

载亚硒酸钠壳聚糖微球的制备、表征及缓释性能研究

Preparation, characterization and sustained-release property of Na₂SeO₃-loading chitosan microsphere

张 驰¹ 商龙臣¹ 吴少魏² 李光大³ 刘信平²

ZHANG Chi¹ SHANG Long-chen¹ WU Shao-wei² LI Guang-da³ LIU Xin-ping²

(1. 湖北民族学院生物科学与技术学院,湖北 恩施 445000;2. 湖北民族学院化学与环境工程学院,湖北 恩施 445000;3. 河南科技大学医学技术与工程学院,河南 洛阳 471003)

(1. College of Biological Science and Technology, Hubei Minzu University, Enshi, Hubei 445000, China; 2. College of Chemistry and Environment Engineering, Hubei Minzu University, Enshi, Hubei 445000, China; 3. College of Medical Technology and Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

摘要:采用壳聚糖为壁材、乳化交联法制备载亚硒酸钠微球。以微球形貌、包封率、载药量和缓释性能为指标,通过单因素及正交试验优化制备工艺条件,并用 SEM 扫描电镜、红外、原子荧光、TG 热重等分析手段对微球粒径外观和结构性能进行表征。以自配的 SBF 模拟体液为体外环境,研究微球缓释硒的性能。结果显示,制备微球的最佳工艺条件为温度 65 ℃,壳聚糖浓度 3%,亚硒酸钠浓度 0.8%,交联剂用量 15%,该条件下的微球形貌优良,包封率和载药量分别为 65.89%,5.05%,微球平均粒径为 10 μm;体外缓释试验表明,通过改变相关变量因素水平,可调控球壁厚度和交联度是影响释放速率的关键因素,实现载硒微球的可控缓释;最佳工艺制备的微球具有较好的长效缓释能力,缓释速率在 482 h 后达平稳,有效缓释时间达 35 d。壳聚糖载硒微球能有效避免硒的突释效应,可为缺硒群体的科学补硒提供新途径。

关键词:壳聚糖;亚硒酸钠;微球;制备;缓释

Abstract: Chitosan was chosen as wall material to prepare the Na₂SeO₃-loading microspheres with emulsion-crosslink method. Then, the microspheres' appearance, drug loading capacity, encapsulation efficiency and its sustained-release property were chosen as evaluation criteria to optimize the process condition through the single factor experiments and the orthogonal tests. In addition to this, the structure of the microspheres was characterized preliminarily by the scanning electron microscopy (SEM), infrared

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:21461009,81402225);恩施州重点科技项目(编号:D20170039)

作者简介:张驰,男,湖北民族学院教授,硕士。

通信作者:刘信平(1967—),女,湖北民族学院教授,硕士。

E-mail: xingping-liu@163.com

收稿日期:2018-04-26

spectroscopy (IR), atomic fluorescence, thermogravimetric analysis (TG), and its sustained-release property were researched in vitro under the circumstance of the simulated body fluid (SBF) which was prepared by ourselves. The best process condition to prepare the microspheres shown by the experimental results were as follow: the temperature was 65 ℃, the concentration of chitosan and sodium selenite was 3% and 0.8%, the dosage of crosslinking agent was 15%. Under such environment, the appearance of microspheres was pretty good, its encapsulation efficiency and drug-loading rate was 65.89% and 5.05% respectively and the average particle size was about 10 μm. The sustained-release rate of microspheres became stabilized after releasing for 482 h and its valid sustained-release time could last for 35 d. This experiment was expected to provide a new way to supply Se reasonably for the Se-shortage population.

Keywords: chitosan; selenium; microsphere; preparation; sustained-release

近年来,被誉为“长寿元素”和“抗癌之王”的人体生命活动必需营养微量元素硒^[1-3],因世界许多地区(中国 72%的地区)严重缺乏^[4],使得全民补硒热潮在国内外悄然兴起。目前补硒方式主要有食补、摄入富硒保健品和药补^[5],补硒模式受价格昂贵和盲目进补两大瓶颈因素的制约。特别是盲目进补,硒与其他人体必需微量元素一样具有两重性^[6-7],适量有益,超量中毒有害,成人每日摄入硒量高达 400~800 mg/kg·体重可导致急性中毒,每天摄入 2 400~3 000 μm 硒数月即出现慢性中毒症状。亚硒酸钠已作为重要的补硒物被列为食品添加剂,如何把控补硒量的尺度,实现科学补硒成为关键。

天然高分子阳离子多糖——壳聚糖,以其良好的吸附性、成膜性和生物相容性,被用作药物缓释载体材料的研究

已有相关报道^[8-10],但可控缓释硒材料的研究国内外尚少见报道,文献[11]报道将单质硒或亚硒酸离子直接涂层成镀硒钛材料,用作载硒骨修复材料,但该硒的负载方式存在突释效应,短时间易引发硒中毒。本研究以壳聚糖为壁材,采用乳化交联法^[12-13]制备壳聚糖载硒微球,让硒长时间缓慢释放有效作用浓度,实现硒剂量的控制,以期开辟科学补硒的新途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

壳聚糖(Chitosan,CS);脱乙酰度>90%,上海伯奥生物科技有限公司;

