

# 花青素缓释材料—氨基壳聚糖的制备及缓释性能研究

袁 博, 许培源, 王佩佩, 张 华, 曹成亮, 蒋继宏\*  
(江苏师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

**摘 要:** 以壳聚糖为材料, 采用反相悬浮交联法制备复合材料, 利用Schiff base反应对壳聚糖的氨基进行了保护。利用乙二胺对得到的复合材料进行修饰, 获得氨基化的壳聚糖材料, 并对其结构进行表征。通过聚乙烯硫酸钾标定氨基, 考察环氧丙烷用量对材料的表面游离氨基的影响。分别探讨了致孔剂、预交联剂与交联剂的含量对花青素包封率的影响以及在模拟生理环境中评价材料的缓释情况。结果表明: 随着环氧丙烷的含量增加, 材料出现游离的氨基减少的情况; 随着致孔剂、预交联剂和交联剂的含量增加, 花青素的包封率也逐渐增高, 但当三者超过一定的含量时, 包封率反而出现下降趋势。通过模拟人体生理环境下的花青素的缓释研究, 载药颗粒在pH 1.72, 温度37℃条件下, 4 h内释放量达到了 $(81.63 \pm 1.92)\%$ , 在10 h内释放完毕, 而在pH 8.25, 温度37℃时4 h内释放量达到了 $(71.68 \pm 2.55)\%$ , 10 h内基本释放完毕。释放曲线符合正态分布模型, 表明该化学修饰的壳聚糖可以作为负载材料用于花青素的缓释用途。

**关键词:** 花青素; 缓释; 氨基壳聚糖; 制备

## Preparation and Release Properties of Amino-Chitosan for Use in Sustained Release of Anthocyanin

YUAN Bo, XU Pei-yuan, WANG Pei-pei, ZHANG Hua, CAO Cheng-liang, JIANG Ji-hong\*  
(Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant of Jiangsu Province, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China)

**Abstract:** Chitosan-based composite materials were prepared using the inverse-phase suspension cross-linking technique by protecting the amino group in chitosan through the Schiff base reaction. Amino-chitosan was obtained after modification of the composite materials with ethidene diamine and its structure was characterized. In addition, the effect of epoxyp propane concentration on free amino groups on the surface of amino-chitosan was investigated; the amount of free amino groups was measured using potassium polyvinylsulfate (PVSK). Also, the effects of porogen, pre-cross-linking agent and cross-linking agent on the entrapment efficiency of anthocyanin were evaluated as well as sustained release properties of anthocyanin-loaded amino-chitosan. The results showed that the amount of free amino group was reduced with increasing epoxyp propane concentration. With increasing concentrations of porogen, pre-cross-linking agent and cross-linking agent within certain ranges, the entrapment efficiency of anthocyanin was also gradually increased, but decreased when they exceeded the ranges. Under simulated human physiological conditions, the release of anthocyanin from chitosan particles at pH 1.72 and 37℃ was  $(81.63 \pm 1.92)\%$  in 4 h, and complete release was achieved in 10 h. By contrast, the release of anthocyanin at pH 8.25 and 37℃ was  $(71.68 \pm 2.55)\%$  in 4 h, and the entrapped anthocyanin was almost completely released in 10 h. The release curves, observed to follow normal distribution patterns, showed that the chemically modified chitosan can be used for sustained release of anthocyanin.

**Key words:** anthocyanin; sustained release; amino-chitosan; preparation

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)10-0062-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201410012

收稿日期: 2013-09-06

基金项目: 江苏省高校自然科学研究项目(13KJD350001); 江苏师范大学校自然科学基金项目(12XLB04); 江苏省药用植物生物技术重点实验室开放课题(KLBMP1401);

江苏省高校优秀科技创新团队资助项目(药用微生物前期开发); 徐州市高技术研究重点实验室建设项目(XF12C045)

