

# 壳聚糖/羧甲基纤维素钠负载苦瓜小分子多肽复合物的制备及其复合效果的表征

杨志凯, 杜先锋\*, 徐晓南, 王晓娜, 杜京京

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036)

**摘要:** 以壳聚糖盐酸盐 (CSC) 和羧甲基纤维素钠 (CMC) 为壁材, 采用离子凝胶法制备苦瓜小分子多肽复合物, 并对其制备工艺和特性进行研究。结果显示, 复合物的最佳制备工艺为 CSC 浓度  $5.35 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , CMC 浓度  $1.60 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 包埋时间 33.10 min, 此时包埋率可达到 69.98%。红外光谱和 X-射线衍射分析结果表明, 芯材和壁材产生了离子交联作用, 苦瓜小分子多肽被成功包埋在 CSC/CMC 复合壁材中。扫描电镜显示复合物表面疏松多孔, 呈不规则形状。所制得的复合物在胃肠液中具有较好缓释特性, 在室温下贮藏 30 d 后仍具有较强的 DPPH 自由基清除能力。

**关键词:** 苦瓜小分子多肽; 复合物; 表征; 体外释放; 体外抗氧化

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)06-0915-08

## The preparation and characterization of chitosan / sodium carboxymethyl cellulose loaded small peptide complex of *Momordica charantia* L.

YANG Zhikai, DU Xianfeng, XU Xiaonan, WANG Xiaona, DU Jingjing

(School of Tea and Food Science Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** Chitosan hydrochloric acid (CSC) and carboxymethyl cellulose sodium (CMC) were used as wall materials to prepare small polypeptide complexes from *Momordica charantia* by ionic gel method, and the preparation process and properties of small polypeptide complexes were studied. The results showed that the maximum encapsulation efficiency of 69.98% was achieved when the CSC concentration, CMC concentration and embedding time were  $5.35 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1.60 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  and 33.10 min, respectively. The results of IR and X-ray diffraction showed that the core and wall materials produced ion crosslinking, and the small peptides of *Momordica charantia* were successfully embedded in the CSC/CMC composite wall. Scanning electron microscopy showed that the surface of the microcapsules was loose, porous and irregular. The prepared microcapsules have good sustained-release properties in gastrointestinal fluid and exhibit stronger DPPH scavenging ability than non-encapsulated sample after storage for 30 days at room temperature.

**Key words:** *Momordica charantia* small molecule peptide; complexes; characterization; *in vitro* release; *in vitro* antioxidant

苦瓜多肽具有降血糖<sup>[1-4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>、降血脂<sup>[6]</sup>和抑菌<sup>[7]</sup>等多种生理活性。其降血糖活性的功能更为显著。Khanna 等<sup>[8]</sup>从苦瓜果实、种子中提取具有胰岛素作用的多肽。Kaur 等<sup>[9]</sup>的研究表明从苦瓜中提取的苦瓜多肽-K 口服具有较好的降糖效果。Lo 等<sup>[10]</sup>研究表明, 苦瓜种子水提取物 (MCSE) 能够调节肌肉和脂肪组织中的胰岛素信号传导途径及降

低高糖小鼠的血糖, 但多肽在环境中的稳定性较差, 容易受到酸、碱、光和热的影响, 并且在食用的过程中极易受到肠液、胃液的破坏<sup>[11]</sup>。因此, 如何提高多肽的稳定性, 是一个亟待需要解决的问题。经研究发现, 壳聚糖衍生物具有很好的生物相容性、降解性、吸附性以及安全无毒性<sup>[12]</sup>。作者以壳聚糖盐酸盐、羧甲基纤维素钠为壁材, 以小分子多肽为

收稿日期: 2019-03-13

作者简介: 杨志凯, 硕士研究生。E-mail: 1072653046@qq.com

\* 通信作者: 杜先锋, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: dxfa@ahau.edu.cn

芯材,采用离子凝胶法制备了苦瓜多肽复合物,并对复合物的微观结构、模拟胃肠液中的释放特性及其短期贮藏的抗氧化活性进行了研究,旨在提高苦瓜多肽的生物利用度,从而为苦瓜多肽在食品中的广泛应用提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

苦瓜小分子多肽(分子量<3 kDa),实验室自制;壳聚糖盐酸盐(CSC,食品级,脱乙酰度90%),万利达生物科技有限公司;羧甲基纤维素钠(CMC,食品级),上海申光食用化学品有限公司;牛血清白蛋白,南京杜莱生物技术有限公司;福林酚试剂,北京索莱宝科技有限公司;DPPH,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;其他药品均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

HH-4 恒温水浴锅,金坛市杰瑞尔电器有限公司;HJ-6A 数显恒温磁力搅拌器,常州朗博仪器制造有限公司;JW-3021H 台式高速离心机,安徽嘉文仪器装备有限公司;UV-2102C 型紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;Scientz-10N 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技有限公司;Nicolette is50 傅里叶红外光谱仪,美国赛默尔飞世尔公司;TTR-III X 射线衍射仪,日本理学公司;S4800 扫描电子显微镜,日本 Hitachi 公司。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 CSC/CMC 小分子多肽复合物的制备** 根据 Ge 等<sup>[13]</sup>的方法,采用离子凝胶法制备 CSC/CMC 小分子多肽复合物。精确称取 8 mg 小分子多肽,溶于 20 mL 超纯水,用移液器逐滴加入 10 mL 不同浓度的 CSC 溶液,搅拌;然后再加入 10 mL 不同浓度的 CMC 溶液,充分搅拌,冷冻干燥可得 CSC/CMC 多肽复合物。

