

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202405019



虾青素复合纳米颗粒 Pickering 乳液 的制备及评价

郑秀梅¹, 杜鑫¹, 柳培忠¹, 虞文熙¹, 吴振², 王立强¹, 侯志勇^{1,3}

(1. 华侨大学 生物医学学院, 福建泉州 362021;

2. 厦门大学 药学院, 福建 厦门 361102;

3. 解放军 962 医院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要: 利用固体颗粒(复合纳米颗粒)稳定油水界面的特性,制备玉米醇溶蛋白-虾青素纳米颗粒(Zein-AST NPs)和玉米醇溶蛋白-虾青素-阿拉伯胶复合纳米颗粒(Zein-AST-GA NPs),并比较它们的稳定性差异。以 Zein-AST-GA NPs 为稳定剂,使用含 AST 的玉米油制备 Pickering 乳液,研究乳液中 AST 的稳定性、体外释放率和大鼠体内药代动力学。实验结果显示:油相中含有 AST 的 Pickering 乳液(PE1)比油相中不含 AST 的 Pickering 乳液(PE2)具有更好的热稳定性和贮藏稳定性,且 PE1 具有较强的自由基清除能力,释放速率优于参比制剂和 PE2,AST 的释放符合非克扩散规律;口服 PE1 后 8 h 达到最大 AST 血浆质量浓度($2.654 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),且相对生物利用度分别是市售虾青素微囊粉(AST-MCs)和 PE2 的 1.703, 1.481 倍。

关键词: 虾青素; Pickering 乳液; 稳定性; 生物利用度

中图分类号: R 944.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)06-0756-10

Preparation and Evaluation of Astaxanthin Composite Nanoparticles Pickering Emulsion

ZHENG Xiumei¹, DU Xin¹, LIU Peizhong¹, YU Wenxi¹,
WU Zhen², WANG Liqiang¹, HOU Zhiyong^{1,3}

(1. School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China;

3. 962 Hospital of Liberation Army, Harbin 150080, China)

Abstract: The property of solid particles (composite nanoparticles) to stabilize the oil-water interface was utilized to prepare corn zein-solubilized protein-astaxanthin nanoparticles (Zein-AST NPs) and corn zein-solubilized protein-astaxanthin-arabic gum composite nanoparticles (Zein-AST-GA NPs), and their stability differences were compared. Using Zein-AST-GA NPs as stabilizer, Pickering emulsion was prepared using corn oil containing AST. The stability, in vitro release rate, and *in vivo* pharmacokinetics in rats of AST in the emulsion were studied. The experimental results show that the Pickering emulsion containing AST (PE1) in the oil phase has better thermal and storage stability than the Pickering emulsion without AST in the oil phase (PE2), and PE1 has stronger free radical scavenging ability with a release rate superior to that of the reference

收稿日期: 2024-05-01

通信作者: 侯志勇(1972-),男,副主任药师,主要从事创新药物的研究。E-mail:mpp5358@163.com。

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFE0101700);福建省高校产学研合作重大项目(2019Y4007);华侨大学研究生科研创新基金资助项目(18013071019)

formulation and PE2, and the release of AST is in accordance with Fick's diffusion law. The maximum AST plasma mass concentration ($2.654 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) is reached 8 hours after oral administration of PE1, and the relative bioavailability are 1.703 and 1.481 times higher than that of commercially available astaxanthin microcapsule powder (AST-MCs) and PE2, respectively.

Keywords: astaxanthin; Pickering emulsion; stability; bioavailability

虾青素 (astaxanthin, AST) 是一种脂溶性营养素^[1], 雨生红球藻是天然 AST 的最佳获取来源之一^[2]。由于 AST 化学结构中的多烯链可有效清除细胞膜磷脂双分子层之间的自由基, 化学结构中的 β -紫罗兰酮环上的羟基和酮基能吸引自由基未配对电子或向自由基提供电子, 因此, AST 具有较强的抗氧化活性、抗炎活性、抗癌活性、抗肥胖和抗糖尿病病活性等^[3-6]。由于 AST 难溶于水, 且化学结构中共轭双键使其在光、氧和热等条件下易发生氧化降解, 导致 AST 存在稳定性差和口服生物利用度低等缺点。

乳液是保护生物活性物质免受降解的给药途径之一, 可增强生物活性物质的物理、化学稳定性, 可提高生物利用度, 并实现靶向递送和控制释放^[7]。Pickering 乳液以固体颗粒为稳定剂, 固体颗粒吸附在油水界面处, 形成密集的界面层, 防止聚集现象和奥斯瓦尔德熟化, 具有更高的稳定性^[8]。Pickering 乳液界面处颗粒形成的网络结构可改变脂质消化, 实现药物的缓释释放, 提高药物的生物利用度。多糖 (如壳聚糖和纤维素等) 与蛋白质相互作用形成的复合纳米颗粒稳定的 Pickering 乳液具有更强的乳化性能和更厚的界面层^[9]。基于此, 本文对虾青素复合纳米颗粒 Pickering 乳液的进行制备及评价。

1 实验部分

1.1 实验仪器

紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司); BSA124S 型电子天平 (奥豪斯仪器 (常州) 有限公司); 高效液相色谱仪 (辽宁省大连市依利特公司); 78HW-1 型恒温磁力搅拌器 (江苏省金坛市环宇科技仪器厂); 台式冷冻高速离心机 (湖南省长沙市湘仪实验仪器); RC-806D 型溶出实验仪 (天津市天大天发科技有限公司); 旋转蒸发仪 (河南省巩义市予华仪器有限责任公司); pH 测定仪 (广东省广州市授科仪器科技有限公司); 纳米粒度及 ZETA 电位分析仪 (美国布鲁克海文仪器公司); 真空冷冻干燥机 (北京松源华兴生物技术有限公司); JEM-1200EX 型透射电子显微镜 (日本电子株式会社); Nicolet iS10 型傅里叶红外光谱仪 (美国 Nicolet 仪器公司); D8 Advance X 型射线衍射仪 (德国 Bruker Optics 仪器公司); STA449F5 型同步热分析仪 (德国 Netzsch 仪器公司); 高速剪切机 (美国布鲁克海文仪器公司); BT-9300ST 型激光粒度分布仪 (辽宁省丹东市百特仪器有限公司); MCR302 型流变仪 (上海市安东帕 (上海) 商贸有限公司); 光学显微镜 (广东省广州市明美光电技术有限公司); 倒置荧光显微镜 (日本尼康)。