作者简介: 袁博(1985—), 男, 助理实验师, 硕士, 研究方向为天然产物分离与分析。E-mail: boyuan@jsnu.edu.cn

\*通信作者: 蒋继宏(1962—), 男, 教授, 博士, 研究方向为药用植物生物技术。E-mail: jhjiang@jsnu.edu.cn

壳聚糖是一种无毒副作用,来源于天然的高分子多糖,是自然界中唯一的碱性多糖,在水处理、金属离子富集回收等环境领域具有重要而广泛的应用<sup>[1-3]</sup>,同时在亲和色谱固定相的开发中也有一定的使用<sup>[4-5]</sup>。在医学上具有止血、促进组织再生、抑菌、抗霉菌生长等生物活性<sup>[6-9]</sup>,目前在作为药物载体、缓释(控释)骨架材料、成膜材料以及靶向药物载体方面具有重要的应用<sup>[10-15]</sup>。同时,随着人们对保健食品的追求,壳聚糖被认为是维他命丸、麦乳精以及卵磷脂等保健品之后的第二代保健食品,是一种可食性动物纤维,被人食用进入肠胃中,在肠胃中的细菌作用下分解成为低聚糖,具有较好的生理活性,具有调节免疫、内分泌、降血脂、降血压以及排除体内毒素的作用,是一种理想的保健食品<sup>[16-17]</sup>。

花青素是生物类黄酮物质,是广泛存在于植物中的水溶性色素<sup>[18]</sup>,是一种具有药用活性的生物活性成分,目前花青素在清除自由基、抗心脑血管疾病、预防衰老、改善糖尿病症状、镇痛抗炎等方面具有广泛的应用<sup>[19-21]</sup>。

壳聚糖与天然产物吸附鲜有报道,但未见负载花青素的相关文献。本实验研究了一种保护壳聚糖氨基的颗粒负载材料制备方法,采用反相悬浮法制备壳聚糖负载颗粒。利用Schiff base反应原理,使得甲醛和壳聚糖上的氨基反应生成Schiff base,再用环氧氯丙烷交联,使得交联大部分发生在羟基上,然后再脱去Schiff base,得到保留氨基的壳聚糖载体材料,同时加入致孔剂的方法来提高载体的孔隙率,探讨了制备工艺。得到交联材料后,在与花青素提取物进行吸附时使用三聚磷酸钠(sodium tripolyphosphate, TPP)二次交联,使得负载材料结构更加紧密,同时由于氨基的保留,可以最大程度的吸附花青素,得到花青素-壳聚糖复合药物,并对该复合药物的缓释情况进行了研究。通过本研究的开展,以期望为花青素作为保健药品提供思路和研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

紫薯 市购;壳聚糖(脱乙酰度>85%) 美国Sigma公司;花青素(HPLC测定含量>95%) 天津尖峰天然产物有限公司;硫酸铁铵( $(\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ )、香草醛( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ ) 上海双香助剂厂;山梨醇酐三油酸酯( $\text{C}_{60}\text{H}_{108}\text{O}_8$ , Span 85) 上海化学试剂公司;聚乙二醇2000(polyethylene glycol, PEG 2000, CP)、四溴酚蓝(tetrabromophenol blu, T.B)指示剂( $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ )、三聚磷酸钠(sodium tripolyphosphate, TPP)、甲醛( $w=37\%$ )、液体石蜡(CP) 国药集团;环氧氯丙烷(epichlorohydrin, EPC) 上海化学试剂公司;甲

醇、乙腈(均为色谱级) 美国默克公司;试剂若无特别说明均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

1260高效液相色谱系统 美国Agilent公司;S-3400N扫描电子显微镜 日本日立公司;UV-2102C型紫外-可见分光光度计 上海尼龙科仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 壳聚糖氨基保护复合材料的制备

按应国清<sup>[11]</sup>方法进行改进。分别将壳聚糖和PEG 2000溶于质量分数为3%的乙酸溶液中配制成一定质量分数的壳聚糖和PEG 2000溶液,将两种溶液置于装有搅拌器及温度计的250 mL三颈烧瓶中。加入液体石蜡80 mL, Span 85 3~4滴,40℃条件下搅拌30 min,升温到50℃,滴加一定量的甲醛溶液,继续反应30 min,调体系pH 10~11。再升温到60℃,加入适量的环氧氯丙烷,以恒压滴液漏斗缓慢滴加质量分数为5%的NaOH溶液,使体系pH值始终保持在10,继续搅拌反应2 h,过滤,水洗,用石油醚不断冲洗,直至去掉表面的石蜡,超声30 min,洗涤。最后在50℃条件下用0.3 mol/L盐酸溶液在磁力搅拌下处理10 h,依次水洗,碱洗,水洗至中性,湿态保存,备用。