**1.3.2 包埋效果的评价** 取一定量的 CSC/CMC 多肽复合物置于超滤离心管中,5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min,收集超滤液,采用 Lowry 法<sup>[14]</sup>测定滤液中的多肽含量。

$$\text{包埋率}(\%) = (M - m) / M \times 100$$

式中, $M$ :加入的多肽总量; $m$ :滤液中的多肽含量。

**1.3.3 CSC/CMC 小分子多肽复合物制备工艺的优化** (1) 单因素试验。以 CSC 浓度(2、3、4、5 和 6 mg·mL<sup>-1</sup>)、CMC 浓度(0.5、1、1.5、2 和 2.5 mg·mL<sup>-1</sup>)和包埋时间(10、20、30、40 和 50 min)为条件,包埋率为指标,固定其中两个因素,确定

第 3 个因素的最优条件,以此类推,确定单因素试验结果。

(2) 响应面设计。根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理,基于单因素试验结果,选择对包埋效率影响显著的 CSC 浓度(A)、CMC 浓度(B)、包埋时间(C)为自变量,以包埋率(Y/%)为响应值,设计了三因素三水平响应面分析试验,采用 Design-Expert V8.0.6.1 软件对实验数据进行二次响应面回归分析,试验方案设计与因素水平编码如表 1。

表 1 试验因素水平及编码

Table 1 Level and coding of experimental factors			
水平 Level	-1	0	1
壳聚糖盐酸盐/mg·mL <sup>-1</sup> Chitosan hydrochloride	4	5	6
羧甲基纤维素钠/mg·mL <sup>-1</sup> Carboxymethyl cellulose sodium	1	1.5	2
包埋时间/min Embedding time	25	30	35

通过响应面结果分析,得出最佳工艺条件,并进行重复试验验证。

**1.3.4 红外光谱表征 CSC/CMC 小分子多肽的复合效果** 以 KBr 压片法对小分子多肽、CMC、CSC 以及小 CSC/CMC 小分子多肽复合物测定在波长 400~4 000 cm<sup>-1</sup>下的吸收光谱,分辨率 4 cm<sup>-1</sup>,波数精度 0.01 cm<sup>-1</sup>,扫描次数 16 次。

**1.3.5 X-射线衍射研究复合前后的结构变化** 利用 X-射线衍射装置观察小分子多肽、CMC、CSC 以及复合处理后结构的变化。将样品研磨成粉末状,均匀铺置于样品板上,用玻璃板将其压紧。衍射条件选择 X-衍射管为铜对阴极,Ni 过滤器,电压为 40 kV,电流为 200 mA,扫描速率为 8°·min<sup>-1</sup>,测量范围为 2θ = 5°~55°。

**1.3.6 CSC/CMC 小分子多肽复合物形态的观察** 将制得的 CSC/CMC 小分子多肽复合物和 CSC/CMC 空载样品冷冻干燥,用棉签取少许样品于带有导电胶的载物台上,并在真空条件下喷金,最后用扫描电镜进行观察。

**1.3.7 CSC/CMC 小分子多肽复合物在模拟胃肠道环境下的体外释放特性** 根据 Wang 等<sup>[15]</sup>的方法稍作修改,考察 CSC/CMC 小分子多肽复合物在模拟胃肠道环境下的体外释放特性。模拟胃液的配方:称取 2 g NaCl 溶解,然后再加入 6 mL HCl,稀释体积为 1 L,用 0.1 mol·L<sup>-1</sup>的盐酸溶液调节 pH 至 1.2;模拟肠液的配方:称取 6.8 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶解,再加入

77 mL 浓度为  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NaOH, 稀释体积为 1 L, 用氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.8。将小分子多肽和 CSC/CMC 小分子多肽复合物分别放入到分子量为 3.5 kDa 透析袋中, 然后将透析袋完全浸没在预先准备好的 50 mL 模拟胃液和肠液中,  $100 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $37^\circ\text{C}$  振荡; 在设定好的时间 (0.5、1、2、4、6、8、10 和 12 h) 取样 2 mL, 测定样液中的多肽含量, 同时补充相同体积的胃液和肠液。通过计算样液中多肽含量与加入的总多肽含量的比值, 来确定释放率。

**1.3.8 CSC/CMC 小分子多肽复合物体外抗氧化试验** 参照 Spinola 等<sup>[16]</sup>方法略有修改。称取 4 mg DPPH, 用无水乙醇定容至 100 mL 棕色容量瓶。取 1 mL 浓度为  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的样品溶液, 加入 3 mL DPPH 溶液, 充分混匀, 避光处理 30 min, 于 516 nm 处测定吸光值。测定室温下 30 d 短期储藏中小分子多肽, CSC/CMC 小分子多肽复合物以及 CSC/CMC 空载对 DPPH 自由基的清除率。