1.2 实验试剂

雨生红球藻油、市售虾青素微囊粉 (安徽省黄山市德宝生物科技有限公司); 玉米油、虾青素标准品、玉米醇溶蛋白、阿拉伯胶、磷酸盐缓冲盐溶液 (上海市阿拉丁生化科技股份有限公司); 乙醇、二氯甲烷、甲醇 (广东省汕头市西陇科学股份有限公司); 丙酮、盐酸、氢氧化钠、氯化钠、氯化钙、氯化钾、无水乙醚 (上海市国药集团化学试剂有限公司); 尼罗红、尼罗蓝 A (上海市易恩化学技术有限公司); 吐温-80、胰蛋白酶、胃蛋白酶、水合氯醛 (上海市源叶生物科技有限公司); 尿素、 α -淀粉酶、脂肪酶、猪胆盐 (上海市易恩化学技术有限公司)。

2 实验方法

2.1 玉米醇溶蛋白-虾青素-阿拉伯胶复合纳米颗粒的制备

将玉米醇溶蛋白 (Zein) 溶于质量分数为 80% 乙醇溶液中, 室温条件下磁力搅拌使其完全分散, 将 pH 值调至 3.5, 得到质量浓度为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Zein 溶液。将 Zein 溶液与 AST 溶液 (pH 值为 3.5, $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 AST 乙醇溶液) 等体积均匀混合, 混合液快速注入蒸馏水 (5 倍混合液体积, pH 值为 3.5) 中, 充分搅拌 (在室温下, 转速为 $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 在 40°C 下, 旋转蒸发, 除去有机溶剂。用相同 pH 值的蒸馏水补充至原有体积, 离心 ($5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min) 除去不溶性物质, 得到玉米醇溶蛋白-虾青素

纳米颗粒 (Zein-AST NPs)分散液。

称取一定质量的阿拉伯胶(Gum Arabic,GA)溶于蒸馏水中,使用磁力搅拌器使溶液完全溶胀,将 pH 值调至 3.5,形成 GA 溶液。将 GA 溶液加入到 Zein-AST NPs 分散液中,GA 和 Zein 的质量比为 1.0 : 1.5,磁力搅拌 2 h(在室温下,转速为 $800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),离心($5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,5 min)去除不溶性物质,得到 Zein-AST-GA NPs 分散液,最终得到的玉米醇溶蛋白-虾青素-阿拉伯胶复合纳米颗粒 (Zein-AST-GA NPs)分散液中 Zein 的质量浓度为 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。Zein-AST-GA NPs 分散液在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,冷冻 12 h 后,用真空冷冻干燥机冷冻干燥 24 h,得到 Zein-AST-GA NPs。

2.2 Pickering 乳液的制备

以体积分数为 30%的玉米油为油相,向玉米油中加入质量浓度为 $0.03\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 AST,在 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速下,将含有 AST 的玉米油缓慢滴入质量浓度为 $6.25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Zein-AST-GA NPs 分散液中,滴加结束后,继续剪切 3 min,得到 Pickering 乳液。

2.3 傅里叶变换红外光谱

将 2 mg Zein-AST NPs 粉末和 2 mg Zein-AST-GA NPs 粉末分别与 KBr 混合,将混合物研磨成细粉并压制成透明薄片,采用傅里叶变换红外吸收光谱仪进行测量分析。光谱采集的波数范围为 $4\,000\sim 400\text{ cm}^{-1}$,分辨率为 4 cm^{-1} ,扫描 32 次。

2.4 X 射线衍射

以 $2^{\circ}\cdot\text{min}^{-1}$ 的扫描速率记录 $5^{\circ}\sim 45^{\circ}$ 的衍射图。管电压为 40 kV,管电流为 40 mA。

2.5 扫描电子显微镜

使用扫描电子显微镜(SEM)观察 Zein-AST NPs 和 Zein-AST-GA NPs 的微观形貌,使用毛细管将新鲜制备的样品点在锡箔纸上,在室温条件下自然晾干并喷金镀膜,使用场发射扫描电镜在 15 kV 的加速电压下记录 SEM 图像。

2.6 乳液的类型

将 Pickering 乳液分别滴加到纯玉米油或纯蒸馏水中,如果乳液液滴能够在水相中迅速分散并在油相中保持团聚,则认为它是水包油(O/W)型乳液,反之,则认为它为油包水(W/O)型乳液。

2.7 乳液微观结构特征

将一滴稀释 5 倍后的乳液滴加到光学显微镜的载玻片上,用盖玻片覆盖后,放置在载物台上观察其形态。为进一步验证 Zein-AST-GA NPs 吸附在油水界面上,使用倒置荧光显微镜对 Pickering 乳液进行观察。将每个样品稀释 5 倍,用尼罗红染色油相和尼罗蓝 A 对蛋白质进行染色。

2.8 流变学特征

采用 MCR 302 型流变仪研究不同油相体积分数(10%,20%,30%,40%,50%,60%)的 Pickering 乳液流变行为,钢制平行板直径为 40 mm,间隙为 1 mm。每次测量取适量 Pickering 乳液平铺于平板上,在室温下进行测量。在剪切速率为 $0.1\sim 100.0\text{ s}^{-1}$ 范围内测量表观粘度,绘制剪切速率-粘度曲线。在 $0.1\sim 100.0\text{ Hz}$ 范围内进行频率扫描,应变为 1%,测量储能模量和损耗模量与频率的关系。

2.9 乳析指数

采用乳析指数(I_c)评价乳液的稳定性,测量并记录不同稳定性条件下每个乳液的总高度(H_t)和乳化相高度(H_s)。 I_c 的计算公式为

$$I_c = H_s / H_t \times 100\%$$

2.10 乳液的稳定性

将 Pickering 乳液避光贮藏,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,分别测定 0,10,30,60,90,120,360 d 乳液的乳析指数,采用光学显微镜观察乳液的微观形态,并计算乳液中 AST 保留率。

2.11 乳液中虾青素的稳定性

以 Zein-AST-GA NPs 为稳定剂,以含 AST 的玉米油为油相(油相 AST 的质量浓度为 $0.03\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),按节 2.2 的方法制备 Pickering 乳液,乳液中 AST 的质量浓度为 $0.054\,3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,记为 PE1,如图 1 (a)所示。