亚硒酸钠、乙酸、盐酸、戊二醛、液体石蜡、Span-80、石油醚、丙酮、无水乙醇、氯化钠、碳酸氢钠、氯化钾、三水合磷酸氢二钾、六水合氯化镁、氯化钙、硫酸钠、三羟甲基氨基甲烷等;分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司;

硒标准溶液:100 μg/mL,中国计量科学研究院。

1.2 仪器与设备

低速台式离心机:TDL-80-2B型,上海安亭科学仪器厂;
pH计:PHSJ-3F型,上海精密科学仪器有限公司;

移液枪:MicroPette型,Dragon Laboratory Instruments Limited;

傅里叶红外光谱仪:Nicolet iS10型,美国 ThermoFisher Scientific 公司;

微波消解仪:MARS HACKER型,美国 CEM Corporation 公司;

双道原子荧光光度计:AFS-9760型,北京海光仪器公司;

SEM扫描电镜:JSM-7001F型,日本电子株式会社。

1.3 方法

1.3.1 载硒、空白 CS 微球的制备

(1) 水相制备:称取一定量的壳聚糖粉末于体积分数 2%的醋酸溶液中,磁力搅拌使壳聚糖完全溶解,得质量浓度 2%的壳聚糖醋酸溶液,静置过夜使其澄清透明,此为制备空白壳聚糖微球所需水相;准确称取一定质量的亚硒酸钠于体积分数 2%的醋酸溶液中,配制成不同质量分数的含硒醋酸溶液,再将一定质量的壳聚糖粉末置于此溶液中,磁力搅拌使壳聚糖完全溶解,配制成含硒量不同的壳聚糖溶液,静置过夜使其澄清透明,此为制备载硒微球所需的水相。

(2) 油相制备:量取一定量的 Span-80 于液体石蜡中,搅拌均匀,配制成含 5 mL/100 mL Span-80 的石蜡油体系,此为制备微球所需油相。

(3) 载硒、空白 CS 微球的制备:在一定温度条件下(空白微球 35℃条件下),按水:油体积比 1:5 将水相缓慢滴加到油相中,边滴加边搅拌,待水相滴加完全后,继续搅拌 1 h,使水油两相充分乳化,缓慢滴加一定量的交联剂(12.5%的戊二醛),继续搅拌 1 h,使戊二醛与壳聚糖充分交联,静置分层,去除上层液相,收集沉淀物,用石油醚和无水乙醇分别

抽滤洗涤数次直至滤液澄清透明,此即为载硒、空白壳聚糖微球。滴加数滴丙酮,使微球颗粒相互分散,于 45℃烘箱中烘干,得载硒和空白壳聚糖微球成品。

1.3.2 载硒 CS 微球制备的单因素试验 固定交联剂用量为 5%,反应温度 35℃,投入 Na₂SeO₃ 量为 0.2%,乳化时间 1 h,交联时间 1 h,分别在壳聚糖浓度为 0.5%,1.0%,2.0%,3.0%的条件下进行试验,考察壳聚糖浓度对微球载药量、包封率^[11]的影响;固定交联剂用量为 5%,反应温度 35℃,壳聚糖浓度为 2%,乳化时间 1 h,交联时间 1 h,分别在 Na₂SeO₃ 质量浓度为 0.2%,0.4%,0.8%,1.6%的条件下进行试验,考察 Na₂SeO₃ 浓度对微球载药量、包封率的影响;固定交联剂用量 5%,Na₂SeO₃ 质量浓度为 0.2%,壳聚糖浓度为 2%,乳化时间 1 h,交联时间 1 h,改变反应温度为 35,45,55,65℃的条件下进行试验,考察温度对微球载药量、包封率的影响;固定反应温度 35℃,Na₂SeO₃ 质量浓度为 0.2%,壳聚糖浓度 2%,乳化时间 1 h,交联时间 1 h,分别在交联剂用量为 2.5%,5.0%,10.0%,15.0%的条件下进行试验,考察交联剂用量对微球载药量、包封率的影响。微球的载硒量、包封率按式(1)、(2)计算:

$$c = \frac{m_2}{m_1} \times 100\%,$$

(1)

$$d = \frac{m_2}{m_3} \times 100\%,$$

(2)

式中:

c ——微球的载硒量,%;

d ——微球的包封率,%;

m_1 ——微球的质量,g;

m_2 ——微球中硒的含量,g;

m_3 ——投入微球中的硒质量,g。

1.3.3 载硒壳 CS 微球制备的正交试验 根据单因素试验结果,选择 Na₂SeO₃ 浓度、壳聚糖浓度、反应温度及交联剂用量 4 个因素为自变量,包封率和载硒量为因变量,设计 L₉(3⁴) 正交试验优化微球制备工艺。

1.3.4 载硒 CS 微球体外缓释试验 参照文献[14~15]方法在聚乙烯烧杯中配制 pH 为 7.40 的模拟体液(SBF)。准确称取 0.04 g 含硒微球于 10 mL 聚乙烯样品管中,并向管中加入 10 mL 模拟体液(SBF),置于 37℃恒温水浴锅中,定期从各管中取缓释液且采用原子荧光光谱法测硒含量^[14],并立即向管中添加缓释液保证缓释体系体积恒定不变。

