



食品科学

Food Science

ISSN 1002-6630, CN 11-2206/TS

## 《食品科学》网络首发论文

题目: 壳聚糖/ $\gamma$ -聚谷氨酸负载黑米花色苷纳米粒的制备、表征及缓释性能  
作者: 潘飞, 赵磊, 陈艳麟, 郝帅, 张会敏  
网络首发日期: 2020-07-22  
引用格式: 潘飞, 赵磊, 陈艳麟, 郝帅, 张会敏. 壳聚糖/ $\gamma$ -聚谷氨酸负载黑米花色苷纳米粒的制备、表征及缓释性能. 食品科学.  
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200722.1116.020.html>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# 壳聚糖/ $\gamma$ -聚谷氨酸负载黑米花色苷纳米粒的制备、表征及缓释性能

潘 飞, 赵 磊\*, 陈艳麟, 郝 帅, 张会敏

(食品营养与人类健康北京高精尖创新中心, 北京市食品添加剂工程技术研究中心, 北京工商大学, 北京 100048)

**摘 要:** 黑米花色苷是一种天然多酚类色素, 具有抗氧化、调节血脂和改善肠道菌群等功能, 然而黑米花色苷稳定性差且生物利用率低, 限制了其在功能性食品领域中的应用。本研究利用壳聚糖在 pH 驱动下与  $\gamma$ -聚谷氨酸通过离子凝聚法对黑米花色苷进行包埋, 以改善黑米花色苷的稳定性和胃肠缓释能力。在单因素试验的基础上, 以粒径、包封率作为优化指标进行响应面优化试验, 获得黑米花色苷纳米粒的最佳制备条件为: 壳聚糖浓度 0.8 mg/mL、聚谷氨酸:壳聚糖质量比 7:20 (w:w)、黑米提取物浓度 1.98 mg/mL、pH 值 5.0 和搅拌时间 30 min, 所得黑米花色苷纳米粒的包封率为 50.90%, 载药量为 4.77%, 粒径为  $(352.95 \pm 6.42)$  nm, PDI 为  $(0.23 \pm 0.02)$ , Zeta 电位为  $(29.56 \pm 1.09)$  mV, 粒径较小、分散稳定。通过扫描电镜观察黑米花色苷纳米粒呈球形颗粒状; 模拟胃肠缓释试验显示, 与游离黑米花色苷相比, 黑米花色苷纳米粒在胃、肠液中释放率分别减少 52.65%和 36.69%, 这表明所制备的黑米花色苷纳米粒具有较好的缓释性能, 具有较好的应用前景。

**关键词:** 黑米花色苷; 响应面优化; 纳米粒; 缓释性能

## Preparation, Characterization and Sustained Release Property of Black Rice Anthocyanin Loaded Chitosan/ $\gamma$ -Polyglutamic Acid Nanoparticles

PAN Fei, ZHAO Lei\*, CHEN Yanlin, HAO Shuai, ZHANG Huimin

(Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health / Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048)

**Abstract:** Black rice anthocyanin (BRA) is a natural polyphenolic pigment with many functional activities including antioxidant, blood lipids regulation and improving intestinal flora. However, BRA has poor stability and low bioavailability, which limits its application in the field of functional foods. Therefore, in order to improve the stability and sustained release property of BRA, chitosan was used to encapsulate BRA by ionic gelation method with  $\gamma$ -polyglutamic acid (PGA) under pH driven in this study. The response surface test was carried out on the basis of the single factor test, and the optimal preparation conditions were obtained based on particle size and encapsulation rate. The results showed that the optimum condition for preparing BRA nanoparticles was: chitosan concentration of 0.8 mg/mL, PGA: chitosan ratio was 7:20 (w:w), BRA concentration of 1.98 mg/mL, pH 5.0 and stirring time 30 min. The encapsulation efficiency and loading efficiency of BRA nanoparticles were 50.90% and 4.77%, respectively, with the particle size of  $352.95 \pm 6.42$  nm, PDI of  $0.23 \pm 0.02$ , and Zeta potential of  $29.56 \pm 1.09$  mV, which suggested a small particle size and good dispersion stability. The observation by scanning electron microscope (SEM) demonstrated that the nanoparticle of BRA was spherical. The simulated gastrointestinal sustained-release test showed that compared with free BRA, the release rate of BRA nanoparticle in gastric and

基金项目: 北京市属高校高水平教师队伍建设支持计划 (CIT&TCD201704042、IDHT20180506); 国家重点研发计划项目 (2018YFC1604203-2); 国家自然科学基金项目 (31701575)

作者简介: 潘飞 (1997-) (ORCID: 0000-0001-9898-1238), 男, 硕士研究生, 从事功能性成分的递送体系设计及促吸收作用研究。E-mail: yunitcon@yeah.net

\*通讯作者: 赵磊 (1982-) (ORCID: 0000-0003-0813-6140), 女, 副教授, 博士, 从事功能性食品 and 食品安全研究。E-mail: zhaolei@th.btbu.edu.cn



intestinal fluids were reduced by 52.65% and 36.69% respectively, indicating that the prepared BRA nanoparticle had good sustained-release property, which may have good application prospects.

**Keywords:** black rice anthocyanin; response surface optimization; nanoparticle; sustained-release property

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200410-139

黑米花色苷, 是一类天然多酚类色素, 源于黑米种皮<sup>[1]</sup>, 主要包括矢车菊素-3-葡萄糖苷(Cyanidin-3-glucoside, C3G)、芍药素-3-葡萄糖苷(Peonidin-3-glucoside)、牵牛花素-3-葡萄糖苷(Petunidin-3-glucoside)等, 其中矢车菊素-3-葡萄糖苷含量最高, 约占总色素含量的 95%。花色苷具有多种生物活性, 如抗氧化<sup>[2]</sup>、调解血脂<sup>[3]</sup>、改善肠道菌群<sup>[4]</sup>、抗炎<sup>[5]</sup>、预防肝损伤<sup>[6]</sup>等, 对保健食品、医药加工和化妆品行业都具有重要意义。

然而, 花色苷极易受到温度、金属离子、光照等外界环境的影响, 导致花色苷发生降解褪色, 甚至失去生物活性<sup>[7]</sup>, 极大限制了花色苷的开发和应用。此外, 花色苷在体内的环境下稳定性差, 生物利用率低<sup>[1]</sup>。近年多项研究表明, 添加辅色剂可提高花色苷的稳定性, 如儿茶素、迷迭香酸、丁香酸等酚酸类物质通过与花色苷分子结构相互作用, 减少外界环境对花色苷的降解<sup>[8]</sup>, 但在缓释和生物利用度方面并没有得到很好改善。相比较辅色剂而言, 由多糖、蛋白质、脂质等生物可降解大分子构建的纳米微胶囊载体更能有效解决这些问题<sup>[9-10]</sup>, 这为花色苷作为功能性天然色素的开发和应用带来了崭新的市场前景。