## 2 结果与分析

### 2.1 包埋单因素试验

CSC 浓度对小分子多肽的包埋率的影响结果 (图 1) 表明, 随着壁材浓度的增大, 包埋率也随着增高, 但当浓度至  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 随着壁材浓度的增加, 包埋率略有降低。推测可能因为随着 CSC 浓度的增加, CSC 的分子链之间会通过一种物理作用相互缠绕, 进而减小了 CSC 形成的空间网络状结构<sup>[17]</sup>。这与 Hu 等<sup>[18]</sup>在研究使用 CS-TPP 包埋儿茶素试验中的包埋率与壳聚糖浓度的关系相类似。综合考虑, 壳聚糖盐酸盐浓度在  $4\sim 6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  之间为最佳浓度。

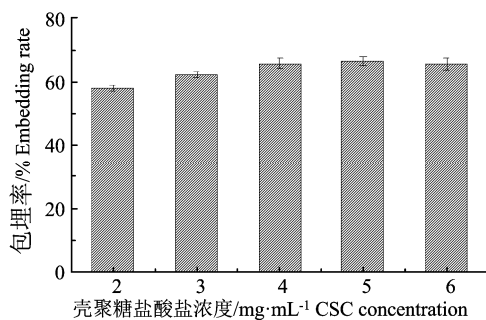


图 1 壳聚糖盐酸盐浓度对小分子多肽包埋率的影响

Figure 1 Effect of water-soluble chitosan concentration on the embedding rate of small molecular peptides

CMC 浓度对小分子多肽的包埋率的影响结果 (图 2) 显示, 随着 CMC 浓度的增加, 包埋率呈现出先增大后减小的趋势。当壁材浓度为  $1.5$

$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 包埋率达到最大, 为 65.89%; 再增大 CMC 浓度, 包埋率反而降低。可能是因为带正电荷的 CSC 和带负电荷的 CMC 通过通过离子凝胶作用对小分子多肽进行包埋, 增大壁材浓度, 不仅减小了复合壁材的空间体系结构, 还使得体系黏度增大与小分子多肽结合容易产生絮状沉淀<sup>[17]</sup>, 从而降低了复合物中芯材的含量。

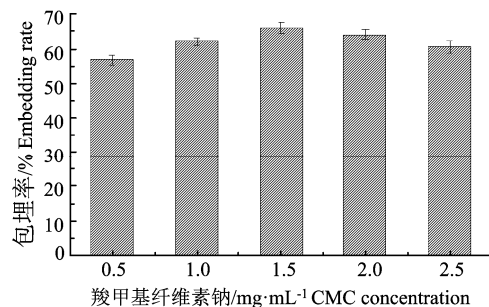


图 2 CMC 浓度对小分子多肽包埋率的影响

Figure 2 Effect of CMC concentration on the embedding rate of small molecular peptides

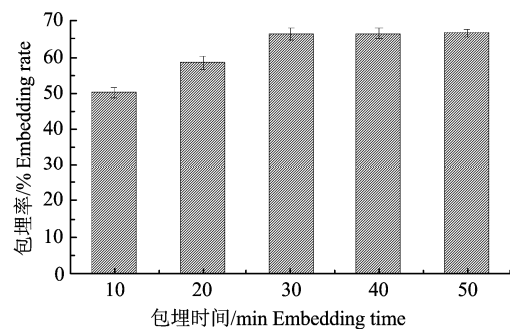


图 3 包埋时间对小分子多肽包埋率的影响

Figure 3 Effect of embedding time on the embedding rate of small molecular peptides

包埋时间对小分子多肽的包埋率的影响结果 (图 3) 显示, 在  $10\sim 30 \text{ min}$  之内随着时间的增加包埋率也随之增加; 在 30 min 后, 增加时间包埋率几乎不再增加。综合考虑, 包埋时间选择 30 min。

### 2.2 响应面设计及优化结果

在单因素的基础上, 根据 BBD 试验设计原理, 对小分子多肽的包埋进行了优化。影响小分子多肽包埋率的主要因素有 CSC 浓度、CMC 浓度和包埋时间, 以包埋率为响应值进行了三因素三水平的响应面法优化了包埋工艺参数。试验设计与结果如表 2 所示。

如表 3 所示, 一次项 A (CSC 浓度)、B (CMC 浓度) 和 C (包埋时间) 的  $P$  值均小于 0.05, 表明 A、B 和 C 对包埋率均有显著影响, 交互项 AB 的  $P$  值小于 0.05, 而交互作用的 AC, BC 的  $P$  值大于

0.05, 表明 A 和 B 对于小分子多肽的包埋率达到极显著水平, 而 A 和 C 以及 B 和 C 的相互作用对于小分子多肽的包埋率没有显著影响。二次项  $A^2$ 、 $B^2$  和  $C^2$  的  $P$  值均小于 0.01, 表明二次项对于小分子多肽的包埋率达到极显著水平。

表 2 响应面优化试验设计及结果

Table 2 Response surface optimization of experimental design and the results

试验号 Number	A	B	C	产量 Yield/%
1	1	0	1	65.24
2	-1	1	0	50.37
3	0	0	0	66.89
4	-1	0	1	61.28
5	0	-1	-1	49.48
6	1	1	0	62.92
7	-1	-1	0	53.19
8	0	0	0	68.72
9	0	1	1	64.87
10	1	0	-1	54.78
11	0	0	0	65.78
12	1	-1	0	56.79
13	0	-1	1	59.25
14	0	0	0	68.15
15	-1	0	-1	49.42
16	0	1	-1	50.19
17	0	0	0	66.04

