

水包水乳液法制备木薯淀粉微球的研究*

Preparation of Cassava Starch Microspheres Using Water-in-water Emulsion Method

李秉正^{1,*}, 潘丽霞¹, 黄纪民¹, 苏志恒²

LI Bing-zheng¹, PAN Li-xia¹, HUANG Ji-min¹, SU Zhi-heng²

(1. 广西科学院, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物质产业化工程院, 广西生物质炼制重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西医科大学药学院, 广西南宁 530021)

(1. Guangxi Academy of Science, State Key Laboratory of Non-food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要:【目的】探明淀粉溶液组分含量和制备条件对淀粉微球产率及粒径的影响规律, 以及鉴定淀粉微球的基本理化特性。【方法】以可溶性木薯淀粉(SCS)为原料, 采用水包水乳液法制备淀粉微球; 采用单因素试验, 考察淀粉溶液中 NaOH 与 H₂O 质量比、温育温度和温育时间对木薯淀粉微球(CSM)产率和粒径的影响; 采用扫描电镜、红外光谱仪和 X 射线衍射仪对 CSM 进行表征分析; 采用 MTT 细胞检测方法, 对 CSM 的细胞毒性进行评价。【结果】当 NaOH 与 H₂O 质量比为 1.0 : 50、温育温度为 25℃、温育时间为 6h 时产率可达 (70.7 ± 0.9)%。上述 3 个因素对 CSM 的粒径影响均不显著 ($P > 0.05$), 且 NaOH 与 H₂O 质量比和温育温度过高时不利于制备分散良好的微球; SCS 多为圆形或卵形截切型, CSM 较为圆整, 基本上均为圆球形; SCS 和 CSM 的红外光谱图基本相同; SCS 基本保留了木薯原淀粉的结晶区, CSM 属于无定形态物质, 无结晶态存在; CSM 对人肝细胞的生长没有抑制作用。【结论】提高 NaOH 与 H₂O 质量比、温育温度和温育时间均有利于提高 CSM 的产率; SCS 和 CSM 的化学组成基本相同, 但在形态和晶体结构上具有明显的区别; 所制备的 CSM 对人肝细胞无毒性, 具有良好的生物相容性。

关键词: 水包水乳液 木薯淀粉 微球 生物相容性

中图分类号: TS23 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2014)02-0095-06

Abstract:【Objective】The objectives of this study were to confirm the influence of formulation and process parameters on yield and particle size of cassava starch microspheres (CSM), and identify the basic physicochemical properties of CSM.【Methods】CSM were prepared using soluble cassava starch (SCS) as raw material through a water-in-water emulsion method. The

effect of NaOH ($m_{\text{NaOH}} : m_{\text{water}}$), incubation temperature and incubation time on yield and particle size of CSM were investigated by single factor experiment. Scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and X-ray diffraction (XRD) were employed to characterize the CSM.【Results】It indicated when $m_{\text{NaOH}} : m_{\text{water}}$ was 1.0 : 50 and incubation temperature was 25℃, a relatively

收稿日期: 2013-10-21

修回日期: 2014-01-20

作者简介: 李秉正(1982-), 男, 副研究员, 主要从事生物质转化与利用研究。

* 广西自然科学基金(编号: 2013GXNSFBA019256)和广西科学研究与技术开发计划项目(编号: 桂科能 12237022、桂科攻 11440001-14 和桂科攻 111107008-7)资助。

** 通讯作者。

high yield of $(70.7 \pm 0.9)\%$ was achieved at 6h. However, no significant effects of those three factors on particle size of CSM ($P > 0.05$) were detected. Besides, NaOH or incubation temperature was at a high level significantly affected the quality of CSM. Most of the SCS granules were sphere and truncated oval, but CSM were spherical in general. FTIR spectra of SCS and CSM were almost the same. Crystalline region still existed in SCS, but not in CSM, which indicated that CSM were amorphous material. CSM had no inhibiting effect on the growth of human liver cells. **【Conclusion】**The yield of CSM increased along with the increase of NaOH concentration, incubation temperature and incubation time. SCS and CSM were very similar on chemical composition, but were obvious different from each other on morphology and crystal structure. CSM were nontoxic to human liver cells, which indicated that CSM were of good biocompatibility.