壳聚糖(Chitosan, CS), 又称脱乙酰甲壳素, 是由几丁质经过脱乙酰作用得到的产物, 具有良好的生物相容性、血液相容性、可自行降解代谢、无毒安全性高等特点<sup>[11]</sup>, 这些优良的性能在纳米医药、食品、化妆品、生物医药工程等领域已经得到广泛的应用。 $\gamma$ -聚谷氨酸( $\gamma$ -Polyglutamic acid, PGA), 是一种阴离子天然聚合物, 易溶于水, 并且无毒、生物相容性好及可降解<sup>[12]</sup>。研究表明, 壳聚糖和  $\gamma$ -聚谷氨酸可在 pH 驱动下通过离子凝聚法形成纳米粒子<sup>[13]</sup>, 对紫杉醇、硫酸链霉素、乳酸链球菌素(Nisin)等活性物质进行微胶囊化研究, 结果表明, 与微胶囊化前相比, 胶囊化的产物在稳定性、缓释效果及生物利用率方面得到明显改善<sup>[14-16]</sup>。此外, 贺博采用壳聚糖和羧甲基壳聚糖包埋蓝莓花色苷, 结果表明负载蓝莓花色苷的纳米粒在稳定性和胃肠缓释性方面均较包埋前显著提高<sup>[17]</sup>。Chen 等人采用硫酸软骨素与壳聚糖制备的接骨木花色苷纳米粒也表现出良好的稳定性和抗氧化能力<sup>[18]</sup>。然而, 壳聚糖和  $\gamma$ -聚谷氨酸构建纳米载体在天然色素的应用研究较少, 尚不清楚壳聚糖/ $\gamma$ -聚谷氨酸(CS-PGA)纳米载体对花色苷的稳定性及缓释性的影响, 这些研究不仅有助于解决花色苷稳定性差的问题, 还利于提高其对胃肠环境的耐受性和缓释性, 极大拓宽了花色苷在食品领域的应用。

因此, 本研究采用壳聚糖和  $\gamma$ -聚谷氨酸作为壁材, 以矢车菊素-3-葡萄糖苷为代表的黑米花色苷作为活性物质进行纳米微胶囊化, 并采用 UPLC 法对花色苷含量进行测定, 分别进行单因素试验和响应面试验, 以粒径和包封率为指标, 确定最佳制备条件。采用表征分析方法对纳米粒的粒径、PDI、Zeta 及微观结构进行测试分析。最后, 采用体外模拟胃肠消化系统对黑米花色苷纳米粒进行缓释研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

黑米提取物(花色苷纯度 $\geq 25\%$ ) 购于湖北紫鑫生物科技有限公司; 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(C3G)(纯度 $\geq 98\%$ ) 购于成都曼斯特生物科技有限公司。

壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 95\%$ )、 $\gamma$ -聚谷氨酸 上海易恩化学技术有限公司; 甲酸(色谱纯) 美国 Mreda 公司; 乙腈(色谱纯) 美国 Fisher Chemical 公司; 胃蛋白酶、猪胰液素 北京博奥拓达科技有限公司; 冰乙酸 天津福晨化学试剂有限公司; 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

透析袋(6000Da) 北京酷来搏科技有限公司; 色谱柱 Eclipse plus C18 (RRHD 1.8 $\mu$ m 2.1 $\times$ 50mm)

美国 Agilent 公司; 多头磁力搅拌器 HJ-6 北京天林恒泰科技有限公司; 超高效液相色谱 Agilent1290 美国 Agilent 公司; 扫描电镜 SU8020 日本日立公司; 真空冷冻干燥机 LABCONCO 美国 Labconco 公司; 马尔文电位粒径纳米分析仪 英国 Malvern 公司; 台式温室震荡器 HNY-100B 天津欧诺仪器有限公司; 台式离心机 H1850 北京天林恒泰科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 黑米花色苷纳米粒的制备

称取一定量的壳聚糖 (CS) 溶解在 1% (v/v) 冰乙酸的水溶液中, 配置不同浓度的壳聚糖, 搅拌 2 h 使其溶液澄清透明, 准确移取 20 mL 壳聚糖溶液于烧杯中, 并加入不同浓度的黑米花色苷提取物, 搅拌 1 h 使其溶液澄清透明, 用 6 mol/L 氢氧化钠溶液调节其 pH 值至 4.5, 然后慢慢滴加 20 mL 一定浓度的  $\gamma$ -聚谷氨酸 (PGA) 水溶液, 使 PGA: CS 呈一定比例 (质量比, w/w), 滴加完毕后继续搅拌一定时间即完成制备, 此操作均避光进行。

#### 1.3.2 花色苷含量的测定

使用 UPLC 对样品中花色苷进行定量分析, 色谱条件如下: 色谱柱: Eclipse plus C18 (RRHD 1.8  $\mu$ m 2.1 $\times$ 50 mm); 流动相: A 乙腈溶液 (2%甲酸), B 水 (2%甲酸); 梯度洗脱条件: 0~2 min, 5%A; 2~10 min, 5%~50%A; 10~12 min, 50%A; 12~14 min, 50%~5%A; 14~16 min, 5%A; 流速: 0.2 mL/min; 检测波长: 520 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 1  $\mu$ L。采用 C3G (6.25、12.5、25、50、100、200  $\mu$ g/mL) 按上述方法进行测定, 以 C3G 浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线 ( $y=21.422x-81.882$   $R^2=0.9994$ ), 并计算样品中花色苷的含量。

#### 1.3.3 包封率及载药率的计算

将制备好的黑米花色苷纳米粒溶液以 12,000 $\times$ g 离心 30 min, 收集上清液, 根据 1.3.2 方法测定游离花色苷的含量, 将沉淀物 (黑米花色苷纳米粒) 进行干燥称量, 并代入公式计算包封率(1)及载药量(2)。

$$\text{包封率/\%} = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{载药量/\%} = \frac{W_0 - W_1}{W_{\text{总}}} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $W_0$  为初始黑米花色苷添加量 (mg/mL);  $W_1$  为游离黑米花色苷含量 (mg/mL);  $W_{\text{总}}$  为黑米花色苷纳米粒质量。

#### 1.3.4 单因素试验

为考察单一因素对黑米花色苷纳米粒包封率的影响, 在其他条件相同的情况下, 分别选择不同黑米提取物浓度 (0.5, 1, 2, 3, 4 mg/mL)、壳聚糖浓度 (0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/mL)、PGA: CS 质量比 (1:10、1:4、1:2、3:4、1:1)、pH 值 (3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5) 和搅拌时间 (0, 30, 60, 90 min) 进行研究。

