

岩藻黄质植物细胞外囊泡递送体系的构建 及其消化特性研究

兰一鸣^{1,2}, 管维良³, 徐淑怡¹, 张皓¹, 田方^{2*}, 蔡路昀^{1,4*}

(1.浙江大学宁波国际科创中心, 浙江宁波 315100) (2.浙江海洋大学食品科学与药学学院, 浙江舟山 316000)
(3.广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004) (4.浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江杭州 310058)

摘要: 岩藻黄质具有良好的抗氧化与抗炎活性, 但其较强的疏水性导致稳定性差、生物利用度低。为提升其递送效率与消化稳定性, 本研究以三角褐指藻细胞外囊泡为载体, 经磷酸三苯酯修饰构建岩藻黄质纳米递送体系, 并开展工艺优化、结构表征及体外消化行为研究。通过单因素与响应面分析确定最佳制备条件为岩藻黄质浓度 $108 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、磷酸三苯酯与岩藻黄质质量比 1.7、超离时间 97 min 及超离速度 $108\,000 \text{ r min}^{-1}$ 。在此条件下, 纳米体系粒径约 140 nm, 包埋率和透过率分别为 82.13% 和 86.44%, 且模型预测值与实测值偏差小于 5%, 表明工艺稳定且具有良好重复性。体外模拟消化结果表明, 该递送体系在胃段释放受限, 而在肠段及结肠段释放显著增强, 显著优于游离岩藻黄质及未修饰体系。综上, 基于三角褐指藻细胞外囊泡构建的功能化纳米递送体系能够有效改善岩藻黄质的稳定性与阶段性释放特征, 为疏水性活性物质的口服递送及微藻资源高值化利用提供了理论依据与技术参考。

关键词: 三角褐指藻; 藻源细胞外囊泡; 岩藻黄质; 纳米递送体系; 消化特性

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.6.0471

Construction of Fucoxanthin Plant Extracellular Vesicle Delivery System and Study on its Digestion Characteristics

LAN Yiming^{1,2}, GUAN Weiliang³, XU Shuyi¹, ZHANG Hao¹, TIAN Fang^{2*}, CAI Luyun^{1,4*}

(1.Ningbo International Science and Innovation Center, Zhejiang University, Ningbo 315100, China)

(2.College of Food Science and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

(3.College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

(4.College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Fucoxanthin has excellent antioxidant and anti-inflammatory activities, but its strong hydrophobicity leads to poor stability and low bioavailability. To improve its delivery efficiency and digestive stability, this study used extracellular vesicles from *Phaeodactylum tricornutum* as the carrier, and constructed a nano-delivery system of Fucoxanthin by modifying with triphenyl phosphate. The process optimization, structural characterization, and *in vitro* digestive behavior studies were carried out. Through single-factor and response surface analysis, the optimal preparation conditions were determined as a Fucoxanthin concentration of $108 \mu\text{g mL}^{-1}$, a mass ratio of Fucoxanthin to triphenyl phosphate of 1.7, an ultracentrifugation time of 97 min, and an ultracentrifugation speed of $108\,000 \text{ r min}^{-1}$. Under these conditions, the particle size of the nano-system was approximately 140 nm, the encapsulation rate and transmittance were 82.13% and 86.44% respectively, and the deviation between the predicted value and the measured value was less than 5%, indicating that the process is stable and has good repeatability. The *in vitro* simulated digestion results showed that the delivery system was limited in release in the gastric segment, but significantly enhanced in the intestinal and colonic segments, significantly superior to free Fucoxanthin and unmodified systems. In summary, the functionalized nano-delivery system constructed based on extracellular vesicles of *Phaeodactylum tricornutum* can effectively improve the stability and staged release characteristics of Fucoxanthin, providing a theoretical basis and technical reference for the oral delivery of hydrophobic active substances and the high-value utilization of microalgae resources.

收稿日期: 2026-05-07; 修回日期: 2026-09-02; 接受日期: 2026-09-03

基金项目: 宁波市重点研发计划 (2024Z282); 宁波市团队科技特派员项目 (2024S217)

作者简介: 兰一鸣 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物的提取及应用, E-mail: 2971701783@qq.com

通讯作者: 田方 (1987-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品贮藏加工与精准营养靶向递送, E-mail: tianfang@zjou.edu.cn; 共同通讯作者: 蔡路昀 (1981-),

男, 博士, 教授, 研究方向: 水产源天然产物及新健康食品开发、水产品冷链贮运及绿色加工, E-mail: cailuyun@zju.edu.cn

Key words: *Phaeodactylum tricornutum*; algal extracellular vesicles; fucoxanthin; nano delivery system; digestive characteristics

岩藻黄质 (Fucoxanthin, FUC) 是一种天然类胡萝卜素, 人体无法内源合成 FUC, 主要通过膳食摄入褐藻类食物 (如裙带菜、海带、马尾藻等) 或通过含 FUC 的膳食补充剂进入人体^[1]。藻类生物物质的高收益确保了其能够在工业规模上实现商业化^[2]。FUC 具有独特的结构由环氧化物基团、烯键和九个双键, 使其成为生物医学药物中一种很有前景的生物活性物质, 赋予其显著的抗氧化和抗炎活性^[3]。FUC 的高度不饱和的共轭双键、烯键和环氧化结构, 赋予其优异的光吸收能力和自由基清除活性, 但也导致其在光照、温度及氧气条件下极易发生降解和顺反异构化^[4]。研究表明, 在含氧条件下储存的 FUC 降解速率显著高于在惰性气体保护环境中的样品, 并且氧气浓度越高, FUC 的氧化降解速度越快^[5]。近年来, 细胞外囊泡 (Extracellular vesicles, EV) 作为一种天然纳米递送载体逐渐受到关注。EV 具有高生物相容性、低免疫原性和低毒性等特性, 因此可以作为治疗剂和药物输送载体, 并应用于包括免疫反应和细胞迁移等领域中^[6]。与传统人工纳米载体相比, EV 的脂质双层结构能够为疏水性分子提供稳定的包埋环境, 从而提高 FUC 在水体系中的分散性。EV 膜结构还可以有效隔离氧气和光照, 从而减少 FUC 在储存和消化过程中的氧化降解^[7]。与哺乳动物来源或人工合成的纳米颗粒相比, 植物来源的 EV 不仅成本更低, 而且更环保, 更符合可持续发展的理念。来自三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*, *Pt.*) 的 EV 已显示出良好的提取率^[8], 使其成为药物传递应用的理想候选者。例如, Algatech 有限公司的 FucoVital™ 用于肝脏健康的食品添加剂中就含有来自 *Pt.* 的 FUC, 已获得美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 的新膳食成分通知^[9]。因此 *Pt.* EV 有望作为口服递送体系用于输送疏水性营养成分。

本研究以 *Pt.* EV 为载体原料, 使用二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-磷酸三苯酯 (DSPE-PEG2K-TPP, TPP) 修饰后, 构建负载 FUC 的纳米颗粒递送体系 (EV/TPP@FUC), 以提升 FUC 的生物利用度, 用于 FUC 在模拟胃肠道环境中表现出阶段性释放差异。通过形貌和结构表征确定所制备的纳米囊泡为 EV。通过单因素和响应面实验优化了制备条件, 利用理化表征、形貌表征探讨了壁材与 FUC 之间结合的机理。该研究不仅扩展了 *Pt.* 的高值化利用途径, 还为易降解的生物活性物质的递送系统设计提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

三角褐指藻, 宁波路鸣生物科技有限公司; 岩藻黄质 (纯度>90%), 山东结晶生物有限公司; 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-磷酸三苯酯 (R-9981), 西安瑞禧生物科技有限公司; 无水乙醇 (高级纯, 水分含量≤0.2%), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 磷酸盐缓冲液 (pH 值为 7.2~7.4)、人工胃液 (PH1840)、人工肠液 (PH1841)、人工结肠液 (PH1842), 福州飞净生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (P0010S), 碧云天生物试剂公司。

1.2 仪器与设备

Optima XE-90 超高速离心机, 贝克曼库尔特公司; ZSU3100 动态光散射激光粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司; TU-1810PC 紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司; Spark 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; JY99-IIDN 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; NanoSight NS300 纳米颗粒跟踪分析仪, 马尔文帕纳科; GZ 磁力搅拌器, 金坛市迅生仪器厂; RV 101-HB 10 旋转蒸发仪, 德国 IKA 集团; HT-7800 透射电子显微镜, 日立公司; Nicolet iS5 傅里叶红外变换光谱, 赛默飞世尔科技公司; Stellaris 5 激光共聚焦显微镜, 德国徕卡 (Leica) 仪器有限公司; Monnae QuickChemi 5100e 超高灵敏度化学发光成像系统, 莫纳生物科技有限公司; FE20 pH 计, 日本 Nikon 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 *Pt.* EV 的制备

参照已有文献^[10,11]将 EV 从 *Pt.* 藻液中提取出来。取 *Pt.* 藻液 50 mL, 在 4 °C 条件下, 依次以 2 000 r min⁻¹, 10 min、10 000 r min⁻¹, 20 min 离心, 以去除藻液中残存的杂质和大囊泡, 收集上清液。上清液通过 0.45 μm 和 0.22 μm 膜

过滤。滤液用超高速离心机,在4℃、150 000 r min⁻¹下离心80 min,将所得沉淀均匀地重悬与200 μL 磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)中。采用BCA蛋白浓度测定试剂盒评估EV的蛋白浓度。细胞外囊泡在使用前储存在-80℃下。

1.3.2 *Pt.EV* 的理化表征

1.3.2.1 *Pt.EV* 的蛋白印迹测定

蛋白印迹(Western blot, WB)分析用于评估EV表面标志蛋白,使用RIPA裂解液分离EV中的总蛋白质。将裂解液与十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)蛋白缓冲液混合均匀,在100℃水浴中变性5 min^[12],12 000 r min⁻¹离心5 min,取上清液用BCA蛋白试剂盒确定蛋白浓度,其余样品于-80℃保存待用。使用β-Actin作为内参蛋白。一抗稀释后将封闭后的聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene fluoride, PVDF)膜装入杂交袋中4℃孵育过夜。用洗膜缓冲液(Tris Buffered Saline Tween, TBST)洗5次,每次5 min。随后,将二抗(辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体)用5%脱脂奶粉稀释,一起孵育1 h,用TBST洗5次,每次5 min。利用化学发光检测系统检测相关条带。

1.3.2.2 *Pt.EV* 的纳米颗粒跟踪分析测定

将从1.3.1中获得的EV样品进行适当稀释,确保EV特异性良好分散,EV形态稳定,渗透压平衡,且不损害颗粒完整性。利用仪器系统相机,即科研级互补金属氧化物半导体(Scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor, sCMOS)相机。追踪并记录单个纳米粒子的布朗运动,并分析和计算运动数据,以确定颗粒的大小分布和浓度。

1.3.2.3 *Pt.EV* 的透射电镜测定

参照Rao等^[13]的方法并稍做修改。将10 μL EV悬浮液在碳膜涂层铜网上,静置10 min干燥。随后,加入10 μL 磷钨酸溶液(3%, m/V, 水性。使用NaOH溶液将pH值调节至7)进行负染,并在2 min后除去过量部分。样品铜栅在65℃条件下将烘烤约10 min。随后使用200 kV运行的透射电子显微镜捕获形态和照片的观察结果。

1.3.3 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-磷酸三苯酯修饰基于*Pt.EV*递送体系的制备