注: A. CSC 浓度; B. CMC 浓度; C. 包埋时间

Note: A. CSC concentration; B. CMC concentration; C. embedding time

对表 2 的试验数据进行了多元回归拟合, 得到 CSC 浓度 (A)、CMC 浓度 (B)、包埋时间 (C) 和包埋率 (Y%) 的二元多项回归模型方程为:

$$Y = 67.12 + 2.56A + 1.83B + 5.85C + 0.99AB - 0.35AC + 1.23BC - 4.16A^2 - 5.89B^2 - 5.28C^2$$

由表 3 可知, 回归模型 ( $P < 0.0001$ ), 表明该模型显著性高。回归方程的决定系数  $R^2 = 0.9365$ , 说明该方程对试验结果的拟合度较好, 各因素与响应值的回归关系显著。因此该模型可以用来预测响应值最优时对应的包埋工艺条件。失拟项  $P = 0.3398 > 0.05$ , 故模型失拟不显著。所以可利用该模型来分析响应面的变化。

利用单因素试验结果建立了响应面优化模型, 并进行了响应面优化试验。对响应面优化结果进行验证实验, 结果表明小分子多肽的包埋率最高可达 69.98%, 与之对应的包埋条件为: CSC 浓度为  $5.35 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , CMC 浓度为  $1.60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 包埋时间为

33.10 min。

从图 4 可以看出各因素相互作用对小分子多肽包埋率的影响。影响因子 CSC 浓度、CMC 浓度和包埋时间对包埋率的都具有较明显的影响, CSC 的浓度从  $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  增加到  $6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , CMC 浓度从  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  增加到  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 小分子多肽的包埋率先升后降, 在 CSC 浓度为  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 CMC 浓度为  $1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  左右时达到最大值, 而后开始下降, 推测可能因为 CMC 浓度增大, 体系黏度增大, 减小了复合壁材的空间体系结构<sup>[17]</sup>。固定 CMC 浓度, 随着 CSC 浓度和包埋时间的增加, CSC 浓度和包埋时间对小分子多肽包埋率的影响呈现出先增加后趋于不变的趋势; 固定 CSC 浓度, 随着 CMC 浓度和包埋时间的增加, CMC 浓度和包埋时间对小分子多肽包埋率的影响呈现出先增加后降低的趋势。通过响应面分析, CMC 浓度对于包埋率的影响更显著。

### 2.3 红外光谱表征 CSC/CMC 小分子多肽复合效果

由图 5 红外光谱结果可知, 苦瓜小分子多肽(图 5d) 在  $3405.08 \text{ cm}^{-1}$  处存在 O-H 的伸缩振动峰;  $1654.86 \text{ cm}^{-1}$  处属于酰胺 I 带, 由 C=O 的伸缩振动 ( $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ ) 引起的, 是  $\beta$ -折叠的标志。通过比较苦瓜小分子多肽和 CSC/CMC 小分子多肽复合物(图 5c)的红外光谱可知, 复合物在酰胺 A 带向高方向移动, 酰胺 I 带向低方向移动吸收峰的宽度发生了变化。推测可能是通过形成复合物, 小分子多肽和壁材之间会发生非共价键作用, 会使得相应的基团吸收强度变小, 从而峰型发生了改变。另外, 小分子多肽在  $1559.57 \text{ cm}^{-1}$  的吸收峰对应的是酰胺 II 带 C—N 伸缩振动和 N—H 弯曲振动<sup>[19]</sup>, 在  $1453.08 \text{ cm}^{-1}$  处为亚甲基变形的特征吸收峰<sup>[20]</sup>, 但经过包埋处理后上述特征吸收峰消失, 这表明小分子多肽的特征峰被壁材所形成的复合物所掩盖。CMC(图 5b)的红外光谱中,  $1617.09 \text{ cm}^{-1}$  和  $1420.13 \text{ cm}^{-1}$  处是 CMC 的特征吸收峰, 分别是 COO-的非对称振动吸收和 COO-的对称振动吸收。经包埋处理后, CMC 的特征峰消失, 原有的结构骨架改变。另外小分子多肽通过 CSC(图 5a)和 CMC 包埋后, 复合物在  $1327.19 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1153.13 \text{ cm}^{-1}$  和  $1026.65 \text{ cm}^{-1}$  处存在吸收峰与壁材的特征吸收峰相似, 这可能是由于 CSC 与 CMC 之间发生了非共价键作用和正负电荷相互吸引的结果, 因此推测小分子多肽与壁材发生了离子交联相互作用并成功包埋在壁材内。这与杨馥溪<sup>[21]</sup>使用红外光谱法研究海藻酸钠/氯化钙负载花青素复合物性质的结果相类似。

