

http://pmse.scu.edu.cn

柠檬酸交联固定化小球藻复合材料的制备及药物缓释性能

李豪¹, 白波¹, 裴柯¹, 罗钰¹, 梁琳琳¹, 王贺铭¹, 彭可慧¹, 曹芳利²

(1. 长安大学旱区地下水文与生态效应教育部重点实验室, 陕西 西安 710054; 2. 陕西建工安装集团有限公司, 陕西 西安 710054)

摘要:天然小球藻具有独特的理化/生物特性,通过柠檬酸对小球藻进行热化学改性,制备了一种新型复合材料,并将其用作酮洛芬的药物缓释载体。通过红外光谱和扫描电镜分别对合成的柠檬酸交联固定化小球藻复合材料的结构和表面形貌进行表征,提出了材料的合成机理。研究了不同反应温度下合成的复合材料的羧基含量、酯化率、等电点等表面属性,确定140℃为最佳的反应温度。此条件下制备的复合材料具有最大的吸水倍率(为35.8 g/g),并对溶胀介质的pH敏感。以酮洛芬为模板药物,研究了柠檬酸交联固定化小球藻复合材料的药物负载性能及在模拟体内环境下的缓释性能,结果表明,pH=1.2和pH=6.8时,经8 h的酮洛芬的累积释放率分别为93.8%和79.7%,该聚合物对抗炎类药物有缓释作用,在智能药物输送方面具有潜在的应用前景。

关键词:固定化技术;水凝胶;溶胀;药物负载;缓释

中图分类号:

文献标识码: A

文章编号: 1000-7555(2022)12-000

近年来,药物输送载体的研究开发受到广泛关注。大量天然和合成聚合物,如明胶、壳聚糖和聚乙烯凝胶,被制备成各种形式作为药物输送的载体,以适应不同需求^[1]。而生物材料具有优异的生物相容性、生态友好性和生物降解性等优点,用于药物载体有巨大的应用潜力^[2]。使用生物材料构建的复合材料具有独特的物理/化学性质,为设计和开发新的药物载体开辟了新的窗口。

小球藻是一类单细胞绿藻,分布广泛且种类很多,生长繁殖快,应用广泛^[3]。小球藻细胞壁主要由纤维素、蛋白质和脂质组成,这些生物大分子为小球藻表面带来了丰富的官能团,包括羧基(-COOH)、羟基(-OH)、氨基(-NH₂)和酰胺基(-CONH₂)等^[4,5],这些官能团不仅提供了必要的亲水性,还可以作为反应位点被进一步修饰,以调整其化学性质,这些优点使小球藻成为了理想的基体材料。但小球藻的细胞很小,难以与水分离,容易引起二次污染,限制了小球藻的直接应用。因此,需要选择合适的方法对小球藻细胞进行固定化及

改性。

柠檬酸是一种天然有机酸,普遍存在于各种水果中。柠檬酸作为天然防腐剂、酸度调节剂和抗氧化剂被广泛用于食品工业和制药业^[6,7]。柠檬酸的生产是通过发酵进行的,全球柠檬酸的年产量约73.6万吨^[6]。柠檬酸是三元羧酸,化学结构中有3个羧基和1个羟基,柠檬酸的3个羧基可以与生物材料的自由羟基反应形成酯键。鉴于这些特点,化学修饰被作为柠檬酸的一种新用途,以赋予天然生物材料新的化学和物理功能,因此,柠檬酸也作为交联剂应用在天然高分子材料上^[8]。例如,Xing等以柠檬酸为交联剂,在高温下对复合纳米纤维中的壳聚糖分子进行交联,提高了纳米纤维的耐溶剂性,并且可以通过调节热处理温度来控制复合纳米纤维的药物释放性能^[9]。

本文以天然生物材料小球藻为基体、柠檬酸为交联剂,制备了低毒性且完全可生物降解的柠檬酸固定化小球藻复合材料(Chlorella@CA)。系统地研究了柠檬酸固定化小球藻复合材料的表面属性,如

doi:10.16865/j.cnki.1000-7555.2022.0280

收稿日期:2022-05-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(211029220461);陕西省自然科学基金基础研究计划(2021SF-497,2022TD-04);

中央高校基本科研业务费专项资金(300102290103,300102291403,300102292903);陕西省水利厅项目(2015slkj-02)

通讯联系人:罗钰,主要从事生物物质资源化再利用研究,E-mail:13289367808@163.com

羧基含量、酯化率和零电荷点,以进一步验证材料的合成过程。考察了热反应温度和外部溶液 pH 对复合材料吸水性能的影响,探究了复合材料对酮洛芬的负载和缓释性能。

1 实验部分

1.1 试剂与原料

小球藻粉:食品级,西安圣青生物科技有限公司;柠檬酸、氢氧化钠:分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;酮洛芬:≥98%,北京百灵威科技有限公司;无水乙醇、丙酮:分析纯,上海阿拉丁生化科技有限公司;溴化钾:光谱纯,上海吉至生化科技有限公司。