将FUC与无水乙醇充分混合均匀,制成所需的FUC溶液,同时将从2.3.1获得的EV溶解于pH值7.4的PBS缓冲液中。接着分别把FUC的乙醇溶液与EV的PBS溶液,两个混合体系按一定的总质量比例进行混合。随后,在冰浴条件下,分别对这两个混合体系使用200 W的超声波探头进行处理。处理模式为开启15秒、关闭15秒,持续2 min,处理结束后孵育2 min,此超声及孵育步骤循环三次,从而获得EV@FUC。完成超声步骤后,将这两种混合体系在室温下孵育1 h,以恢复EV膜的稳定性。之后,把EV@FUC与二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-磷酸三苯酯(下方简称磷酸三苯酯, TPP)按一定质量比(m/V)在37℃下避光搅拌2 h,并在37℃时通过旋转蒸发从反应系统中除去乙醇。最后,通过超速离心去除游离的TPP和FUC,弃去上清液,沉淀部分即为所需的EV/FUC和EV/TPP@FUC^[14]。

1.3.4 单因素试验

1.3.4.1 包埋率的测定

参考Guo等^[15]的方法并稍做修改。取1 mL所制得的所有EV悬浮液以12 000 r min⁻¹离心35 min。将上清液置于5 mL棕色容量瓶中,使用紫外-可见分光光度计测定450 nm处的吸光度来评估其中FUC的含量。使用下式确定包埋率(Encapsulation efficiency, E)的百分比。

$$E / \% = \frac{M_0 - M}{M_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

E——为体系中岩藻黄质的包埋率, %;

M——为游离FUC的质量;

*M*₀——为FUC的添加量。

1.3.4.2 粒径与电位的测定

将1.3.4.1中所得的*Pt.EV*的悬浮液分别放入马尔文粒径样品池和马尔文zeta电位样品池中。所有悬浮液的粒径、zeta电位和多分散指数(Polydispersity index, PDI)使用马尔文激光粒度仪测量。

1.3.4.3 透过率的测定

通过紫外分光光度计计算在 600 nm 处 EV 悬浮液的透过率 (Transmittance, T%)^[16]。使用蒸馏水作为空白溶液。所有实验一式三份进行。

1.3.5 响应面试验

为进一步优化 EV 负载性能,在单因素实验的基础上,综合选取影响最为显著的三个水平为考察因素,根据 Box-Behnken 实验设计原理,设计 4 因素 3 水平实验。具体因素及水平如下所示。

表 1 实验因素及水平编码

Table 1 Test factors and level coding

变量	水平		
	-1	0	1
因子			
X ₁ =FUC/(μg mL ⁻¹)	96	108	120
X ₂ =TPP 与 FUC 质量比	1.4	1.7	2
X ₃ =转速/(r min ⁻¹)	100 000	105 000	110 000
X ₄ =离心时间/min	60	80	100
响应	约束条件		
Y ₁ =粒径/nm	最小		
Y ₂ =包埋率/%	最大		
Y ₃ =透过率/%	最大		

1.3.6 EV/TPP@FUC 的粒径测定

同 1.3.4.2。

1.3.7 EV/TPP@FUC 的透射电镜测定

将 10 μL EV、EV@FUC 和 EV/TPP@FUC 的悬浮液分别滴在碳膜涂层铜网上,同 1.3.2.3。

1.3.8 EV/TPP@FUC 的傅里叶红外光谱测定

为表征 EV-FUC 复合物中特征官能团的化学结构,参考 Richa 等^[17]并稍做修改。采用傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 对所有实验制备的 EV 悬浮液样本进行系统分析。具体操作中,取 100 μL 待测液样精准滴加于高抛光溴化钾 (KBr) 晶体基底表面,随后覆盖第二片同规格 KBr 晶片,采用夹片法形成均匀液膜。在波数 4 000~400 cm⁻¹ 范围内以 4 cm⁻¹ 分辨率进行 64 次扫描累加,同时以空白 KBr 晶片作为背景参照进行实时背景扣除,最终获取各样本的分子振动特征谱图。

1.3.9 EV/TPP@FUC 的激光共聚焦显微镜测定

取 500 μL EV 悬液分别与 1 μg mL⁻¹ DiO 染料 (500 μL) 及 0.5 μg mL⁻¹ 尼罗红溶液 (500 μL) 进行序贯染色。首先于 37 °C 避光条件下进行 DiO 染色 (30 min),随后通过超速离心 (100 000 r min⁻¹, 4 °C, 60 min) 去除未结合染料,沉淀重悬后与尼罗红溶液共孵育 (25 °C, 避光, 20 min) 完成脂质染色。使用的激光共聚焦显微镜 (Confocal laser scanning microscopy, CLSM) 进行多通道图像采集: DiO 以 488 nm 激发波长激发,在 525 nm 发射波长收集;尼罗红在 552 nm 激发,发射检测范围调整为 635 nm^[18]。

1.3.10 EV/TPP@FUC 的体外模拟消化

在人工胃液 (Simulated gastric fluid, SGF)、人工小肠液 (Simulated intestinal fluid, SIF) 和人工结肠液 (Simulated colonic fluid, SCF) 中监测所得 EV 中 FUC 的释放能力。操作方法为,将 3.5 mg 所制样品置于 15 mL 的 SGF 中混合,在 37 °C 的恒温振荡器中孵育 1 h。然后将消化后的混合物分成三等份,分别加入 15 mL 的 SGF、SIF 和 SCF 中,使用 37 °C 的振荡水浴连续搅拌 (150 r min⁻¹) 分别在 2、4、6 h 取样。样品在 4 °C 下以 10 000 r min⁻¹ 离心 10 min 去除沉淀^[19]。收集上清液,使用酶标仪在 450 nm 处测定 FUC 含量的吸光值。FUC 释放量 (Release rate, R) 的计算如式。

$$R/\% = \frac{M_1}{M_2} \times 100\% \tag{2}$$

式中:

R——为岩藻黄质在模拟消化后的释放量, %;

M_2 ——为体外模拟消化前的 FUC 剩余量;

M_1 ——为体外模拟消化后的 FUC 剩余量。

1.4 数据处理

所有实验均重复进行三次,取平均值。本实验中所有实验数据通过 Excel 整理;采用 Origin 2026 软件进行统计分析,并通过单因素方差分析检验数据间差异的显著性,并进行图表绘制;响应面实验数据采用 Design-Expert 13 软件处理分析。

2 结果与讨论

2.1 EV 的蛋白印迹分析

图 1 展示了 *Pt* 来源样品的蛋白印迹结果及灰度定量分析,用于评估所分离颗粒是否具有 EV 特征。WB 结果显示,泳道中四种蛋白条带分子量分别为,CD9 约 25 kDa, CD63 约 25~30 kDa, CD81 约 25 kDa, TSG101 约 45~55 kDa。CD9、CD63 和 CD81 均属于跨膜四蛋白家族,广泛富集于 EV 膜结构中,是 EV 最常用的膜标志蛋白。TSG101 参与多囊泡体(MVB)形成和内体分选,是 EV 生物发生的关键蛋白^[20],其在 EV 中的富集进一步支持样品来源于内体途径形成的囊泡结构。同时,内参蛋白 β -Actin 在约 42 kDa 处检测到清晰且均一的条带,表明各泳道上样量一致,灰度定量结果可靠。以 β -Actin 为内参进行归一化后的灰度值定量分析显示,CD9 约 6.7×10^4 , CD63 约 6.0×10^4 , TSG101 约 6.2×10^4 , CD81 约 3.1×10^4 。整体灰度分布显示 CD9、CD63 和 TSG101 明显富集,CD81 信号稳定可检测,符合典型 EV 蛋白组模式。膜蛋白(CD9、CD63、CD81)反映囊泡膜结构,ESCRT 相关蛋白(TSG101)反映内体来源,这种组合检测可从结构和生物发生机制两层面验证样品性质,提高鉴定可靠性。

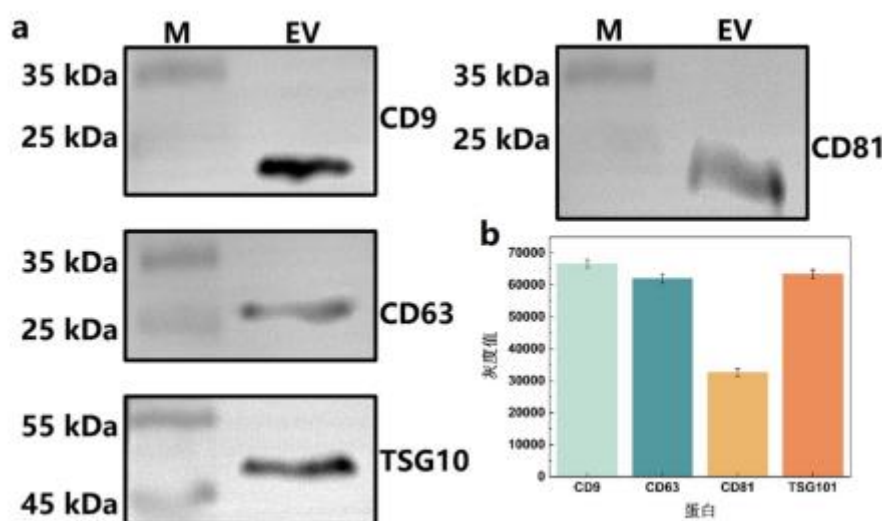


图 1 蛋白印迹表征

Fig.1 Western blot characterization

注: a 蛋白印迹条带。分别为 CD9、CD63、TSG101 和 CD81; b 蛋白印迹条带灰度值

2.2 EV 的理化特性及形貌表征

2.2.1 纳米颗粒跟踪分析

纳米颗粒追踪分析(Nanoparticle Tracking Analysis, NTA)可以精确反映样品中纳米颗粒的粒径分布和浓度,是判定样品是否为 EV 的关键理化指标。图 2A 中样品的 NTA 曲线显示主峰位于 100~150 nm 范围,且粒径分布主要集中在该区间。在临床和基础研究中, EV 通常显示出的粒径集中于 30~150 nm^[21]。此外, NTA 还提供颗粒浓度信息,以 particles mL^{-1} 为单位,图 2A 中样品浓度峰值约每毫升 10^9 个,与典型生物样品中 EV 丰度一致,说明样品中绝大多数颗粒为生物来源囊泡,而非低浓度非生物颗粒或污染物。NTA 可显示样品中次级峰值,用于识

别不同 EV 或微囊泡亚群,但图 2A 主峰清晰、未见明显次峰,说明分离颗粒主要为 EV 级纳米囊泡且样品纯度较高。结合粒径集中范围和高浓度峰值,NTA 数据表明样品主要由纳米级囊泡构成,符合 EV 物理分类标准,为后续 TEM 形态分析和分子标志物鉴定提供了可靠的定量依据,是确认样品具有 EV 物理特征的重要证据。