Key words: water-in-water emulsion, cassava starch, microsphere, biocompatibility

【研究意义】淀粉作为一种重要的生物质资源,在农业、工业和科学等众多领域一直受到高度重视。近几十年来,以淀粉为原料制备生物能源^[1,2]、生物基化学品^[3]及生物基材料^[4,5]的研究十分活跃。其中,以淀粉为原料(基质)制备淀粉微球一直是学术界关注的热点。淀粉微球无毒、无抗原性、生物相容性好、可被人体内的淀粉酶降解,在聚合物微球中尤其更受到关注。近年来,国内外学者对淀粉微球在医学领域的应用,包括用作栓塞剂^[6]、止血剂^[7]和药物载体^[8]等进行了较为广泛的研究。在我国,广西是木薯生产大省,木薯产量占全国总产量的70%以上,木薯淀粉资源十分丰富。以木薯淀粉为原料制备微球,不仅能延长木薯淀粉加工产业链,还能大大提高木薯淀粉的附加值。**【前人研究进展】**油包水(water-in-oil)乳液法是当前研究和生产中制备淀粉微球的主要方法^[9,10]。然而,由于需使用乳化剂和大量有机溶剂,有可能影响淀粉微球的使用安全性,并对环境造成负担。为此,科学家开发了一种基于水包水(water-in-water)乳液的新型微球制备方法,并最早应用于葡聚糖微球的制备^[11]。该方法无需使用有机溶剂,制得的微球使用安全性高,是一种应用前景广阔的绿色方法。目前,水包水乳液法已成功应用于淀粉微球的制备^[12,13]。笔者还对这一方法进行了改进,开发了分步水包水乳液法以进一步减小能耗^[14]。**【本研究切入点】**到目前为止,虽然学术界已对水包水乳液法制备淀粉微球进行了一定的研究,但有关水包水乳液组成和制备条件对制备效果影响的研究仍不够完善。另外,在目前水包水乳液法制备淀粉微球的研究中均以马铃薯淀粉或玉米淀粉为原料,未见以木薯淀粉为原料的研究。**【拟解决的关键问题】**本研究采用水包水乳液法制备木薯淀粉微球(CSM),研究淀粉溶液中NaOH与H₂O

质量比、温育温度和温育时间等组分和制备条件对微球产率和粒径的影响,并对微球的表观形貌、化学组成、晶体结构和细胞毒性等进行表征分析。

1 材料与方法

1.1 材料

试剂:可溶性木薯淀粉(SCS,食品级, $M_w \approx 340\text{kDa}$)由广西农垦明阳生化集团有限公司提供;聚乙二醇(PEG,化学纯, $M_w \approx 10\text{kDa}$)购自汕头市西陇化工厂有限公司;三偏磷酸钠(TSTP,分析纯)购自阿法埃莎(天津)化学有限公司;无水乙醇(分析纯)购自成都市科龙化工试剂厂;氢氧化钠(分析纯)购自国药集团上海化学试剂有限公司;二甲基亚砜(分析纯)购自美国Sigma公司;人肝细胞由广西医科大学药学院宋慧副教授提供。

仪器:数显电动搅拌机(RW20),德国IKA公司;恒温水浴锅(HH-4),江苏金坛市宏华仪器厂;激光衍射粒度仪(BT-2001),丹东百特公司;扫描电镜(S-3400N),日本Hitachi公司;X射线衍射仪(Ultima IV),日本Rigaku公司;红外光谱仪(iS10),美国Thermo Scientific公司;酶联免疫检测仪(Spectramax plus384),美国Molecular Devices公司。

1.2 方法

1.2.1 CSM的制备

采用分步水包水乳液法^[12]制备CSM,具体步骤如下:

(1)乳化:搅拌状态下(400r/min)将20mL含有NaOH和TSTP的SCS溶液(SCS:TSTP:H₂O=10:3:50,W/W)缓慢倒入含有60mL的PEG溶液(37.5%,W/W)的高型烧杯中,并维持搅拌10min以形成水包水乳液。乳化过程中搅拌转速为

400rpm,乳化温度为 30℃;

(2)温育:将烧杯放入带有冷却系统的水浴锅(自制)中静置温育;

(3)洗涤:将乳液移入离心管中,离心后用去离子水将下层产物(微球)洗涤 3 次,再用无水乙醇洗涤 3 次;