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

方差来源 Source of variation	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	800.465 7	9	88.940 63	43.924 41	< 0.000 1	**
A-CSC	81.090 11	1	81.090 11	40.047 34	0.000 4	**
B-CMC	11.616 2	1	11.616 2	5.736 802	0.047 8	*
C-T	273.429 1	1	273.429 1	135.036 3	< 0.000 1	**
AB	20.025 63	1	20.025 63	9.889 899	0.016 3	*
AC	0.49	1	0.490 00	0.241 992	0.637 8	
BC	6.027 025	1	6.027 025	2.976 52	0.128 1	
A <sup>2</sup>	96.324 59	1	96.324 59	47.571 07	0.000 2	**
B <sup>2</sup>	178.744 2	1	178.744 2	88.274 98	< 0.000 1	**
C <sup>2</sup>	91.159 62	1	91.159 62	45.020 29	0.000 3	**
残差 Residual	14.174	7	2.024 856			
失拟项 Lack of fit	7.538 275	3	2.512 758	1.514 686	0.339 8	
纯误差 Pure error	6.635 72	4	1.658 93	43.924 41		
总离差 Total variation	814.639 7	16				

注: “\*” ,  $P < 0.05$  差异显著; “\*\*”,  $P < 0.01$  差异极其显著

Note: “\*” and “\*\*” represent significant difference at the 0.05 and 0.01 levels, respectively

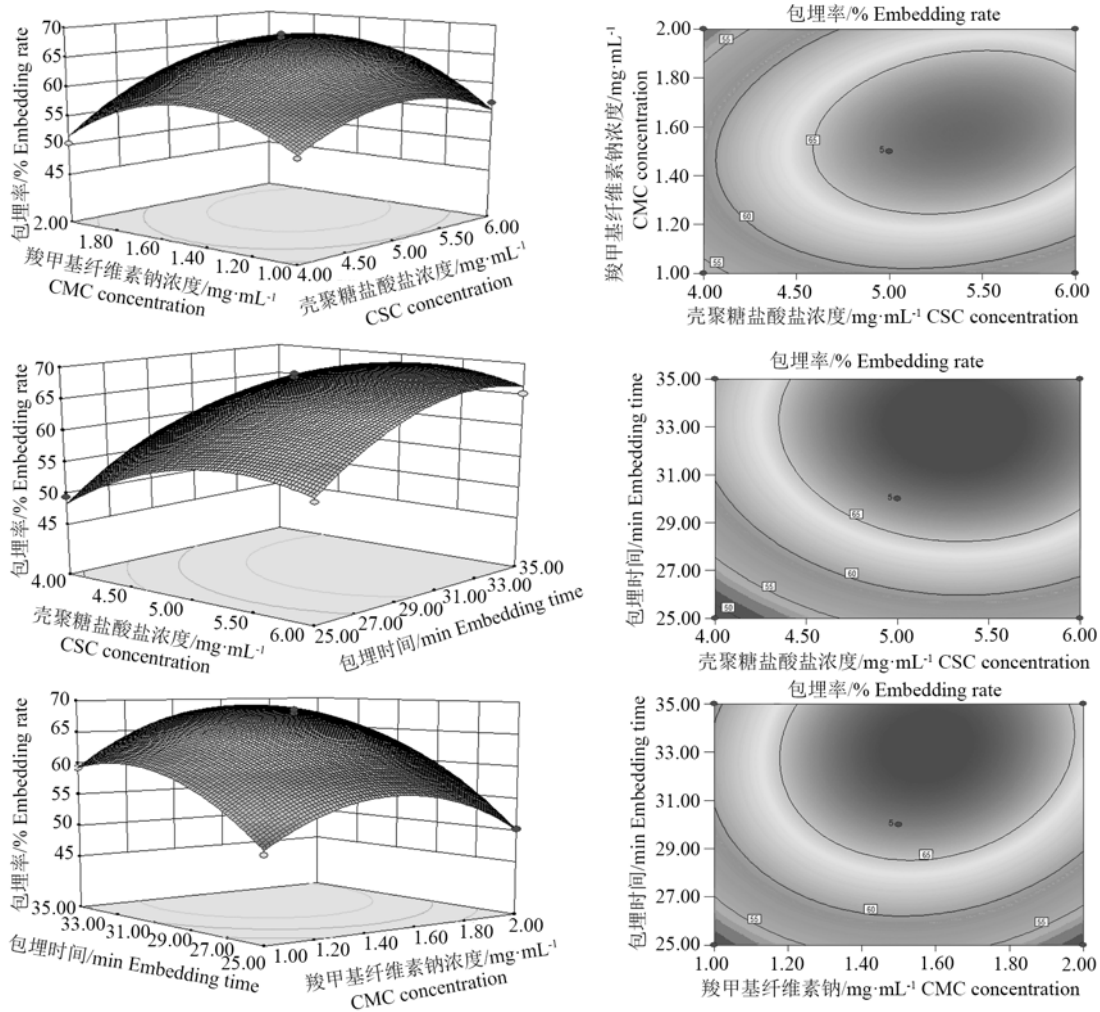
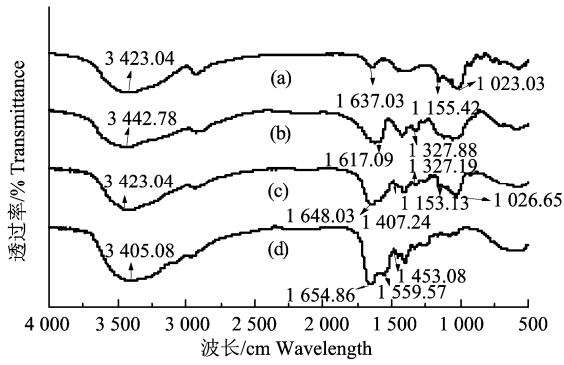