1.2 制备过程

通过化学交联法对小球藻进行固定化。称取 5 g 的柠檬酸溶解于 20 mL 去离子水中,加入 2 g 小球藻粉末与柠檬酸溶液混合,充分搅拌使其均匀混合。将混合溶液转移到坩埚中,置于烘箱中于 55 °C 脱水干燥 3 d,直至混合物表面的水分被蒸发到半干状态时,小球藻被完全包裹于柠檬酸中。之后调节烘箱温度,在特定温度(110 °C, 120 °C, 130 °C, 140 °C 和 150 °C)持续反应 3 h 得到反应产物。将产物用去离子水和丙酮交替洗涤,直至中性,得到柠檬酸交联固定化小球藻复合材料,烘干并研磨粉碎备用。

1.3 测试与表征

1.3.1 样品的结构表征:称取一定量的柠檬酸固定化小球藻复合材料样品,加入适量溴化钾,研磨后进行压片,使用傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR, Spectrum two, 美国珀金埃尔默仪器有限公司)进行红外光谱表征。测定的波数范围为 500~4000 cm^{-1} 、扫描次数 32 次、分辨率为 4 cm^{-1} 。

1.3.2 样品的形貌表征:取适量样品于载物台上进行喷金处理,通过扫描电子显微镜(SEM, Hitachi S-4800, 日本日立有限公司)观察样品的表面形貌,扫描电压为 20.0 kV。

1.3.3 羧基含量的测定:通过酸碱滴定法测定复合材料的羧基含量。准确称取 2.0 g 样品溶于 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液中,使其充分反应。以酚酞为指示剂,用 0.1 mol/L 的盐酸滴定溶液中剩余的 NaOH。每 100 g 样品中的羧基含量(W , 单位 mmol/kg)按式(1)计算

$$W = \frac{(V_0 - V_1) \cdot C}{m} \quad (1)$$

式中: V_1 和 V_0 ——分别为有、无样品时滴定所需要的 HCl 溶液体积, mL; C ——滴定使用的盐酸溶液的浓度, mol/L; m ——溶解的样品质量, g。

1.3.4 酯化率的测定:通过滴定法测定柠檬酸固定化小球藻复合材料的酯化率,酯化率的测定包括酯键的完全碱性水解和过量碱的电位滴定。准确称量 1.0 g 柠檬酸固定化小球藻样品,加入 50 mL 的 75 % 乙醇溶液混合均匀,在 50 °C 下水浴加热 0.5 h。待溶液冷却后,加入 25 mL 的 0.5 mol/L NaOH 溶液,在室温下搅拌 72 h 使其完全反应。以酚酞为指示剂,用 0.5 mol/L 盐酸反滴定过量的碱。以同样的方法进行空白对照和重复样品的处理。样品的酯化率(E)按式(2)计算:

$$E = \frac{(V_0 - V_1) \cdot C \cdot 158}{M} \quad (2)$$

式中: V_1 和 V_0 ——分别为有、无样品时滴定所需盐酸的体积, mL; C ——盐酸溶液的浓度, mol/L; M ——样品的质量, g; 158——柠檬酸脱去 2 个 OH 后的相对分子质量。

1.3.5 Zeta 电位的测定:称取少量柠檬酸固定化小球藻复合材料样品溶解于水中,配置成溶液,通过滴加 HCl 和 NaOH 溶液调节溶液的 pH, 得到 pH 为 2~9 的溶液,使用英国 Malvern Zetasizer Nano ZS90 电泳仪测定样品的 Zeta 电位。

1.3.6 吸水率的测定:通过质量法测定柠檬酸固定化小球藻样品的吸水率。称取一定质量的样品,放入过量去离子水中吸水溶胀 2 h。用金属筛网将溶胀后的样品分离出来,静置一段时间以除去表面未吸收的水。样品的吸水倍率(Q_e)按式(3)计算

$$Q_e = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \quad (3)$$

式中: Q_e ——溶胀平衡时样品的吸水率, g/g; m_0 , m_1 ——分别为样品吸水前和吸水后的质量, g。样品在不同 pH 的缓冲溶液中的吸水率按照同样的方式测定。

1.3.7 药物负载率和释放率测试:以柠檬酸固定化小球藻复合材料为载体,将酮洛芬作为模板药物来研究药物负载与控释。首先将酮洛芬溶解于无水乙醇中,配置成 20 mg/mL 的溶液。称取 2 g 样品加入 100 mL 酮洛芬溶液进行药物负载,将混合液放在摇床中摇动 4 h,达到平衡状态。每隔一定时间,取 3 mL 溶液用紫外可见分光光度计测定其在 275 nm 波长处的吸光度^[10],将负载过药物的样品与溶液分离并干燥,用于药物释放实验的测试。按式(4)计