#### 1.3.5 响应面法试验设计

采用 SPSS 18.0 对单因素试验结果分析, 选出对载药纳米粒包封率影响较大的三组——CS 浓度 (A)、PGA:CS 质量比 (B) 和黑米提取物浓度 (C)。每个变量水平分别以 -1、0、1 进行编码, 因素和水平见表 1。采用 Design Expert 8.0.6 对试验数据进行回归分析, 对黑米花色苷纳米粒包封率和粒径的影响因素进行深入研究和条件优化, 并做出响应面图, 对响应值受多个变量影响的问题进行建模及分析预测。该模型通过最小二乘法拟合二次多项方程(3):

$$W_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (3)$$



式中:  $W_i$  为响应值(包封率、粒径),  $\beta_0$  是常数,  $\beta_i$  是线性系数,  $\beta_{ii}$  是二次项系数,  $\beta_{ij}$  是两个因素间的交互作用系数。 $X_i$  和  $X_j$  是参数变量(A、B、C)。

表 1 响应面试验因素水平设计

Table 1 Horizon design of response surface test factors

水平	因素		
	A-CS 浓度(mg/mL)	B-PGA:CS 质量比	C-黑米提取物浓度
-1	0.8	1:4	1.8
0	1	1:2	2
1	1.2	3:4	2.2

### 1.3.6 结构表征分析

#### 1.3.6.1 粒径, PDI 和 Zeta 电位

取一定量制备好的黑米花色苷纳米粒溶液, 稀释至一定倍数, 采用马尔文激光粒度分析仪测定溶液状态下纳米粒平均粒径、多分散系数(PDI)和表面电位(Zeta), 在 25℃ 下测试 6 次取平均值。

#### 1.3.6.2 扫描电镜观察

为了观察样品的表面形态, 对冻干后的载药纳米粒进行扫描电镜测试。使用导电双面胶将样品固定在样品台上, 喷镀铂金后进行观察。测试条件为放大倍率 400 倍, 加速电压 3.0 kV, 在电子显微镜下观察、拍照。

### 1.3.7 缓释研究

参考 Hu 等<sup>[19]</sup>的研究方法配置模拟胃肠液。将装有 10 mg 冻干黑米花色苷纳米粒的透析袋置于盛有 50 mL 的新鲜胃液(2.0 g/L 氯化钠、2.917 g/L 盐酸及 1 mg/mL 胃蛋白酶, pH=2.0 ± 0.1)的锥形瓶中, 然后使其在 37℃, 150 r/min 的摇床上震荡, 在固定时间取样。2 h 后, 向锥形瓶中加入 90 mL 新鲜肠液(0.616 g/L 氢氧化钠、6.8 g/L 磷酸二氢钾及 10 mg/mL 猪胰液素, pH=7.2 ± 0.1), 使其继续在 37℃, 150 r/min 的摇床上震荡, 在固定时间取样, 采用未包封的黑米花色苷提取物作为对照, 按照 1.3.2 所述方法检测黑米花色苷含量, 代入公式计算黑米花色苷释放率(4)。

$$\text{释放率/\%} = \frac{W_t}{W_0} \times 100 \quad (4)$$

式中:  $W_t$  表示黑米花色苷在消化液中的释放量(mg/mL);  $W_0$  表示初始黑米花色苷总添加量(mg/mL)。

### 1.3.8 数据分析

采用 SPSS 19.0 和 Design Expert 8.0.6 软件对结果进行分析, 试验数据以“平均值±标准偏差”表示, 采用 t 检验,  $P < 0.05$  具有显著性差异,  $P < 0.01$  具有极显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素制备条件研究

黑米提取物浓度对包封率的影响结果表明(图 1A), 当黑米提取物浓度为 2 mg/mL 时, 包封率最高为 29.9%, 之后黑米提取物浓度继续增加包封率降低, 这可能是因为黑米提取物中存在一些电解质杂质影响着纳米粒的形成, 当浓度过大不利于花色苷的包埋。

壳聚糖浓度及 PGA:CS 质量比对包封率的影响结果表明(图 1B-C), 随着壳聚糖浓度及 PGA:CS 质量比的增大, 包封率呈现先升高后下降的趋势, 在壳聚糖浓度为 1 mg/mL 和 PGA:CS 质量比为 1:2 时包封率达到最大, 分别为 41.76%和 42.45%, 这是因为合适的壁材浓度和 PGA:CS 质量比反映两种

壁材离子交联的强度和稳定性,直接影响纳米粒包封率和性能<sup>[20]</sup>。

pH 对包封率的影响结果如图 1D 所示,包封率随着 pH 的升高呈现先升后降的趋势,在 pH 5.0 时包封率最高,可达 49.51%。这可能是因为在 pH 5.0 时所形成的纳米粒表面电荷相对稳定,有利于聚谷氨酸和壳聚糖通过离子交联,当 pH 增大时,所形成的交联聚合物表面电荷降低,出现凝聚影响黑米花色苷的包埋<sup>[21-22]</sup>。

搅拌时间对包封率的影响结果表明(图 1E),适当的搅拌时间有利于黑米花色苷的包埋,搅拌时间为 30 min 时包封率最高,可达 49.78%。因为黑米花色苷纳米粒的形成是一个动态过程,适当搅拌有利于溶质的分散和纳米粒粒径的均一,搅拌时间过长破坏了纳米粒之间的相互作用,发生碰撞和聚集导致包埋后黑米花色苷释放出来。从 5 个单因素的结果显示, pH 和搅拌时间对包封率的影响相对较小,而黑米提取物浓度、壳聚糖浓度及 PGA:CS 质量比对包封率影响显著,因此,后续试验选择 pH 5.0 和搅拌时间 30 min 作为固定参数,对黑米花色苷的包埋条件进一步优化。