2 结果与分析

2.1 单因素对载硒 CS 微球制备的影响

2.1.1 壳聚糖浓度对载硒 CS 微球制备的影响 壳聚糖浓度对载硒 CS 微球制备的影响见图 1。由图 1 可知,壳聚糖浓度在 0.5%~3.0%内,随着浓度的升高,微球包封率与之呈正比关系,而载硒量却呈负相关关系,随之降低,而 0.5%的壳聚糖溶液制备的微球壁薄不利于硒缓释,故舍弃该变量水平作正交试验。

2.1.2 Na₂SeO₃ 浓度对载硒 CS 微球制备的影响 Na₂SeO₃ 浓度对载硒 CS 微球制备的影响见图 2。由图 2 可知,在

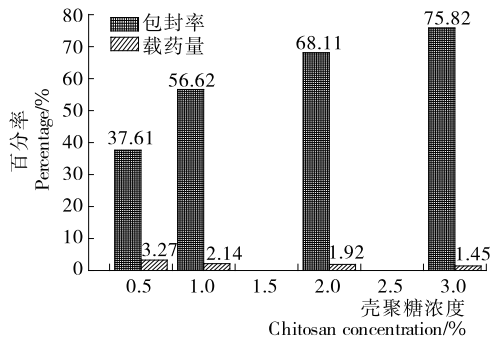


图 1 壳聚糖浓度对微球包封率和载药量的影响
Figure 1 Effects of CS concentration on encapsulation Efficiency and selenium loading capacity

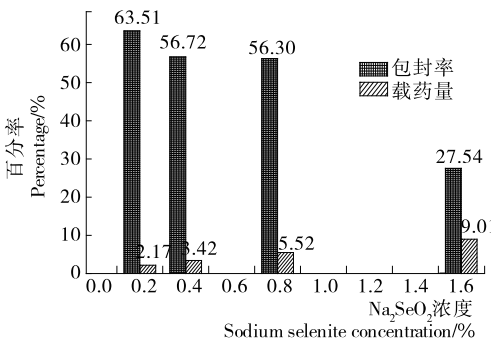


图 2 亚硒酸钠浓度对微球包封率和载药量的影响
Figure 2 Effects of Na₂SeO₃ concentration on encapsulation Efficiency and selenium loading capacity

Na₂SO₂质量浓度为 0.2%~1.6%时,随着 Na₂SeO₃浓度的升高,微球的包封率随之降低,载药量随之升高,Na₂SeO₃浓度为 1.6%时微球包封率相对太低,故正交试验变量选 0.2%,0.4%,0.8%三水平。

2.1.3 交联温度对载硒 CS 微球制备的影响 温度对载硒 CS 微球制备的影响见图 3。由图 3 可知,在温度为 35~65℃时,不同温度对微球得率略有影响,55℃时微球的包封率较好,而微球载药量的峰值则出现在 45℃,35℃时微球不仅包封率较低,且微球间黏连较多,正交试验选择 45,55,65℃三温度水平。

2.1.4 交联剂用量对载硒 CS 微球制备的影响 交联剂用量

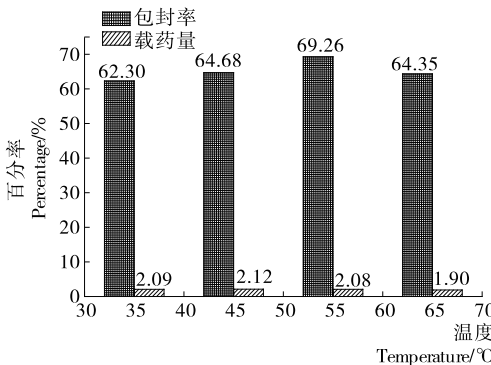


图 3 温度对微球包封率和载药量的影响
Figure 3 Effects of different temperature on encapsulation efficiency and selenium loading capacity

对载硒 CS 微球制备的影响如图 4 所示,由图 4 可知,在交联剂用量为 2.5%~15%时,随着交联剂用量的增加,微球的包封率和载药量都呈先升高后降低的趋势,当交联剂的用量为水相用量的 10.0%时,微球包封率都达到最大值。当交联剂的用量为水相用量的 5.0%时,微球的载药量达到最大值,综合考虑,正交试验交联剂用量选 5%,10%,15%三水平。

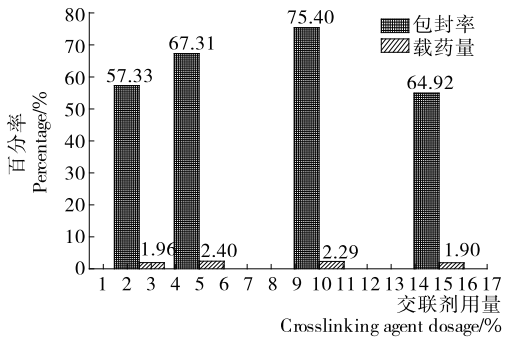


图 4 交联剂用量对微球包封率和载药量的影响
Figure 4 Effects of crosslinking agent on encapsulation efficiency and selenium loading capacity