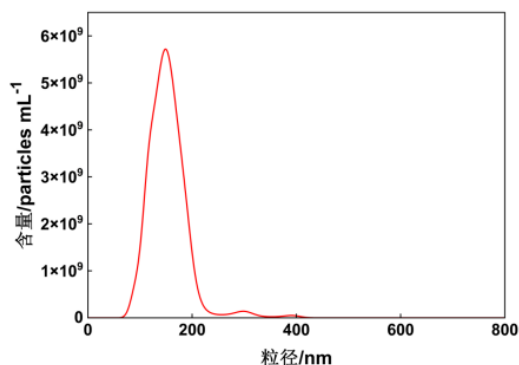


图 2 *Pt.* EV 的纳米颗粒跟踪分析

Fig.2 Nanoparticle tracking analysis of *Pt.*EV

2.2.2 透射电镜分析

TEM 在 EV 领域的应用已经被广泛验证,它能够显示 EV 的双层膜结构和典型形态特征,并被用于区分纳米囊泡与非囊泡杂质^[22]。EV 的典型微观形态通常呈现圆形或接近圆形的膜状结构,有时在样品制备和负染色下可见略微凹陷(cup-shaped)的轮廓。TEM 图像可直接验证是否存在具备脂质膜边缘的纳米囊泡,例如在肿瘤组织衍生 EV 的研究中,使用 TEM 图像确认了样品中存在典型的纳米级囊泡结构,并将这些结构与 NTA 的粒径分布联系起来^[23],以确保物理和形态证据的一致性。TEM 图像在图 3a 中显示粒子具有明显的圆形(或近圆形)边缘,这与 EV 结构一致,而非无规则颗粒或沉积物。从图 3b 中可观察到,TEM 所见的膜状结构表明这些粒子不是简单的蛋白质聚集体或非囊泡纳米颗粒,而是具有某种类型的脂质膜边界。

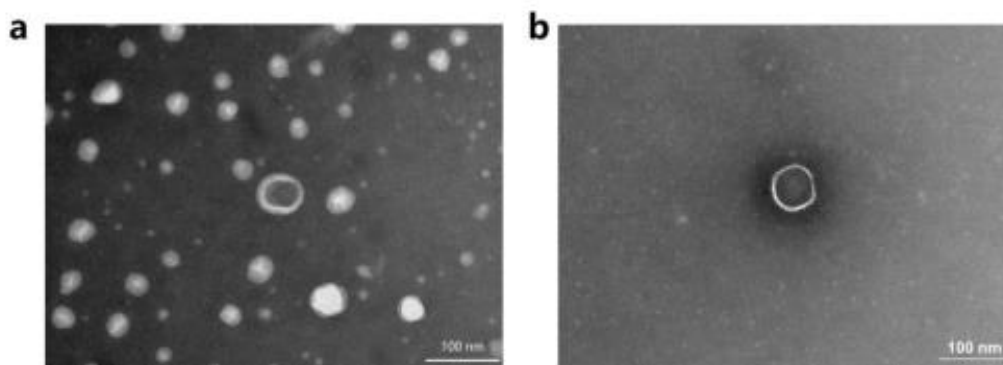


图 3 *Pt.* EV 的透射电镜图

Fig.3 Transmission electron microscope image of *Pt.*EV

注: a 多视野图; b 单个图。

2.3 单因素试验分析

2.3.1 岩藻黄质浓度对 EV/TPP@FUC 制备的影响

根据 1.3.3 中 EV/TPP@FUC 的制备方法,分别配置浓度为 60、72、84、96、108、120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的 FUC 溶液,加入 TPP 溶液,使其与 FUC 质量比(m/V)为 2,在旋转速度 110 000 r min^{-1} ,离心时间 80 min 的超速离心下制备纳米粒子,测定其粒径、zeta 电位、包埋率和透过率,结果如图 4 所示。

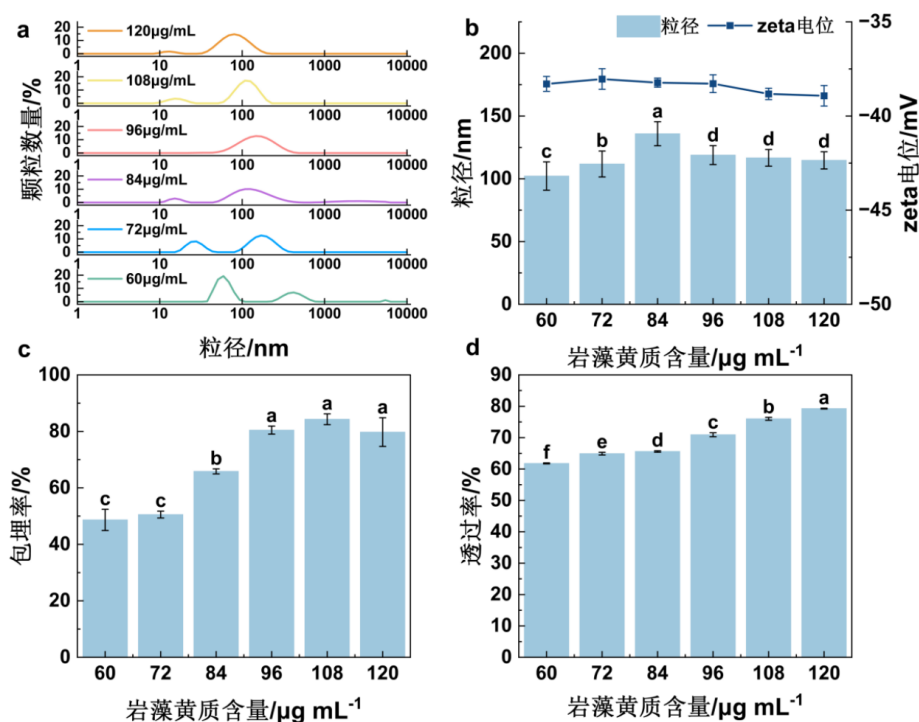


图4 岩藻黄质浓度对EV/TPP@FUC的影响

Fig.4 The effects of fucoxanthin concentration on EV/TPP@FUC

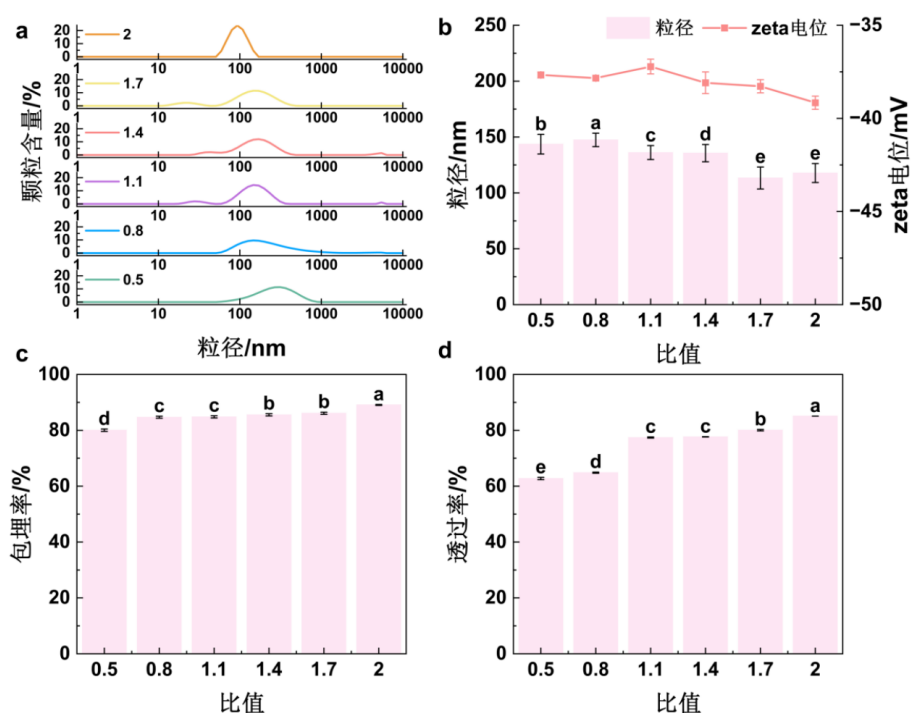
注: a 粒径分布; b 粒径与电位; c 包埋率; d 透过率的影响。同一组中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下图同。

由图 4a 可知, EV/TPP@FUC 的粒径分布主要分布于 120 nm 左右, 其中在 FUC 浓度为 $96 \mu\text{g mL}^{-1}$ 时呈单峰分布, 表明 EV/TPP@FUC 的均匀性极佳。除 FUC 浓度为 60 和 $72 \mu\text{g mL}^{-1}$ 外, 其他浓度的 EV/TPP@FUC 均存在主要峰, 表明样品的均匀性较好。由图 4b 可知, EV/TPP@FUC 的粒径随 FUC 浓度的增大首先快速增加, 在浓度 $84 \mu\text{g mL}^{-1}$ 时达到最大, 随后趋于稳定, 表明在 FUC 浓度为 $96 \mu\text{g mL}^{-1}$ 时, FUC 已与 Pt.EV 充分混合, 继续增大浓度只能分散在水溶液中而无法形成更多的 EV 纳米颗粒。zeta 电位代表分散介质与粒子表面 Stern 层之间的电势差^[24]。更高的 zeta 点绝对值能够增加纳米粒子之间的静电斥力, 从而增强分散系统的物理稳定性。zeta 点位的绝对值在 FUC 浓度增加的过程中并未出现明显变化。这是由于 FUC 本身作为类胡萝卜素化合物不带固定电荷^[25], 其浓度的增加对体系中携带的电荷数量影响不大, 导致 zeta 电位的绝对值没有明显变化。由图 4c 可知, EV/TPP@FUC 的包埋率 (Encapsulation efficiency) 随着 FUC 浓度的增大而增大, 在 FUC 浓度为 $108 \mu\text{g mL}^{-1}$ 时达到最大, 此时包埋率达到 84.29%。由图 4d 可知, EV/TPP@FUC 的透过率 (Transmittance, T) 在 FUC 浓度为 $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ 时最大, 此时透过率为 79.25%。因此, 通过单因素实验确定 FUC 的较优浓度范围为 $96 \sim 120 \mu\text{g mL}^{-1}$ 。

2.3.2 岩藻黄质与磷酸三苯酯的质量比对 EV/TPP@FUC 制备的影响

根据 1.3.3 中 EV/TPP@FUC 的制备方法, 分别配置 TPP 与 FUC 质量比 (m/V) 为 0.5、0.8、1.1、1.4、1.7、2 的溶液, 在 FUC 浓度为 $96 \mu\text{g mL}^{-1}$, 旋转速度 $110\,000 \text{ r min}^{-1}$, 离心时间 80 min 的超速离心下制备纳米粒子, 测定其粒径、zeta 电位、包埋率和透过率, 结果如图 5 所示。

由图 5a 可知, EV/TPP@FUC 的粒径分布基本上均为单峰, 表明 EV/TPP@FUC 的均匀性较好。当 TPP 与 FUC 质量比为 2 时, 粒径分布最集中。质量比过低, 如 0.5~1.1 时, 粒径增大且分布宽泛, 这可能是由于过少的 TPP 影响了 EV 膜的稳定性, 导致粒子聚集, 从而影响粒径的均一性^[26]。由图 5b 可知, 质量比的变化对粒子表面电荷影响不大。EV/TPP@FUC 的包埋率和透过率随质量比的增大而逐渐增加, 且在质量比为 1.4 后趋于稳定, 包埋率和透过率均在 2 时达到最大, 分别为 89.09% 和 85.08%。有研究表明, TPP 与壁材的离子基团结合后, 更大的浓度会表现出较慢的初期释放, 之后释放进入更平稳的阶段, 进而 TPP 直接影响微球的膨胀比和药物释放特性^[27]。透过率的增加也表明, 适量的 TPP 有助于提高 EV 的稳定性, 进而提高 Pt.EV 和 FUC 的分子间吸引力。因此, 通过单因素实验确定 EV@FUC 中 TPP 与 FUC 的较优浓度范围为 1.4~2。

