 2a 看出, 交联后, 当 CS/TPP 比值为 3.333 时, 20.06 °附近有一衍射峰, 当 CS/TPP 比值为 1.667 时, 20.06 °附近的衍射峰移至 24.43 °, 并且峰的强度略有降低。而当 CS/SHMP 之比为 3.333 时, CS 基凝胶在 20.91 °左右有一峰(图 2b)。随着 CS/SHMP 比值的降低, 峰向 22.73 °~22.83 °方向移动。这说明在交联过程中, 分子链重新排列。如前所述, 交联后, 阴离子交联剂与壳聚糖之间通过氢键而形成网络结构, 随着分子链段的重排, 水凝胶中的分子内和分子间的作用力增强^[18,29], 在不同的壳聚糖/交联剂质量比的影响下, 最终生成具有不同结晶结构的交联壳聚糖, 水凝胶链结构与结晶结构的改变会影响水凝胶的性能, 后续会通过热性能分析及体外控释实验做进一步探讨。

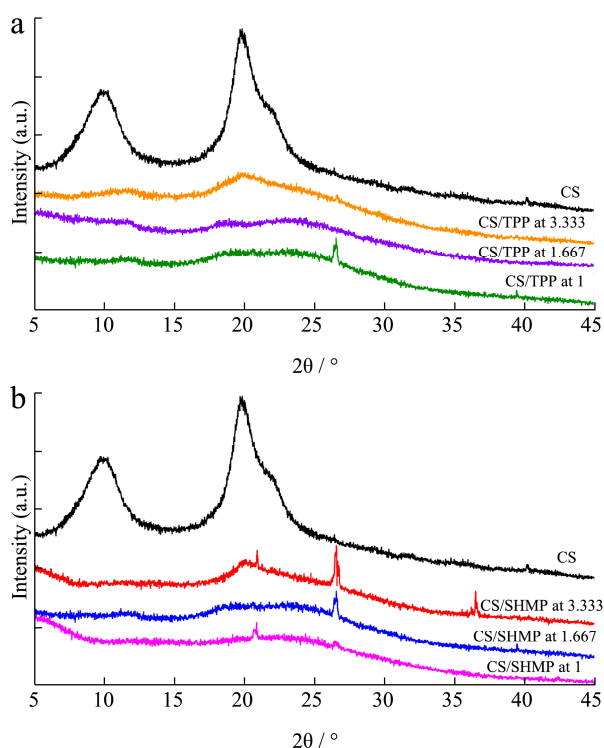


图 2 壳聚糖水凝胶的 X-射线衍射图

Fig.2 XRD patterns of CS-based hydrogel

注: a: TPP 交联壳聚糖水凝胶; b: SHMP 交联壳聚糖水凝胶。

2.3 交联壳聚糖水凝胶的热性能分析

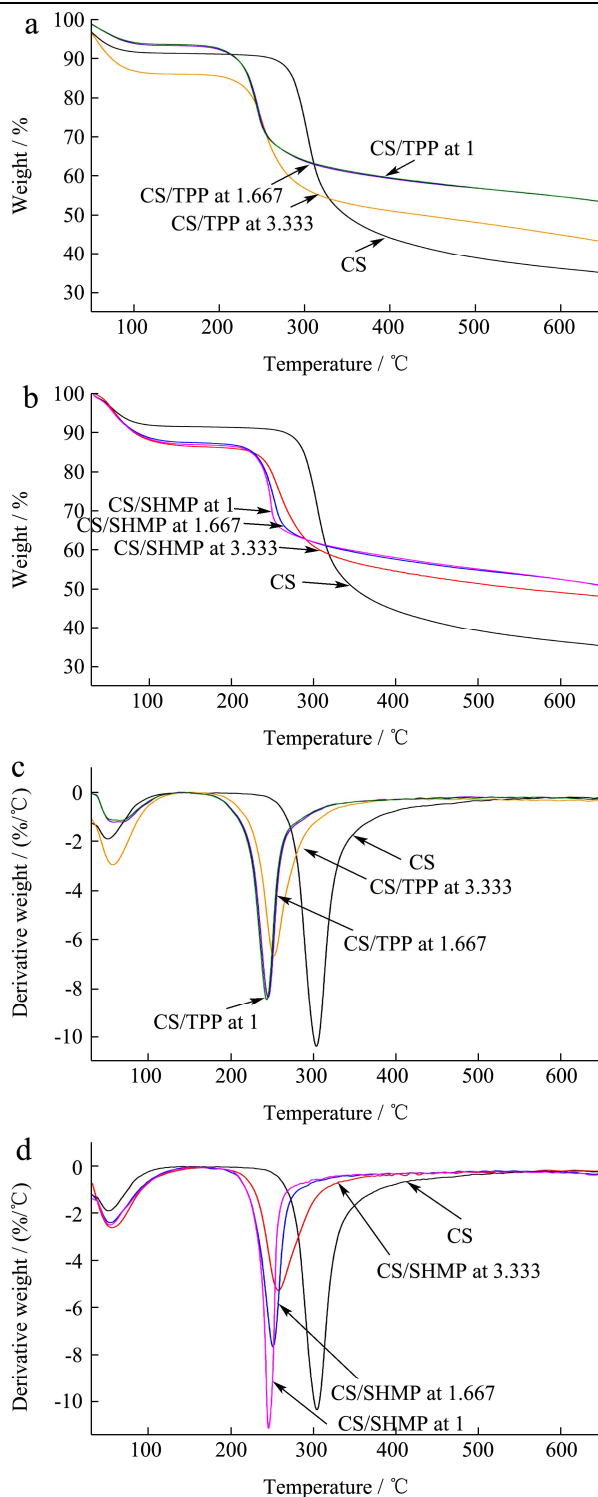


图 3 壳聚糖水凝胶的热重分析图

Fig.3 TGA thermogram of CS-based hydrogel

注: a、c: TPP 交联壳聚糖水凝胶; b、d: SHMP 交联壳聚糖水凝胶。

在 30~150 °C 范围内出现 8.22% 的失重, 属于未改性壳聚糖天然结构中的水分散失。当 CS/TPP 的质量比从 1 增加到 3.333 时, TPP 交联壳聚糖水凝胶在