2.2 正交试验

正交试验方案及采用 SPSS 20.0 软件统计分析的试验结果见表 1 和表 2。

2.2.1 包封率为因变量的正交试验 以包封率为因变量的正交试验结果方差分析见表 3。

由表 3 可知,因素 A、B、C、D 对微球的包封率有显著的影响($P<0.01$)。根据表 2、3 结合变量因子对微球包封率影响的 Duncan 多重分析,得到微球最佳的优化组合为 A₃B₃C₃D₂。

2.2.2 载硒量为因变量的正交试验 以包封率为因变量的正交试验结果方差分析见表 4。

由表 4 可知,因素 A、B、C、D 对微球的包封率有显著的影响($P<0.01$),根据表 2、4 以及变量因子对微球载硒量影响的 Duncan 多重分析,可知微球最佳的优化组合为 A₁B₃C₃D₂。

由上述可知,以不同的因变量进行正交分析得到了不同的优化组合条件,分别为 A₃B₃C₃D₂、A₁B₃C₃D₂。按照这些组合条件设计进行验证实验,结果见表 5。

由表 5 可知,验证实验结果与正交分析结果相吻合。A₁B₃C₃D₂ 组正交优化方案的载硒量更优、A₃B₃C₃D₂ 组的包封率更好。

表 1 乳化交联法正交试验因素水平

Table 1 Factor levels of orthogonal test with emulsion cross-linking method				
因素水平	A 壳聚糖浓度 /%	B 亚硒酸钠量 /%	C 反应温度 /°C	D 交联剂量 /%
1	1.0	0.2	45	5.0
2	2.0	0.4	55	10.0
3	3.0	0.8	65	15.0

表 2 L₉(3⁴) 正交试验方案及结果

Table 2 Scheme and results of orthogonal experimental scheme L₉(3⁴)

试验号		A	B	C	D	包封率/%		载药量/%	
						1	2	1	2
	1	1	1	1	1	33.3	33.5	2.79	2.81
	2	1	2	2	2	40.4	40.1	5.25	5.21
	3	1	3	3	3	55.9	55.7	7.50	7.48
	4	2	1	2	3	58.0	58.0	1.78	1.78
	5	2	2	3	1	61.5	61.2	3.92	3.90
	6	2	3	1	2	62.4	62.5	6.60	6.61
	7	3	1	3	2	90.8	91.3	1.97	1.98
	8	3	2	1	3	69.8	69.7	2.74	2.74
	9	3	3	2	1	71.4	72.3	4.96	5.02
包封率	k ₁	129.45	182.45	165.60	166.60				
	k ₂	181.90	171.35	170.10	193.75				
	k ₃	232.65	190.10	208.20	183.55				
	R	103.20	18.75	42.60	27.15				
载药量	k ₁	15.52	6.56	12.15	14.50				
	k ₂	12.30	11.88	12.00	13.81				
	k ₃	9.71	19.09	13.38	12.01				
	R	5.81	12.53	1.38	2.11				

表 3 正交试验结果的方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal test

因素	平方和	自由度	均方	F	P
A	0.355	2	0.177	24 047.523	0.000
B	0.012	2	0.006	803.119	0.000
C	0.073	2	0.037	4 946.243	0.000
D	0.025	2	0.013	1 696.967	0.000
误差	6.642×10 ⁻⁵	9	7.380×10 ⁻⁶		
总和	1.980	18			

表 4 正交试验结果的方差分析

Table 4 Variance analysis of result on orthogonal test

因素	平方和	自由度	均方	F	P
A	0.001	2	0.001	15 431.197	0.000
B	0.005	2	0.003	71 899.561	0.000
C	7.610×10 ⁻⁵	2	3.805×10 ⁻⁵	1 037.742	0.000
D	0.000	2	8.654×10 ⁻⁵	2 360.061	0.000
误差	3.300×10 ⁻⁷	9	3.667×10 ⁻⁸		
总和	0.038	18			

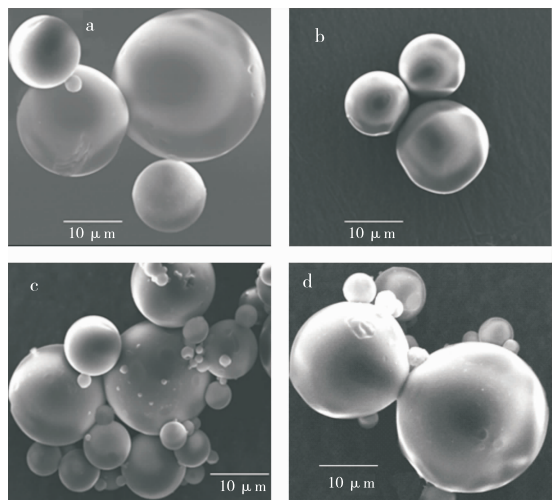
表 5 验证实验结果

Table 5 Result of test and verify experimentation

优化组合 条件	测硒所用样 品质量/g	样品硒含量/ (μg·g ⁻¹)	包封率/ %	载硒量/ %
A ₁ B ₃ C ₃ D ₂	0.040 3	62 055.359	52.89	6.21
A ₃ B ₃ C ₃ D ₂	0.040 1	50 510.819	65.89	5.05