图5 磷酸三苯酯与 FUC 质量比 (m/V) 对 EV/TPP@FUC 的影响Fig.5 The effects of the mass ratio (m/V) of EV@FUC triphenylphosphine to fucoxanthine

注: a 粒径分布; b 粒径与电位; c 包埋率; d 透过率的影响。

2.3.3 超离时间对 EV/TPP@FUC 制备的影响

根据 1.3.3 中 EV/TPP@FUC 的制备方法, 在 FUC 浓度为 $96 \mu\text{g mL}^{-1}$, 旋转速度 $110\,000 \text{ r min}^{-1}$, TPP 与 FUC 质量比 (m/V) 为 0.5 的条件下, 分别调整超离时间为 40、60、80、100、120 min 的离心条件下制备纳米粒子, 测定其粒径、zeta 电位、包埋率和透过率, 结果如图 6 所示。

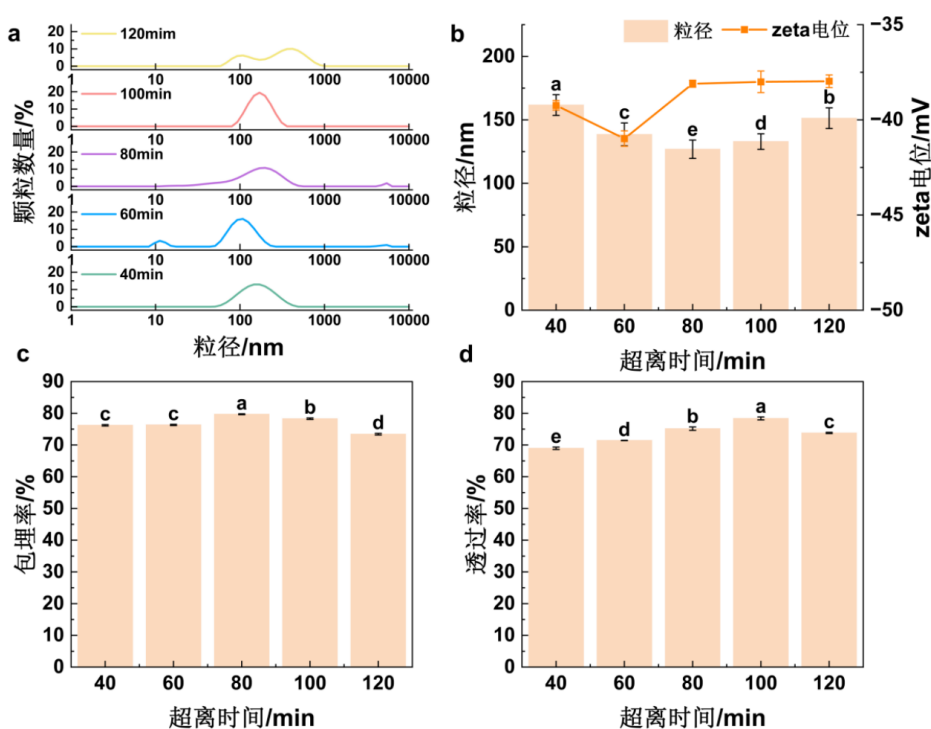


图6 超离时间对 EV/TPP@FUC 的影响

Fig.6 The effects of ultracentrifugation time on EV/TPP@FUC

注: a 粒径分布; b 粒径与电位; c 包埋率; d 透过率。

EV/TPP@FUC 的包埋率和透过率随超速离心时间的增大呈现出先增大后减小大的趋势。在超离时间为 40 min 时, 由于离心时间较短, EV 的分离效果较差, 导致粒径较大且分布较宽, 表明粒子之间存在较大的尺寸差异。随着超离时间的进一步延长, 粒子的分散度逐渐提高, 但当超离时间达到 120 min 时, 粒子的粒径变大, 这表明部分粒子可能发生了聚集或沉淀, 进而影响了粒子分布的均匀性。这与粒径分布中出现的双峰分布及峰值滞后的结果一致。进一步表明过短的超离时间可能导致粒子的聚集或分散不充分、FUC 未能充分包埋, 而过长的超离时间可能会导致载体的结构损伤, 即破坏 EV 膜, 影响包埋率和透过率^[28]。在不同超离时间下, zeta 电位维持在较为稳定的范围内, 这表明超离时间的变化并未显著改变粒子的电荷分布。超离时间的变化对粒子的电荷状态影响较小, 主要通过改变粒子的分散度和 EV 膜的稳定性来调节包埋率和透过率。因此, 通过单因素实验确定超速离心时间的较优范围为 60~100 min。

2.3.4 超离转速对 EV/TPP@FUC 制备的影响

根据 1.3.3 中 EV/TPP@FUC 的制备方法, 在 FUC 浓度为 $96 \mu\text{g mL}^{-1}$, TPP 与 FUC 质量比 (m/V) 为 0.5, 超离时间为 80 min 的条件下, 分别调整超离速度为 100 000、105 000、110 000、115 000、120 000 r min^{-1} 的离心条件下制备纳米粒子, 测定其粒径、zeta 电位、包埋率和透过率, 结果如图 7 所示。

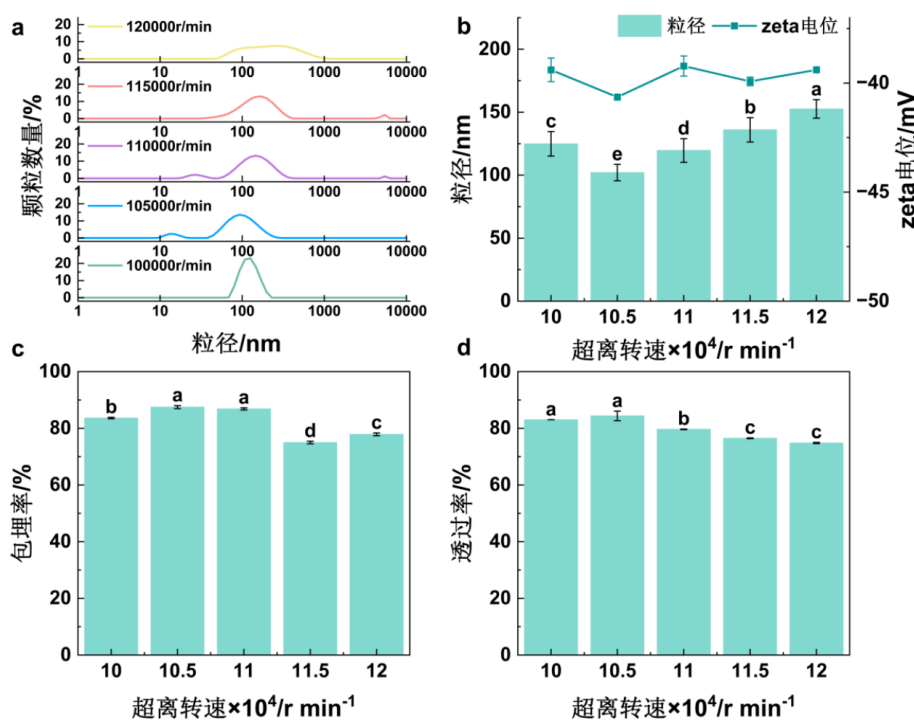


图 7 超离速度对 EV/TPP@FUC 的影响

Fig.7 The influence of ultracentrifugation speed on EV/TPP@FUC

注: a 粒径分布; b 粒径与电位; c 包埋率; d 透过率的影响。

由图 7a 可知, 随着超速离心旋转速度的增加, 粒子的均匀性和稳定性逐步提高, 这是因为较高的超离转速能够有效地增强离心力, 进而增加粒子间的剪切力, 从而促进 EV 纳米粒子的均匀分散。但当超离转速过高时会产生巨大的能量, 可能会破坏 EV 的结构, 导致其内部所包埋的 FUC 泄露, 粒径增大且分布不均匀。由图 7b 可知, 制备过程中超离转速对 EV/TPP@FUC 的 zeta 电位无明显影响, 无论超离转速如何变化, zeta 电位都能维持在相对稳定的范围。zeta 电位的稳定性可以作为判断 EV 纳米粒子稳定性的一项重要指标。由图 7c 和 d 可知, EV 纳米粒子的包埋率和透过率随超离转速的提高而先增大后减小, 在 105 000 r min^{-1} 时达到最大, 分别为 87.49% 和 84.38%。这可能是因为一定范围内, 较高的超离转速能够增大剪切力, 使得 EV 纳米粒子和尺寸更加细小、均匀, 有助于生物活性物质的包埋过程。因此, 通过单因素实验确定超速离心旋转速度的较优范围为 100 000~110 000 r min^{-1} 。

2.4 Box-Behnken 响应面分析

根据单因素实验结果确定了四因素三水平 Box-Behnken 响应面实验的中心点, 利用 Design-Expert 13 软件设计的 29 组实验如表 2 所示。其中选择 FUC 浓度 (X_1)、TPP 与 FUC 质量比 (X_2)、超离时间 (X_3)、超离转速 (X_4) 作为自变量, EV/TPP@FUC 的; 粒径 (Y_1)、包埋率 (Y_2)、透过率 (Y_3) 作为响应值。其中 X_2 的 1 ~ 3 分别为 1.4、1.7、2。

表 2 Box-Behnken 响应面实验设计方案及结果

Table 2 Experimental design and results of Box-Behnken response surface							
Run	因素水平				响应值		
	X_1	X_2	X_3	X_4	粒径/nm	包埋率/%	透过率/%
1	108	2	105 000	80	140	86.96	90.59
2	108	1	110 000	80	137.2	79.84	78.42
3	108	2	105 000	80	141.2	83.31	89.44
4	108	2	100 000	60	138.2	78.65	83.58
5	96	2	110 000	80	138	78.95	83.63
6	108	2	105 000	80	141.3	84.98	88.23
7	120	2	105 000	60	137.7	77.55	79.52
8	120	1	105 000	80	137.1	76.48	82.65
9	108	3	110 000	80	137.4	76.40	79.74
10	108	3	105 000	100	137.9	78.27	81.71
11	108	3	105 000	60	137.6	77.71	82.04
12	96	1	105 000	80	137.7	81.00	78.36
13	108	1	100 000	80	137.2	77.92	80.52
14	108	2	110 000	100	137.5	77.71	82.76
15	96	2	100 000	80	137.5	77.30	81.92
16	96	3	105 000	80	137.3	77.67	84.14
17	96	2	105 000	60	138	79.13	79.50
18	96	2	105 000	100	137.9	79.30	82.03
19	120	3	105 000	80	137.6	79.49	77.66
20	108	3	100 000	80	137.7	78.43	81.06
21	108	2	100 000	100	136.6	75.33	79.64
22	120	2	110 000	80	136	75.14	80.11
23	120	2	105 000	100	137.4	78.16	78.92
24	108	2	110 000	60	136.7	76.80	80.51
25	108	2	105 000	80	141.8	82.84	87.60
26	108	2	105 000	80	140.5	83.48	89.58
27	120	2	100 000	80	136.6	76.99	79.80
28	108	1	105 000	100	137.2	77.31	81.61
29	108	1	105 000	60	137.7	77.72	80.35