以 Zein-AST-GA NPs 为稳定剂,以纯玉米油为油相,按节 2.2 的方法制备 Pickering 乳液,乳液中

AST 的质量浓度为 $0.054\ 3\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 记为 PE2, 如图 1(b) 所示。

Zein-AST-GA NPs, 如图 1(c) 所示。AST, 如图 1(d) 所示。

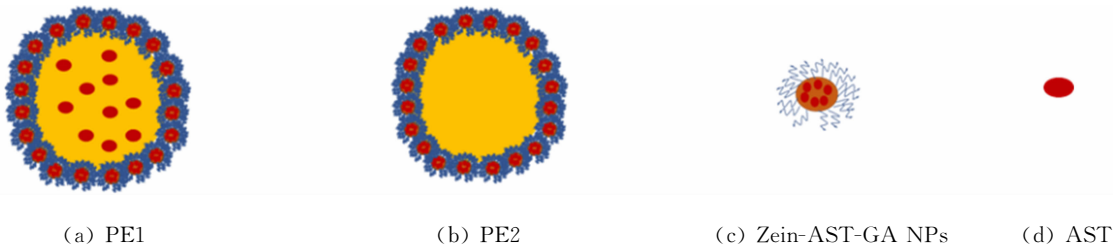


图 1 Pickering 乳液示意图

Fig. 1 Schematic diagram of Pickering emulsion

2.12 体外释放实验

分别以 200 mL, 质量分数为 0.5% 的 Tween 80 溶液的 SGF (模拟胃液), SIF (模拟肠液) 为溶出介质, 将等 AST 浓度的 AST 丙酮溶液、市售虾青素微囊粉 (AST-MCs) 溶液、PE2 和 PE1 分别装入处理好的透析袋 (相对分子质量为 14 000) 中, 将透析袋分别置于溶出介质中, 在温度为 $(37.0 \pm 0.5)\ ^\circ\text{C}$, 搅拌速度为 $100\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下, 分别于 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 48.0 h 从释放的溶出介质中取 2 mL 样品溶液, 并加入相同体积的空白溶出介质。将取出的 2 mL 样品溶液与 2 mL 的丙酮溶液混合均匀, 用 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤膜除去杂质, 使用紫外-可见分光光度计在波长 479.5 nm 处测量 AST 吸光度, 计算各时间点的药物累计释放率, 药物累计释放率 (η_a) 为

$$\eta_a = \frac{\rho_t V + \sum_{i=1}^{n-1} \rho_i V_s}{m_0} \times 100\%。$$

上式中: ρ_t 为取样时间点 t 时 AST 的质量浓度; ρ_i 为取样时间点的前一个时间点 i 的 AST 质量浓度; V 为溶出介质的总体积; V_s 为取样的体积; m_0 为 AST 总质量。

2.13 大鼠体内药代动力学实验

取 24 只健康雄性 SD (白色封闭群) 大鼠, 将等质量浓度的 AST 玉米油、市售 AST-MCs、PE2 和 PE1 随机分为 4 组 ($n=6$)。AST 玉米油组、市售 AST-MCs 组和 PE2 组为对照组, PE1 组为实验组。每组大鼠给药前禁食 12 h, 不禁水, 分别以剂量为 $100\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 进行灌胃。灌胃结束后分别于 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 48.0 h 对大鼠眼眶取约 0.5 mL 血, 置于用肝素钠处理过的 EP 管中。将血浆样品进行处理后, 使用高效液相分析方法进样分析, 记录峰面积, 计算 AST 质量浓度。以取样时间为横坐标, AST 质量浓度为纵坐标, 绘制血药质量浓度-时间曲线图。用 Data Analysis System (DSA) 软件以非房室模型进行分析计算药动学参数及相对生物利用度 (F)。 F 的计算式为

$$F = \frac{\text{AUC}_{(0 \sim \infty), \text{T}}}{\text{AUC}_{(0 \sim \infty), \text{ASTO}}} \times 100\%。$$

上式中: $\text{AUC}_{(0 \sim \infty), \text{T}}$ 为试制剂的药物质量浓度时间曲线下面积 (时间为 $0 \sim \infty$); $\text{AUC}_{(0 \sim \infty), \text{ASTO}}$ 为 AST 玉米油的药物质量浓度时间曲线下面积 (时间为 $0 \sim \infty$)。

3 实验结果与分析

3.1 傅里叶变换红外光谱

傅里叶变换红外 (FTIR) 光谱通常用于研究复合物中潜在的相互作用, 因此, 测定了 Zein, GA, AST, Zein NPs, Zein-AST NPs, Zein-AST-GA NPs 的 FTIR 光谱 (图 2)。图 2 中: ν 为波数。由图 2 可知如下 2 点结论。

1) 在 FTIR 中, 波数为 $3\ 100 \sim 3\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰是由于羟基的 O—H 拉伸振动^[10] 引起的, 在 Zein, GA 和 AST 的 FTIR 光谱中, 氢键的特征峰波数分别为 $3\ 424.02$, $3\ 424.95$ 和 $3\ 495.50\ \text{cm}^{-1}$; Zein NPs 氢键的特征峰波数为 $3\ 416.49\ \text{cm}^{-1}$; 在 Zein-AST NPs 和 Zein-AST-GA NPs 的光谱中, 氢键的特征峰波数移动至 $3\ 427.33\ \text{cm}^{-1}$ 和 $3\ 416.27\ \text{cm}^{-1}$ 处, 表明在 Zein, AST 和 GA 之间形成了氢键。