2.3 载硒 CS 微球的形貌表征

将采用优化组合方案所制备的微球进行 SEM 电镜扫描观察,微球的 SEM 图片见图 5。从图 5 可发现,A₁B₃C₃D₂和 A₃B₃C₃D₂ 2 方案条件下制备的微球都有较好的球形结构,形态良好,但 A₁B₃C₃D₂ 条件下制备的微球粒径(粒径为 4~8 μm)显著小于 A₃B₃C₃D₂(粒径为 9~12 μm),说明随着



a、c. $A_3B_3C_3D_2$ 方案的空白/载硒微球;b、d. $A_1B_3C_3D_2$ 方案的空白/载硒微球

图 5 载硒壳聚糖微球的 SEM 图

Figure 5 SEM images for blank and selenium-loaded microspheres

材壁壳聚糖浓度的增大,所制备的微球粒径也增大。

2.4 载硒 CS 微球的 IR 和热分析

2 种方案制得微球的 IR 和热分析结果基本相同,红外光谱、DTG 和 TG 见图 6~8。

2.4.1 红外分析 从图 6 可知,壳聚糖的特征吸收峰在 $3\,441.03\text{ cm}^{-1}$ 处出现的宽峰是 O—H 和 N—H 的伸缩振动峰, $2\,908.98\text{ cm}^{-1}$ 为 CH_3 的 C—H 伸缩振动吸收峰,

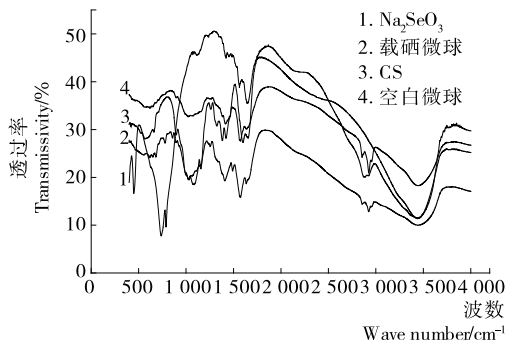


图 6 各样品的红外光谱曲线

Figure 6 IR curves of samples

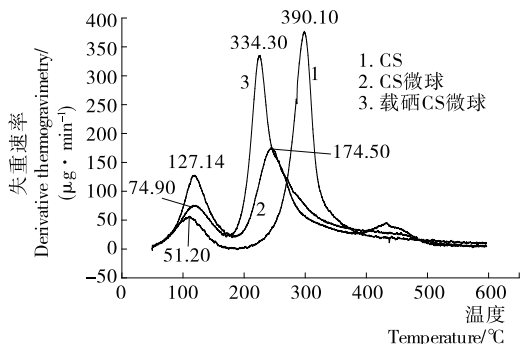


图 7 各样品的 DTG 曲线

Figure 7 DTG curves of samples

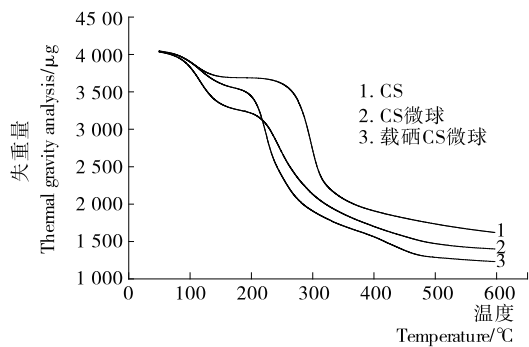


图 8 各样品的 TG 曲线

Figure 8 TG curves of samples

$2\,883.02\text{ cm}^{-1}$ 是醛基的特征峰, $1\,652.01$, $1\,596.75\text{ cm}^{-1}$ 是酰胺键 I 和酰胺键 II 的特征吸收峰, $1\,381.03\text{ cm}^{-1}$ 附近是 CH_3 的 C—H 的对称弯曲振动峰, $1\,424.71\text{ cm}^{-1}$ 附近是 $-\text{CH}_2-$ 的弯曲振动吸收, $1\,325.76$, $1\,264.26\text{ cm}^{-1}$ 是壳聚糖中 C—N 的伸缩振动峰, $1\,079.74\text{ cm}^{-1}$ 附近是壳聚糖的 C—OH 伸缩振动吸收峰;空白壳聚糖微球的 IR 曲线与壳聚糖相比,在 $1\,079.74\text{ cm}^{-1}$ 以下的低波数段曲线形状相对于高波数段变化较大, $3\,441.03\text{ cm}^{-1}$ 处的峰基本未变, $2\,923.73\text{ cm}^{-1}$ 处较弱的吸收峰,是微球中尚存有少量未发生反应的醛基, $1\,638.58\text{ cm}^{-1}$ 处有较强的吸收峰,这是戊二醛和壳聚糖的氨基反应形成的 schiff 碱吸收峰,即戊二醛与壳聚糖发生了交联反应;从 Na_2SeO_3 的 IR 光谱图可知:在 786.94 cm^{-1} 附近是亚硒酸根 $\text{Se}=\text{O}$ 的伸缩振动峰, $1\,113.82\text{ cm}^{-1}$ 附近是亚硒酸根 O—Se—O 的对称伸缩振动峰, 489.29 cm^{-1} 处是 O—Se—O 弯曲变角振动峰;载硒微球和空白微球的 IR 光谱曲线图整体上比较相近,但在 $2\,923.73\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰非常微弱,说明载硒壳聚糖微球中未发生反应的醛基很少, $1\,409.78\text{ cm}^{-1}$ 处有强的吸收峰,这是载硒微球中 O—Se—O 的伸缩振动峰,证明微球中的确包裹了预期硒目标药物,相对于 Na_2SeO_3 纯物质,这个峰向高波数发生了明显的移动。