2.4.1 粒径回归模型拟合与方差分析

通过对表 2 中粒径与各因素间进行回归拟合, 得到二次多项式回归模型方程:

$$Y_1=140.96-0.333\ 3X_1+0.116\ 7X_2-0.083\ 3X_3-0.116\ 7X_4+0.225\ 0X_1X_2-0.275\ 0X_1X_3-0.050\ 0X_1X_4-0.075\ 0X_2X_3+0.200\ 0X_2X_4+0.600\ 0X_3X_4-1.78X_1^2-1.68X_2^2-2.06X_3^2-1.58X_4^2$$
。对此回归模型的方差分析如表 3 所示。

表 3 粒径二次模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance of the quadratic model of particle size						
模型	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
X_1	1.33	1	1.33	5.50	0.034 3	*

X ₂	0.16	1	0.16	0.67	0.425 7	—
X ₃	0.08	1	0.08	0.34	0.567 2	—
X ₄	0.16	1	0.16	0.67	0.425 7	—
X ₁₂	0.20	1	0.20	0.84	0.376 4	—
X ₁₃	0.30	1	0.30	1.25	0.283 0	—
X ₁₄	0.01	1	0.01	0.04	0.842 0	—
X ₂₃	0.02	1	0.02	0.09	0.765 2	—
X ₂₄	0.16	1	0.16	0.66	0.430 4	—
X ₃₄	1.44	1	1.44	5.93	0.028 8	*
X ₁ ²	20.65	1	20.65	85.10	<0.000 1	**
X ₂ ²	18.40	1	18.40	75.82	<0.000 1	**
X ₃ ²	27.50	1	27.50	113.35	<0.000 1	**
X ₄ ²	16.28	1	16.28	67.09	<0.000 1	**
模型	57.20	14	4.09	16.84	<0.000 1	**
残差	16.28	1	16.28	67.09	<0.000 1	
失拟项	3.40	14	0.24			—
纯误差	1.38	10	0.14	0.28	0.955 4	
总相关系数	2.01	4	0.50			

$R^2=0.943\ 9$; $R^2_{Adj}=0.887\ 9$; $R^2_{Pre}=0.816\ 5$; C.V.%=0.356 9

注：*表示差异显著（ $P<0.05$ ）、**表示差异极显著（ $P<0.01$ ）。下表同。

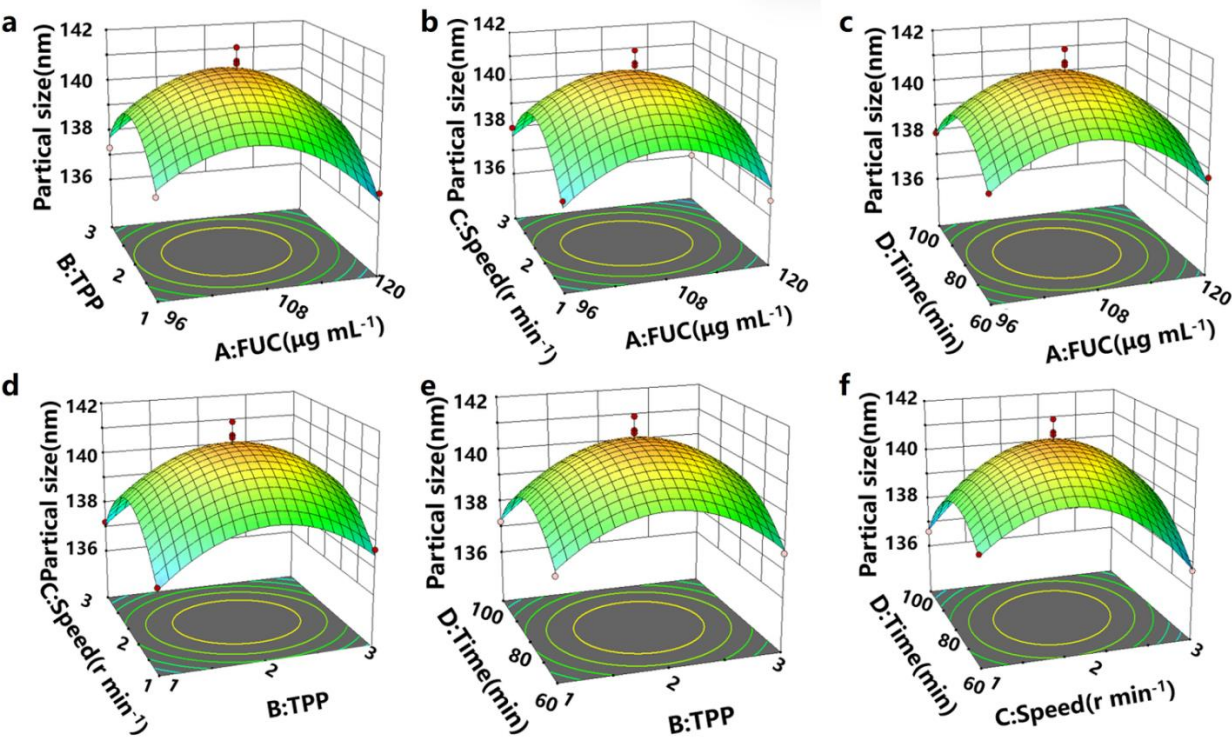


图 8 不同因素对 EV/TPP@FUC 粒径的响应面图

Fig.8 Response surface plots of the effects of different factors on the particle size of EV/TPP@FUC

注：a 岩藻黄质和磷酸三苯酯与岩藻黄质质量比、b 岩藻黄质与超离转速（其中，超离转速指标刻度 1 为 100 000 r min⁻¹；3 为 110 000 r min⁻¹）、c 岩藻黄质与超离时间、d 磷酸三苯酯与岩藻黄质质量比和超离转速、e 磷酸三苯酯与岩藻黄质质量比和超离时间、f 超离转速和超离时间。

模型的 F 值为 16.28、P 值<0.000 1，说明模型极显著，具有统计学意义。失拟项 P 值为 0.242 6（>0.05），表

明实验误差不显著,模型的残差均由随机误差引起,符合实际情况。回归模型的绝对系数 R^2 、矫正决定系数 R^2_{Adj} 和预测决定系数 R^2_{Pre} 分别为 0.943 9、0.887 9 和 0.816 5, 决定系数 0.356 9%, 小于 15%, 说明变异程度较小、可信度高。在该模型中 X_1 , 交叉项 X_{34} , 二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 对粒径有显著影响 ($P<0.05$)。F 值表示各因素对响应值的影响程度, 各因素对粒径影响大小的顺序为: FUC 浓度>TPP 与 FUC 质量比>超离转速>超离时间。综上, 所构建的回归模型能够较为准确地反映各影响因素与粒径之间的实际关联, 因此可以通过此模型对 EV/TPP@FUC 的制备条件进行有效预测。

根据上述回归模型, 四个因素之间的交互作用对粒径影响的 3D 响应面图和等高线图如图 8 所示。在 3D 响应面图中, 若某因素的曲线越陡峭, 表明对该因素变化对响应值的影响更显著。响应面显示存在最优区间。四个因素的等高线图呈椭圆形, 表明各因素之间存在交互作用。因为适当浓度的 FUC 被包埋会与 EV 纳米粒子相应融合, 更多的 FUC 会导致纳米粒子沉积, 因此 FUC 浓度对粒径的影响最为显著。其中 EV 纳米系统构建时的超离时间和超离转速的交互作用最大, 这与方差分析结果一致。这表明制备条件与 FUC 的相互作用对 EV 纳米粒子结构的形成和粒径的精确控制至关重要。

2.4.2 包埋率回归模型拟合与方差分析

通过对表 3 中包埋率与各因素间进行回归拟合, 得到二次多项式回归模型方程: $Y_2=84.31-0.794\ 9X_1-0.191\ 0X_2+0.019\ 9X_3-0.123\ 4X_4+1.58X_1X_2-0.875\ 6X_1X_3+0.109\ 2X_1X_4-0.987\ 8X_2X_3+0.2451X_2X_4+1.06X_3X_4-2.90X_1^2-2.76X_2^2-3.86X_3^2-3.34X_4^2$ 。对此回归模型的方差分析如表 4 所示。

表 4 包埋率二次模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance of the quadratic model of Encapsulation efficiency						
模型	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
X_1	7.58	1	7.58	5.75	0.031 0	*
X_2	0.44	1	0.44	0.33	0.573 6	—
X_3	0.01	1	0.01	0.01	0.953 1	—
X_4	0.18	1	0.18	0.14	0.715 3	—
X_{12}	10.00	1	10.00	7.59	0.015 5	*
X_{13}	3.07	1	3.07	2.33	0.149 5	—
X_{14}	0.05	1	0.05	0.04	0.851 9	—
X_{23}	3.90	1	3.90	2.96	0.107 3	—
X_{24}	0.24	1	0.24	0.18	0.675 9	—
X_{34}	4.46	1	4.46	3.39	0.087 0	—
X_1^2	54.47	1	54.47	41.32	<0.000 1	**
X_2^2	49.47	1	49.47	37.53	<0.000 1	**
X_3^2	96.66	1	96.66	73.33	<0.000 1	**
X_4^2	72.22	1	72.22	54.79	<0.000 1	**
模型	206.82	14	14.77	11.21	<0.000 1	**
残差	18.45	14	1.32			
失拟项	7.17	10	0.72	0.25	0.964 1	—
纯误差	11.28	4	2.82			
总相关系数	217.96	28				

$R^2=0.918\ 1$; $R^2_{Adj}=0.836\ 2$; $R^2_{Pre}=0.738\ 4$; C.V.%=1.45

模型的 F 值为 11.21、P 值<0.000 1, 说明模型极显著, 具有统计学意义。失拟项 P 值为 0.964 1 (>0.05), 表明实验误差不显著,模型的残差均由随机误差引起,符合实际情况。回归模型的绝对系数 R^2 、矫正决定系数 R^2_{Adj} 和预测决定系数 R^2_{Pre} 分别为 0.918 1、0.836 2 和 0.738 4, C.V.%为 1.45%, 小于 15%, 说明变异程度较小、可信度高。在该模型中 X_1 , 交叉项 X_{12} , 二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 对包埋率有显著影响 ($P<0.05$)。F 值表示各因素对响应值的影响程度, 各因素对包埋率影响大小的顺序为: FUC 浓度>TPP 与 FUC 质量比>超离转速>超离时间。综

上，所构建的回归模型能够较为准确地反映各影响因素与包埋率之间的实际关联，因此可以通过此模型对 EV/TPP@FUC 的制备条件进行有效预测。

根据上述回归模型，四个因素之间的交互作用对包埋率影响的 3D 响应面图和等高线图如图 9 所示。在 3D 响应面图中，若某因素的曲线越陡峭，表明对该因素变化对响应值的影响更显著。开口向下的 3D 响应面图说明包埋率存在最大值。四个因素的等高线图呈椭圆形，表明各因素之间存在交互作用。因为 FUC 的浓度与 EV 纳米粒子的包埋效果直接相关，待 EV 纳米粒子与 FUC 的配比间达成平衡时，包埋率无法再增高。FUC 及其与 TPP 质量比的相互作用是影响包埋率的关键因素。