(4)干燥:将洗涤后的微球在 60℃下真空干燥 12h,干燥后的微球密封保存在干燥器中备用。

1.2.2 淀粉溶液组成和制备条件对制备效果的影响

1.2.2.1 NaOH 与 H₂O 质量比

为研究淀粉溶液中 NaOH 与 H₂O 质量比对 CSM 产率及粒径的影响,固定温育温度为 20℃,温育时间为 3h。在此条件下,改变 NaOH 与 H₂O 质量比分别为 0.8 : 50、1.0 : 50 和 1.2 : 50 进行试验。

1.2.2.2 温育温度

为研究温育温度对 CSM 产率及溶胀率的影响,固定 NaOH 与 H₂O 质量比为 1.0 : 50,温育时间为 3h。在此条件下,改变温育温度分别为 15℃、20℃、25℃和 30℃进行试验。

1.2.2.3 温育时间

为研究温育时间对 CSM 产率及溶胀率的影响,固定 NaOH 与 H₂O 质量比为 1.0 : 50,温育温度为 25℃。在此条件下,改变温育时间分别为 2h、3h、4h、5h 和 6h 进行试验。

1.2.3 产率的确定

$$Y = \frac{M}{M_1 + M_2}$$

从式中,Y 表示产率(%),M 表示所得 CSM 的质量(g),M₁表示加入 SCS 的质量(g),M₂表示加入 TSTP 的质量(g)。

1.2.4 木薯淀粉微球的表征

1.2.4.1 粒径分析

采用激光衍射粒度仪分析 CSM 的粒径分布,操作方法如下:在样品池中加入适量无水乙醇并进行背景测量,直至背景达到测量要求。将微球悬浮液按少量多次的原则加入循环池,待遮光率达到要求的范围并超声 2min 后,测量微球的粒径体积分布曲线。

1.2.4.2 表观形貌分析

采用扫描电镜(SEM)分析 CSM 的表观形貌,操作方法如下:用双面胶将干燥后的样品固定在样品台上,并在真空环境中对样品进行喷金处理。将

样品置于扫描电子显微镜中观察,并拍摄具有代表性的照片,加速电压为 20kV。

1.2.4.3 化学组成分析

采用红外光谱仪(FTIR)分析 CSM 的化学组成,操作方法如下:将干燥后的样品洒在 Smart iTR 附件的样品台上,以室内空气为背景,在 4000 ~ 525cm⁻¹波数范围内进行扫描。

1.2.4.4 晶体结构分析

采用 X 射线衍射仪(XRD)分析 CSM 的晶体结构,操作方法如下:将干燥后的样品填入样品板的凹槽内并适当压紧,然后将高出表面的多余部分刮去并抹平。将样品板放入衍射仪样品台中,在 5~35°(2θ)范围内进行叠扫。仪器工作条件为:管压 36 kV,管流 20mA,扫描速度 5°/min。

1.2.4.5 细胞毒性分析

采用 MTT 法分析 CSM 的细胞毒性,操作方法如下:将不同浓度的 CSM 悬浮液加入人肝细胞细胞培养液中,培养 48h 后加入 50μL 的 MTT 溶液。在 37℃下保温 4h 后,除掉溶液并用二甲基亚砷溶解,用酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测定吸光值,每个浓度重复 6 次。

2 结果与分析

2.1 CSM 的制备研究

2.1.1 NaOH 与 H₂O 质量比对 CSM 产率及粒径的影响

从表 1 中可以看出,随着 NaOH 与 H₂O 质量比增大,微球的产率逐渐增大。当 NaOH 与 H₂O 质量比为 1.2 : 50 时微球的产率达到 (70.2 ± 0.4)%。试验结果表明,NaOH 的作用不只是促进淀粉溶解,还对交联反应起到催化剂的作用。理由是 SCS 与 PEG 溶液混合后,两种溶液中的物质相互迁移并形成由 SCS 富集相(分散相)和 PEG 富集相(连续相)组成的水包水乳液。NaOH 与 H₂O 质量比越大,淀粉富集相中 NaOH 含量越高,因此交联反应速率也越高。

表 1 NaOH 与 H₂O 质量比对微球制备效果的影响

No.	W/W (g/g)	微球分散性*	产率 (%)	平均粒径 (μm)
1	0.8 : 50	++	61.8 ± 1.2	32.5 ± 2.9
2	1.0 : 50	++	65.6 ± 1.7	31.3 ± 1.0
3	1.2 : 50	-	70.2 ± 0.4	n. d. **