此温度范围内的失重率分别为 5.82%、6.077% 和 13.10% (图 3a)。当 CS/SHMP 的质量比从 1 增加到 3.333 时, SHMP 交联壳聚糖水凝胶的失重率分别为 11.76%、11.43% 和 12.03% (图 3b)。在 30~150 °C 范围内, 壳聚糖水凝胶的降解与其亲水性有关, 由于交联作用, 交联剂中的磷酸基团增强了水与壳聚糖分子链的相互结合^[30], 所以交联壳聚糖水凝胶在此温度范围内的失重率上升。

从 150 到 600 °C, 由于壳聚糖分子的分解^[30], 天然壳聚糖的失重率约为 55.15%。当 CS/TPP 的质量比从 1 增加到 3.333 时, TPP 交联壳聚糖水凝胶的失重率分别为 38.87%、38.59% 和 41.08% (图 3a)。当 CS/SHMP 的质量比从 1 增加到 3.333 时, SHMP 交联壳聚糖水凝胶的失重率分别为 34.44%、34.99% 和 37.40% (图 3b)。在 650 °C 下, 未改性的壳聚糖有 35.10% 的重量残留。当 CS/TPP 质量比从 1 增加到 3.333 时, TPP 交联壳聚糖水凝胶的物质残留率分别为 53.40%、53.45% 和 43.23%。当 CS/SHMP 的质量比从 1 增加到 3.333 时, SHMP 交联壳聚糖水凝胶的物质残留率分别为 50.66%、50.78% 和 47.94%。

对比两种水凝胶, SHMP 交联壳聚糖水凝胶的失重率要低于 TPP 交联的, 这与壳聚糖水凝胶分子结构差异有关。与交联剂 TPP 相比, SHMP 交联剂可提供更多的交联作用位点。在 FT-IR 分析中, 由于壳聚糖上 $-NH_3^+$ 在交联过程中构象转变以及水凝胶内部交联程度上升而形成紧密的网络结构, SHMP 交联的壳聚糖水凝胶中 N-H 键在 1530 cm^{-1} 附近的峰强度明显增加。另外, 在交联反应过程中, 壳聚糖分子链段重排, 破坏其原有的结晶结构, 壳聚糖分子通过分子内和分子间的交联, 水凝胶内部的作用力逐渐增强, 提高了水凝胶的稳定性, 所以在热性能分析中, SHMP 交联壳聚糖水凝胶要优于 TPP 交联壳聚糖水凝胶。此处的研究结果与参考文献的相近^[18,29]。