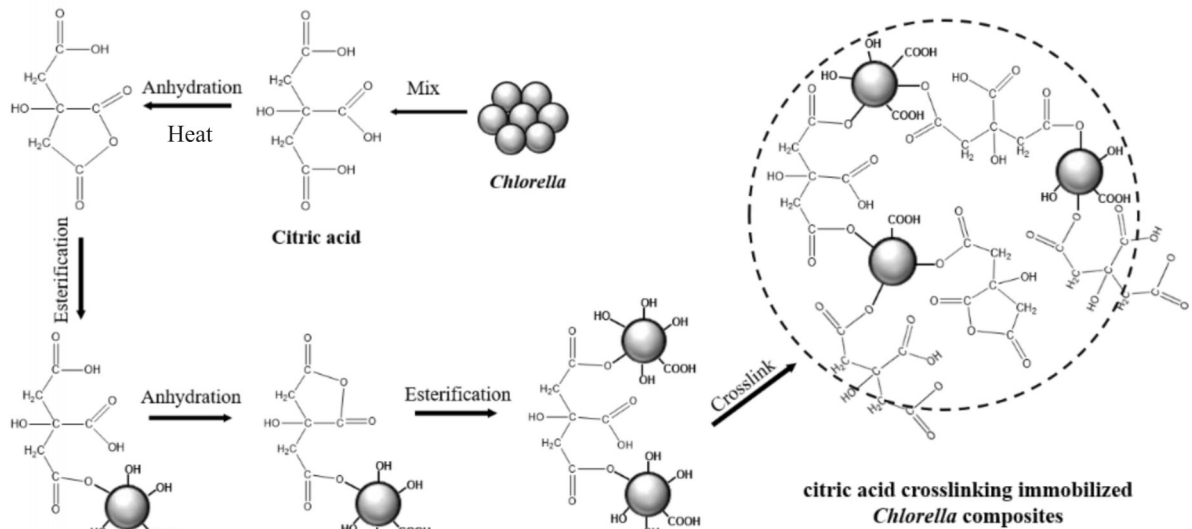


Fig.1 Formation mechanism of citric acid crosslinking immobilized Chlorella composites

算酮洛芬的负载率(LC)

$$LC = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \quad (4)$$

式中: C_0 和 C_1 ——分别为载药前后酮洛芬溶液的浓度, mol/L。

药物释放使用的柠檬酸固定化小球藻复合材料来自药物负载实验结束后重新干燥的样品, 体外模拟缓释的介质为 pH=1.2 的 HCl 溶液和 pH 6.8 的磷酸盐缓冲溶液。精确称取一定质量负载酮洛芬的干燥样品, 分别置于 200 mL 2 种释放介质中, 在 37 °C 的恒温摇床中进行药物缓释。每隔一段时间, 取 5 mL 溶液测定其吸光度, 并补充相同体积的释放介质以保持体积恒定。药物释放率(RP)按式(5)计算

$$RP(\%) = \frac{m_t}{m_0} \quad (5)$$

式中: m_t ——t 时刻时被释放出来的药物质量, g;
 m_0 ——样品中负载的药物总质量, g。

2 结果与讨论

2.1 材料的制备机理

Fig.1 为柠檬酸交联固定化小球藻的制备机理示意图。柠檬酸是具有 3 个羧基的多元羧酸, 多元羧酸会先脱水形成环状酸酐然后交联成酯, 因此, 柠檬酸上的 3 个羧基最多与 2 个自由羟基反应, 在 2 个聚合物分子间或同一分子间形成 2 个酯键^[11]。小球藻的细胞壁上具有大量的亲水性基团, 当小球藻与柠檬酸的混合物被加热到半干状态, 在氢键作用

下, 小球藻被大量的柠檬酸包裹。当温度升高到 100 °C 以上, 柠檬酸相邻的 2 个羧基脱水形成活性酸酐, 其中一个羧基与小球藻表面的羟基发生酯化反应, 另一个羧基被释放出来; 当中间的羧基被释放出来时, 它与第 3 个羧基继续脱水形成酸酐, 从而再与羟基发生交联^[12]。通过这种方式, 柠檬酸将小球藻细胞连接起来, 形成了三维交联网络结构。

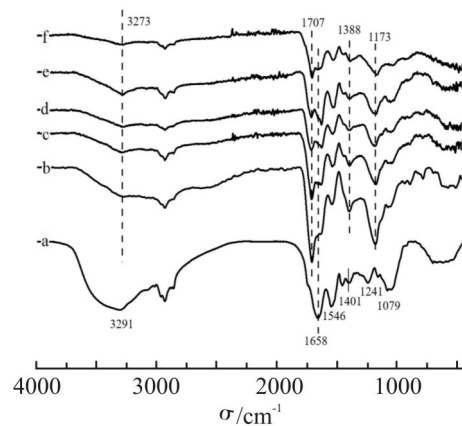


Fig.2 FT-IR spectra of (a) Chlorella, and (b-f) citric acid crosslinking immobilized Chlorella composites at reaction temperatures of 110 °C, 120 °C, 130 °C, 140 °C and 150 °C, respectively

2.2 材料的结构分析

为了研究柠檬酸与小球藻之间的相互作用, 测定了小球藻和柠檬酸交联固定化小球藻复合材料的 FT-IR 光谱, 如 Fig.2 所示。对于小球藻, 3291 cm^{-1} 处的宽峰可归因于分子间羟基的伸缩振动, 而 1241 cm^{-1} 处的峰归因于 C—O 伸缩振动, 表明小球藻上