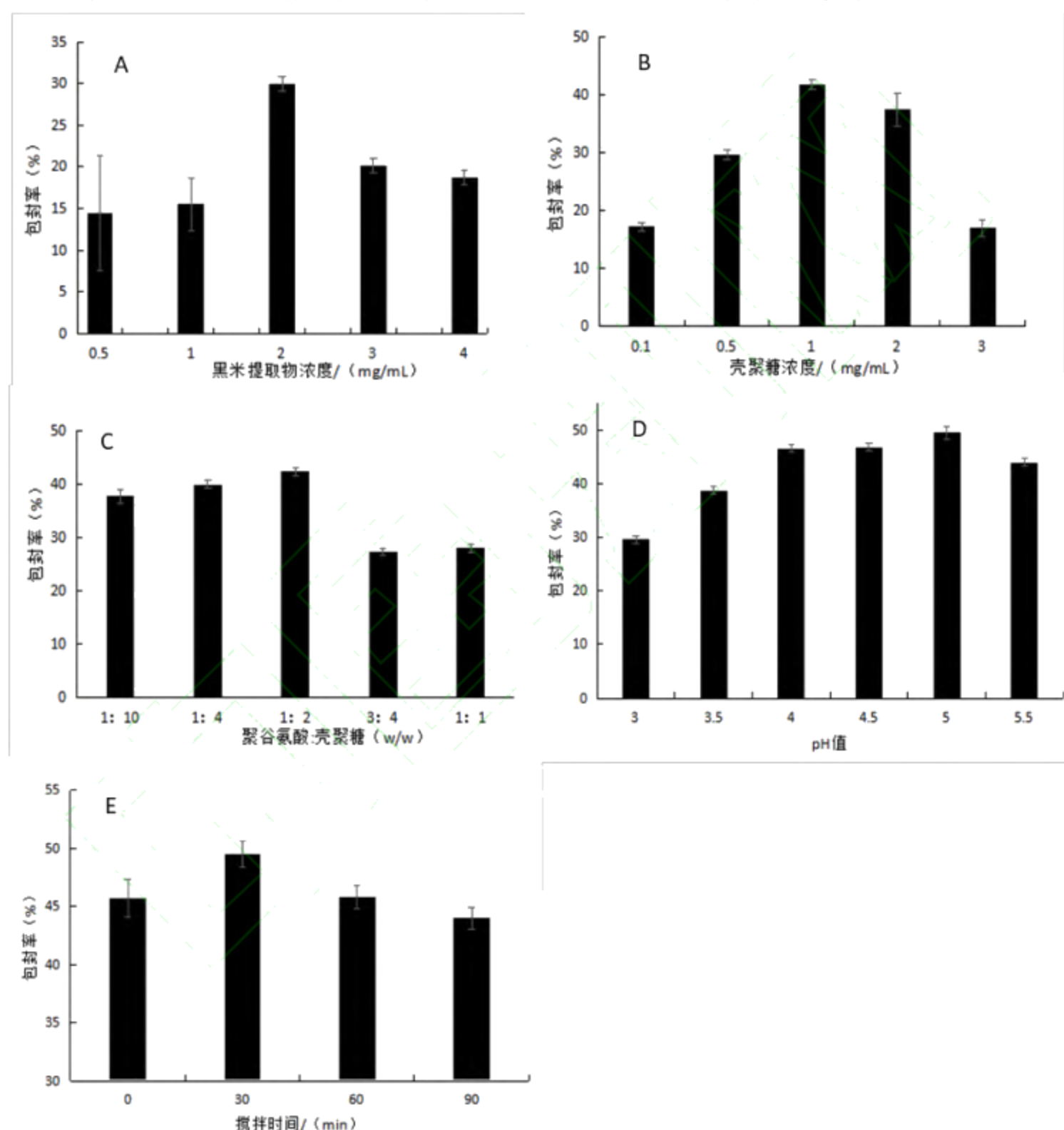


图 1 包埋条件对黑米花色苷包封率的影响

Fig.1 Effect of embedding conditions on the encapsulation rate of black rice anthocyanin

A 黑米提取物浓度; B 壳聚糖浓度; C 聚谷氨酸:壳聚糖质量比; D pH 值;

E 搅拌时间

## 2.2 响应面优化试验

### 2.2.1 响应面结果与分析

根据单因素试验结果,以壳聚糖浓度(A)、PGA:CS 质量比(B)、黑米提取物浓度(C)为自

变量，粒径（ $W_1$ ）和包封率（ $W_2$ ）为因变量进行响应面试验，Box-Benhken 试验设计及结果见表 2，方差分析结果见表 3。

表 2 响应面试验结果表

Table 2 Rsponse surface test results

试验组	制备条件			试验结果	
	A	B	C	$W_1$	$W_2$
	(mg/mL)	(w:w)	(mg/mL)	(nm)	(%)
1	0.8	1:4	2.0	342.57	51.16
2	1.0	1:2	2.0	392.27	49.93
3	1.0	3:4	2.2	754.00	39.79
4	1.2	1:2	2.0	364.20	49.77
5	1.2	3:4	2.0	635.33	46.69
6	1.2	1:2	1.8	431.30	47.13
7	1.2	1:2	2.2	465.93	41.01
8	0.8	1:2	2.2	443.90	42.26
9	1.0	1:2	2.0	414.60	52.11
10	1.0	1:2	2.0	418.00	50.75
11	1.0	1:2	2.0	417.23	49.51
12	1.0	1:2	2.0	411.63	51.37
13	1.0	3:4	1.8	560.00	38.84
14	0.8	3:4	2.0	617.77	48.53
15	0.8	1:2	1.8	388.03	44.39
16	1.0	1:4	2.2	352.60	42.82
17	1.0	1:4	1.8	385.27	46.39

注 A：壳聚糖浓度；B：聚谷氨酸:壳聚糖质量比；C 黑米提取物浓度； $W_1$ ：粒径； $W_2$ ：包封率

采用 Design Expert8.0.6 软件对表 2 试验数据进行多元回归拟合，得到壳聚糖浓度（A）、聚谷氨酸:壳聚糖质量比（B）和黑米提取物浓度（C）与粒径（ $W_1$ ）和包封率（ $W_2$ ）的二次多项回归模型方程为：

$$W_1=3137+377A-2964B-2504C-18A^2+1279B^2+557C^2-20AB-133AC+1133BC$$

$$W_2=-671.0+48.9A-23.6B+712.5C+0.5A^2-27.5B^2-176.4C^2-2.3AB-24.9AC+22.6BC$$

表 3 独立变量响应面模型方差分析

Table 3 ANOVA for response surface models of all independent variables.

因素	粒径					包封率				
	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值
模型	209721	9	23302	127.94	<0.0001	286.485	9	31.832	15.74	0.001
一次项										
A	1365	1	1365	7.49	0.029	0.378	1	0.378	0.19	0.678
B	157490	1	157490	864.65	<0.0001	33.171	1	33.171	16.4	0.005
C	7927	1	7927	43.52	<0.0001	14.770	1	14.77	7.3	0.031
二次项										
A <sup>2</sup>	2	1	2	0.01	0.915	0.002	1	0.002	0.014	0.977
B <sup>2</sup>	26913	1	26913	147.76	<0.0001	12.413	1	12.413	6.14	0.042
C <sup>2</sup>	2089	1	2089	11.47	0.012	209.689	1	209.689		<0.0001
交互项										
AB	4	1	4	0.02	0.884	0.051	1	0.051	0.03	0.879
AC	113	1	113	0.62	0.457	3.980	1	3.98	1.97	0.203
BC	12845	1	12845	70.52	<0.0001	5.108	1	5.108	2.53	0.156
失拟项	823	3	274	2.43	0.205	9.712	3	3.237	2.91	0.164
纯误差	452	4	113			4.443	4	1.111		
R <sup>2</sup>	0.994					0.953				
调整 R <sup>2</sup>	0.986					0.892				