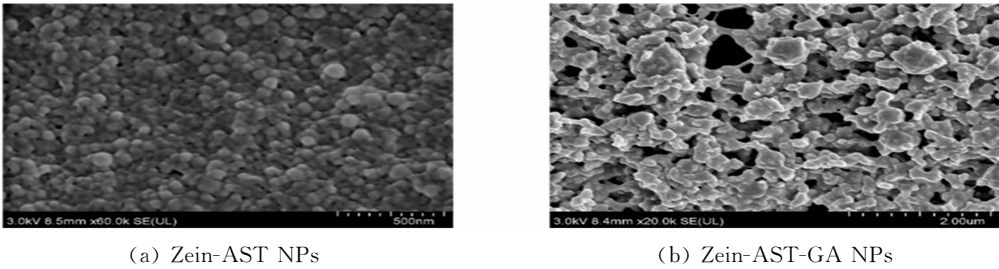
2) 蛋白质在波数为 $1\,650\sim1\,700\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰代表酰胺 I 带,在波数为 $1\,500\sim1\,550\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰代表酰胺 II 带^[11],酰胺 I, II 带分别为 C=O 的拉伸和 C—N 的拉伸。在 FTIR 光谱中,Zein 在波数为 $1\,656.17\text{ cm}^{-1}$ 处显示了一个酰胺 I 带,在波数为 $1\,537.15\text{ cm}^{-1}$ 处显示了一个酰胺 II 带;Zein NPs 的酰胺 I 带未发生移动,酰胺 II 带的特征峰移至波数为 $1\,535.50\text{ cm}^{-1}$;AST 的 FTIR 光谱在波数为 $1\,650.82\text{ cm}^{-1}$ 处显示了 C=O 的拉伸振动,在波数为 $1\,551.63\text{ cm}^{-1}$ 处显示六元原子环 C—C 的拉伸震动,在波数为 976.42 cm^{-1} 处显示 C,C 共轭中 C—H 的拉伸振动,在波数为 976.42 cm^{-1} 处的吸收峰消失了;Zein-AST NPs 的酰胺 I, II 带分别移至波数为 $1\,653.96,1\,536.14\text{ cm}^{-1}$ 处,表明 Zein 和 AST 之间存在静电相互作用,同时,Zein 和 AST 都具有疏水性,说明 Zein 和 AST 之间可能存在疏水相互作用,疏水相互作用也可能是形成 Zein-AST NPs 的另一种作用力;Zein-AST-GA NPs 形成后,在波数为 $1\,656.19,1\,540.32\text{ cm}^{-1}$ 处显示出酰胺 I, II 带,表明 Zein,AST 和 GA 之间发生了静电相互作用,与 Zein-AST NPs 相比,Zein-AST-GA NPs 在波数为 $1\,072.62\text{ cm}^{-1}$ 处显示了一个特征峰,这是 GA 的特征峰,表明 GA 已经吸附到 Zein 表面,表明 Zein,AST 和 GA 之间可能存在氢键相互作用和疏水相互作用等。

3.2 X 射线衍射分析

使用 X 射线衍射(X-Ray Diffraction,XRD)法分析 Zein,GA,AST,Zein NPs,Zein-AST NPs,Zein-AST-GA NPs 的光谱,X 射线衍射谱图,如图 3 所示。由图 3 可知:Zein 在 9° 和 19° 显示出两个宽衍射峰,表明蛋白质的无定形性质;GA 在 19° 显示出一个宽衍射峰,表明天然多糖的无定形性质;AST 在 $11.2^\circ,13.9^\circ,14.4^\circ,16.5^\circ,18.6^\circ,20.8^\circ$ 和 25.7° 具有尖锐的吸收峰,表明 AST 的存在形式为高结晶结构;在 Zein-AST NPs 和 Zein-AST-GA NPs 的 XRD 光谱中并没有发现 AST 的特征衍射峰,表明 AST 可能通过与 Zein 之间的疏水相互作用,以无定形的形态分布在纳米颗粒中;Zein-AST-GA NPs 的峰值低于 Zein-AST NPs 的峰值,表明 Zein 与 GA 之间存在分子间的相互作用;与未包埋 AST 的 Zein NPs 相比,Zein-AST NPs 的衍射峰强度更高,说明 Zein 和 AST 之间存在分子间的相互作用。

3.3 扫描电子显微镜分析

采用扫描电子显微镜(SEM)对 Zein-AST NPs 和 Zein-AST-GA NPs 的微观结构进行表征,扫描电镜图,如图 4 所示。



(a) Zein-AST NPs (b) Zein-AST-GA NPs

图 4 样品的扫描电镜图

Fig. 4 Diagrams of scanning electron microscope of samples

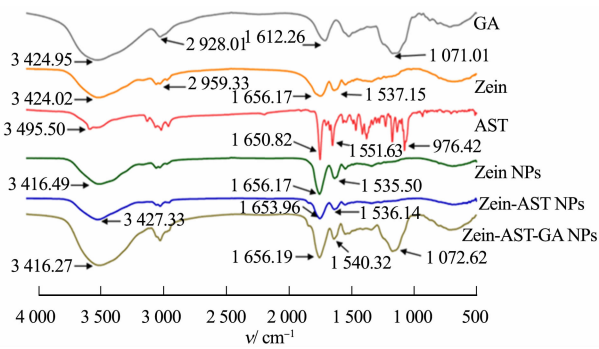


图 2 样品的傅里叶变换红外光谱图

Fig. 2 Fourier transform infrared spectrogram of samples

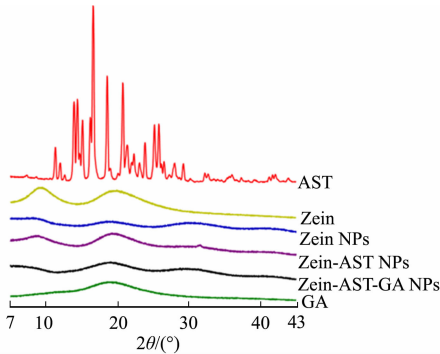


图 3 样品的 X 射线衍射谱图

Fig. 3 X-ray diffraction pattern of samples

由图 4 可知:Zein-AST NPs 呈球形,表面光滑,粒径约为 100 nm,与纳米粒度仪测定的结果相对应;添加 GA 后,Zein-AST-GA NPs 的粒径变大,并观察到复合纳米颗粒之间相互连接,表明 GA 和 Zein 之间的交联可能不止发生在分子内部,还可能发生在分子间,导致颗粒之间形成团块。

3.4 Pickering 乳液类型和微观结构

Pickering 乳液的类型对比,如图 5 所示。由图 5 可知:乳液液滴在水相中均匀分散,在油相中保持团聚。借助倒置荧光显微镜观察 Zein-AST-GA NPs 稳定的 Pickering 乳液的界面结构。

倒置荧光显微镜图,如图 6 所示。由图 6 可知:油相被尼罗红染色呈现绿色;由蛋白质组成的 Zein-AST-GA NPs 被尼罗蓝 A 染色呈现红色;组合尼罗红染色的绿色荧光位于球形液滴中间,液滴周围有明显的红色圆圈,表明 Zein-AST-GA NPs 吸附在了油水界面上,进一步确认复合纳米颗粒和油相中含 AST 的 Pickering 乳液为水包油(O/W)型乳液。