图 4 3 种因素互动对小分子多肽包埋率的影响

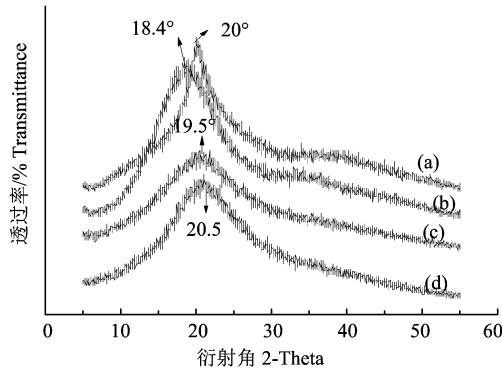
Figure 4 Effect of interaction of three factors on the embedding rate of small molecular peptide



(a) CSC; (b) CMC; (c) CSC/CMC 小分子多肽复合物; (d) 小分子多肽

图 5 CSC/CMC 小分子多肽复合物及其单体成分的傅里叶红外光谱图

Figure 5 Fourier transform infrared spectroscopy of CSC/CMC small molecular polypeptide complexes and their monomers



(a) CMC; (b) CSC; (c) CSC/CMC 小分子多肽复合物; (d) 小分子多肽

图 6 CMC, CSC, CSC/CMC 小分子多肽复合物和小分子多肽的 X-射线衍射图

Figure 6 X-ray diffraction patterns of CMC, CSC, CSC/CMC small molecular polypeptide complexes and small molecular peptides

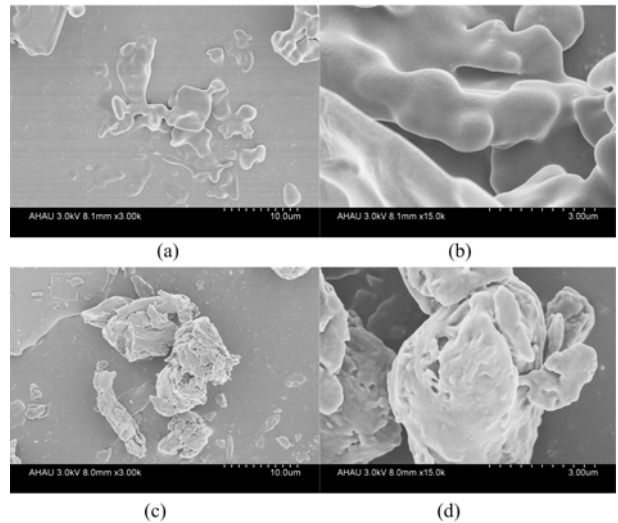
2.4 X-射线衍射研究复合前后的结构变化

由图 6 可知, CMC 和 CSC 分别呈现出一个以  $2\theta$  为  $20^\circ$ <sup>[22]</sup>和  $18.4^\circ$ 为中心的无定型隆起, 表明 CMC 和 CSC 不具有结晶结构。小分子多肽在  $2\theta$  为  $19^\circ\sim 22^\circ$ 之间存在多个弥散峰, 这表明酶法制备的小分子多肽不存在结晶结构。这可能是因为酶的作用下, 蛋白质的结晶结构遭到了破坏。复合物的 XRD 图谱表明, 在  $2\theta$  为  $18.5^\circ\sim 20.6^\circ$ 之间存在数个弥散峰, 没有衍射峰存在, 与多肽相比, 复合物的吸收峰发生明显的偏移, 峰的吸收强度大大降低, 另外 CMC 在  $2\theta$  为  $20^\circ$ 附近的特征弥散峰消失, 表明推测小分子多肽通过离子交联作用与壁材之间发生了相互作用, 使得峰值位置发生了转移。

2.5 CSC/CMC 小分子多肽的复合物形貌的观察

从图 7 中可以看出, CSC/CMC 空载呈现出表

面光滑, 形似一种膜状结构。推测可能是因为带正电荷的 CSC 与带负电荷的 CMC 通过电荷的相互作用形成的。这与贺博<sup>[17]</sup>研究蓝莓花色苷纳米微胶囊扫描电镜的分析结果相类似。但当通过离子凝胶法制备 CSC/CMC 小分子多肽复合物之后, 复合物的表面较 CSC/CMC 复合壁材空载发生了明显改变, 表面变得十分粗糙, 并形成了大小不一的孔, 推测可能因为壁材 CSC 和 CMC 通过正负电荷以及一些非共价键作用吸附了大量小分子多肽, 使得小分子多肽进入复合壁材的腔内, 进而产生了一种新的物相。这表明 CSC/CMC 负载的苦瓜小分子多肽复合物形成。



(a) CSC/CMC 空载 SEM 图( $\times 3.0$  K); (b) CSC/CMC 空载 SEM 图( $\times 15.0$  K); (c) CSC/CMC 小分子多肽复合物 SEM 图( $\times 3.0$  K); (d) CSC/CMC 小分子多肽复合物 SEM 图( $\times 15.0$  K)