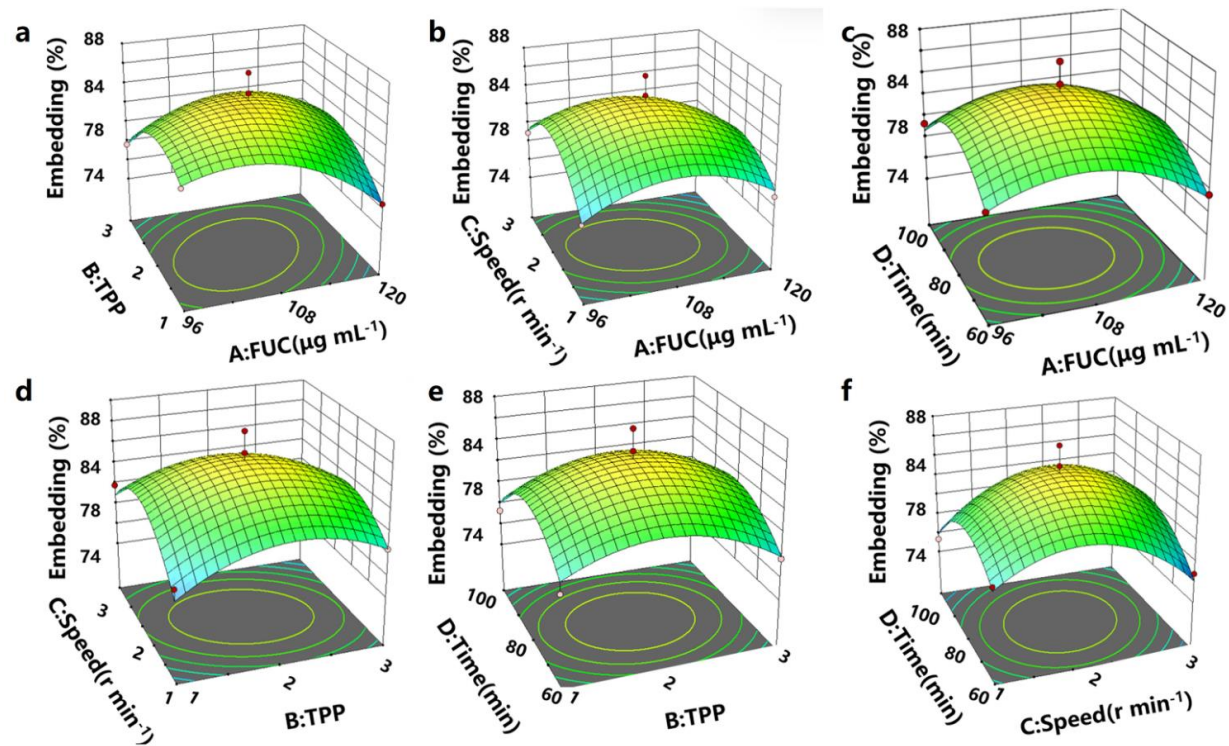


图 9 不同因素对 EV/TPP@FUC 包埋率的响应面图

Fig.9 Response surface plots of the effects of different factors on the EV/TPP@FUC Encapsulation efficiency

注：a 岩藻黄质和磷酸三苯酯与岩藻黄质质量比；b 岩藻黄质与超离转速（其中，超离转速指标刻度 1 为 100 000 r min⁻¹；3 为 110 000 r min⁻¹）；c 岩藻黄质与超离时间；d 磷酸三苯酯与岩藻黄质质量比和超离转速；e 磷酸三苯酯与岩藻黄质质量比和超离时间；f 超离转速和超离时间。

2.4.3 透过率回归模型拟合与方差分析

通过对表 4 中透过率与各因素间进行回归拟合，得到二次多项式回归模型方程： $Y_3=89.09-0.909\ 1X_1+0.368\ 6X_2-0.114\ 2X_3+0.097\ 8X_4-2.69X_1X_2-0.348\ 0X_1X_3-0.782\ 7X_1X_4+0.195\ 1X_2X_3-0.399\ 6X_2X_4+1.55X_3X_4-4.35X_1^2-4.35X_2^2-3.92X_3^2-3.86X_4^2$ 。对此回归模型的方差分析如表 5 所示。

表 5 透过率二次模型的方差分析

Table 5 Analysis of variance of the quadratic model of transmittance						
模型	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
X ₁	9.92	1	9.92	6.20	0.025 9	*
X ₂	1.63	1	1.63	1.02	0.329 8	—
X ₃	0.16	1	0.16	0.10	0.759 0	—
X ₄	0.12	1	0.12	0.07	0.792 6	—
X ₁₂	29.02	1	29.02	18.15	0.000 8	**
X ₁₃	0.48	1	0.48	0.30	0.590 7	—
X ₁₄	2.45	1	2.45	1.53	0.236 1	—
X ₂₃	0.15	1	0.15	0.10	0.762 2	—

X_{24}	0.64	1	0.64	0.40	0.537 6	—
X_{34}	9.56	1	9.56	5.98	0.028 3	*
X_1^2	122.96	1	122.96	76.90	<0.000 1	**
X_2^2	123.01	1	123.01	76.93	<0.000 1	**
X_3^2	99.85	1	99.85	62.45	<0.000 1	**
X_4^2	96.85	1	96.85	60.57	<0.000 1	**
模型	337.35	14	24.01	15.07	<0.000 1	**
残差	22.39	14	1.60			
失拟项	16.79	10	1.68	1.20	0.465 7	—
纯误差	5.59	4	1.40			
总相关系数	359.74	28				

$R^2=0.937\ 8$; $R^2_{Adj}=0.875\ 5$; $R^2_{Pre}=0.706\ 8$; C.V.%=1.54

模型的 F 值为 15.07、P 值<0.000 1，说明模型极显著，具有统计学意义。失拟项 P 值为 0.465 7 (>0.05)，表明实验误差不显著，模型的残差均由随机误差引起，符合实际情况。回归模型的绝对系数 R^2 、矫正决定系数 R^2_{Adj} 和预测决定系数 R^2_{Pre} 分别为 0.937 8、0.875 5 和 0.706 8，C.V.%为 1.54%，小于 15%，说明变异程度较小、可信度高。在该模型中 X_1 ，交叉项 X_{12} ，二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 对透过率有显著影响 ($P<0.05$)。F 值表示各因素对响应值的影响程度，各因素对透过率影响大小的顺序为：FUC 浓度>TPP 与 FUC 质量比>超离时间>超离转速。综上，所构建的回归模型能够较为准确地反映各影响因素与透过率之间的实际关联，因此可以通过此模型对 EV/TPP@FUC 的制备条件进行有效预测。

根据上述回归模型，四个因素之间的交互作用对透过率影响的 3D 响应面图和等高线图如图 10 所示。在 3D 响应面图中，若某因素的曲线越陡峭，表明对该因素变化对响应值的影响更显著。开口向下的 3D 响应面图说明透过率存在最大值。四个因素的等高线图呈椭圆形，表明各因素之间存在交互作用。FUC 和 TPP 与 FUC 的质量比会影响 EV 纳米粒子的均匀性和稳定性，影响纳米粒子的分散性。由于透过率主要受到壁材和芯材添加量的影响，故超离时间和超离转速对其影响较小。

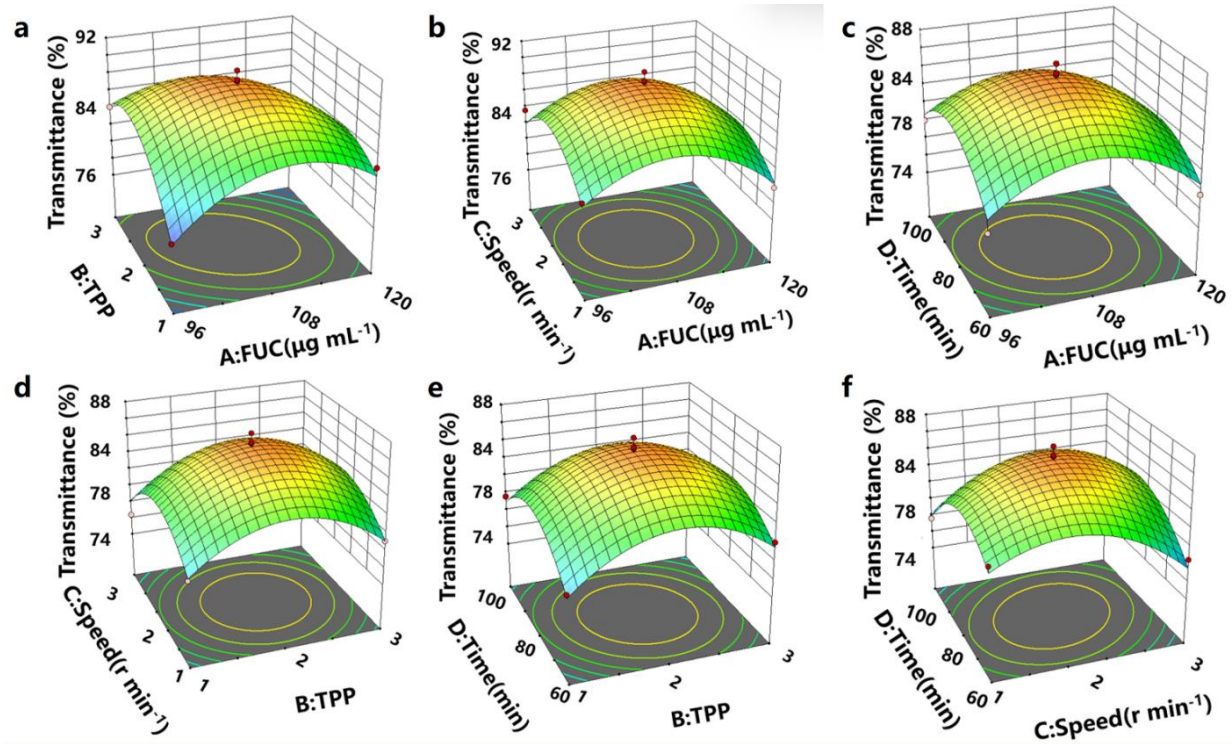


图 10 不同因素对 EV/TPP@FUC 透过率的响应面图

Fig.10 Response surface plots of different factors on the transmittance of EV/TPP@FUC

注: a 岩藻黄质和磷酸三苯酯与岩藻黄质质量比; b 岩藻黄质与超离转速 (其中, 超离转速指标刻度 1 为 $100\ 000\ \text{r min}^{-1}$; 3 为 $110\ 000\ \text{r min}^{-1}$); c 岩藻黄质与超离时间; d 磷酸三苯酯与岩藻黄质质量比和超离转速; e 磷酸三苯酯与岩藻黄质质量比和超离时间; f 超离转速和超离时间。

2.5 优化条件预测与验证

基于对最小粒径、最大包埋率和最大透过率的目标期望, 使用 Design-Expert 13 软件的数值优化方法获得最佳制备参数: FUC 浓度 $108\ \mu\text{g mL}^{-1}$, TPP 与 FUC 质量比 1.7, 超离时间 97 min, 超离速度 $108\ 000\ \text{r min}^{-1}$ 。预测的粒径、包埋率和透过率分别为 140 nm、82.13%和 86.44%。在最佳制备条件下进行的验证实验结果显示, 三个响应值的实测值分别为 142.51 nm、78.97%和 85.25%, 与模型预测值之间的偏差分别为 1.09%、3.85%和 1.38%, 均在 5%以内, 有力地验证了模型的有效性和实验的可重复性。响应量的实验值与预测值之间的线性关系如图 11 所示, 进一步证明了实验结果与预测值基本一致。