存在丰富的羟基和羧基^[13]。此外, 1658 cm^{-1} , 1546 cm^{-1} 和 1401 cm^{-1} 处的吸收峰分别来自 C=O 伸缩振动(酰胺 I)、N—H 弯曲振动(酰胺 II)和 C—N 吸收带(酰胺 III)^[15]。在谱线(b~f)经过柠檬酸热化学处理过后, 3291 cm^{-1} 处的特征峰转移到 3273 cm^{-1} 处并明显减弱, 1658 cm^{-1} 处的峰减弱, 1241 cm^{-1} 处的峰偏移到 1173 cm^{-1} 处, 这些变化表明, 小球藻细胞壁表面的羟基通过酯化反应与柠檬酸发生了交联。此外, 在 1707 cm^{-1} 和 1388 cm^{-1} 处产生的新的吸收峰, 分别对应酯基的 C=O 伸缩振动和 COO⁻ 伸缩振动, 也证实了这一反应。也就是说, 柠檬酸与小球藻细胞壁上的羟基发生反应, 生成了酯键, 从而形成了交联结构。

Fig.3 为小球藻和柠檬酸交联固定化小球藻样

品的 SEM 图, 可以观察到小球藻的形态及其在热处理后的变化。在 Fig.3(a) 中, 小球藻细胞团聚成簇状分布, 放大后可以看到独立的直径为 4~5 μm 的小球藻细胞。Fig.3(b~d) 中显示, 在经过柠檬酸热化学交联后, 其结构发生了完全改变, 柠檬酸固定化小球藻样品的质地更加紧密, 呈微凝胶结构。样品表面粗糙不平, 这种高比表面积的结构带来了更多的吸附位点, 使水分子更容易渗透到凝胶内部。

2.3 表面属性分析

柠檬酸对小球藻的改性程度依赖于反应温度, 因此测定了不同反应温度(110~150 $^{\circ}\text{C}$) 制备的样品的一系列表面属性, 包括羧基含量、酯化率、零点电荷, 实验结果如 Tab.1 所示。由 Tab.1 可见, 柠檬酸交联固定化小球藻样品的羧基含量显著高于原始小

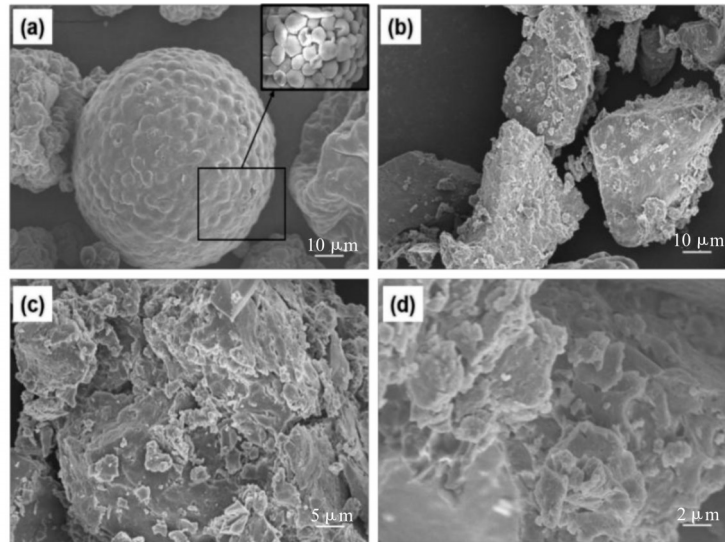


Fig.3 SEM graphs of (a)*Chlorella* and (b~d)citric acid crosslinking immobilized *Chlorella* composites at different magnifications

Tab.1 Surface characteristics of *Chlorella* and citric acid immobilized *Chlorella* composites

Samples	Carboxyl content /(mmol· kg ⁻¹)	Esterification rates/%	pH _{PZC}
<i>Chlorella</i>	3540		3.8
<i>Chlorella</i> @CA-110	740	28.4	3.1
<i>Chlorella</i> @CA-120	896	37.7	2.8
<i>Chlorella</i> @CA-130	1090	44.2	2.5
<i>Chlorella</i> @CA-140	1124	49.9	2.4
<i>Chlorella</i> @CA-150	1012	52.1	2.7

note:*Chlorella*@CA- 110, *Chlorella*@CA- 120, *Chlorella*@CA- 130, *Chlorella*@CA- 140 and *Chlorella*@CA- 150 were immobilized chlorella composites with citric acid crosslinking under reaction conditions of 110 $^{\circ}\text{C}$, 120 $^{\circ}\text{C}$, 130 $^{\circ}\text{C}$, 140 $^{\circ}\text{C}$ and 150 $^{\circ}\text{C}$, respectively

球藻。在 110~150 °C 范围内,样品的羧基含量先升高后降低,峰值温度为 140 °C,最高羧酸含量为 11240 mmol/kg。温度较低时,较慢的交联有助于得到羧基含量更高的复合材料,小球藻表面引入了更多的羧酸基团。但温度超过 140 °C 时,柠檬酸与附近的羧基发生了额外的聚合,柠檬酸分子之间的自聚合行为导致了羧酸含量降低。