2.4 交联壳聚糖水凝胶的形貌分析

图 4 为交联壳聚糖水凝胶的断面形貌, 从断面中可以看出, 未改性的壳聚糖原膜的断面均匀, 而通过交联剂改性后的水凝胶, 其断面结构致密, 且随着交联剂用量的提升, 断面致密程度增加。对比两种不同的交联剂, 采用 SHMP 交联的壳聚糖水凝胶, 其断面的致密程度要比相同条件下 TPP 交联的壳聚糖水凝胶要大。

在交联后, 壳聚糖水凝胶变得致密, 这与交联过程形成的网络结构有关。当壳聚糖与交联剂质量比下降, 壳聚糖分子链段可形成分子内和分子间的交联, 交联程度上升, 网络结构越多, 水凝胶越致密。这与

文献的结果一致, 也与前述的 XRD 分析结果一致, 同时, 交联过程所形成的网络结构也会进一步改变水凝胶的溶胀性能、控释性能等。

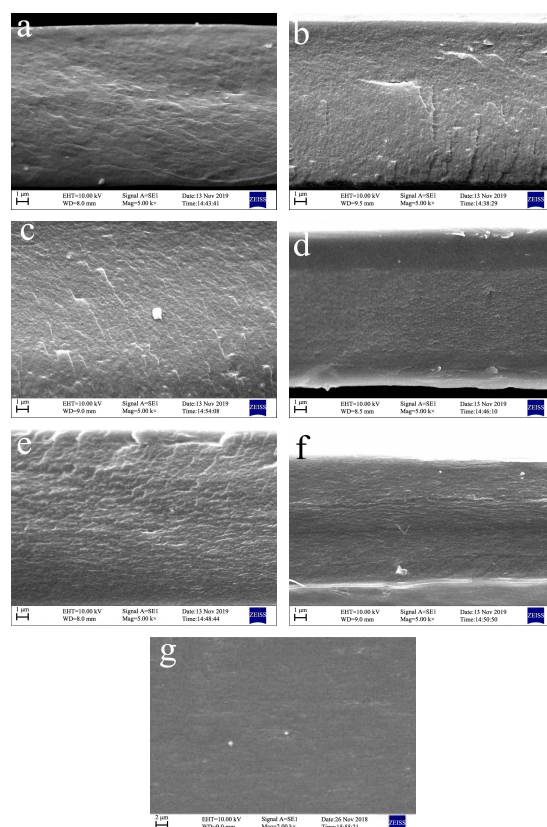


图 4 交联壳聚糖水凝胶断面形貌

Fig.4 Morphology of CS-based hydrogel

注: a~c 为 TPP 交联壳聚糖水凝胶, 质量比 3.333、1.667 和 1; d~f 为 SHMP 交联壳聚糖水凝胶, 质量比 3.333、1.667 和 1; g 为未改性壳聚糖水凝胶。

2.5 交联壳聚糖水凝胶的溶胀性能

壳聚糖水凝胶的溶胀能力与离子交联过程中通过静电作用形成的网络结构密切相关^[23], 易受 pH 的影响, 本文通过对壳聚糖水凝胶在 pH 2.2、4.0 和 7.0 条件下的溶胀情况进行测定, 结果如表 1 所示。

当 pH 为 2.2 时, 随着 CS/TPP 的质量比从 1 增加到 3.333, TPP 交联壳聚糖水凝胶的溶胀率从 13.06% 下降到 10.83%。当 pH 为 4.0 时, TPP 交联壳聚糖水凝胶的溶胀率随 CS/TPP 质量比的增加, 从 7.90% 下降到 6.21%。当 pH 为 7.0 时, TPP 交联壳聚糖水凝胶的溶胀率随 CS/TPP 质量比的增加, 从 7.84% 下降到 5.51%。通过对比发现, 在相同 CS/TPP 质量比下, TPP 交联壳聚糖水凝胶的溶胀率随 pH 的增加而逐渐下降。对于 SHMP 交联壳聚糖水凝胶, 随着 CS/SHMP 的质量比从 1 增加到 3.333, SHMP 交联壳聚糖水凝胶的溶胀率从 5.40% 上升到 19.41%。当 pH

为 4.0 时, SHMP 交联壳聚糖基水凝胶的溶胀率随 CS/SHMP 质量比的增加, 从 4.48% 上升到 6.73%。当 pH 为 7.0 时, SHMP 交联壳聚糖基水凝胶的溶胀率随 CS/SHMP 质量比的增加, 从 2.97% 上升到 5.26%。通

过对比发现, 在相同 CS/SHMP 质量比下, SHMP 交联壳聚糖基水凝胶的溶胀率随 pH 的增加而逐渐下降, 同时, 与 TPP 交联壳聚糖水凝胶相比, SHMP 交联壳聚糖水凝胶的溶胀能力明显减小。

表 1 壳聚糖水凝胶的溶胀能力

Table 1 Swelling capacity of CS-based hydrogel.