从表 3 可以看出, 所获得的回归模型均极显著 ( $P < 0.01$ ), 失拟项均不显著 ( $P > 0.05$ ),  $R^2 > 0.95$ , 说明模型有效且得到较好的预测值。一次项 B、C 对载药纳米粒粒径和包封率影响均显著 ( $P < 0.05$ ), 且 B、C 对粒径影响极显著 ( $P < 0.01$ ), 一次项 A 对粒径影响显著 ( $P < 0.05$ ), 而对包封率不显著; 二次项 B<sup>2</sup> 和 C<sup>2</sup> 对粒径和包封率影响显著 ( $P < 0.05$ ), A<sup>2</sup> 则不显著 ( $P > 0.05$ ); 交互项中除 BC 对粒径影响极显著 ( $P < 0.01$ ) 外, 其他均不显著 ( $P > 0.05$ ), 可以看出这些因素影响着粒径大小和包封率的高低, 而聚谷氨酸:壳聚糖质量比 (B) 和黑米提取物浓度 (C) 的交互作用对粒径影响比较大。因此, 通过对实验因素优化有利于设计形成粒径小且高封率高的纳米粒。此外, 工艺参数对粒径和包封率影响大小依次为: 聚谷氨酸:壳聚糖质量比 > 黑米提取物浓度 > 壳聚糖浓度。

采用 Design Expert 8.0.6 软件对影响黑米花色苷纳米粒粒径和包封率的 3 个因素进行交互分析, 结果见图 2。



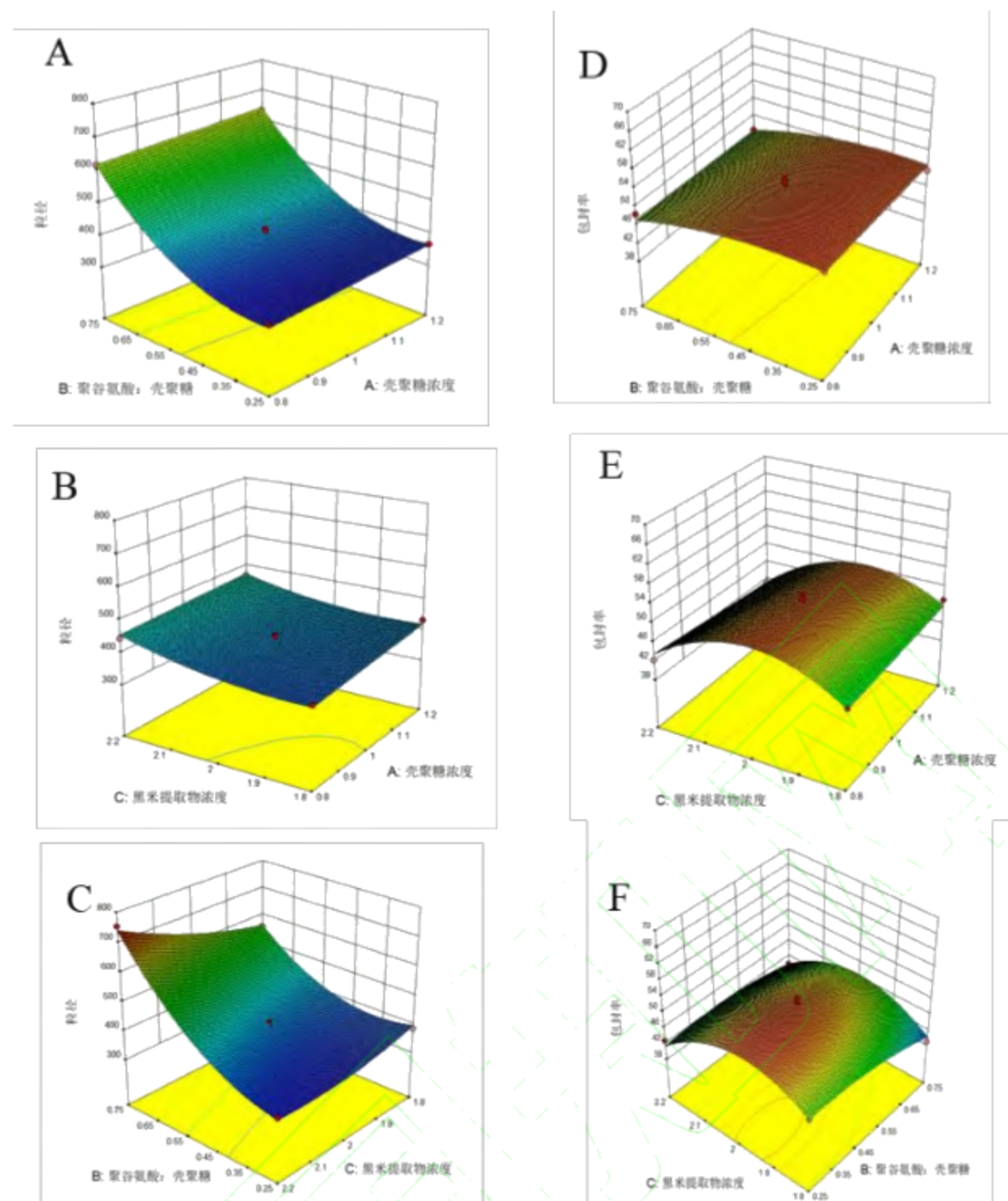


图2 响应曲面图为两两因素交互对粒径和包封效率的综合影响:(A, D)聚谷氨酸:壳聚糖质量比和壳聚糖浓度;(B, E)壳聚糖浓度和黑米提取物浓度;(C, F)黑米提取物浓度和聚谷氨酸:壳聚糖

Fig.2 Response surface plots, as predicted by the model, of the combined effects of two factors on the particle size and encapsulation efficiency: (A, D) PGA:CS (w:w) and CS concentration; (B, E) CS concentration and black rice extract concentration; and (C, F) black rice extract concentration and PGA:CS (w:w) .