2.4.2 热重分析 由图 7、8 可知,总体上制备的微球热稳定性优于单纯的壳聚糖。壳聚糖在温度为 $67.24\sim 133.31\text{ }^\circ\text{C}$ 时有个小的失重阶段,此时剩余质量为样品总重的 $99.32\%\sim 91.20\%$, $102.60\text{ }^\circ\text{C}$ 失重速率最大达到 $51.20\text{ }\mu\text{g}/\text{min}$,此阶段为自由水的挥发; $243.84\sim 588.87\text{ }^\circ\text{C}$ 时有较大的失重,剩余质量为样品总重的 $90.89\%\sim 40.07\%$, $298.70\text{ }^\circ\text{C}$ 失重速率最大达到 $390.10\text{ }\mu\text{g}/\text{min}$,此为壳聚糖的部分分解。空白壳聚糖微球存在 2 个失重阶段, $69.14\sim 161.79\text{ }^\circ\text{C}$ 时剩余质量为样品总重的 $99.02\%\sim 84.34\%$, $118.0\text{ }^\circ\text{C}$ 失重速率最大达到 $127.14\text{ }\mu\text{g}/\text{min}$; $185.15\sim 588.87\text{ }^\circ\text{C}$ 时有较大的失重,剩余质量为样品总重的 $79.82\%\sim 32.71\%$, $244.30\text{ }^\circ\text{C}$ 失重速率最大达到 $174.50\text{ }\mu\text{g}/\text{min}$ 。载硒壳聚糖微球存在 2 个失重阶段, $68.05\sim 158.93\text{ }^\circ\text{C}$ 时,剩余质量为样品总重的 $99.48\%\sim 88.88\%$, $117.8\text{ }^\circ\text{C}$ 失重速率最大达到 $74.90\text{ }\mu\text{g}/\text{min}$; $177.54\sim 588.38\text{ }^\circ\text{C}$ 时有较大的失重,剩余质量为样品总重的 $87.71\%\sim 30.79\%$, $225.50\text{ }^\circ\text{C}$ 失重速率最大达到 $334.30\text{ }\mu\text{g}/\text{min}$ 。

2.5 载硒 CS 微球体外缓释性能的调控

将表 1 中 9 组正交试验组制备的载硒 CS 微球样品进行体外缓释试验,探求微球的缓释可控性。准确称取每 1 种待测样品 0.020 g 各 3 份,装入透析袋中,将透析袋放入 10 mL 聚乙烯样品管中,向其中加入 10 mL 模拟体液(SBF),37 ℃ 恒温水浴,定期取出缓释液 5 mL 检测其硒含量,计算微球的累计释放量,并同时补加同体积和温度的 SBF 液。各样品的缓释曲线见图 9。图 9 显示,低浓度的 CS 和交联剂用量少的试验组制备的微球,释硒速率大于高浓度壁材和交联剂用量多的试验组,试验组 1 的释放速率最大且持续时间较短,在 6 h 内累计释放率达到 59.6%,有一定的突释现象,而 3% CS 和 15% 交联剂的试验组制备的微球缓释效应明显。即微球的释硒速率受 CS 材壁浓度和交联剂用量的影响很大,而交联温度和投药量对释放速率的影响相对弱化。由此可推断,球壁厚度和交联度是微球药物释放速率的主要控制因素,通过选择相关变量因素的不同水平,调控球壁厚度和交联度,可实现载硒微球硒的可控缓释。

以包封率、载药量为指标,根据正交试验分析得到 A₁B₃C₃D₂ 和 A₃B₃C₃D₂ 2 组正交优化方案,将优化组合方案制备的微球进行体外缓释试验,缓释性能见图 10。从图 10 可知,整体上看 2 种方案制备的载硒壳聚糖微球都具有较好的缓释能力,说明芯材 Na₂SeO₃ 结构中带负电的 SeO₃²⁻ 离子与壳聚糖结构单元中带正电荷的氨基之间形成了静电吸引作用,同时戊二醛交联使得壳聚糖载硒微球形成的交联网络,又可有效控制加载的 SeO₃²⁻ 长效缓慢释放。2 种方案条

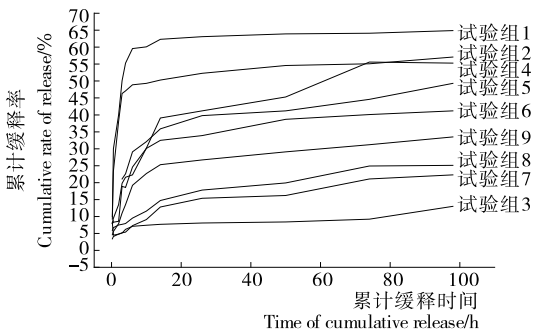


图 9 正交试验各组制备的 Na₂SeO₃/CS 微球缓释曲线
Figure 9 Sustained release selenium curve of Na₂SeO₃/CS microsphere on orthogonal test