溶胀环境	TPP 交联壳聚糖水凝胶			SHMP 交联壳聚糖水凝胶		
	CS:TPP=1	CS:TPP=1.667	CS:TPP=3.333	CS:SHMP=1	CS:SHMP=1.667	CS:SHMP=3.333
pH 2.2	13.06±0.37 ^c	11.79±0.72 ^{bc}	10.83±0.51 ^b	5.40±0.64 ^a	6.78±1.03 ^a	19.41±2.11 ^d
pH 4.0	7.90±0.27 ^e	7.85±0.33 ^e	6.21±0.16 ^c	4.48±0.09 ^a	5.70±0.142 ^b	6.73±0.00 ^d
pH 7.0	7.84±0.01 ^f	7.44±0.04 ^e	5.51±0.14 ^d	2.97±0.21 ^a	3.42±0.05 ^b	5.26±0.06 ^c

注: 根据重复测量计算平均值±标准差。同一原始数据中不同字母的值在 $p < 0.05$ 处有显著差异。

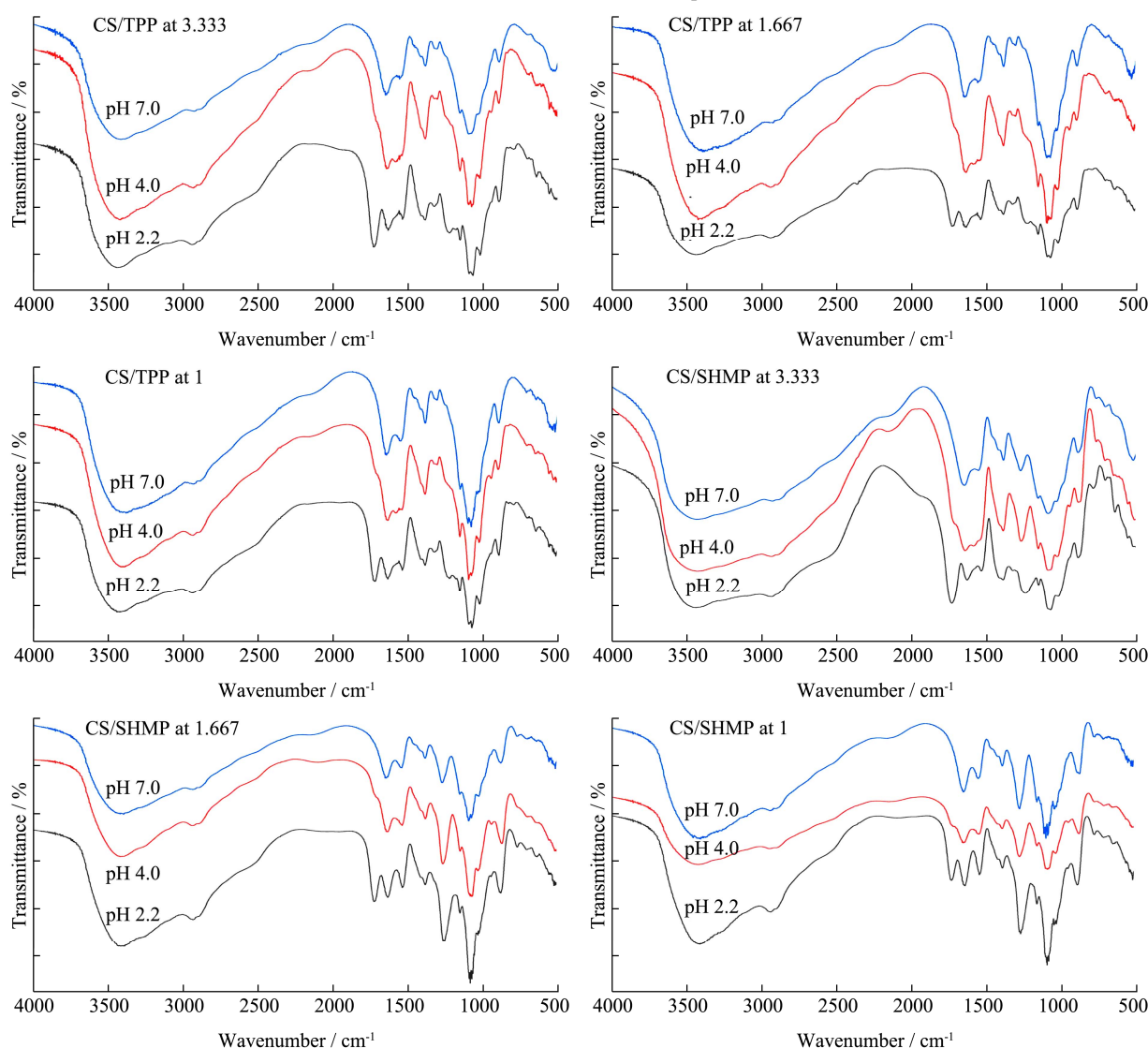


图 5 在不同 pH 下壳聚糖水凝胶溶胀后的红外变换光谱

Fig.5 FT-IR spectra of CS-based hydrogel swelling in different pH buffers

同一交联壳聚糖水凝胶在 pH 2.2 环境下溶胀性能最好, 这是由于在酸性环境下溶液中 H^+ 浓度的增加, 溶胀的水凝胶与外部溶液之间渗透压增加^[22], 使得交联壳聚糖水凝胶在 pH 值为 2.2 时迅速膨胀。随

着 pH 的上升, 溶液中的 H^+ 数量下降, 水凝胶内外的渗透压减小, 水分渗透速度减慢, 从而降低水凝胶的溶胀率。而在同样的 pH 条件下, TPP 交联壳聚糖水凝胶随 CS/TPP 质量比增大, 其溶胀率逐渐下降,