#### 1.3.2 壳聚糖氨基保护复合材料的氨基化

选取乙二胺作为胺化试剂胺化反应。将得到的壳聚糖氨基保护颗粒重新置于三颈烧瓶中,加入0.2 mol/L  $\text{NaHCO}_3$ 溶液100 mL,再加入50 mL乙二胺,60℃条件下回流搅拌反应24 h,反应后所得到的颗粒悬混液抽滤,用1 mol/L的醋酸溶液处理,水洗至中性,继续抽干,得到壳聚糖氨基衍生物(amidogen chitosan, Ado-CS)复合材料,用傅里叶变换红外光谱测定光谱结构,并用扫描电子显微镜对其表面特征进行了表征。

#### 1.3.3 胶体滴定测定Ado-CS表面游离氨基

用双蒸水配制0.2 mmol/L聚乙烯硫酸钾(polyvinylsulfuric acid potassium salt, PVSK)标准溶液。精密移取10 mL得到的Ado-CS溶液,按上述方法制备系列空白Ado-CS溶液,定容至20 mL,精密移取5 mL置于锥形瓶中,加入质量分数为0.2% T.B指示剂100  $\mu\text{L}$ ,混合后用PVSK标准溶液滴定溶液由蓝色刚好变为紫红色,并在10 s内不褪色,此时为滴定终点,记录消耗PVSK体积 $V_1$ ,双蒸水做空白。另精密移取2 mg/mL空白壳聚糖溶液10 mL,定容至20 mL,按同样方法滴定,消耗PVSK体积为 $V_2$ ,以上数据平均测定3次,同时测定壳聚糖(chitosan, CS)的游离氨基数量。总游离氨基物质的量百分数按公式(1)计算。

$$N/\% = \frac{V_1}{V_2} \times 100 \quad (1)$$

按上述方法测定不同质量浓度EPC 2000对Ado-CS游离氨基的影响,同时做CS为对照。

1.3.4 花青素的提取<sup>[22]</sup>

准确称取50 g紫薯干粉于1 000 mL烧瓶中,按1:10的比例加入体积分数75%的乙醇溶液(含1.5%的柠檬酸),80℃条件下回流提取6 h,期间,每隔2 h减压抽滤,收集过滤液,补加等量乙醇溶液。收集3次的滤液合并减压得到花青素粗浸膏物,过大孔树脂,收集体积分数75%的乙醇洗脱液,减压浓缩回收乙醇,得花青素浸膏,用0.2%醋酸溶液溶解,并定容于500 mL,即得紫薯花青素(purple sweet potato anthocyanins, PSPA)溶液。

## 1.3.5 Ado-CS-PSPA复合材料制备

取一定量的Ado-CS材料用20 mL乙酸溶解,配制成为一定浓度的Ado-CS乙酸溶液。用高速均质机8 000 r/min均质10 min。均质后的溶液立即置于磁力搅拌器上持续搅拌,用1 mL注射器逐滴加入TPP溶液,并继续搅拌1 h使其形成例子交联网络,形成网状交联材料。这时加入PSPA,充分包裹花青素,最后将溶液离心,用去离子水清洗,冷冻干燥后制成极细小颗粒。

## 1.3.6 Ado-CS-PSPA复合材料包封率的测定

移取载药Ado-CS-PSPA悬浮液1 mL到超滤管中,3 500 r/min离心10 min,取离心液,稀释100倍,以花青素为标准,利用反相高效液相色谱法测定花青素含量,计算游离药物 $W_{游}$ ,包封率 $w$ 按公式(2)计算。

$$w/\% = \frac{W_{总} - W_{游}}{W_{总}} \times 100 \quad (2)$$

式中: $W_{总}$ 为花青素的质量(加入壳聚糖的质量); $W_{游}$ 为测定的游离花青素质量。

取20 mg/L的花青素溶液1 mL加到超滤管中,同法操作,测定离心液中花青素质量浓度,计算回收率,每组重复实验3次。

以包封率为指标,按照上述制备方法分别测定用量的环氧丙烷、甲醛以及TPP对花青素包封率的影响。

## 1.3.7 体外释药实验

精密移取载药壳聚糖,加入到筒状透析袋中,用透析夹子夹住两端,分别悬浮于100 mL 3种不同的介质溶液(pH 4.5的醋酸钠缓冲溶液, pH 7.4磷酸盐缓冲溶液, pH 9.5碳酸钠缓冲液)中,37℃水浴摇床,在开始实验后的0.25、0.5、1、2、4、8、12、24、48、72 h取袋外液2 mL,同时补充等量的介质。利用高效液相色谱测定所取液体中的花青素含量,计算释放的花青素总量及各时间点的累积释放率,按公式(3)计算。