图 7 CSC/CMC 空载和 CSC/CMC 小分子多肽复合物扫描电镜图

Figure 7 Scanning electron microscopy of CSC/CMC no-load and CSC/CMC small molecular polypeptide complexes

2.6 CSC/CMC 小分子多肽复合物在模拟胃肠道环境下的体外释放特性

CSC/CMC 小分子多肽复合物在模拟胃肠道的释放情况如图 8 所示。小分子多肽在酸性条件下稳定性差, 很容易受到胃液的破坏从而变性失去生物活性。由图 8A 可知, CSC/CMC 小分子多肽复合物在模拟胃液中的释放情况。在 2 h 时小分子多肽的累积释放率仅为 36.38%, 大部分的多肽并没有释放出来, 这是因为 CSC 和 CMC 之间通过正负电荷相互吸引将多肽包裹在壁材中, 产生了缓控释作用, 从而延缓了多肽在胃液中的释放, 因此避免了胃液的破坏, 使小分子多肽的活性得到了保护。摄入的食物一般在胃内的停留时间为 2 h 左右, 随后转移

至小肠。图 8B 为 CSC/CMC 小分子多肽复合物在模拟肠道环境中小分子多肽的释放情况。由图 8 还可知, 在第 4 和第 10 小时, CSC/CMC 小分子多肽复合物的累积释放率分别为 54.14% 和 82.16%, 而在 10 h 后复合物累积释放率趋于平缓, 这说明

CSC/CMC 小分子多肽复合物具有更好的持续释放能力。推测可能是因为壁材通过正负电荷的相互作用形成了一种电解质屏障<sup>[23-24]</sup>, 包裹了苦瓜小分子多肽, 从而产生了缓控释作用。

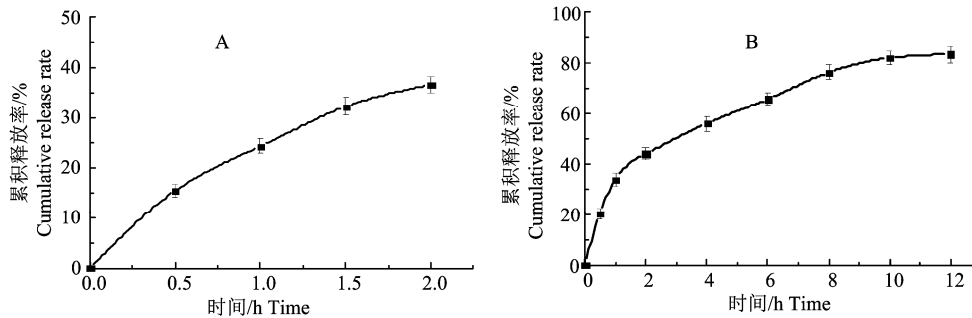


图 8 CSC/CMC 小分子多肽复合物的体外释放特性 (A: 模拟胃液, pH1.2; B: 模拟肠液, pH6.8)

Figure 8 Release characteristics of CSC/CMC small-molecule polypeptide complexes *in vitro* (A: mimic gastric juice, pH1.2; B: mimic intestinal fluid, pH6.8)

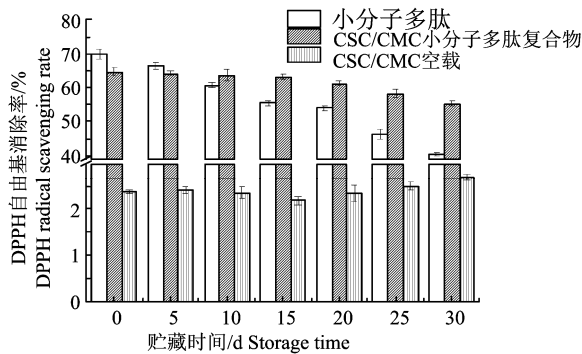


图 9 室温贮藏小分子多肽、CSC/CMC 多肽复合物和 CSC/CMC 空载对 DPPH 自由基的清除率的变化

Figure 9 Changes in scavenging rates of DPPH free radicals by storage of small polypeptides, CSC/CMC polypeptide complexes and CSC/CMC at room temperature

## 2.7 CSC/CMC 小分子多肽复合物的体外抗氧化研究

由图 9 可知, 在室温下贮藏 30 d, 小分子多肽对 DPPH 自由基的清除能力呈现出明显下降的趋势, 从 69.86% 下降至 40.35%。而多肽复合物对 DPPH 自由基的清除能力减小缓慢。在室温下开始贮藏时, 小分子多肽原样, CSC/CMC 多肽复合物对 DPPH 自由基的清除率分别为 69.86% 和 64.49%, 而 CSC/CMC 空载对 DPPH 自由基的清除率极低, 仅为 2.38%。在第 30 天, 多肽原样、CSC/CMC 多肽复合物对 DPPH 自由基的清除率分别为 40.35% 和 57.34%。这可能是因为带正电荷的 CSC 通过物理吸附和正负电荷的相互作用将芯材吸附在壁材中并与带负电荷的 CMC 发生离子相互作用形成了一种凝