这是由于 CS/TPP 质量比增大, TPP 可更多地交联壳聚糖分子链段, 形成壳聚糖分子内、分子间交联的复杂网络结构。CS/TPP 质量比增大, TPP 交联壳聚糖水凝胶的网络结构越紧密, 这对水分的向内渗透迁移不利, 从而造成水凝胶的溶胀能力下降^[18,29], 这也与 FT-IR 和 SEM 的分析结果一致。对于 SHMP 交联壳聚糖水凝胶, SHMP 是一种复杂的磷酸盐混合物, 其磷酸盐成分比例随 pH 变化, 这容易导致壳聚糖与 SHMP 之间的交联结构解体^[14], 从而减少 SHMP 交联壳聚糖水凝胶的吸水溶胀能力。这也是 SHMP 交联壳聚糖水凝胶的溶胀能力小于 TPP 交联壳聚糖水凝胶的原因。随 CS/SHMP 质量比增大, 交联剂周围的壳聚糖分子链段增加, 致密的水凝胶结构既减缓了水分的渗入, 也降低了 SHMP 交联壳聚糖水凝胶解体的可能, 从而在一定程度上提高水凝胶的溶胀性。

最后, 图 5 展示在不同 pH 值下交联壳聚糖水凝胶红外光谱。在 pH 2.2 条件下, 周围环境中 H^+ 浓度增加, 利用水凝胶内外渗透压, 水凝胶发生溶胀, 在对应的红外图谱中, 1750 cm^{-1} 附近存在 $-NH_3^+$ 基团的振动峰。随着 pH 的升高, 这一峰逐渐减弱并消失, 这与该基团转变成 N-H 带振动 (1539 cm^{-1}) 有关^[23,31]。

2.6 交联壳聚糖水凝胶的体外释放及其变化机理

当 CS/TPP 比值分别为 3.333、1.667 和 1 时, TPP 壳聚糖水凝胶的 BSA 的包载率分别为 96.89%、93.43%和 10.88%。当 CS/TPP 的质量比分别为 3.333、1.667 和 1 时, 在模拟胃液中, TPP 壳聚糖水凝胶中 BSA 的释放率分别为 15.12%、15.82%和 15.04% (图 6a)。随后, TPP 壳聚糖水凝胶运转到模拟小肠液, 在该环境下, BSA 逐渐释放。6 h 后, TPP 壳聚糖水凝胶转换至模拟结肠液中运转。体外释放实验结束时, 牛血清白蛋白的累积释放率分别为 59.90%、70.10%和 76.57%。