$$\text{累积释放率 } i/\% = \frac{i_{外}}{i_{总}} \times 100 \quad (3)$$

式中: $i_{外}$ 为透析外液药物总质量; $i_{总}$ 壳聚糖中药物总质量。

精密移取4.0 mL游离花青素水溶液按同法透析,考察该透析条件的回收率。

采用Logarithmic normal distribution(对数正态分布模型)对整个释药曲线进行拟合<sup>[23]</sup>。S型释药曲线的累积释放率 $Q$ 与时间 $t$ 的关系为:

$$Q = \Psi \frac{\lg t - \mu}{\sigma} \quad (4)$$

式中: $\Psi$ 为标准正态分布函数; $\mu$ 为药物累计溶出质量分数的对数均数; $\sigma$ 为对数标准差;标准正态离差 $U$ 为:

$$U = \frac{\lg t - \mu}{\sigma} \quad (5)$$

带入(4)得:

$$U = \Psi^{-1}(Q) = \frac{\lg t - \mu}{\sigma} = \frac{1}{\sigma} \lg t - \frac{\mu}{\sigma} \quad (6)$$

因此,将 $Q$ 转化成 $U$ 后对 $\lg t$ 线性回归,可得直线方程,可以求得出均数 $m = \lg^{-1}(\mu + 1.151\delta^2)$ ,标准差 $s = m[\lg^{-1}(2.303\sigma^2) - 1]^{1/2}$ 。利用比较 $m$ 和 $s$ 的值大小可以得到药物溶出快慢情况。

## 1.3.8 活性成分含量分析方法检测

将待测液配制成0.1 g/L的甲醇溶液,取其1 mL移入10 mL试管内,做5个平行,依次加入6 mL质量分数为4%的香草醛甲醇溶液和3 mL浓盐酸,加盖摇匀,在(30±1)℃避光条件下反应15 min后,于500 nm处测其吸光度,以甲醇代替样品溶液作为空白对照。用标准曲线计算出样品的花青素含量。样品中花青素含量计算公式:

$$D/\% = \frac{V \times C \times n}{1\,000m} \times 100 \quad (7)$$

式中: $D$ 为试样中花青素含量/%; $V$ 为试样定容体积/mL; $C$ 为试样中花青素质量浓度/(mg/mL); $n$ 为稀释倍数; $m$ 为试样质量/g。

## 2 结果与分析

## 2.1 氨基化壳聚糖表征

将供试样品干燥脱水,按常规方法镀金,在扫描电子显微镜上观察。图1a、b为分别为观察壳聚糖和氨基化壳聚糖局部表面结构。

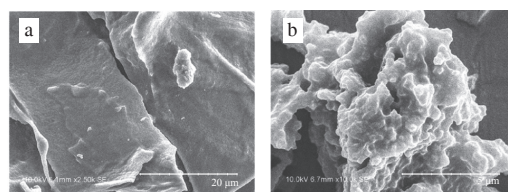


图1 样品的电子显微镜扫描图

Fig.1 Scanning electron micrograph images of chitosan and amino-chitosan



由于在制备载体时,壳聚糖本身的氨基会受到破坏,本研究采用甲醛与壳聚糖上的氨基发生反应生成Schiff base,在使用环氧氯丙烷交联,这样便会使得交联大部分发生在羟基上,不破坏氨基,当交联结束时,用酸脱去Schiff base,这样便得到了保留氨基的负载材料,同时利用乙二胺作为胺化试剂对负载材料进行了二次氨基修饰,得到了壳聚糖氨基衍生物复合材料。从图1可以看出,经过处理后由片状结构聚集成类球状,壳聚糖表面不再光滑,表面出现凹凸不平,含有较多的孔洞,孔径较大,这些孔洞为包裹药物提供了位置。