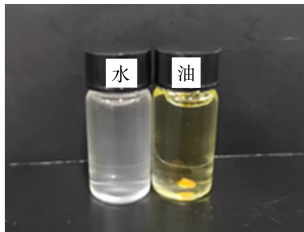


图 5 Pickering 乳液的类型对比
Fig. 5 Comparison of Pickering emulsion types

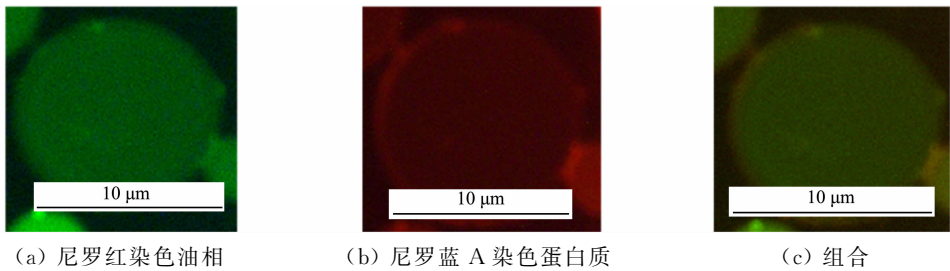


图 6 Pickering 乳液界面结构的倒置荧光显微镜图

Fig. 6 Inverted fluorescence microscope diagram of Pickering lotion interface structure

3.5 Pickering 乳液的流变性能分析

通过 Pickering 乳液的流变形可以更好地了解其内部结构,不同油相体积分数的 Pickering 乳液流变性,如图 7 所示。图 7 中: μ 为表观粘度; v 为剪切速率; φ 为体积分数; f 为频率; G' 为储能模量; G'' 为损耗模量。

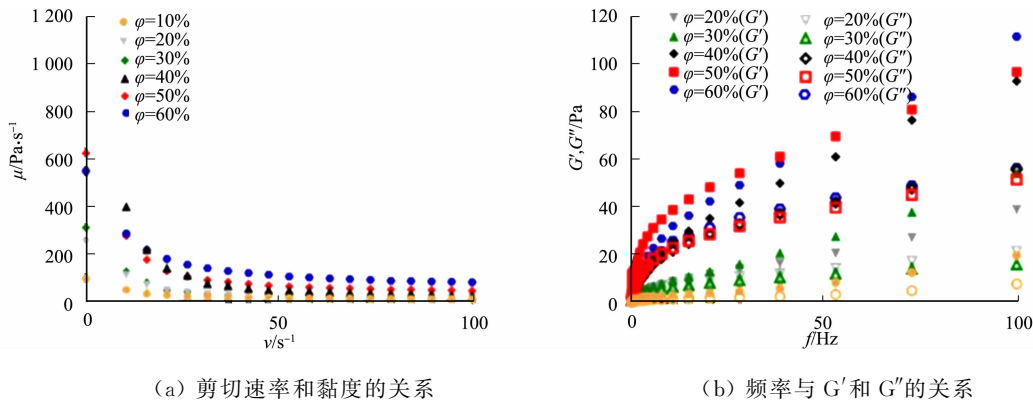


图 7 不同油相体积分数的 Pickering 乳液流变特性

Fig. 7 Rheological properties of Pickering emulsions with different volume fractions of oil phase

由图 7(a)可知:剪切速率从 0.1 s^{-1} 增加到 100.0 s^{-1} ,Pickering 乳液的表观粘度逐渐降低,表明 Pickering 乳液的剪切稀化行为,这是由于乳液内部的结构随剪切速率的增加而破裂,导致粘度降低;乳液的表观粘度随油相体积分数的增加而增加,这可能是由于 Zein-AST-GA NPs 吸收更多的油滴形成了稳定的三维网络结构^[12]。

由图 7(b)可知:频率为 $0.1 \sim 100.0 \text{ Hz}$ 的 Pickering 的 G' 和 G'' 随油相体积分数的增加而增加, Pickering 乳液的 G' 明显高于 G'' ,表明 Pickering 乳液形成了弹性凝胶结构,乳液液滴的相对密度增大,并在较高的油相体积分数下有更高的 G' ,较高的 G' 和 G'' 说明 Pickering 乳液中 Zein-AST-GA NPs 形成的界面层更稳定,因此,当复合纳米颗粒质量浓度固定时,油相体积分数对 Pickering 乳液的流变性能

有明显的影响,增多的油相可以通过在油水界面形成稳定的三维网络结构,并在一定程度上抵抗高频振荡,增强乳液的稳定性^[13]。

3.6 乳液的稳定性

贮藏时间对 Pickering 乳液的影响,如图 8 所示。图 8 中: t 为贮藏时间。由图 8 可知:随着贮藏时间的推移,Pickering 乳液的 I_c 略微增加,且乳液液滴的微观形态仍然保持着均匀的球形形态,表明 Zein-AST-GA NPs 稳定的 Pickering 乳液对乳液液滴的聚集有较好的稳定性;贮藏 360 d 后,Pickering 乳液的液滴未出现聚集现象,表明 Zein-AST-GA NPs 在油滴表面形成的致密界面层,提高了乳液的贮藏稳定性。