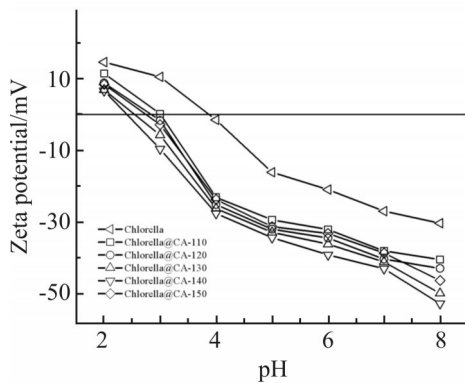


Fig.4 Zeta potential of *Chlorella*, and citric acid crosslinking immobilized *Chlorella* composites prepared at different reaction temperatures

为了更深入研究反应温度对交联结果的影响,测定了小球藻表面的羟基与柠檬酸羧基之间的酯化率,即小球藻表面参与酯化反应的羟基占初始羟基的百分比。从 Tab.1 中可以看到,在 110~150 °C 范围内,酯化率随反应温度升高,从 28.4 % 增加到 52.1 %。这是因为在高温下,柠檬酸的羧基与小球藻的羟基之间反应活性提高,促进了柠檬酸对小球藻的热化学交联,得到了更高的酯化率。

柠檬酸对小球藻的改性也可以通过表面电荷的改变来证明。Fig.4 为小球藻和柠檬酸固定化小球藻复合材料的 Zeta 及其等电点 (pH_{PZC})。原本小球藻的等电点为 3.8,而在 110~150 °C 制备的复合材料的等电点分别为 3.1, 2.8, 2.5, 2.4 和 2.7,均低于小球藻。这表明改性之后,羧酸基团的引入使小球藻的酸性中心增加。此外,样品的等电点随反应温度的变化趋势与羧基含量的变化一致,也证明了柠檬酸对小球藻的改性过程。

2.4 复合材料的吸水性能

Fig.5 为不同反应温度下制得的柠檬酸交联固定化小球藻样品的吸水倍率。在不同温度下制备的复合材料的表面属性不同,样品表现出来的溶胀能力也不同。当反应温度为 140 °C 时,样品在去离子水中的吸水能力最强,达到 35.8 g/g,较高或较低的反应温度都将导致吸水能力降低。这是因为柠檬酸固定化小球藻复合材料的吸水能力与样品羧

基含量直接相关,最大羧基含量在最佳反应温度 140 °C 下产生。当反应温度在 110~140 °C 时,较慢的交联可以得到羧基含量较高的样品;当温度进一步升高时,羧基之间发生交联,降低了羧基含量。当复合材料在去离子水中溶胀时,羧酸基团电离使样品带负电荷,这些带负电荷的基团互相排斥,扩张了三维网络结构,水分子在渗透压差的作用下渗透进入交联网络内部。因此,样品的吸水能力与羧基含量呈正相关,羧基含量最大的样品表现出最高的吸水率。此外,样品在磷酸盐缓冲溶液中的吸水曲线与在去离子水中的变化趋势一致,但吸水率更低。这是因为缓冲溶液的渗透压大于去离子水,样品内部与外部的渗透压差变小导致吸水率降低。

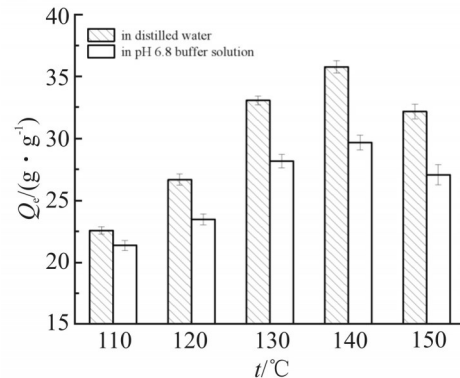


Fig.5 Water absorption of the composites prepared at different reaction temperatures in distilled water and phosphate buffer solution at pH 6.8, respectively

2.5 复合材料的溶胀动力学

Fig.6 为不同反应温度制得的柠檬酸固定化小球藻复合材料在蒸馏水中随时间变化的溶胀过程。样品的溶胀度先迅速增加,然后逐渐趋于平衡。当样品在去离子水中溶胀,复合材料中的羧基电离为 COO^- ,静电斥力扩张了交联网络,促进了水分子扩散进入凝胶内部。随着样品吸水溶胀,内外渗透压差不断减少,溶胀速率逐渐降低,最终达到平衡。

通过动力学研究样品溶胀过程的机理,采用准一级动力学模型和准二级动力学模型对实验数据进行拟合^[14]

$$\ln(Q_c - Q_t) = \ln Q_c - K_1 t \quad (6)$$

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{K_2 Q_c^2} + \frac{t}{Q_c} \quad (7)$$

式中: Q_c ——样品溶胀平衡时的吸水率, g/g; Q_t —— t 时刻的吸水率, g/g; K_1 ——准一级动力学速率常数, \min^{-1} ; K_2 ——准二级动力学速率常数, $g/(g \cdot \min)$ 。相关的动力学参数列于 Tab.2 中。可以看出,准二级