与此相比, 当 CS/SHMP 的质量比分别为 3.333、1.667 和 1 时, 交联壳聚糖水凝胶的包载率分别为 99.68%、98.31%和 21.70%, 在模拟胃液中, BSA 释放率分别为 14.89%、13.04%和 22.41%。当运转至模拟小肠环境, 分别有 3.164%、19.81%和 7.90%的 BSA 从 SHMP 交联壳聚糖水凝胶中释放。在整个体外模拟释放过程中, BSA 的累积释放率分别为 30.47%、47.6%和 50.27%。研究报道显示, 以 TPP 交联的壳聚糖水凝胶(质量比 4), 大约有 55%的活性蛋白累积释放率, 其中约有 45%的活性蛋白释放于模拟上消化道环境,

真正释放于结肠部位的活性蛋白较少。而以 SHMP 交联的壳聚糖水凝胶(质量比 4), 其活性蛋白的累积释放率则与本研究的相近^[10]。

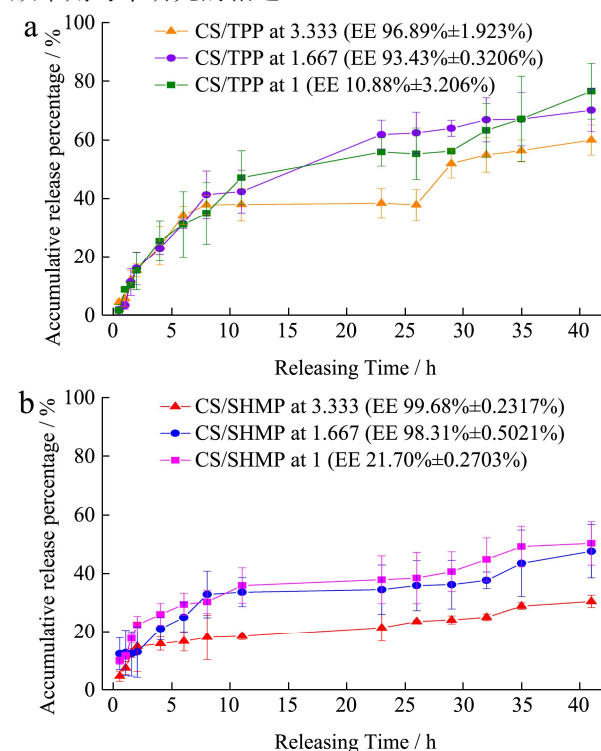


图 6 包载有 BSA 的水凝胶体外释放情况

Fig.6 *In vitro* release of BSA from CS-based hydrogel particle

注: a: TPP 交联壳聚糖水凝胶; b: SHMP 交联壳聚糖水凝胶。

在胃肠道转运过程中, pH 值由 1.2 (模拟胃液) 升至 6.8 (模拟小肠液), 再升至 7.0 (模拟结肠液), 水凝胶由酸性介质向中性环境转变。在此过程中, 模拟胃液中高浓度的 H^+ 使交联壳聚糖水凝胶发生溶胀, 后续随模拟胃肠道运转, 水凝胶逐渐被侵蚀。因此, 在上消化道, 交联壳聚糖水凝胶中的活性物质是通过载体材料溶胀、水凝胶网络结构的侵蚀以及活性物质分子扩散进行释放的^[17]。在模拟结肠液中, 交联壳聚糖水凝胶的释放速率下降, 这与壳聚糖在中性条件下不溶于水有关, 处于水凝胶外围的壳聚糖链段在酸性环境下溶胀后, 随胃肠道 pH 的转变而逐渐不溶于水, 从而形成限制内部物质迁移的障碍, 因此, BSA 在中性的模拟结肠环境中缓慢释放。

而对比两种不同的交联剂, TPP 交联壳聚糖水凝胶在低 CS/TPP 质量比情况下, 在 TPP 分子周围对壳聚糖分子链段进行分子内和分子间交联, 形成复杂致密的水凝胶结构, 以保护活性蛋白, 减少上消化道环境的侵蚀, 增大运送至结肠部位的活性蛋白量。如前所述, SHMP 是一种复杂的磷酸盐混合物, 其在酸性介质中能被水解成三磷酸钠和正磷酸钠, 磷酸基团

的改变,会破坏其与壳聚糖-NH₃⁺之间所形成的氢键^[14]。在模拟胃酸中,SHMP交联壳聚糖水凝胶的氢键被破坏,壳聚糖分子链段发生游离,处于水凝胶周围。所以,在模拟胃液运转阶段,BSA从两种水凝胶中的累积释放率相近。