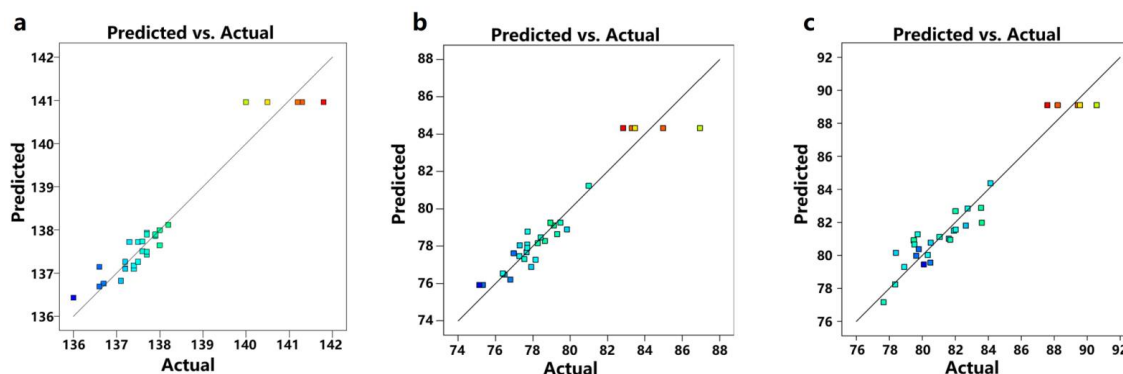


图 11 预测值和实际值之间的线性相关图

Fig.11 Linear correlation plots between the predicted and actual values

注: a 粒径、b 包埋率和 c 透过率。

2.6 粒径与电位分析

图 12 表明, EV 的平均粒径约为 115 nm, 处于典型细小 EV 尺度范围内。该结果说明所分离的 Pt.EV 在粒径特征上符合 EV 的一般定义。在负载 FUC 后, EV@FUC 的粒径增大至 137 nm。该变化表明负载过程未破坏 EV 结构完整性, 而是增加了颗粒的水合层或界面附着层厚度。EV/TPP@FUC 的粒径继续增加至约 143 nm, 但增幅有限, 说明 TPP 引入未诱导明显聚集, 而是在 EV@FUC 基础上形成稳定界面层。zeta 电位结果进一步支持上述判断。EV 电位约为 -32 mV, 负载 FUC 后下降至约 -36 mV, 进一步修饰后达到约 -38 mV, 呈现连续负移趋势。EV 表面负电性来源于磷脂及吸附分子, 其电位变化反映界面组成重构^[29]。负电位绝对值增大意味着颗粒间静电斥力增强, 从而提高胶体稳定性。此外, zeta 电位易受介质条件影响, 包括 pH 值、离子强度及吸附层结构。因此, 本结果应被理解为体系在特定测试条件下的相对变化, 而非绝对电性表征。尽管如此, 三组样品电位绝对值均超过 30 mV, 结合粒径维持在 100~150 nm 范围, 可判断体系具备较好的胶体稳定性。

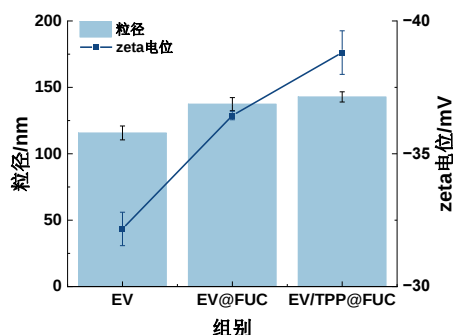


图 12 FUC、EV、EV@FUC 和 EV/TPP@FUC 纳米颗粒的粒径与电位图

Fig.12 Particle size and potential plots of FUC, EV, EV@FUC and EV/TPP@FUC nanoparticles

2.7 傅里叶红外变换光谱分析

通过傅里叶红外变换光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 对 FUC、EV、EV@FUC 以及 EV/TPP@FUC 纳米颗粒的分子化学特征进行了系统比较。FUC 样品在约 $3\ 000\sim 2\ 850\text{ cm}^{-1}$ 区域出现明显吸收峰, 对应 $-\text{CH}_3$ 与 $-\text{CH}_2$ 的伸缩振动, 反映其长链疏水碳骨架特征。在 $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ 附近可观察到中等强度吸收峰, 可能归属于共轭 $\text{C}=\text{O}$ 或 $\text{C}=\text{C}$ 振动, 体现类胡萝卜素结构中多烯链与含氧基团的特征。此外, 在较低波数区域 (约 $1\ 100\text{ cm}^{-1}$ 附近) 存在弱吸收, 可归因于 $\text{C}-\text{O}$ 振动, 这一谱学特征与类胡萝卜素分子结构相一致^[30]。EV 样品的 FTIR 光谱主要揭示蛋白质及脂类基团特征, 约 $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰归属于酰胺 I 带中 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动, 反映蛋白质主链结构的存在^[31]。而 $2\ 800\sim 3\ 000\text{ cm}^{-1}$ 区间呈现弱而不显著的 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动, 对应脂类及其他组织成分, 可视为未修饰 EV 的化学特征基线。该体系中并未出现新的共价键特征峰, 说明 FUC 可能主要通过非共价作用 (如疏水相互作用、 $\pi-\pi$ 堆积或范德华力) 嵌入或吸附于 EV 膜结构中, 而非形成化学键合。

在 EV/TPP@FUC 体系中, FTIR 谱图进一步发生变化。与 EV@FUC 相比, 在 $2\ 900\sim 2\ 950\text{ cm}^{-1}$ 区间出现更为清晰的 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩吸收峰, 这表征有机芳基或烷基链振动, 符合 TPP 相关有机结构的振动特征^[32], 这一吸收模式在纳米体系中被用于确认含芳基或有机修饰的存在。尽管针对 TPP 分子本体的 FTIR 数据在本研究中无法完全复现, 但已有利用 FTIR 确认 TPP 类修饰纳米粒子的文献表明, TPP 引入体系后在 $1\ 600\sim 1\ 100\text{ cm}^{-1}$ 区间呈现特征性振动信号, 且在 $3\ 000\text{ cm}^{-1}$ 附近的 $\text{C}-\text{H}$ 振动更为显著, 这与本研究 EV/TPP@FUC 的特征变化一致^[33]。FTIR 分析不仅证实了 FUC 与 EV 的成功复合, 还提示了 TPP 可能在复合体系中的存在, 为纳米系统的结构特性、药物递送功能及后续功能评价提供了分子级证据。通过对不同纳米颗粒的 FTIR 特征进行对比分析, 可以明确各组分在复合体系中的保留情况及化学稳定性, 为理解纳米载体的装载效率、分子结构完整性及功能化修饰提供了可靠依据。

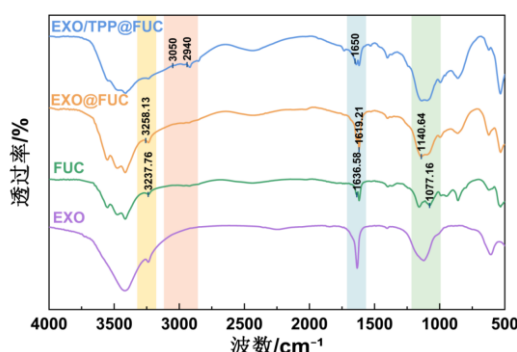


图 13 FUC、EV、EV@FUC 和 EV/TPP@FUC 纳米颗粒的傅里叶红外变换光谱图

Fig.13 Fourier transform infrared spectra of FUC, EV, EV@FUC and EV/TPP@FUC nanoparticles

2.8 形貌分析

2.8.1 透射电镜分析

TEM 图像可提供纳米颗粒的二维形貌、尺寸及结构完整性信息, 是验证 EV 及其功能化纳米载体的重要工具。未修饰 EV (图 14a) 在负染 TEM 中呈典型“杯状”或环形结构, 边缘暗、内部略浅, 颗粒直径约 $80\sim 120\text{ nm}$ 。这一“杯状”形态是 EV 在负染 TEM 中的经典表征, 反映其脂质双层膜形成的自然收缩效应, 同时显示颗粒内部均质性。功能化修饰的 EV@FUC (图 14b) 仍保持完整膜结构, 但边缘呈现低对比度模糊环, 其对膜边缘轮廓的影响可间接反映修饰层的存在。复合修饰的 EV/TPP@FUC (图 14c) 显示颗粒仍为完整膜囊泡, 边缘对比明显且粒径略减少。该现象可能表明 TPP 复合修饰未破坏囊泡结构, 反而通过分子间相互作用增强表面层密实性, 使膜边缘在负染 TEM 下更清晰。这种结构变化有利于功能化纳米载体的稳定性和靶向性能, 表明多层复合修饰在保持纳米囊泡完整性的同时, 可调控表面形态。

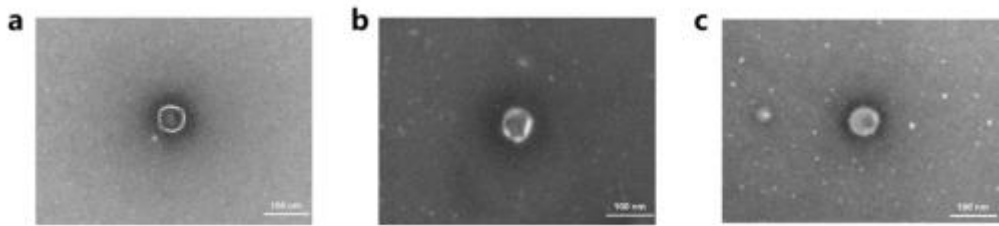


图 14 EV、EV@FUC、EV/TPP@FUC 纳米颗粒的透射电子显微镜图像

Fig.14 Transmission electron microscopy images of EV, EV@FUC, EV/TPP@FUC nanoparticles

2.8.2 激光共聚焦显微镜分析

图 15 显示了 EV@DiO-Nile Red 与 EV/TPP@DiO-Nile Red 纳米颗粒的激光共聚焦显微镜成像结果，用于评估纳米载体膜标记的有效性和修饰对膜环境的影响。实验中采用尼罗红（Nile Red）与 DiO 双荧光标记策略，其中尼罗红为环境敏感性亲脂性染料，优先嵌入脂质双层膜，在低极性环境中发射强荧光，而在水相中荧光弱；DiO 作为常用膜亲和性探针，可嵌入膜脂层并提供绿色荧光信号^[34]。在 EV@DiO-Nile Red 样本中，单通道图像显示红色（Nile Red）与绿色（DiO）点状荧光分布均匀，合并（Merge）通道呈黄色重叠信号，可能表明两种荧光信号在 EV 膜附近高度共定位，验证了标记的特异性和膜嵌入的有效性。结果显示，尼罗红能稳定结合于 EV 膜脂双层，并与 DiO 信号高度一致，排除了游离染料或非特异性荧光的干扰。与未修饰 EV 相比，EV/TPP@DiO-Nile Red 的荧光点密度显著增加，Merge 通道中的黄色共定位区域更均匀且亮度增强，提示 TPP 修饰改善了膜环境对尼罗红的亲和性和荧光稳定性。TPP 分子可能通过疏水相互作用，使膜脂双层局部环境极性降低，从而增强尼罗红的量子产率和荧光响应^[35]。TPP 修饰未破坏 EV 膜完整性，而是使表面层排列更加紧凑均匀，为荧光染料提供了稳定的嵌入位点，从而在共聚焦成像中呈现高强度和高密度信号。