* ++ 表示分散良好,基本无团聚现象;- 表示严重团聚。

** 表示未测定。

值得注意的是,当 NaOH 与 H₂O 质量比为

1.2:50时,水包水乳液中的乳滴出现聚集现象,造成所制得的微球团聚。在现有文献中,未见与这一现象类似的报道,其原因仍有待进一步研究。由于此条件下微球团聚严重,因此不再检测粒径。从表1中还可以看出,NaOH与H₂O质量比分别为0.8:50和1.0:50时,所制得微球的平均粒径分别为(32.5±2.9) μm 和(31.3±1.0) μm ,区别不显著($P>0.05$)。原因可能是改变NaOH与H₂O质量比并不会明显改变分散相的粒径,因此所制得微球的粒径也没有太大差别。

2.1.2 温育温度对CSM产率及粒径的影响

从表2中可以看出,随着温育温度提高,微球的产率逐渐增大。当温育温度为30℃时,产率增大至(69.6±0.6)%。试验结果表明温育温度越高,交联反应的速率也越大。然而与NaOH与H₂O质量比过高时的情况类似,当温育温度为30℃时,水包水乳液中的乳滴出现聚集现象,造成所制得的微球团聚。因此,同样不再检测此条件下制得微球的粒径。从表2中还可以看出,温育温度在15~25℃范围内,微球平均粒径之间的差别不显著($P>0.05$)。原因可能是:形成水包水乳液时的乳化温度和搅拌速度均相同,意味着分散相的粒径大致相同。虽然乳化后置于不同的温度下温育,但温度的改变并未改变分散相的粒径。

表2 温育温度对微球制备效果的影响

No.	温育温度(℃)	微球分散性*	产率(%)	平均粒径(μm)
4	15	++	64.7±0.7	30.9±2.9
2	20	++	65.6±1.7	31.3±1.0
5	25	++	68.3±0.5	30.8±1.2
6	30	-	69.6±0.6	n. d. **

* ++表示分散良好,基本无团聚现象;-表示严重团聚。

**表示未测定。

2.1.3 温育时间对木薯淀粉微球产率及粒径的影响

从表3中可以看出,在2~5h范围内随着反应时间的延长,微球产率逐渐增大。当反应时间为5h时产率达到(70.3±0.3)%。然而,反应时间超过5h微球产率即趋于稳定,说明此时几乎没有新的淀粉分子交联到微球上。从表3中还可以看出,不同温育时间制备的微球平均粒径在30~31 μm 之间,相差很小($P>0.05$)。原因可能是:形成水包水乳液时的乳化温度和搅拌速度均相同,意味着分散相的粒径大致相同,而温育时间的不同并未改变分散相的粒径。

表3 温育时间对微球制备效果的影响

No.	温育时间(h)	微球分散性*	产率(%)	平均粒径(μm)
7	2	++	67.0±1.0	30.8±1.6
5	3	++	68.3±0.5	30.8±1.2
8	4	++	69.4±0.5	30.6±1.0
9	5	++	70.3±0.3	31.0±0.7
10	6	++	70.7±0.9	30.1±1.7

* ++表示分散良好,基本无团聚现象;-表示严重团聚。

2.2 木薯淀粉微球的表征结果

2.2.1 表观形貌

从图1中可以看出,SCS颗粒表面较为光滑,且多为圆形或卵形截切型,保持了木薯原淀粉的外观(图1a);CSM的表面同样较为光滑,但形状较为圆整,基本上均为圆球形(图1b),与文献^[15]中采用油包水乳液法制备的淀粉微球相似。从扫描电镜照片中可以明显看出,CSM的表观形貌与SCS具有明显的区别,表明虽然CSM是以SCS为原料制备,但经过“溶解-乳化-交联固化”这一成球过程后,其形状与SCS相比已经有了本质的不同。

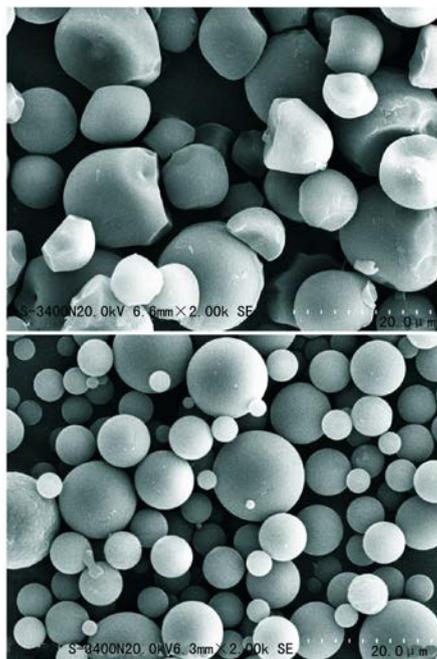


图1 SCS(a)和CSM(b)的SEM照片(2000×)