## 2.2 EPC对Ado-CS表面氨基数量的影响

Ado-CS表面的游离氨基在酸性介质中会质子化,形成 $\text{-NH}_3^+$ ,用标准聚阴离子PVSK直接滴定表面游离氨基,统计结果如图2所示。

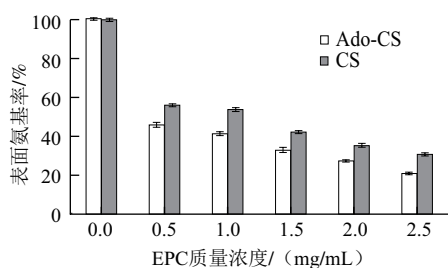


图2 EPC质量浓度对Ado-CS表面氨基数量的影响

Fig.2 Effect of EPC concentration on free amino groups on the surface of chitosan and amino-chitosan

从图2可以看出,随着EPC质量浓度的增加,Ado-CS和CS溶液都会出现游离的氨基减少的趋势,这说明EPC阴离子与 $\text{-NH}_3^+$ 基团分子之间和分子内的交联是Ado-CS形成的关键,通过控制EPC阴离子与 $\text{-NH}_3^+$ 的比例可以得到不同表面氨基游离率的Ado-CS。同时也可以看出,通过氨基化和氨基保护的壳聚糖更容易得到表面氨基游离率高的复合材料。

## 2.3 致孔剂对包封率的影响

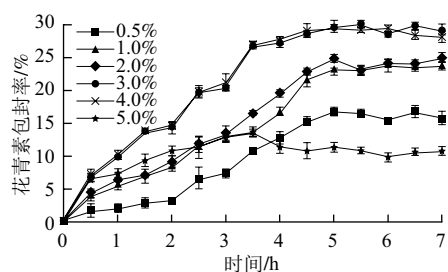


图3 PEG 2000质量分数对吸附能力的影响

Fig.3 Effect of PEG concentration on the entrapment efficiency of anthocyanin

固定Ado-CS的溶液质量分数2%,甲醛用量1 mL,环氧丙烷用量1 mL,通过使用不同质量分数PEG 2 000

比较生成的材料对花青素吸附量的高低来确定适合的用量。致孔剂可以使材料孔洞增加从而增加吸附能力,对不同质量分数PEG 2000得到的材料进行吸附得到的花青素含量进行统计,得图3。

从图3可以看出,随着致孔剂PEG 2000质量分数的增大,花青素的包封率也逐渐提高,花青素因可能是由于致孔剂含量增大导致壳聚糖孔隙率增加,比表面积逐渐增大,从而花青素分子能更好的进入孔隙中,然而当致孔剂含量逐渐增大到5%时,对花青素包封率反而出现了下降,主要花青素因可能是因为致孔剂含量增加,孔隙率太高,导致了孔与孔之间的承受力下降,导致了孔的坍塌。所以从图3可以得到,在制备负载材料时,致孔剂的含量不宜过大,取3%~4%之间含量即可。

## 2.4 预交联剂甲醛的用量对花青素包封率的影响

固定壳聚糖的溶液质量分数2%,PEG 2000质量分数3.5%,环氧氯丙烷用量1 mL,搅拌速率约为400 r/min,Span 3滴,乙二胺用量为3 mL,其他实验条件不变,按体积分数计算,分别加入体积分数0.5%~5%的甲醛进行实验,所得的包封率见图4。通过图4可以看出,甲醛用量对吸附材料影响较大,在一定的范围内,随着甲醛体积比例逐级增大时,花青素的包封率也逐级增加,当甲醛体积分数为4%时,花青素的包封率最大,花青素因可能为:当甲醛的体积分数较少时,体系容易发生粘连,很难制备出较好的吸附材料,同时少量的甲醛会使得对氨基的保护下降,使得环氧氯丙烷与材料中的氨基发生交联反应,这样会导致氨基的空间位阻增大,所以导致了花青素的吸附能力。但当超过这个阈值后,包封率明显下降。花青素因可能为:随着甲醛的体积分数增大,吸附材料中的过多氨基会与甲醛反应,这样也会影响对花青素的吸附能力。