在模型中,当任一因素向响应曲线中点靠近时,粒径尺寸从754 nm降至342.57 nm。当因素超过中点时,粒径受到负向影响逐渐增大(图2A-C;表2),较低浓度的聚谷氨酸有利于形成小的粒径<sup>[23]</sup>。这可能是载药纳米粒在形成之前壳聚糖溶液呈连续凝胶状,随着聚谷氨酸的加入,壳聚糖逐渐与聚谷氨酸进行离子交联形成纳米粒,但聚谷氨酸浓度升高,使聚谷氨酸支链与壳聚糖进行横向结合产生较大的纳米粒<sup>[24]</sup>。

黑米花色苷纳米粒的包封率随所选三种因素向响应曲线中点靠近而升高,包埋率在38.84%~52.11%范围内增大,当三种因素逐渐超过中点时,包封率开始降低(图2D-F),这与其影响粒径的趋势相同。聚谷氨酸:壳聚糖质量比和黑米提取物浓度处在2:5和2mg/mL附近时,可以获得高包封率的载药纳米粒(图2E-F;表2),随着黑米提取物浓度升高则包封率降低<sup>[25]</sup>。然而,壳聚糖浓度与包封率之间并未呈现正相关性,这与Feng等人的结论不同<sup>[23]</sup>,这可能是壳聚糖分子量选取的不同导致的,低分子量更有利于包封,而高分子量载药量高<sup>[26]</sup>。

此外,这些参数的用量也影响着粒径与包封率之间的关系,如聚谷氨酸:壳聚糖质量比决定粒径的大小,但影响着包封率,而黑米提取物浓度决定包封率,也改变粒径。在粒径较小的条件下,随着黑米提取物浓度的增大导致黑米花色苷纳米粒的粒径增大,包封率也相应提高,但浓度过高时不利于

纳米粒的稳定反而影响着包封率。因此,选取了粒径最小、包封率最高为最佳优化条件,最终选择了壳聚糖浓度为 0.8 mg/mL、聚谷氨酸:壳聚糖质量比为 7:20 和黑米提取物浓度为 1.98 mg/mL 作为后续研究的制备条件,粒径预测值为 341.9 nm,包封率预测值为 51.55%。

### 2.2.2 响应面模型验证

为了验证模型的有效性,在最优条件下进行试验预测。所得制备载药纳米粒的结果:平均粒径为 352.95 nm,包封率为 50.90%,载药量为 4.77%,与预测值相符。预测值与实验值之间的误差均小于 5%。因此,从响应面回归模型可以准确地预测黑米花色苷纳米粒的粒径大小和封装效率。

### 2.3 表征学分析

粒径、Zeta 电位和多分散系数是衡量纳米粒性能评价的重要标准,理想情况下,制备纳米粒应具有小的尺寸。Zeta 电位值和多分散系数 PDI 与分子稳定性有关,Zeta 电位值越小,越容易发生凝聚至有溶质析出,多分散系数 PDI 值越小,表明纳米粒在溶液中分散效果越好,越稳定<sup>[27-28]</sup>。在最优制备条件下即聚糖浓度为 0.8 mg/mL、聚谷氨酸:壳聚糖质量比为 7:20、黑米提取物浓度为 1.98 mg/mL、pH 值 5.0 和搅拌时间 30 min 时,测定黑米花色苷纳米粒的平均粒径为  $352.95 \pm 6.42$  nm, PDI 为  $0.23 \pm 0.02$ , Zeta 电位为  $29.56 \pm 1.09$  mV,这表明所制备的黑米花色苷纳米粒尺寸小,在溶液中分散效果良好,电位较高且稳定性好。

采用扫描电镜对冻干后的黑米花色苷纳米粒表面微观结构进行观察,并与空载纳米粒比较。图 3 为放大 2 万倍的空载纳米粒(A)和黑米花色苷纳米粒(B)的扫描电镜照片。由 3A 可知,壳聚糖与聚谷氨酸通过离子凝胶作用形成,表面相对光滑平整,这是因为在冻干过程中内部中空的纳米粒发生团聚效应从而紧密排列,与 Liang 等人<sup>[29]</sup>采用壳聚糖和硫酸软骨作为壁材制备纳米粒在扫描电镜下形态一致。在壳聚糖与聚谷氨酸交联过程中,黑米花色苷被包裹在多聚物内部,形成黑米花色苷纳米粒,此外,由于离子交联是个动态过程,有部分黑米花色苷可能吸附在多聚物表面,从而在扫描电镜下其微观结构表面粗糙、呈现多颗粒、不规则形状(图 3B),这表明负载黑米花色苷的纳米粒已经形成。

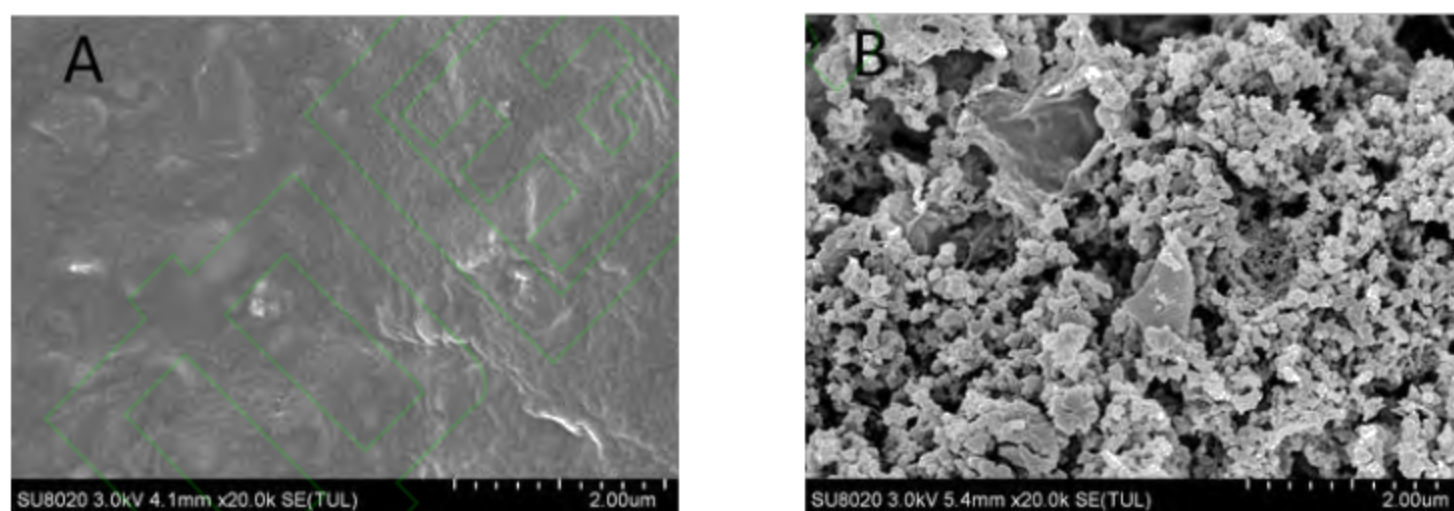


图 3 扫描电镜下的空载纳米粒(A)和黑米花色苷纳米粒(B)

Fig 3 (A) No-load nanoparticles and (B) Black rice anthocyanin nanoparticles under SEM