随着模拟小肠液和模拟结肠液的运转,释放介质pH上升,在SHMP交联壳聚糖水凝胶中,游离的

壳聚糖不溶于水,且水解后的磷酸盐可重新与壳聚糖分子链段结合,水凝胶内部发生分子内、分子间的复杂交联。因此,在中性的肠道环境,SHMP交联壳聚糖水凝胶内部仍然致密,而外部有不溶于水的壳聚糖层,共同限制BSA的释放,使得SHMP交联壳聚糖水凝胶在模拟结肠环境的BSA累积释放率明显低于TPP交联壳聚糖水凝胶。

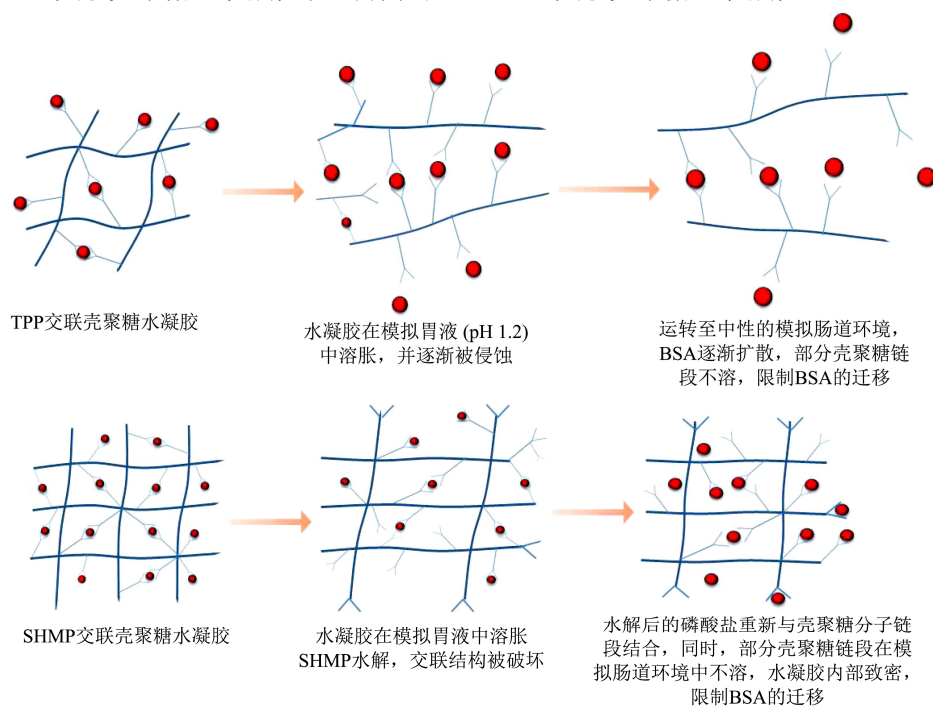


图7 两种交联壳聚糖水凝胶的控释机理图

Fig.7 The controlled-releasing mechanism of CS-based hydrogel particle

3 结论

为提高活性物质的生物利用度,本文通过不同的交联剂,在不同的浓度下对壳聚糖进行离子交联,获得具有不同微观结构的壳聚糖水凝胶。通过红外光谱和X-射线衍射分析,交联壳聚糖水凝胶通过壳聚糖上的氨基和交联剂中的磷酸基团间形成氢键,使得壳聚糖分子链段间可形成分子内和分子间的相互作用,提升水凝胶空间结构的紧密程度。同时,随着壳聚糖/交联剂质量比的下降,即交联剂用量增加,交联壳聚糖水凝胶紧密性增大。热重分析也表明随着交联程度的提高,壳聚糖水凝胶的热稳定性上升。由于交联剂分子结构的差异,TPP交联壳聚糖水凝胶在较低pH下具有较好的溶胀性能,所以在模拟胃液环境中,其对BSA的控释能力优于SHMP交联壳聚糖水凝胶。在后续的模拟小肠液和模拟结肠液中,松散的SHMP交联壳聚糖水凝胶由于释放介质pH的提升以及壳聚糖溶解性下降而形成致密结构,减缓BSA在肠道中的快速释放。本文的研究结果可为活性蛋白类功能因子

的递送以及功能食品的发展提供一定的参考。

参考文献

- [1] Udenigwe C C, Aluko R E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits [J]. *Journal of Food Science*, 2012, 77(1): 11-24
- [2] Li F, Jin H, Xiao J, et al. The simultaneous loading of catechin and quercetin on chitosan-based nanoparticles as effective antioxidant and antibacterial agent [J]. *Food Research International*, 2018, 111: 351-360
- [3] Zhang Y, Chi C, Huang X, et al. Starch-based nanocapsules fabricated through layer-by-layer assembly for oral delivery of protein to lower gastrointestinal tract [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 171: 242-251
- [4] Nooshkam M, Varidi M. Maillard conjugate-based delivery systems for the encapsulation, protection, and controlled release of nutraceuticals and food bioactive ingredients: a review [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 100: 105389
- [5] F C de Oliveira, J S D Coimbra, E B de Oliveira, et al. Food