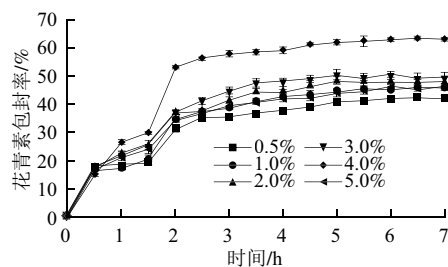


图4 甲醛体积分数对吸附能力的影响

Fig.4 Effect of formaldehyde dosage on the entrapment efficiency of anthocyanin

## 2.5 交联剂对花青素的包封率影响

壳聚糖(及改性壳聚糖)和TPP反应是因为壳聚糖上带正电的氨基与TPP与带负电的磷酸基的静电相互作用。因此,配制不同比例的Ado-CS和TPP对花青素的包封率也会大不相同,由于改性之后的壳聚糖是反应中的主要

包裹材料, TPP的作用主要是起连接作用, 理论上包封率的影响主要是来源于改性壳聚糖Ado-CS投放量, 投放不同质量的Ado-CS和TPP, 观察包封率变化, 主要变化见表1。

表 1 不同投放量的氨基壳聚糖和TPP质量浓度对花青素的包封率的影响  
Table 1 Effect of amino-chitosan dosage and TPP concentration on the entrapment efficiency of anthocyanin

TPP质量浓度/ (mg/mL)	氨基壳聚糖的投放量/g				
	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0.50	18.55±0.22	25.33±0.65	35.62±0.44	32.52±0.92	28.22±0.51
1.00	20.24±0.68	32.68±1.02	44.36±0.57	41.36±0.69	31.24±0.99
1.50	21.66±1.33	43.23±0.66	57.99±0.55	51.33±0.55	39.33±0.55
2.00	22.14±0.27	46.31±0.36	59.66±0.72	50.25±1.55	47.06±0.87
2.50	21.89±0.88	45.88±1.22	60.08±0.54	51.33±0.88	47.99±0.22

从表1可以看出, 当Ado-CS投放量固定不变, 当TPP的质量浓度达到一定值后, 材料对花青素的包封率几乎不再提高。出现这种情况的花青素因主要是由于溶液中离散的Ado-CS的静电连接作用大部分已经连接在一起, TPP的质量浓度增加不会再进一步提高Ado-CS之间的连接, 因此对花青素的包封率也不会进一步提高。而再同一质量浓度TPP下, 随着Ado-CS投放量的提高, 花青素的包封率出现先上升后下降, 下降的花青素因可能主要是因为随着Ado-CS在溶液中的质量浓度增加, 溶液的黏度也随之增加, 而这样便会带来不易于搅拌, 导致不能充分混合, 导致了包封率的下降。

从表1还可以得到最佳的配料比为乙酸体积20 mL、TPP含量2 mg/mL、Ado-CS投放量2 g, 此时复合载体材料对花青素的包封率较高。

2.6 Ado-CS- PSPA体外释放研究

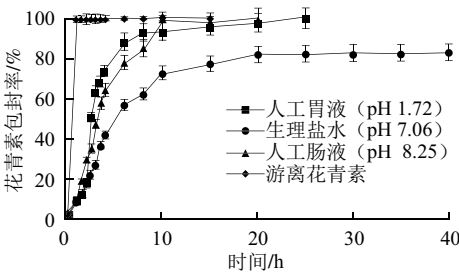


图 5 不同pH值条件下的Ado-CS-PSPA花青素缓释曲线 (25 °C)  
Fig.5 Release curves of anthocyanin-loaded amino-chitosan in release media with different pH values (25 °C)

图5反映载花青素颗粒在模拟人体胃、肠以及中性环境下花青素的释放情况。通过图5可以看出, 3种pH值条件下载花青素颗粒释放花青素都显著慢于游离花青素, 游离花青素在最初的1 h就几乎释放100%, 在这个时间下, 在3种pH值条件下, 释放量均在15%左右, 在中性环境下, 虽然花青素的缓释时间较长, 释放实验40 h后, 花青素的释放量才达到(82.49±4.1)%。在模

拟人肠道环境下的花青素释放量较快, 2 h释放花青素量(27.58±1.37)%, 20 h时释放量为(99.78±4.9)%, 推断在肠中的大量释放时间在3.5 h之后。而在模拟人胃环境下时, 2 h释放花青素量(15.55±1.77)%, 25 h内释放花青素达到(99.87±4.99)%, 推断在胃中的大量释放时间在2.5 h之后。花青素在肠胃中可以完全释放, 符合对花青素的释放要求。