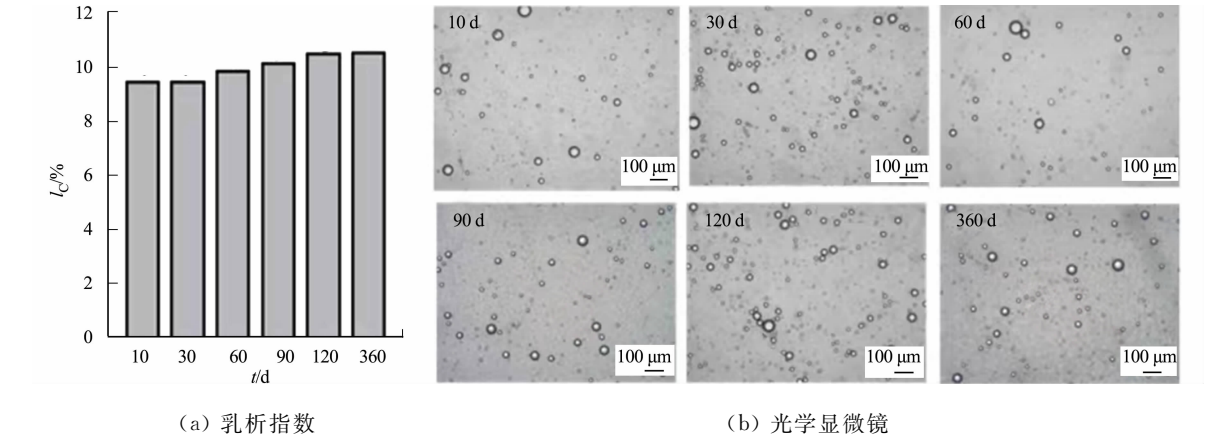


图 8 贮藏时间对 Pickering 乳液的影响

Fig. 8 Effects of storage time on Pickering emulsion

贮藏时间对虾青素保留率(K)的影响,如图 9 所示。在 4 ℃下,虾青素贮藏 360 d 后,PE1 的 AST 保留率为 $(92.500 \pm 0.100)\%$,高于 PE2 的 $(88.700 \pm 0.110)\%$,表明将 AST 同时包封在 Pickering 乳液的复合纳米颗粒和油滴中可有效提高 AST 的保留率,可能是因为吸附在油水界面处复合纳米颗粒中的 AST 可保护油滴内部的 AST,防止过多的 AST 氧化分解。

3.7 体外释放

体外释放模拟药物在体内的释放过程,考察 Pickering 乳液在摄入后释放包封物质的能力。当口服药物后,在胃肠道的释放有助于药物的吸收,根据 2020 版《中华人民共和国药典》通则,难溶性药物可加少许表面活性剂,因此,在两种溶出介质中均添加 0.5% 的吐温-80 以满足“漏槽条件”。体外释放曲线,如图 10 所示。图 10 中: Q 为释放率。

在 SGF 中释放 48 h 后,AST 丙酮溶液、市售 AST-MCs、PE2 和 PE1 的释放率分别达到 $(14.960 \pm 0.052)\%$, $(42.960 \pm 0.051)\%$, $(56.800 \pm 0.095)\%$ 和 $(47.060 \pm 0.044)\%$ 。在 SGF 中,PE2 的释放率更高的可能是因为低 pH 值环境下,Zein 和 GA 之间的静电相互作用减少,Zein-AST-GA NPs 稳定性下降,导致复合纳米颗粒中的 AST 释放增加,PE1 中复合纳米颗粒中 AST 质量分数较少,复合纳米颗粒分布在油水界面处形成屏障,导致油滴内部的 AST 溶出缓慢,释放率较低。

在 SIF 中释放 48 h 后,AST 丙酮溶液、市售 AST-MCs、PE2 和 PE1 的释放率分别达到 $(32.990 \pm 0.015)\%$, $(56.210 \pm 0.185)\%$, $(61.780 \pm 0.015)\%$ 和 $(77.070 \pm 0.257)\%$,并在前 12 h 快速释放,可能是因为 AST 丙酮溶液长时间放置在溶出杯中,导致部分 AST 氧化降解,释放率较低。与市售 AST-MCs 相比,Pickering 乳液具有更好的体外释放率,且 PE1 释放率高于 PE2。原因可能是在较高的 pH 值下,Zein-AST-GA NPs 之间发生聚集,导致 Zein-AST-GA NPs 与释放介质的接触面积减小,不利于

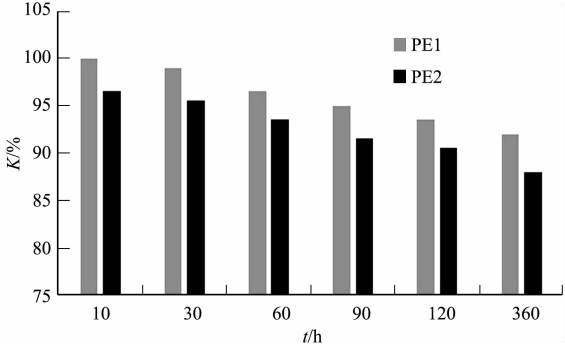


图 9 贮藏时间对虾青素保留率的影响

Fig. 9 Effects of storage time on retention rate of astaxanthin in shrimp

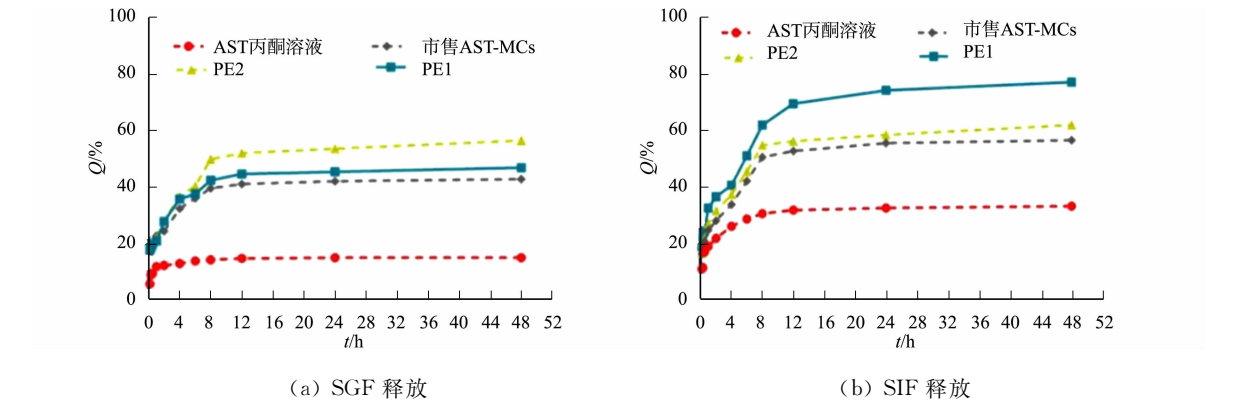


图 10 体外释放曲线
Fig. 10 *In vitro* release curves

包封在复合纳米颗粒中 AST 的释放,而复合纳米颗粒的聚集增加了油滴与释放介质的接触面积,增加了油滴中 AST 的释放。因此,PE1 在 SIF 中的释放率最高,并高于 PE2 在 SGF 中的释放率。

通过 DDSolver 软件拟合药物释放动力学模型,阐述药物释放的机制及动力学。模拟肠液中、胃液中各模型拟合结果,如表 1,2 所示。

表 1 模拟肠液中各溶液拟合结果
Tab. 1 Fitting results of solutions in simulated intestinal fluid