### 2.4 黑米花色苷纳米粒体外缓释性研究

缓释试验能够模拟生物活性物质在人体消化道中释放情况,一方面衡量生物活性物质在胃肠液的稳定性、耐受性,另一方面衡量生物活性物质在胃肠液中的释放率,这对研究生物活性物质的运送及代谢至关重要,也是衡量纳米粒性能及稳定性的评价标准<sup>[30]</sup>。采用优化后的工艺进行制备纳米粒,按照 1.3.3 方法进行离心,随后将沉淀物放入真空冷冻干燥机处理获得冻干的纳米粒,分别对冻干后的黑米花色苷纳米粒粉末及未包埋的黑米提取物进行胃肠液缓释作用研究,结果如图 4 所示。



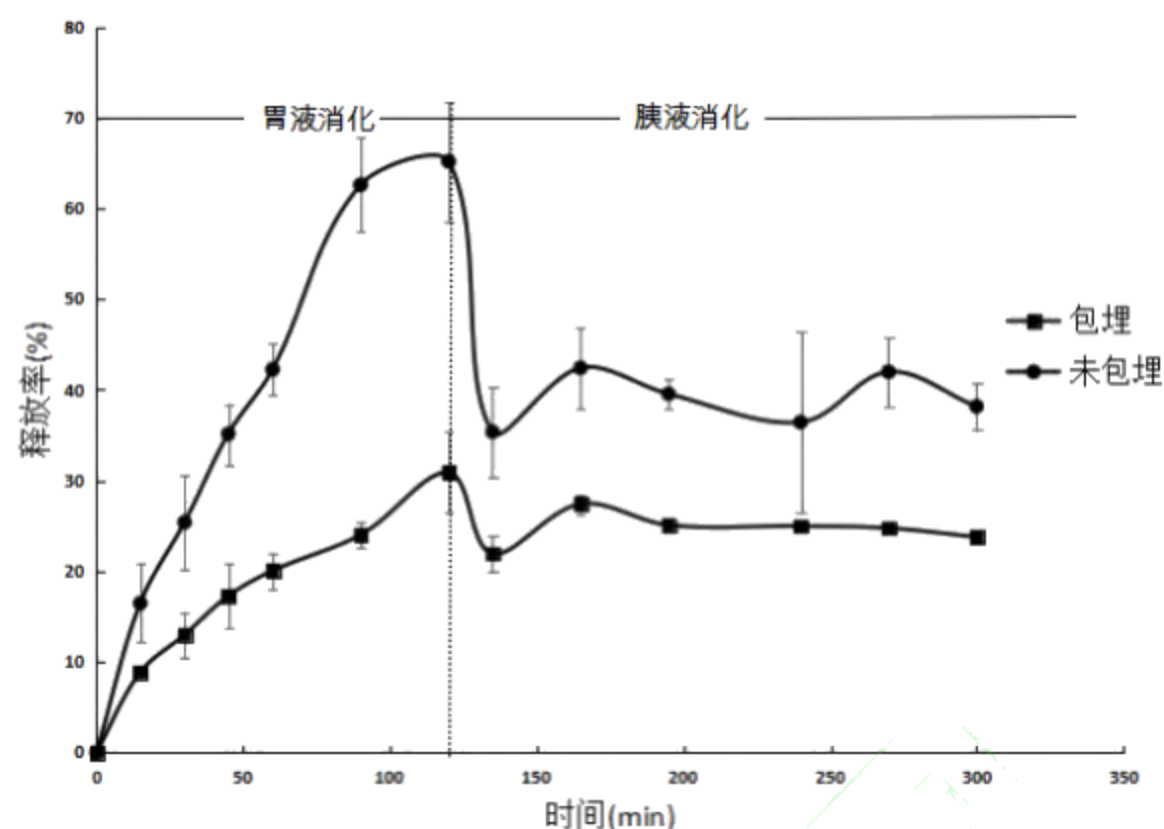


图4 黑米花色苷在禁食状态下模拟胃肠道环境的释放率

Fig 4 Anthocyanins release percentage (%) during incubation with fasting-state simulated gastrointestinal fluid

在胃液中, 未包埋的黑米花色苷释放率为 65.13%, 而包埋后的黑米花色苷纳米粒中花色苷释放率显著降低, 仅为 30.84%。这说明由壳聚糖和聚谷氨酸通过静电离子作用形成的聚合物, 对包埋的黑米花色苷具有较好的缓释能力, 延缓黑米花色苷在胃中的释放。在肠液中, 黑米花色苷包埋前后的释放率均出现了显著下降, 从花色苷的保留率上来看, 未包埋的黑米花色苷远低于黑米花色苷纳米粒, 这是因为花色苷在碱性条件容易发生降解<sup>[31]</sup>, 而采用壳聚糖与聚谷氨酸所构成的纳米载体恰好可以改善这一劣势。综合来看, 相比较未包埋的黑米花色苷, 黑米花色苷纳米粒在胃、肠液中释放率分别减少 52.65%、36.69%, 这表明所制备的黑米花色苷纳米粒具有明显的缓释效果, 可以延缓黑米花色苷在胃肠液的释放。

### 3 结论

本研究通过单因素和响应面试验优化 CS/PGA 包埋黑米花色苷的工艺, 以包埋率和粒径为指标, 确定最佳工艺为: 聚糖浓度 0.8 mg/mL、聚谷氨酸:壳聚糖质量比 7:20、黑米提取物浓度 1.98 mg/mL、pH 值 5.0 和搅拌时间 30 min, 所制备的黑米花色苷纳米粒包埋率为 50.90%, 载药量为 4.77%, 粒径为  $352.95 \pm 6.42$  nm, PDI 为  $0.23 \pm 0.02$ , Zeta 电位为  $29.56 \pm 1.09$  mV。采用二次模型拟合和验证试验表明该模型显著且相关性高。通过扫描电镜观察黑米花色苷纳米粒呈球形颗粒状; 模拟胃肠缓释试验显示, 黑米花色苷纳米粒具有明显的缓释作用, 这表明所制备的纳米粒粒径较小、分散稳定、缓释性能较好, 具有较好的应用前景。