图6反映了在不同温度和不同pH值的作用下, 载花青素颗粒释放花青素的能力。人体内的温度一般维持在37 °C, 当在模拟胃部生理环境下(pH 1.72, 37 °C)时, 花青素的释放率相对于25 °C条件下要大一些。在37 °C条件下, 花青素释放量在4 h内达到了(81.63±1.92)%, 高于25 °C条件下的(72.55±3.62)%。在10 h内花青素基本释放完毕, 释放率为(99.41±1.87)%。在模拟人体肠道生理环境下(pH 8.25, 37 °C)时, 花青素的释放率相对于模拟胃环境下要大一些, 同时也比25 °C条件下要高, 在37 °C时, 花青素的释放量在4 h内达到了(71.68±2.55)%, 高于25 °C时的释放率, 也在10 h内基本释放完毕, 释放率为(99.72±2.51)%。出现上述现象的主要花青素因可能为花青素的释放为吸热反应, 当温度升高时, 反应会向着正方向移动, 这样就会促使花青素的释放。

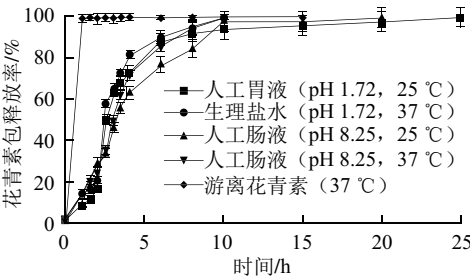


图 6 不同pH值和温度下的Ado-CS-花青素PSPA缓释曲线  
Fig.6 Release curves of anthocyanin-loaded amino-chitosan in release media with different pH values at different temperatures

采用对数正态分布模型对释药曲线(pH值和温度)进行拟合, 按照方法中的公式利用Matlab软件进行计算拟合, 计算得到拟合方程如表2所示。通过拟合方程可以看出, 拟合程度较好,  $m$ 、 $s$ 值表示花青素溶出过程的特点, 一般 $m$ 值越大, 花青素溶出缓慢, 结合图7也可以看出, 当温度升高时,  $m$ 值是略有下降, 整体的释放花青素曲线符合正态分布模型。

表 2 METLAB模型参数结果  
Table 2 Kinetics models for anthocyanin release under different conditions

条件	拟合方程	相关系数	$m$	$s$
pH 1.72, 25 °C	$U=\psi^{-1}(Q)=2.9712\lg t-1.4144$	0.972 8	4.039 5	32.333 5
pH 1.72, 37 °C	$U=\psi^{-1}(Q)=3.7165\lg t-1.4768$	0.975 6	3.023 3	24.363 6
pH 8.25, 25 °C	$U=\psi^{-1}(Q)=3.2016\lg t-1.5779$	0.987 6	4.027 7	29.333 4
pH 8.25, 37 °C	$U=\psi^{-1}(Q)=3.7369\lg t-1.6119$	0.966 4	3.263 8	24.223 7

### 3 讨论

扫描电子显微镜下观察材料在修饰前后发生了比较明显的变化花青素本表明光滑的壳聚糖材料被扭曲成近似球状物,表明出现褶皱,出现了较大的空隙,这些空隙为下一步的包裹花青素提供了位置。

随着EPC的质量浓度的增加,材料游离的氨基都会相应降低,但通过氨基化的壳聚糖材料相对花青素壳聚糖材料在氨基数量上仍然较多,这就保证了下一步的花青素吸附、包裹。同时也论证了EPC阴离子与 $\text{-NH}_3^+$ 基团分子之间和分子内的交联是Ado-CS形成的关键,同时,氨基保护后,更容易得到游离氨基更多的符合材料。

在一定的配比范围内,TPP和Ado-CS的配比可以有效提高花青素的包封率。但TPP以及壳聚糖进一步增加时,包封率都不会提高,甚至出现下降的情况。

通过体外模拟体内环境,对花青素的释放效果进行了评估,负载花青素的材料在酸性环境下释放效果较好,其次是碱性,可以推断药物在胃部的释放程度已经达到97%以上,同时运用对数模型验证了释放花青素曲线是符合正态分布模型的。