胶网状结构<sup>[25]</sup>, 将小分子多肽包裹其中, 进而提高了小分子多肽的稳定性。

## 3 结论

以壳聚糖盐酸盐 (CSC) 和羧甲基纤维素钠 (CMC) 为壁材, 小分子多肽为芯材制备小分子多肽复合物, 并通过响应面法进行优化, 根据响应面优化结果进行验证实验。结果表明, 小分子多肽的包埋率最高可达 69.98%, 对应的包埋条件为: CSC 浓度  $5.35 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , CMC 浓度  $1.60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 包埋时间 33.10 min。

通过扫描电镜、红外光谱、X-射线衍射对 CSC/CMC 小分子多肽复合物的复合效果进行了表征。结果显示, 通过离子交联作用使得小分子多肽成功包埋在壁材内形成了一种新的物相。体外释放试验结果表明, 以 CSC/CMC 为载体制备的小分子多肽复合物在模拟胃肠液中具有很好的缓释、控释的能力。贮藏期的试验结果表明, 在贮藏过程中, CSC/CMC 小分子多肽复合物的抗氧化性能能够得到更好的保护。

## 参考文献:

- [1] 张文姬. 苦瓜降糖多肽的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2011.
- [2] 盛清凯. 苦瓜降糖多肽-P 的分离纯化及降糖机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [3] 袁晓晴. 癩葡萄降血糖肽的制备及其降糖机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2007.
- [4] 刘红雨, 付中平, 周吉燕, 等. 苦瓜降糖多肽研究进展

- [J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(7): 89-91.
- [5] KIM K, LEE S, KANG I, et al. *Momordica charantia* ethanol extract attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death by its antioxidant and anti-apoptotic properties in human neuroblastoma SK-N-MC cells[J]. *Nutrients*, 2018, 10(10): 1368.
- [6] HE Q F, LI Y J, LI H, et al. Hypolipidemic and antioxidant potential of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf in mice fed on a high-fat diet[J]. *Pakistan J Pharm Sci*, 2018, 31(5): 1837-1843.
- [7] JABEEN U, KHANUM A. Isolation and characterization of potential food preservative peptide from *Momordica charantia* L.[J]. *Arab J Chem*, 2017, 10: S3982-S3989.
- [8] KHANNA P, JAIN S C, PANAGARIYA A, et al. Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source[J]. *J Nat Prod*, 1981, 44(6): 648-655.
- [9] KAUR P, GARG V, GULATI M, et al. Oral delivery of antidiabetic polypeptide-k: journey so far and the road ahead[J]. *Curr Drug Deliv*, 2016, 13(2): 236-244.
- [10] LO H, HO T, LIN C, et al. *Momordica charantia* and its novel polypeptide regulate glucose homeostasis in mice via binding to insulin receptor[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(10): 2461-2468.
- [11] 王芳, 田建文. 复合物技术在食品抗氧化剂中的应用研究进展[J]. *食品与机械*, 2010, 26(4): 149-152.
- [12] HE B, GE J, YUE P X, et al. Loading of anthocyanins on chitosan nanoparticles influences anthocyanin degradation in gastrointestinal fluids and stability in a beverage[J]. *Food Chem*, 2017, 221: 1671-1677.
- [13] GE J, YUE P X, CHI J P, et al. Formation and stability of anthocyanins-loaded nanocomplexes prepared with chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan[J]. *Food Hydrocoll*, 2018, 74: 23-31.
- [14] 林鸿佳. 具有  $\alpha$ -糖苷酶抑制作用的啤酒糟多肽的分离及其作用机理研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
- [15] WANG W J, JUNG J, ZHAO Y Y. Chitosan-cellulose nanocrystal microencapsulation to improve encapsulation efficiency and stability of entrapped fruit anthocyanins[J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 157: 1246 - 1253.
- [16] SPÍNOLA V, PINTO J, CASTILHO P C. Hypoglycemic, anti-glycation and antioxidant *in vitro* properties of two *Vaccinium* species from Macaronesia: A relation to their phenolic composition[J]. *J Funct Foods*, 2018, 40: 595-605.
- [17] 贺博. 蓝莓花色苷纳米复合物制备及其性能研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2016.
- [18] HU B, PAN C L, SUN Y, et al. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(16): 7451-7458.
- [19] 王迎军, 杨春蓉, 汪凌云. EDC/NHS 交联对胶原物理化学性能的影响[J]. *华南理工大学学报(自然科学版)*, 2007, 35(12): 66-70, 96.
- [20] 陈和生, 邵景昌. 聚丙烯酰胺的红外光谱分析[J]. *分析仪器*, 2011(3): 50-54.
- [21] 杨馥溪. 深度共熔溶剂提取花青素及其抗氧化性能评估和复合物制备的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
- [22] SINGH V, JOSHI S, MALVIYA T. Carboxymethyl cellulose-rosin gum hybrid nanoparticles: An efficient drug carrier[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 112: 390-398.
- [23] LETCHFORD K, BURT H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 65(3): 259-269.
- [24] QU D, LIN H J, ZHANG N, et al. *In vitro* evaluation on novel modified chitosan for targeted antitumor drug delivery[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(1): 545-554.
- [25] FENG C, WANG Z G, JIANG C Q, et al. Chitosan/o-carboxymethyl chitosan nanoparticles for efficient and safe oral anticancer drug delivery: *In vitro* and *in vivo* evaluation[J]. *Int J Pharm*, 2013, 457(1): 158-167.