## 参考文献:

- [1]VIVIAN C I, LUIZ G L. Black rice (*Oryza sativa* L.): A review of its historical aspects, chemical composition, nutritional and functional properties, and applications and processing technologies[J]. Food Chemistry, 2019. 125304. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125304.
- [2]朱晓莉. 黑米花色苷对小鼠运动耐力及肝脏组织抗氧化能力的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, (11): 223-225. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2017.1004.
- [3]王心哲, 孟祥敏, 游颖, 等. 黑米花色苷微波辅助提取工艺的优化及其降血脂功能研究[J]. 食品科技, 2018, 43(08): 198-204. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2018.08.035.
- [4]WANG Hao, LIU Dong, JI Yanglin, et al. Dietary Supplementation of Black Rice Anthocyanin Extract Regulates Cholesterol Metabolism and Improves Gut Microbiota Dysbiosis in C57BL/6J Mice Fed a High-Fat and Cholesterol Diet[J]. Molecular nutrition & food research, 2020. 1900876. DOI: 10.1002/mnfr.201900876.
- [5]ZHAO L, ZHANG Y, LIU G, et al. Black rice anthocyanin-rich extract and rosmarinic acid, alone and in combination, protect against DSS-induced colitis in mice[J]. Food & Function, 2018,9(5):2796-2908. DOI: 10.1039/C7FO01490B.
- [6]王治博, 宋顺宗, 张子波. 黑米花色苷通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路保护四氯化碳所致急性肝损伤的机制[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(5): 1097-1100. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2019.05.022.
- [7]李恩惠, 矫馨瑶, 王晨歌, 等. 蓝莓花色苷降解动力学及稳定性[J]. 食品科学, 2018, 39(5): 1-7. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201805001.
- [8]慕妮, 吴海浩, 顾颖娟, 等. 咖啡酸对紫玉米花色苷的辅色作用研究[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 58-62. DOI: CNKI:SUN:SPKX.0.2010-05-015.
- [9]NILE S H, BASKAR V, SELVARAJ D, et al. Nanotechnologies in Food Science: Applications, Recent Trends, and Future Perspectives[J]. Nano-Micro Letters, 2020, 12(03): 222-255. DOI: 10.1007/s40820-020-0383-9.
- [10]WUSIGAL, LIANG Li, LUO Chaoyang. Casein and pectin: Structures, interactions, and applications[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 97. 391-403. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.01.027.
- [11]宋丽洁, 郭谦, 李想, 等. 两亲性胆酸化壳聚糖微胶囊包埋 VA[J]. 食品科学, 2018, 39(5): 121-127. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201805019.
- [12]贾玉萍, 李秀娥, 邱文旭, 等.  $\gamma$ -聚谷氨酸的研究及应用进展[J]. 鲁东大学学报(自然科学版), 2019, 35(02): 122-128. DOI: CNKI:SUN:WOOD.0.2019-02-006.
- [13]任东雪, 陈鹏程, 郑璞, 等.  $\gamma$ -聚谷氨酸/壳聚糖纳米颗粒的制备及 pH 响应释放性能[J]. 功能高分子学报, 2020, 33(01): 54-62. DOI: 10.14133/j.cnki.1008-9357.20181128001.
- [14]王亨缙, 金园园, 韩盛智, 等.  $\gamma$ -聚谷氨酸/壳聚糖负载紫杉醇复合纳米粒子的制备与研究[J]. 广州化工, 2012, 40(16): 59-61. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9677.2012.16.025.
- [15]陈兴江, 蔡恺, 陆宁, 等. 壳聚糖/ $\gamma$ -聚谷氨酸负载硫酸链霉素纳米微胶囊的制备及特征分析[J]. 农药学报, 2013, 15(3): 331-336. DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2013.03.15.
- [16]吴娟. 负载 Nisin 聚谷氨酸/壳聚糖纳米粒子的明胶纤维膜制备及其在奶酪贮藏中的应用[D]. 江苏大学, 2017.
- [17]贺博. 蓝莓花色苷纳米微胶囊制备及其性能研究[D]. 安徽农业大学, 2016.
- [18]CHEN Tan, JOSEPH S M, ALIREZA A. Anthocyanin stabilization by chitosan-chondroitin sulfate polyelectrolyte complexation integrating catechin co-pigmentation[J]. Carbohydrate polymers, 2018, 181. 124-131. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.10.034.
- [19]HU Qiaobin, BAE M, FLEMING E, et al. Biocompatible polymeric nanoparticles with exceptional gastrointestinal stability as oral delivery vehicles for lipophilic bioactives[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 89.

386-395. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.10.057.

[20]NORKAEW O, THITISUT P, MAHATHEERANONT S, et al. Effect of wall materials on some physicochemical properties and release characteristics of encapsulated black rice anthocyanin microcapsules[J]. Food Chemistry, 2019, 294: 493-502. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.05.086.

[21]CHEN Yuhao, XUE Jingyi, WUSIGALE, et al. Carboxymethylation of phyto glycogen and its interactions with caseinate for the preparation of nanocomplex[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 105390. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.105390.

[22]TARONE A G, CAZARIN C B B, JUNIOR M R M. Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation[J]. Food Research International, 2020, 109092. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109092.

[23]FENG Chao, WANG Zhiguo, JIANG Changqing, et al. Chitosan/o-carboxymethyl chitosan nanoparticles for efficient and safe oral anticancer drug delivery: In vitro and in vivo evaluation[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2013, 457(1): 158-167. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.07.079.

[24]GRIS E F, FERREIRA E A, FALCÃO L D, et al. Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems[J]. Food Chemistry, 2005, 100(3): 1289-1296. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.10.014.

[25]LIANG Jin, LI Feng, FANG Yang, et al. Response surface methodology in the optimization of tea polyphenols-loaded chitosan nanoclusters formulations[J]. European Food Research & Technology, 2010, 231(6): 917-924. DOI: 10.1007/s00217-010-1341-4.

[26]万卓雅, 张樊, 杨瑞, 等. 三甲基壳聚糖分子量对载胰岛素纳米粒的影响[J]. 华西药学杂志, 2016(3): 227-229. DOI: 10.13375/j.cnki.wcjps.2016.03.003.

[27]DANIEL H P, BRUNO S C, MARIO A C V, et al. Development of Chitosan and Alginate Nanocapsules to Increase the Solubility, Permeability and Stability of Curcumin[J]. Journal of Pharmaceutical Innovation, 2019, 14(2): 132-140. DOI: 10.1007/s12247-018-9341-1.

[28]VISHWAKARMA N, JAIN A, SHARMA R, et al. Lipid-Based Nanocarriers for Lymphatic Transportation[J]. AAPS PharmSciTech, 2019, 20(2):83. DOI: 10.1208/s12249-019-1293-3.

[29]LIANG Tisong, ZHANG Zhentao, JING Pu. Black rice anthocyanins embedded in self-assembled chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles enhance apoptosis in HCT-116 cells[J]. Food Chemistry, 2019, 125280. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125280.

[30]魏显峰, 王海华, 单俊伟, 等. 海洋多糖 BTH 缓释微球的制备及释放特性研究[J].中国海洋药物, 2018, 37(2): 52-56. DOI: 10.13400/j.cnki.cjmd.2018.02.009.

[31]江玉婷, 秦昉, 陈洁, 等. 天然花色苷色素稳定化研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(5): 213-218+236. DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.05.038.