- protein-polysaccharide conjugates obtained via the Maillard reaction: a review [J]. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 2016, 56(7): 1108-1125
- [6] Ba C, Fu Y, Niu F, et al. Effects of environmental stresses on physiochemical stability of beta-carotene in zein-carboxymethyl chitosan-tea polyphenols ternary delivery system [J]. *Food Chemistry*, 2020, 311: 125878
- [7] Muxkia A, Etxabide A, Uranga J, et al. Chitosan as a bioactive polymer: processing, properties and applications [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 105: 1358-1368
- [8] Sonia T A, Sharma C P. Chitosan and its derivatives for drug delivery perspective [J]. *Advances in Polymer Science*, 2011, 243(1): 23-53
- [9] Suginta W, Khunkaewla P, Schulte A. Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan [J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(7): 5458-5479
- [10] SITU Wenbei, XIANG Tuo, LIANG Yan. Chitosan-based particles for protection of proteins during storage and oral administration [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 308-314
- [11] Yuan D, Jacquier J C, Oriordan E D. Entrapment of protein in chitosan-tripolyphosphate beads and its release in an *in vitro* digestive model [J]. *Food Chemistry*, 2017, 229: 495-501
- [12] Gasper V M, Sousa F, Oueiroz J A, et al. Formulation of chitosan-TPP-pDNA nanocapsules for gene therapy applications [J]. *Nanotechnology*, 2011, 22(1): 15101
- [13] Sanchez-Diaz J C, Becerra-Bracamontes F, Gonzalez-Alvarez A, et al. Effect of sodium hexametaphosphate concentration on the swelling and controlled drug release properties of chitosan hydrogels [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010, 117(6): 3595-3600
- [14] Sang Z C, Qian J, Han J H, et al. Comparison of three water-soluble polyphosphate tripolyphosphate, phytic acid, and sodium hexametaphosphate as crosslinking agents in chitosan nanoparticle formulation [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 230: 115577
- [15] 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 Wenbei, LIANG Yan, CHEN Xiaoling, 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
- [16] Yang J, Liang G, Xiang T, et al. Effect of crosslinking processing on the chemical structure and biocompatibility of a chitosan-based hydrogel [J]. *Food Chemistry*, 2021: 129476
- [17] Tian F, Liu Y, Hu K A, et al. Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2004, 57(1): 31-37
- [18] Hamdi M, Nasri R, Li S, et al. Design of blue crab chitosan responsive nanoparticles as controlled-release nanocarrier: physicochemical features, thermal stability and *in vitro* pH-dependent delivery properties [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 145: 1140-1154
- [19] Huang W, Wang Y, Huang Z, et al. On-demand dissolvable self-healing hydrogel based on carboxymethyl chitosan and cellulose nanocrystal for deep partial thickness burn wound healing [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(48): 41076-41088
- [20] Liu Q, Ji N, Xiong L, et al. Rapid gelling, self-healing, and fluorescence-responsive chitosan hydrogels formed by dynamic covalent crosslinking [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 246: 116586
- [21] Chen J, Li X, Chen L, et al. Starch film-coated microparticles for oral colon-specific drug delivery [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 191: 242-254
- [22] Mazancova P, Nemethova V, Tre Ova D A, et al. Dissociation of chitosan/tripolyphosphate complexes into separate components upon pH elevation [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 192: 104-110
- [23] Gupta K C, Jabrail F H. Controlled-release formulations for hydroxy urea and rifampicin using polyphosphate-anion-crosslinked chitosan microspheres [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, 104(3): 1942-1956
- [24] Kumar V, Leekha A, Tvagi A, et al. Preparation and evaluation of biopolymeric nanoparticles as drug delivery system in effective treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Pharmaceutical Research*, 2017, 34(3): 654-667
- [25] Lu J, Sun M, Yuan Z, et al. Innovative insight for sodium hexametaphosphate interaction with serpentine [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2019, 560: 35-41
- [26] Janes K A, Alonso M J. Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: preparation and characterization [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2003, 88(12): 2769-2776