2.2.2 化学组成

由图2中可以看出,SCS和CSM的谱图基本相同,这是因为二者均主要由淀粉分子组成。此外,二者的谱图中在3400 cm^{-1} 附近均有宽峰,说明交联反应后CSM中仍存在大量的羟基。值得一提的是,CSM的红外谱图中未见PEG的特征峰,说明水包水乳液法制备的淀粉微球中不含或仅含极少量的PEG。

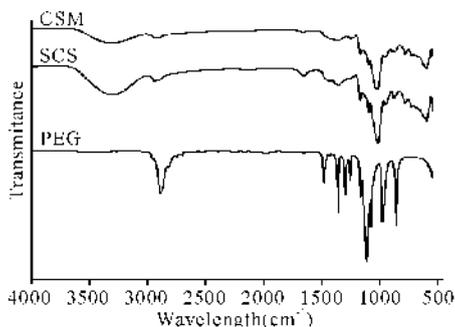


图2 PEG、SCS和CSM的红外光谱

2.2.3 晶体结构

从图3可以看到,TSTP的图谱在 2θ 为 10° 和 45° 范围内有多个强衍射峰,说明TSTP为晶体结构;SCS的图谱在 2θ 为 15.2° 、 17.1° 、 18.1° 、 23.1° 附近存在4个明显的衍射峰,说明SCS仍基本保留了木薯原淀粉的结晶区;与SCS不同的是,CSM的图谱为属于无定形态物质的特征宽峰,并不存在属于SCS的特征衍射峰,这是由于溶液中的氢氧化钠破坏了SCS的结晶结构,而交联反应形成的三维网络结构又抑制了淀粉分子结晶,因此不能形成有序的排列。此外,TSTP的特征峰在CSM中同样没有出现,说明微球中并无结晶态的交联剂残留。这一结果与Dziechciarek等^[16]的报道一致。然而,在Malafaya等的研究中却出现了不同的结果:他们所制备的微球中含有TSTP结晶的特征峰^[17]。原因可能是他们未用水洗涤微球。通过本研究可以证实,用去离子水洗涤后可以去除微球中残留的交联剂TSTP。

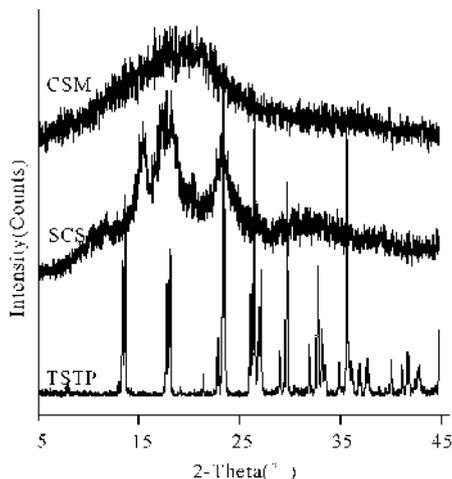


图3 TSTP、SCS和CSM的XRD图谱

2.2.4 MTT试验结果

MTT试验中,吸光值与活细胞数量成正比,可间接反映活细胞数量。吸光值越高,活细胞数量越多。通过与对照组(未加微球)的吸光值进行比较,

对不同加入量条件下CSM的细胞毒性进行评价。

从图4中可以看出,加入的微球悬浮液浓度为 $0.125\sim 2.0\text{mg/mL}$ 时,吸光值与对照组相比无显著变化($P>0.05$),说明在所考察的用量条件下所制得的CSM对人肝细胞的生长没有抑制作用。结果表明CSM基本无细胞毒性,表现了较好的生物相容性,具备了用作药物载体或止血剂等医药领域应用的良好潜力。