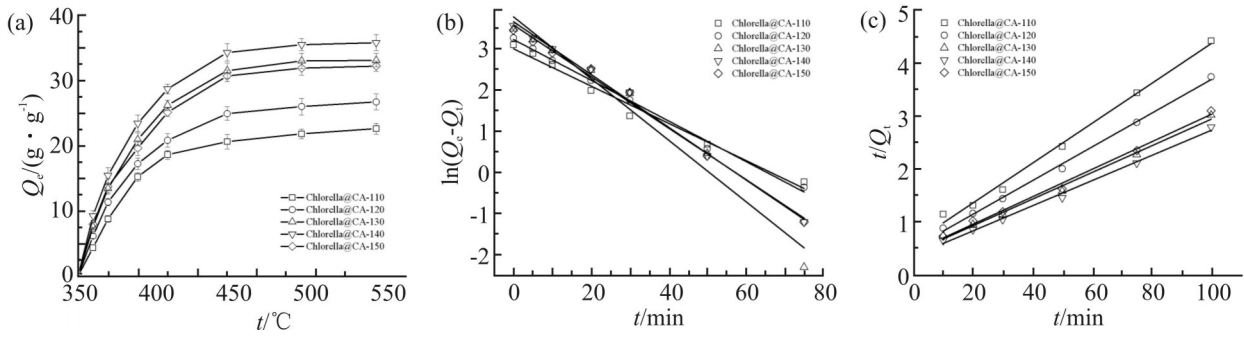


Fig.6 (a) Swelling process of the composites prepared at various reaction temperatures, (b) pseudo-first-order kinetics model and (c) pseudo-second-order kinetics model

Tab.2 Kinetic parameters of the swelling process for citric acid immobilized *Chlorella* composites

Samples	Q_e /(g·g ⁻¹)	Pseudo-first-order kinetics model			Pseudo-second-order kinetics model		
		K_1	R^2	$Q_{e,cal}$ /(g·g ⁻¹)	K_2	R^2	$Q_{e,cal}$ /(g·g ⁻¹)
<i>Chlorella</i> @CA-110	22.6	0.0454	0.9845	20.47	0.0023	0.9940	26.55
<i>Chlorella</i> @CA-120	26.7	0.0496	0.9955	25.67	0.0020	0.9974	31.42
<i>Chlorella</i> @CA-130	33.1	0.0751	0.9718	44.59	0.0015	0.9937	39.71
<i>Chlorella</i> @CA-140	35.8	0.0642	0.9954	39.64	0.0016	0.9953	42.09
<i>Chlorella</i> @CA-150	32.2	0.0628	0.9922	36.61	0.0015	0.9943	38.52

动力学模型拟合得到的相关系数(R^2)更接近1,通过准二级动力学模型计算出的理论数据 $Q_{e,cal}$ 比准一级模型更符合实际数据。这说明柠檬酸固定化小球藻复合材料在水中的溶胀过程更适合准二级动力学模型。

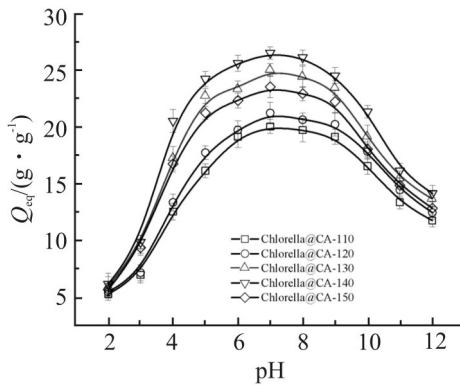


Fig.7 Swelling behavior of citric acid crosslinking immobilized *Chlorella* composites at various pH values

2.6 复合材料的pH敏感性

Fig.7为柠檬酸交联固定化小球藻复合材料在不同pH的缓冲溶液中的吸水率变化曲线,溶液pH仅通过滴加HCl溶液或NaOH溶液来调节。当pH在5~9范围内时,样品的吸水率较高且变化较小;当

缓冲溶液的pH高于或低于此范围,样品的吸水率均下降。当溶胀介质的pH=2时,大多数COO⁻基团质子化为-COOH,阴离子间的静电斥力减弱,阻碍了溶胀;随着pH升高,更多-COOH电离为带负电荷-COO⁻,静电斥力扩张了网络结构,水分子更容易扩散进入内部,促进了吸水率上升。但当溶液的pH>10,溶液中的大量Na⁺产生了阳离子电荷屏蔽效应^[15];此外,过强的碱性使样品中的酯键水解,破坏了交联结构,导致吸水率降低。

2.7 复合材料的药物负载和缓释性能

酮洛芬(α -甲基-3-苯甲酰基苯乙酸)是一种有效的非甾体抗炎药,具有镇痛、消炎及解热作用^[16]。酮洛芬可以很容易被胃肠道吸收,但药物的半衰期短,仅为1.6~1.9 h,必须经常口服给药。然而,多次口服送药会引起胃肠道副作用,为了降低对胃肠道的副作用,通过控释给药系统延长作用时间是一种解决办法。此前的研究表明,酮洛芬可以通过氢键负载到pH敏感的水凝胶网络上,并在模拟胃肠液中释放^[17]。而小球藻是天然生物,可以在体内消化降解,因此,柠檬酸交联固定化小球藻复合材料是理想的酮洛芬负载和给药载体。本实验以酮洛芬