溶液	模拟肠液							
	零级动力学		一级动力学		Higuchi		Korsmeyer-Peppas	
	方程	R^2	方程	R^2	方程	R^2	方程	R^2
AST 丙酮溶液	$Q=0.389t+19.869$	0.396 5	$\ln(100-Q)=0.006t+36.951$	0.429 3	$Q=3.494t^{0.5}+15.153$	0.690 9	$Q=18.700t^{0.178}$	0.890 5
市售 AST-MCs	$Q=0.809t+28.373$	0.523 1	$\ln(100-Q)=0.020t+15.155$	0.637 0	$Q=6.927t^{0.5}+19.395$	0.818 1	$Q=26.505t^{0.225}$	0.914 3
PE2	$Q=0.881t+30.491$	0.528 7	$\ln(100-Q)=0.024t+12.87$	0.661 0	$Q=7.535t^{0.5}+20.739$	0.802 8	$Q=28.504t^{0.226}$	0.923 9
PE1	$Q=1.188t+34.548$	0.591 7	$\ln(100-Q)=0.06t+4.627$	0.852 2	$Q=9.935t^{0.5}+21.945$	0.848 5	$Q=32.182t^{0.251}$	0.938 1

由表 1 可知:PE1 在 SIF 中的释放曲线与 Korsmeyer-Peppas 拟合效果最好,且药物释放动力学指数范围为 0.126~0.251,表明 PE1 释放 AST 遵循菲克扩散规律。进一步说明复合纳米颗粒和油相中同时含有 AST 的 Pickering 乳液(PE1)在模拟肠液中可以持续释放药物。

表 2 模拟胃液中各溶液拟合结果
Tab. 2 Fitting results of solution in simulated gastric juice

溶液	模拟胃液							
	零级动力学		一级动力学		Higuchi		Korsmeyer-Peppas	
	方程	R^2	方程	R^2	方程	R^2	方程	R^2
AST 丙酮溶液	$Q=0.123t+10.932$	0.284 0	$\ln(100-Q)=0.001t+79.255$	0.290 9	$Q=1.147t^{0.5}+9.346$	0.555 2	$Q=10.455t^{0.12}$	0.820 5
市售 AST-MCs	$Q=0.511t+26.639$	0.454 3	$\ln(100-Q)=0.009t+31.164$	0.509 0	$Q=4.503t^{0.5}+19.665$	0.745 3	$Q=24.229t^{0.176}$	0.909 0
PE2	$Q=0.793t+28.625$	0.535 2	$\ln(100-Q)=0.019t+16.106$	0.642 6	$Q=6.76t^{0.5}+19.906$	0.805 1	$Q=26.808t^{0.219}$	0.916 2
PE1	$Q=0.585t+26.926$	0.465 2	$\ln(100-Q)=0.011t+26.385$	0.531 2	$Q=5.125t^{0.5}+20.156$	0.752 7	$Q=25.365t^{0.188}$	0.907 0

3.8 大鼠药代动力学研究

大鼠单次口服给药后血药质量浓度-时间曲线,如图 11 所示。图 11 中: ρ 为质量浓度。由图 11 可知:AST 玉米油和 PE1 血浆中 AST 质量浓度的达峰时间分别为 4,8 h,使用 Data Analysis System 软

件以非房室模型计算药动力学参数。

非房室模型药代动力学参数,如表 3 所示。表 3 中:^a 表示与 AST 玉米油相比,显著水平 $P<0.05$;^b 表示与市售 AST-MCs 相比,显著水平 $P<0.05$;^c 表示与 PE2 相比,显著水平 $P<0.05$ 。

由表 3 可知:PE1 血浆中的 AST 达峰质量浓度(ρ_{\max})最高,其平均质量浓度为 $(2.654\pm0.004)\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,分别是 AST 玉米油、市售 AST-MCs 和 PE2 的 5.74,2.43,1.49 倍;PE1 的 $\text{AUC}_{(0\sim t)}$ 分别是 AST 玉米油、市售 AST-MCs 和 PE2 的 5.50,1.70,1.56 倍;PE1 平均滞留时间(T_{MR})和半衰期($t_{1/2}$)是 AST 玉米油的 1.17,1.80 倍,表明 PE1 可在体内滞留更长的时间;血浆中生物活性物质的相对生物利用度可以根据($\text{AUC}_{(0\sim\infty)}$)反映,PE1 的相对生物利用度分别是市售 AST-MCs 和 PE2 的 1.703,1.481 倍。

表 3 非房室模型药代动力学参数

Tab. 3 Pharmacokinetic parameters of non compartmental model

药代动力学参数	AST 玉米油	市售 AST-MCs	PE2	PE1
$t_{1/2}/\text{h}$	16.871 ± 0.008	28.038 ± 0.039^a	36.402 ± 1.565^{ab}	30.417 ± 0.188^{ab}
T_{\max}/h	4 ± 0	8 ± 0	8 ± 0	8 ± 0
$\rho_{\max}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.462 ± 0.001	1.092 ± 0.006^a	1.779 ± 0.001^{ab}	2.654 ± 0.004^{abc}
$\text{AUC}_{(0\sim t)}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	8.265 ± 0.014	26.733 ± 0.165^a	29.140 ± 0.143^{ab}	45.486 ± 0.054^{abc}
$\text{AUC}_{(0\sim\infty)}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	9.514 ± 0.040	42.239 ± 0.327^a	48.601 ± 0.849^{ab}	71.944 ± 0.083^{abc}
T_{MR}/h	39.946 ± 0.023	46.047 ± 0.055^a	52.262 ± 1.873^{ab}	46.642 ± 0.108^a
$F/\%$	—	443.967	510.676	756.191

PE1 具有最高的血药质量浓度和相对生物利用度的原因可能有以下 3 点。

1) Zein-AST-GA NPs 稳定的乳液具有较小的尺寸和更大的表面积,加速了 AST 的溶出。

2) Pickering 乳液中的油相使 Pickering 乳液具有 I 型脂质制剂的部分特征^[14],口服 Pickering 乳液后,分散在乳液油相中的 AST 被充分消化,形成胶体物质,该物质与内源性增溶物质相互作用后,产生混合胶束,增强了 AST 的口服吸收^[15]。

3) 口服给药后,乳剂可以增加向肠道相关淋巴组织运输 AST,促进 AST 的肠道淋巴组织的吸收^[16]。以上结果表明复合纳米颗粒和油相中同时含有 AST 的 Pickering 乳液(PE1)可以提高 AST 在大鼠血浆中的质量浓度和相对生物利用度。