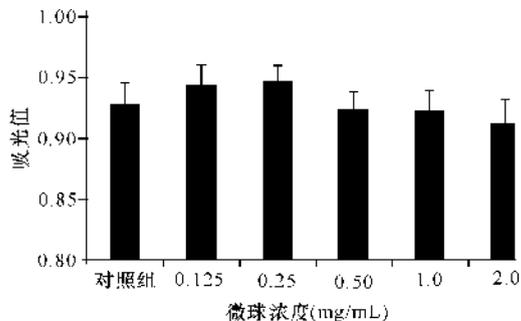


图4 MTT法测定CSM的肝细胞毒性

3 结论

(1)提高NaOH与 H_2O 质量比、温育温度和温育时间均可提高微球产率。当NaOH与 H_2O 质量比为 $1.0:50$ 、温育温度为 25°C 、温育时间为 6h 时微球产率可达 $(70.7\pm 0.9)\%$ 。然而,上述3个因素对微球粒径的影响均不显著($P>0.05$),且NaOH与 H_2O 质量比和温育温度过高会造成微球严重团聚。

(2)SEM、FTIR和XRD分析结果表明,SCS和CSM的化学组成基本相同,但CSM为较规整的圆球形,且属于无定形物质,在表观形貌和晶体结构上与SCS均有明显的区别。

(3)MTT试验结果表明,所制备的CSM对肝细胞无毒性,具有较好的生物相容性。

参考文献:

- [1] Yamada R, Bito Y, Adachi T, et al. Efficient production of ethanol from raw starch by a mated diploid *Saccharomyces cerevisiae* with integrated α -amylase and glucoamylase genes[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 44(5-6): 344-349.
- [2] 秦艳, 申乃坤, 莫勇生, 等. 黄浆水与木薯粉混合发酵高浓度乙醇的发酵条件[J]. *广西科学*, 2012, 19(3): 249-252.
- [3] Petrov K, Urshev Z, Petrova P. L(+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84[J]. *Food Microbiology*, 2008, 97

- (13):1554-1562.
- [4] Pimpa B, Muhammad K, Ghazali Z, et al. Optimization of conditions for production of sago starch-based foam [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2007, 68(4):751-760.
- [5] 梁兴泉, 贾德民, 林桂汕, 等. 淀粉/聚乙烯薄膜中聚乙烯的降解特性研究[J]. *广西科学*, 2000, 7(1):50-53.
- [6] Erichsen C, Bolmsjö M, Hugander A, et al. Blockage of hepatic - artery blood flow by biodegradable microspheres (Spherex®) combined with local hyperthermia in the treatment of experimental liver tumors in rats[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1985, 109(1):38-41.
- [7] Hoffmann N E, Siddiqui S A, Aqarwal S, et al. Choice of hemostatic Agent influences adhesion formation in a rat cecal adhesion model[J]. *Journal of Surgical Research*, 2009, 155(1):77-81.
- [8] Mao S R, Chen J M, Wei Z P, et al. Intranasal administration of melatonin starch microspheres [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 272(1-2):37-43.
- [9] Yu J, Liu J. Effects of suspension crosslinking reacting conditions on the size of starch microspheres [J]. *Starch/Stärke*, 1994, 46(7):252-255.
- [10] 李仲谨, 刘节根. 阴离子淀粉微球的合成及吸附性能研究[J]. *食品科技*, 2009, 34(2):234-237.
- [11] Franssen O, Hennink W E. A novel preparation method for polymeric microparticles without the use of organic solvents [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 1998, 168(1):1-7.
- [12] Elfstrand L, Eliasson A, Jänsson M, et al. From starch to starch microspheres: Factors controlling the microspheres quality [J]. *Starch/Stärke*, 2006, 58(8):381-390.
- [13] Li B-z, Wang L-j, Li D, et al. Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method [J]. *Journal of Food Engineering*, 2009, 92(3):250-254.
- [14] Li B-z, Wang L-j, Li D, et al. Preparation and characterization of crosslinked starch microspheres using a two-stage water-in-water emulsion method [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88(3):912-916.
- [15] Hamdi G, Ponchel G, Duchêne D. An original method for studying in vitro the enzymatic degradation of cross-linked starch microspheres [J]. *Journal of Controlled Release*, 1998, 55(2-3):193-201.
- [16] Dziechciarek Y, van Soest J J G, Philipse A P. Preparation and properties of starch-based colloidal microgels [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002, 246(1):48-59.
- [17] Malafaya P B, Stappers F, Reis R L. Starch-based microspheres produced by emulsion crosslinking with a potential media dependent responsive behavior to be used as drug delivery carriers [J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2006, 17(4):371-377.

(责任编辑:尹 闯,竺利波)