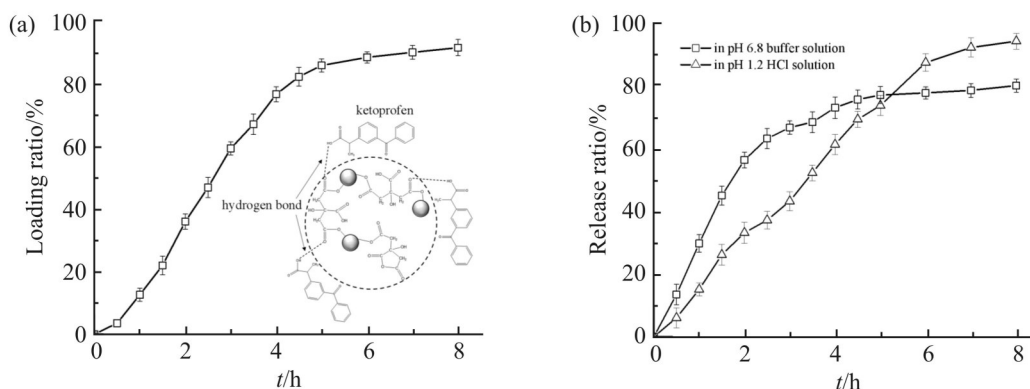


Fig.8 (a) Drug loading ratio of pure ketoprofen on citric acid crosslinking immobilized *Chlorella* composite; (b) slow-release ratio of citric acid crosslinking immobilized *Chlorella* composite

为模板药物、柠檬酸交联固定化小球藻样品为载体,研究了药物负载与体外缓释性能。

Fig.8(a)是室温下柠檬酸固定化小球藻复合材料的药物负载效率随时间变化的曲线。可以看出,药物负载率的变化表现出持续上升的趋势,并与柠檬酸固定化小球藻样品的溶胀行为紧密相关。复合材料在水中快速溶胀时,药物负载率随之快速的上升。随着时间的推移,溶胀达到平衡,药物负载也趋于平稳,直至负载率上升到91.6%。柠檬酸改性小球藻带来的大量羧基,为酮洛芬的负载提供了大量的吸附位点。在复合材料的羧基与药物之间由氢键连接,在氢键的作用下,药物被紧密结合到网络结构上。

为了测定柠檬酸固定化小球藻复合材料体外药物缓释的性能,在模拟人体内环境——胃液(pH=1.2的HCl溶液)和肠液(pH=6.8的磷酸盐缓冲溶液)下进行体外药物释放,结果如图8(b)所示。可以看出,酮洛芬的释放显著地受到释放介质的pH的影响。在前3h,在pH=6.8的介质中药物缓释速率显著高于pH=1.2时的缓释速率这主要归因于2个原因:一方面是因为酮洛芬是弱酸性的,在酸性强的盐酸溶液中溶解度低,难以扩散到介质中;另一方面是在pH=1.2条件下,柠檬酸固定化小球藻复合材料的溶胀有限,缓慢的溶胀速率抑制了药物的释放。当释放超过6h之后,pH=6.8的模拟肠液中药物释放结束,而pH=1.2的模拟胃酸中释放仍然进行,最终达到93.8%,长时间的强酸环境腐蚀了复合材料的交联结构,负载的药物被释放出来。药物缓释实验表明,外部介质pH的变化可以控制药物的释放速率,使柠檬酸固定化小球藻复合材料可以成为酮洛芬给药的理想载体。

3 结论

(1)通过无毒的多元羧酸柠檬酸对小球藻进行化学交联,制备了环境友好的柠檬酸交联固定化小球藻复合材料。FT-IR和SEM分析表明,柠檬酸与小球藻通过酯化反应完成了交联固定化,合成的复合材料表面粗糙不平,有更强的吸附能力。

(2)表面属性的研究表明,在140℃反应制备的复合材料其羧基含量最高,在去离子水中的最大吸水率为35.8 g/g。对复合材料的溶胀过程的动力学研究表明,复合材料在去离子水中的溶胀过程更符合准二级动力学模型。

(3)柠檬酸交联固定化小球藻复合材料的溶胀行为表现出pH敏感性,在中性时的吸水率最高,过酸或过碱的环境都会导致吸水率降低。药物缓释实验表明,该材料具有调控药物释放的潜力,可通过改变释放介质的pH来控制酮洛芬的释放速率,有望在药物控制释放方面得到应用。

参考文献:

- [1] Chen Y, Abdalkarim S Y H, Yu H Y, *et al.* Double stimuli-responsive cellulose nanocrystals reinforced electrospun PHBV composites membrane for intelligent drug release [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155: 330-339.
- [2] Zhao Y X, Fan Z, Chen Y R, *et al.* A bio-based hydrogel derived from moldy steamed bread as urea-formaldehyde loading for slow-release and water-retention fertilizers [J]. ACS Omega, 2021, 6: 33462-33469.
- [3] Safi C, Zebib B, Merah O, *et al.* Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014, 35: 265-278.
- [4] Takeda H. Sugar composition of the cell wall and the taxonomy