4 结论

由于 AST 在水中的溶解度较低,其化学结构容易在光、氧、热等条件下氧化分解,导致稳定性和生物利用度低,限制了其应用。目前有研究报道部分新型载体和技术可以改善 AST 的稳定性和生物利用度,Kim 等^[17]制备了包封 AST 的壳聚糖-三聚磷酸纳米颗粒,研究表明,包封在纳米颗粒中的 AST 可以延长其在胃肠道中的释放时间,增强其抗氧化活性。Bassijeh 等^[18]将包封 AST 的微胶囊与游离的 AST 进行比较,在 60℃下放置 12 d 后,微胶囊中游离 AST 的质量分数比 AST 的质量分数降低了 30%。然而,仍存在一定的局限性,例如,贮藏稳定性差和相对生物利用度依旧较低。

文中 Pickering 乳液可以提高 AST 的稳定性。与游离 AST 油溶液和商业 AST-MC 相比,复合纳米颗粒和油相中含有 AST 的 Pickering 乳液在大鼠中显示出最佳的体外生物可利用性和相对生物利用度。综上所述,在复合纳米颗粒和油相中含有 AST 的 Pickering 乳液具有成为负载 AST 的有效递送体系的潜力,为 AST 的开发和应用提供参考。

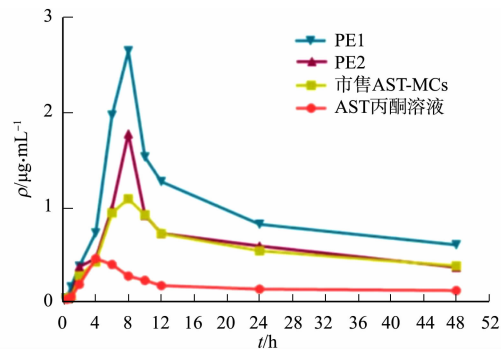


图 11 大鼠单次口服给药后血药质量浓度-时间曲线

Fig. 11 Blood mass concentration vs. time curves after single oral administration in rats

参考文献:

- [1] KHOO K S, LEE S Y, OOI C W, *et al.* Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 288: 121606. DOI: 10. 1016/j. biortech. 2019. 121606.
- [2] HONGM E, CHANG W S, PATEL A K, *et al.* Microalgal-based carbon sequestration by converting LNG-Fired waste CO₂ into red gold astaxanthin: The potential applicability[J]. *Energies*, 2019, 12(9): 1718. DOI: 10. 3390/en12091718.
- [3] AMBATI R R, PHANG S M, RAVI S, *et al.* Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications: A review[J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(1): 128-152. DOI: 10. 3390/md12010128.
- [4] SPERANZA L, PESCE M, PATRUNO A, *et al.* Astaxanthin treatment reduced oxidative induced pro-inflammatory cytokines secretion in U937: SHP-1 as a novel biological target[J]. *Marine Drugs*, 2012, 10(4): 890-899. DOI: 10. 3390/md10040890.
- [5] CHEN Yannan, SU Wentao, TIE Shanshan, *et al.* Advances of astaxanthin-based delivery systems for precision nutrition[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 127: 63-73. DOI: 10. 1016/j. tifs. 2022. 07. 007.
- [6] CHEN Yenting, KAO Chienjen, HUANG Hsinyi, *et al.* Astaxanthin reduces MMP expressions, suppresses cancer cell migrations, and triggers apoptotic caspases of *in vitro* and *in vivo* models in melanoma[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 31: 20-31. DOI: 10. 1016/j. jff. 2017. 01. 005.
- [7] ARAIZA-CALAHORRA A, AKHTAR M, SARKAR A. Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From encapsulation to bioaccessibility[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 71: 155-169. DOI: 10. 1016/j. tifs. 2017. 11. 009.
- [8] HARMAN C L G, PATEL M A, GULDIN S, *et al.* Recent developments in Pickering emulsions for biomedical applications[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2019, 39: 173-189. DOI: 10. 1016/j. cocis. 2019. 01. 017.
- [9] WEI Zihao, ZHU Pei, HUANG Qingrong. Investigation of ovotransferrin conformation and its complexation with sugar beet pectin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 87: 448-458. DOI: 10. 1016/j. foodhyd. 2018. 08. 036.
- [10] LIANG Hongshan, ZHOU Bin, HE Lei, *et al.* Fabrication of zein/quaternized chitosan nanoparticles for the encapsulation and protection of curcumin[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(18): 13891-13900. DOI: 10. 1039/c4ra14270e.
- [11] ALCANTARA A C S, ARANDA P, DARDER M, *et al.* Bionanocomposites based on alginate-zein/layered double hydroxide materials as drug delivery systems[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2010, 20(42): 9495-9504. DOI: 10. 1039/c0jm01211d.
- [12] ZAMANI S, MALCHIONE N, SELIG M J, *et al.* Formation of shelf stable Pickering high internal phase emulsions (HIPE) through the inclusion of whey protein microgels[J]. *Food & Function*, 2018, 9(2): 982-990. DOI: 10. 1039/c7fo01800b.
- [13] CHEN Kai, CHEN Miancai, FENG Yuhong, *et al.* Application and rheology of anisotropic particle stabilized emulsions: Effects of particle hydrophobicity and fractal structure[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2017, 524: 8-16. DOI: 10. 1016/j. colsurfa. 2017. 02. 088.
- [14] POUTON C W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 29(3/4): 278-287. DOI: 10. 1016/j. ejps. 2006. 04. 016.
- [15] 刘颖, 易涛, 宦娣, 等. 利用体外脂解模型评价 I 型脂质制剂[J]. *药学学报*, 2010, 45(10): 1307-1311. DOI: 10. 16438/j. 0513-4870. 2010. 10. 019.
- [16] 徐浩, 高艺璇, 王向涛. 槲皮素纳米混悬剂的制备、表征及抗乳腺癌研究[J]. *中草药*, 2019, 50(1): 42-51.
- [17] KIM E S, BAEK Y, YOO H J, *et al.* Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles prepared by ionic gelation improve the antioxidant activities of astaxanthin in the *in vitro* and *in vivo* model[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(3): 479. DOI: 10. 3390/antiox11030479.
- [18] BASSIJEH A, ANSARI S, HOSSEINI S M H. Astaxanthin encapsulation in multilayer emulsions stabilized by complex coacervates of whey protein isolate and Persian gum and its use as a natural colorant in a model beverage [J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109689. DOI: 10. 1016/j. foodres. 2020. 109689.