本研究从化学修饰和氨基化角度出发,设计不同的实验考察作为花青素的药物载体,壳聚糖不仅可以达到花青素缓释的效果,更重要的是壳聚糖是一种环保、低毒的负载材料是,是现在药物、保健品等重要的负载材料选择之一。研究的进行对壳聚糖与花青素在保健食品方面的应用开发提供理论和实验基础。

### 参考文献:

- [1] 蔡玲,李爱阳,何晓梅. 甲壳素/壳聚糖在水处理中的应用[J]. 吉林化工学院学报, 2006, 23(1): 19-21.
- [2] 王爱勤,周金芳,俞贤达. 完全脱乙酰壳聚糖与 $\text{Zn(II)}$ 的配位作用[J]. 高分子学报, 2000(6): 688-691.
- [3] 张鸿雁,刘星生,黄国林. 壳聚糖对金属离子吸附性能改性的研究进展[J]. 化工时刊, 2005, 19(9): 60-62.
- [4] 申屠静灵,贾之慎,高慧. 活性F3GA固载的壳聚糖微球对过氧化氢酶的吸附[J]. 浙江大学学报:理学版, 2005, 32(6): 674-677.
- [5] 王峥,郭敏亮,姜涌明. 新型疏水色谱填料-丁基交联壳聚糖的合成[J]. 功能高分子学报, 2001, 14(1): 81-84.
- [6] 位晓娟,张长青,顾其胜. 壳聚糖的性能、产品及应用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2010(10): 1265-1270.
- [7] 董静,刘群. 甲壳素/壳聚糖及其衍生物的最新应用进展[J]. 医学综述, 2011, 17(6): 921-922.
- [8] 莫名月,李国明,孔志玲. 壳聚糖负载利福平微囊的制备及其性能研究[J]. 华南师范大学学报:自然科学版, 2006, 2(1): 87-91.
- [9] 彭湘红,张俐娜,潘雪龙. 壳聚糖丝心蛋白包药微球的结构和释放性能研究[J]. 高分子学报, 2000(4): 502-505.
- [10] 林爱华,刘奕明,平其能. 壳聚糖纳米粒表面游离氨基与纳米粒特性研究[J]. 药科学, 2007, 42(3): 323-328.
- [11] 应国清,卢霞,石陆娥,等. 新型胺基壳聚糖微球的制备及对黄酮类物质的吸附性能[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(2): 94-97.
- [12] 郭英,李骝,谢静,等. 阿司匹林壳聚糖纳米缓释微球的制备及体外释放性能的研究[J]. 化学世界, 2007(1): 38-42.
- [13] 余婷婷. 壳聚糖的药剂学进展[J]. 广东药学院学报, 2001, 17(7): 26-30.
- [14] 张灿,丁娅,平其能. 水溶性6-*O*-琥珀酰-*N*-半乳糖化壳聚糖衍生物的制备与表征[J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(4): 291-295.
- [15] PARK I K, JIANG H L, COOK S E, et al. Galactosylated chitosan (GC)-graft-poly(vinylpyrrolidone) as hepatocyte-targeting DNA carrier: *in vitro* transfection[J]. Archives of Pharmacal Research, 2004, 27(12): 1284-1289.
- [16] 何欣云. 甲壳素的预防保健作用及其展望[C]//中国甲壳素资源研究开发应用学术研讨会. 青岛:中国化学会, 1997: 27.
- [17] 赖凤英,向东,梁平. 壳聚糖在食品工业中的应用[J]. 中国甜菜糖业, 2004(2): 29-30.
- [18] 韩海华,梁名志,王丽,等. 花青素的研究进展及其应用[J]. 茶叶, 2011, 37(4): 217-220.
- [19] MAKOTO Y, SHIGENORI O, MASATU Y, et al. Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweet potato[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, 65(7): 1652-1655.
- [20] HOU D X, LIN S G, TERAHARA N, et al. Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(1): 29-36.
- [21] NEILL S O, GOULD K S, KILMARTIN P A, et al. Antioxidant activities of red versus green leaves in *elastostema rugosum*[J]. Plant, Cell & Environment, 2002, 25(4): 539-547.
- [22] 黄思梅,张镜,范玉琴,等. 短穗鱼尾葵果实原花青素的提取工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(20): 104-108.
- [23] 刘元江. 基于MATLAB的释药对数正态分布模型参数求解[J]. 清远职业技术学院学报, 2009, 6(2): 21-22.