- of chlorella (chlorophyceae) [J]. *Journal of Phycology*, 1991, 27: 224-232.
- [5] Jafari Y, Sabahi H, Rahaie M. Stability and loading properties of curcumin encapsulated in *Chlorella vulgaris* [J]. *Food Chemistry*, 2016, 211: 700-706.
- [6] Behera B C, Mishra R, Mohapatra S. Microbial citric acid: production, properties, application, and future perspectives [J]. *Food Frontiers*, 2021, 2: 62-76.
- [7] Max B, Salgado J M, Rodriguez N, *et al.* Biotechnological production of citric acid [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2010, 41: 862-875.
- [8] 胡天娇, 陆晔婷, 彭亚倩, 等. 柠檬酸交联处理对壳聚糖纤维的增强作用[J]. *丝绸*, 2020, 57(12): 15-20.
Hu T J, Lu Y T, Peng Y Q, *et al.* Effect of cross-linking treatment with citric acid on enhancement of chitosan fiber[J]. *Journal of Silk*, 2020, 57(12): 15-20.
- [9] Xing G, Shao L, Du Y, *et al.* Citric acid crosslinked chitosan/poly (ethylene oxide) composite nanofibers fabricated by electrospinning and thermal treatment for controlled drug release [J]. *Cellulose*, 2020, 28: 961-971.
- [10] Joshi T, Bhavsar A, Senta A. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of ketoprofen and thiocolchicoside in combined solid oral dosage form [J]. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 2016, 7: 4979-4986.
- [11] Bueno V B, Bentini R, Catalani L H, *et al.* Synthesis and swelling behavior of xanthan- based hydrogels [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92: 1091-1099.
- [12] 刘金云. 以柠檬酸为交联剂的溶胶-凝胶法超拒水整理耐久性研究[D]. 上海: 东华大学, 2011.
Liu J Y. Preparation of durable superhydrophobic surface by sol-gel method with citric acid as crosslinking agent [D]. Shanghai: Dong Hua University, 2011.
- [13] Phukan M M, Chutia R S, Konwar B K, *et al.* Microalgae chlorella as a potential bio-energy feedstock[J]. *Applied Energy*, 2011, 88: 3307-3312.
- [14] Liu D, Li Z, Li W, *et al.* Adsorption behavior of heavy metal ions from aqueous solution by soy protein hollow microspheres[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2013, 52: 11036-11044.
- [15] Hayati M, Rezanejide Bardajee G, Ramezani M, *et al.* Temperature/pH/magnetic triple - sensitive nanogel - hydrogel nanocomposite for release of anticancer drug [J]. *Polymer International*, 2019, 69: 156-164.
- [16] 石开云, 余清宝. 酮洛芬药理研究进展[J]. *中国药业*, 2015, 24(23): 1-6.
Shi K Y, Yu Q B. Progresses in pharmacological study of ketoprofen [J]. *Chinese Pharmaceuticals*, 2015, 24(23): 1-6.
- [17] Cao H, Ma X, Sun S, *et al.* A new photocrosslinkable hydrogel based on a derivative of polyaspartic acid for the controlled release of ketoprofen [J]. *Polymer Bulletin*, 2010, 64: 623-632.

Preparation of Citric Acid Crosslinking Immobilized Chlorella Composite and Drug Slow-Release Performance

Hao Li¹, Bo Bai¹, Ke Pei¹, Yu Luo¹, Linlin Liang¹, Heming Wang¹, Kehui Peng¹, Fangli Cao²
(1. Key Laboratory of Subsurface Hydrology and Ecological Effect in Aird Region (Chang'an University), Ministry of Education, Xi'an 710054, China; 2. Design and Research Institute of Shaanxi Construction Installation Group, Xi'an 710054, China)

ABSTRACT: Natural Chlorella has unique physicochemical/biological properties. An eco-friendly composite material was prepared by thermo-chemical modification of Chlorella with citric acid and used as drug release carrier for ketoprofen. The structure and morphology of the synthesized citric acid-Chlorella composites were characterized by FT-IR and SEM, respectively. The surface properties such as carboxyl content, esterification rate, and isoelectric charge point of the composites synthesized at different reaction temperatures were studied, and 140 °C is determined as the optimal reaction temperature. The composite prepared under this condition has the maximum water absorption multiplicity of 35.8 g/g and exhibits a sensitivity to pH of swelling medium. The drug loading performance of citric acid cross-linked immobilized *Chlorella vulgaris* composites and the slow release performance under simulated in vivo environment were investigated using ketoprofen as template drug. The results show that the cumulative release rate of ketoprofen after 8 h is 93.8 % and 79.7 % at pH=1.2 and pH=6.8, respectively, and the polymer has a slow release effect on anti-inflammatory drugs with potential applications.

Keywords: immobilization technology; hydrogel; swelling; drug loaded; slow-release