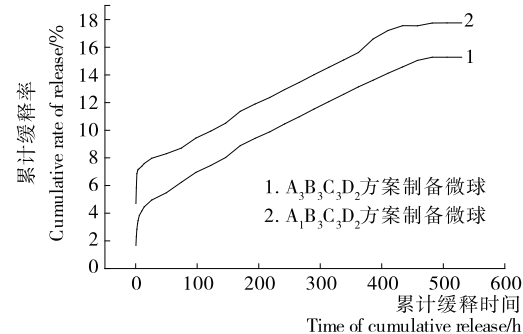


图 10 载硒微球的体外累计释放曲线
Figure 10 Release curve of drug-loading microspheres in vitro

件下制备的微球,2 h 内释放速率较大,缓释初期的累计释放率增加明显,A₁B₃C₃D₂ 和 A₃B₃C₃D₂ 方案制备微球分别达到 6.867 4%,2.837 9%,可能是部分所载芯材硒吸附于微球表面,当微球接触到 SBF 释放介质时,球壁外侧吸附的硒就立即扩散到了介质中,导致微球初期具有较高的释放速率。A₁B₃C₃D₂ 方案制备的微球缓释初期短暂的突释效应更明显,在 2~26 h 时微球呈一定速率的曲线缓释,累计释放率从 6.867 4%增长到 7.978 1%,26~434 h 时呈一定的线性缓释规律,434 h 后缓释速率达平衡,最长缓释时间达到 22 d;相比之下,A₃B₃C₃D₂ 方案制备的微球缓释效应良好,在 26 h 时累计释放率为 4.948 6%,6~434 h 时呈一定的线性缓释规律,期间微球呈一定速率的曲线缓释,从 6.867 4%增长到 7.978 1%,26~482 h 时呈一定的线性缓释规律,482 h 后缓释速率达平衡,最长缓释时间达到 35 d。因此从微球缓释指标来衡量,A₃B₃C₃D₂ 方案更优于 A₁B₃C₃D₂ 方案。

微球释放介质的 pH 变化并不明显,仅在 pH 7.3~7.4 时有较小的波动,表明微球在释硒过程中对释放介质的 pH 影响较小。

3 结论

本试验研究结果表明:载 Na₂SeO₃ 壳聚糖缓释微球最佳制备工艺条件为温度 65 ℃,壳聚糖浓度 3%,亚硒酸钠浓度 0.8%,交联剂用量 15%,包封率和载药量分别为 65.89%,5.05%,且微球形貌优良、平均粒径为 10 μm、热稳定性优于单纯的壳聚糖。

体外缓释试验证明,球壁厚度和交联度是微球释硒速率的主要控制因素,通过选择相关变量因素的不同水平,调控这 2 个因素,可实现载硒微球硒的可控缓释。最佳工艺制备的微球缓释性能良好,缓释速率在 482 h 后达平稳,有效缓释时间达 35 d,即载 Na₂SeO₃ 壳聚糖微球具有较好的长效缓释能力。

因此乳化交联法制备可控缓释硒的壳聚糖微球是可行的,将该载硒壳聚糖微球应用到食品、药品及精细化工等行业产品中,能有效避免硒的突释效应,为缺硒群体的科学补硒提供一条新途径。后续试验需对该产品进行体外细胞和体内动物试验,以精准评价其应用过程中的生物安全性。

参考文献

[1] 史丽英. 人体必需微量元素硒[J]. 微量元素与健康研究, 2005, 22(4): 61-63.
[2] 徐正. 硒的独特生理活性不可替代[J]. 中老年保健, 2014(49): 1-2.
[3] GERALD Batist. Selenium preclinical studies of anticancer therapeutic potential[J]. Biological Trace Element Research, 1988, 15: 223-228.
[4] 唐新欣. 中国缺硒状况的调查[J]. 医药世界, 2002(6): 22-24.
[5] 王磊, 杜非, 孙卉, 等. 人体硒代谢与硒营养研究进展[J]. 生物技术进展, 2015, 5(4): 285-290.
[6] 郑博学, 栗静, 王瑞. 硒是双刃剑: 谈微生物中的硒代谢[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(5): 1-8.

的加标回收率均满足 GB/T 27404—2008 对方法确认技术参数的要求。本试验中 14 种光引发剂的回收率为 73.0%~92.4%，回收率的相对标准偏差为 4.1%~8.9%。

2.5 实际样品检测

采用本方法对 40 个样品(代表基质为酸奶、牛奶、腊肉和面包)进行了检测,共有 2 个牛奶样品分别检测出了二苯甲酮和 2-氯噻吨酮,其他样品中均未检出光引发剂。

3 结论

本试验建立了气相色谱—质谱联用法同时测定高脂高蛋白食品中 14 种光引发剂的方法。方法采用 HLB 固相萃取小柱和 PSA 净化管进行联合净化。所得的方法检出限为 0.02~0.20 μg/kg, 14 种光引发剂的回收率为 73.0%~92.4%,回收率的相对标准偏差均小于 10%,方法的检出限低,重现性好,准确度较高。从方法前处理到检测结果的确认少于 3 h,实现了 14 种光引发剂在此类食品中的快速高效检测。下一步将围绕食品类别与光引发剂检出及含量关系进行研究,并扩大食品类别及光引发剂的种类对方法的适用性进行进一步评估。

参考文献

[1] 金养智. 光引发剂的进展[J]. 影像技术, 2011, 23(3): 8-18.

[2] 韦星船, 杨前程, 李国荣, 等. 紫外光固化水性光引发剂的研究现状及进展[J]. 电镀与涂饰, 2014, 33(14): 587-591.

[3] HOUWE K V D, VELDE S V D, EVRARD C, et al. Evaluation of the migration of 15 photo-initiators from cardboard packaging into TenaxÅ® using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) [J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2014, 31(4): 767-775.

[4] 邓晓军, 郭德华, 李波, 等. 气相色谱-质谱法测定乳制品中光引发剂异丙基硫杂蒽酮的残留量[J]. 色谱, 2007, 25(1): 39-42.

[5] RHODES M C, BUCHER J R, PPECKHAM J C, et al. Carcinogenesis studies of benzophenone in rats and mice[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(5): 843-851.

[6] COOK N, FREEMAN S. Report of 19 cases of photoallergic contact dermatitis to sunscreens seen at the Skin and Cancer Foundation[J]. Australasian Journal of Dermatology, 2015, 42(4): 257-259.

[7] 李中皓, 吴帅宾, 刘珊珊, 等. 超高效合相色谱法快速检测纸质印刷包装材料中 10 种受限制光引发剂[J]. 分析化学, 2013, 41(12): 1 817-1 824.

[8] 张居舟, 尚光志, 蔡荟梅, 等. 基质分散固相萃取-气相色谱-质谱联用法测定塑料食品包装材料中 9 种光引发剂[J]. 食品工业科技, 2015, 36(17): 269-274.

[9] SANCHES-SILVA A, PASTORELLI S, CRUZ J M, et al. Development of a multimethod for the determination of photoinitiators in beverage packaging[J]. Journal of Food Science, 2010, 73(2): C92-C99.

[10] 刘艳, 张强, 顾华, 等. 气相色谱-质谱同时测定食品包装材料中 9 种光引发剂[J]. 分析科学学报, 2017(6): 812-816.

[11] 张耀海, 焦必宁, 周志钦. 气相色谱-串联质谱法结合 QuEChERS 方法快速检测软包装饮料中 8 种光引发剂[J]. 分析化学, 2012, 40(10): 1 536-1 542.

[12] 邓晓军, 郭德华, 李波, 等. 气相色谱-质谱法测定乳制品中光引发剂异丙基硫杂蒽酮的残留量[J]. 色谱, 2007, 25(1): 39-42.

[13] SAGRATIINI G, CAPRIOLI G, CRISTALLI G, et al. Determination of ink photoinitiators in packaged beverages by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1 194(2): 213-220.

[14] MATOVSKA K. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1 040(2): 259-272.

[15] 张建莹, 沈金灿, 岳振峰, 等. 液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 11 种光引发剂残留量[J]. 江西农业学报, 2013(7): 94-97.

[16] ROTHENBACKER T, FUGEL M B D. 2-Isopropylthioxanthone (2-ITX) in food and food packaging materials on the German market[J]. Food Additives & Contaminants, 2007, 24(4): 438-444.

[17] ZHANG Y, JIAO B. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined With Micellar Electrokinetic Chromatography for the Determination of Some Photoinitiators in Fruit Juice[J]. Food Analytical Methods, 2015, 8(4): 973-981.

[18] 李中皓, 范子彦, 边照阳, 等. 分散固相萃取净化气相色谱-质谱联用法快速检测纸质包装材料中 18 种光引发剂[J]. 分析化学, 2013, 41(9): 1 334-1 340.

(上接第 44 页)

[7] 荀黎红, 吴丛雅. 高硒与疾病的研究进展[J]. 国外医学地理分册, 2005, 26(3): 106-117.

[8] 黄亮亮. 壳聚糖复合微胶囊的制备及性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 2-4.

[9] 王大卫, 温宝芳, 商洪才. 原花青素/白芨多糖/壳聚糖微球的制备及理化特性研究[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(7): 133-137.

[10] 冯婕, 刘中秋, 严铁琛, 等. 载普伐他汀钠的壳聚糖微球的制备及性能评价[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(6): 879-882.

[11] THIAGARAJAN Hemalatha, GUNASEKARAN Krithiga, BASKAR Santhosh Kumar, et al. Preparation and characterization of hydroxyapatite-coated selenium nanoparticles and their

interaction with osteosarcom (SaOS-2) cells[J]. Acta Metall. Sin. (Engl. Lett.), 2014, 27(6): 1 152-1 158.

[12] MD Rabiul Hussain, RASHMI R Devi, TARUN K Maji. Controlled release of urea from chitosan microspheres prepared by emulsification and cross-linking method[J]. Iran Polymer and Petrochemical Institute, 2012, 21: 473-479.

[13] 王振旺. 乳化交联法制备壳聚糖微球及其包载药物的研究[D]. 天津: 天津大学, 2007: 33-35.

[14] TADASHI Kokubo, HIROAKI Takadama. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity[J]. Biomaterials, 2006, 27: 2 907-2 915.

[15] 罗琳. 聚乳酸/β-磷酸三钙系可降解骨修复材料的生物降解性能研究[D]. 成都: 四川大学, 2006: 32-33.