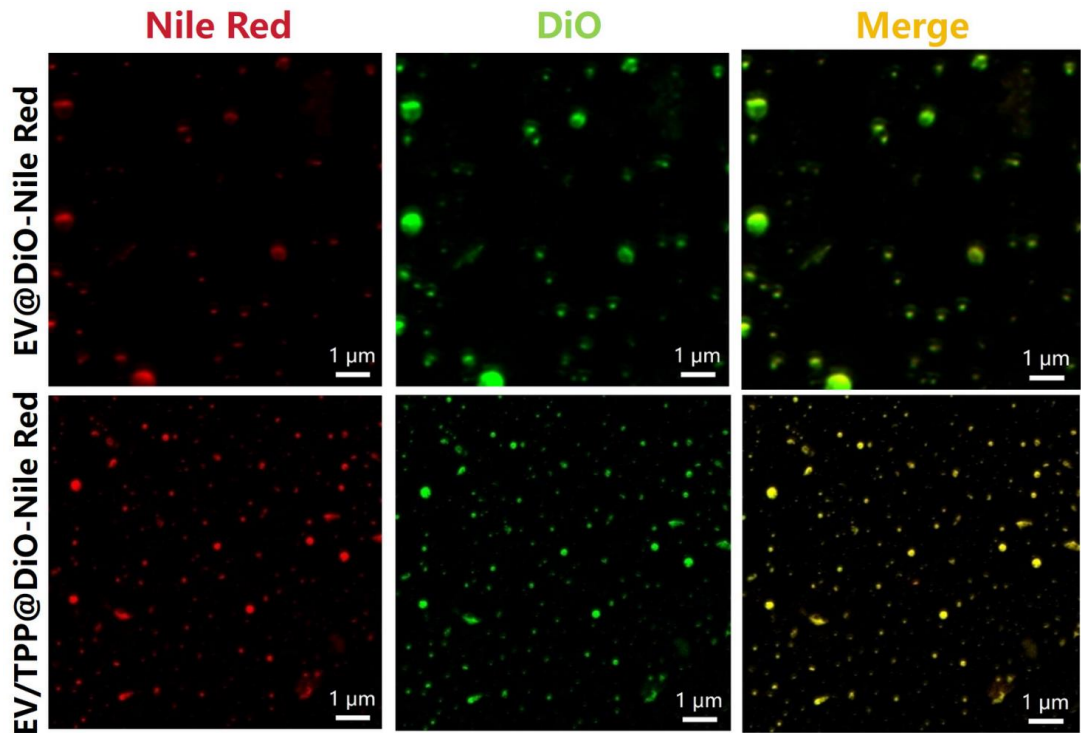


图 15 EV@DiO-Nile Red 和 EV/TPP@DiO-Nile Red 的激光共聚焦图像

Fig.15 Laser confocal images of EV@DiO-Nile Red and EV/TPP@DiO-Nile Red

2.9 体外模拟消化分析

图 16 表征了不同模拟环境中的平行释放比较游离 FUC、EV@FUC 及 EV/TPP@FUC 体系的释放行为及结构演变特征。结果显示，该体系在消化过程中呈现出显著的阶段性释放规律。图 16a 和 b 供了模拟消化各阶段的形态变化，图 16c 进一步定量展示了释放曲线。游离 FUC 本体在整个 8 h 过程中释放比例始终较低，2 h 后趋于平

缓,表明其在模拟消化液中扩散能力有限,难以实现持续释放。EV@FUC 与 EV/TPP@FUC 体系表现出明显不同的释放模式。在胃段,两者释放速率较低,未出现显著突释;进入肠段及结肠段后,释放速率显著提高,8 h 累计释放量均高于游离体系,其中 EV/TPP@FUC 最高, FUC 释放率接近 80%。该差异说明 EV 包载可显著改变 FUC 的释放路径。EV 包载后,脂质双层首先提供了酸性屏障,减少胃段突释,待进入中性或弱碱环境后膜结构逐渐松弛,促进内容物外扩^[36]。响应面显示存在最优区间, EV/TPP@FUC 在胃段释放受限,进入肠段和结肠段后释放增加,说明 TPP 修饰可能增强了体系前期稳定性,并使其在后续模拟消化环境中表现出更明显的阶段性释放。TEM 结果为上述释放曲线提供了形貌证据。EV@FUC 在 2 h 时仍保持较规则的近球形边界(图 d), 4 h 后周围出现明显模糊晕圈与伴随小颗粒(图 e), 6 h 和 8 h 时转变为不规则团聚/塌陷结构(图 f、g); EV/TPP@FUC 在 2 h 同样保持完整颗粒(图 h), 4 h 仍可辨识主体轮廓(图 i), 至 6 h 和 8 h 虽出现局部崩解与不规则化(图 j、k), 但整体上解体过程较 EV@FUC 更滞后,提示 TPP 参与后提高了结构抗消化扰动能力。该现象与文献中关于 EV 口服稳定性的认识一致。牛乳来源 EV 可耐受消化环境并跨越肠上皮,其膜结构在模拟肠液处理后仍保持较好的转运能力^[37]。

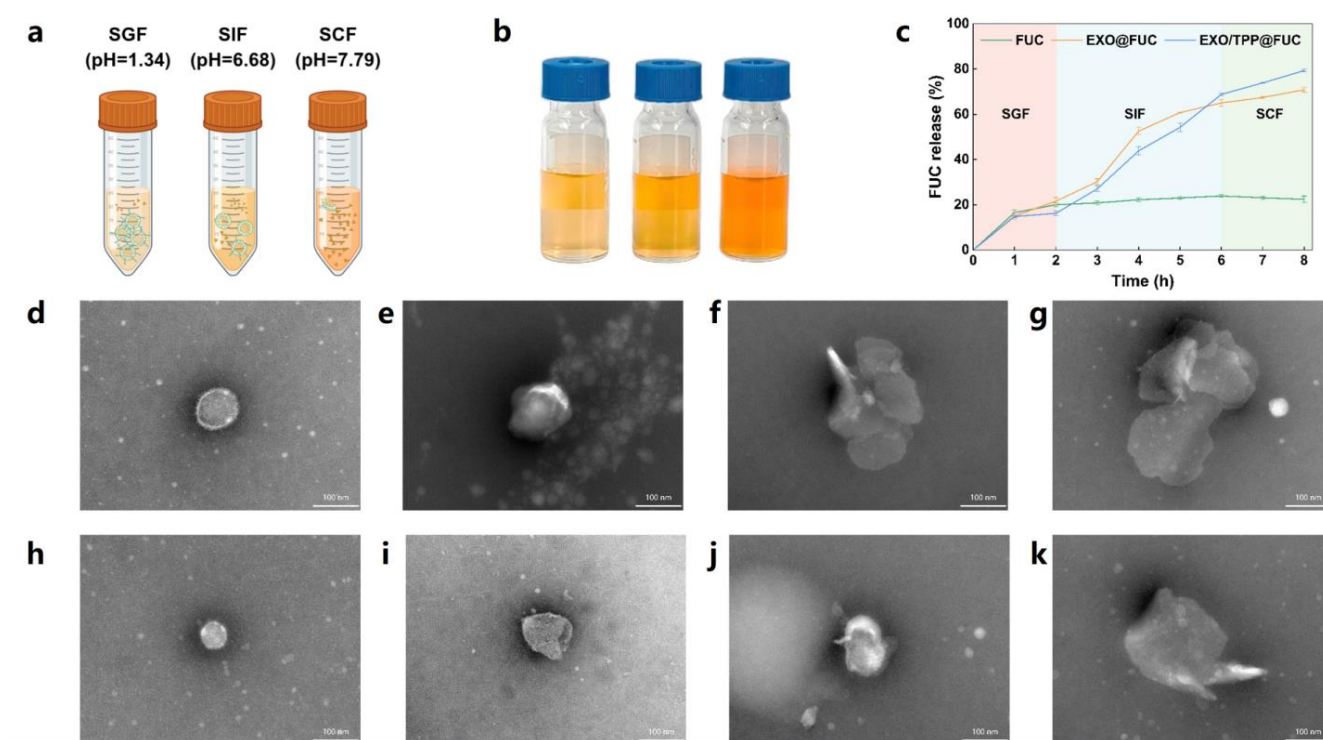


图 16 FUC、EV@FUC、EV/TPP@FUC 纳米颗粒的体外胃肠道消化释放模拟图

Fig.16 Simulation of *in vitro* gastrointestinal digestion and release of FUC, EV@FUC, EV/TPP@FUC nanoparticles

注: aFUC、EV@FUC、EV/TPP@FUC 纳米颗粒分别在胃道、肠道、结肠道消化液中的释放模拟图 bFUC、EV@FUC、EV/TPP@FUC 纳米颗粒分别在胃道、肠道、结肠道消化液中的实物图; cFUC、EV@FUC、EV/TPP@FUC 纳米颗粒在模拟胃肠道内的 FUC 释放量; (D-G) EV@FUC 在 2、4、6、8 h 的透射电镜图; (H-K) EV/TPP@FUC 在 2、4、6、8 h 的透射电镜图。

3 结论

本研究构建了基于 *Pt* 细胞外囊泡的 EV/TPP@FUC 纳米递送体系,并系统分析了其结构特性及消化行为。通过单因素与响应面优化,确定了最佳制备条件为 FUC 浓度 $108 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、TPP 与 FUC 质量比 1.7、超离时间 97 min 及超离速度 $108\,000 \text{ r min}^{-1}$ 。结构表征结果表明, EV 能够有效负载 FUC 且维持典型囊泡结构, TPP 修饰进一步增强了体系的界面稳定性并提高了胶体分散性;所构建纳米体系粒径约 140 nm,包埋率和透过率均处于较高水平。体外消化研究表明, EV/TPP@FUC 体系体系在模拟胃肠环境中表现出阶段性释放差异,胃段释放较低、肠段和结肠段增加,有效提升了 FUC 在消化过程中的稳定性与释放效率。消化实验结果进一步说明,该递送体系能够提高 FUC 在胃肠环境中的保留与利用潜力。本研究通过构建天然来源的功能化纳米递送体系,不仅改善了岩藻黄质的稳定性与递送性能,也为微藻活性物质的高值化利用提供了新的思路。

参考文献

- [1] BUDIARSO FS, LEONG YK, CHANG JJ, et al. Current advances in microalgae-based fucoxanthin production and downstream processes [J]. *Bioresource Technology*, 2025, 428: 132455.
- [2] RUIZ JS, OLIVIERI G, DE VREE J, et al. Towards industrial products from microalgae [J]. *Energy & Environmental Science*, 2016, 9(10): 3036-3043.
- [3] LEE N, YOUN K, YOON JH, et al. The Role of Fucoxanthin as a Potent Nrf2 Activator via Akt/GSK-3 β /Fyn Axis against Amyloid- β Peptide-Induced Oxidative Damage [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(3): 629.
- [4] ZHAO D, YU D, KIM M, et al. Effects of temperature, light, and pH on the stability of fucoxanthin in an oil-in-water emulsion [J]. *Food Chemistry*, 2019, 291: 87-93.
- [5] FERNANDES V, MAMATHA BS. Fucoxanthin, a Functional Food Ingredient: Challenges in Bioavailability [J]. *Current Nutrition Reports*, 2023, 12(4): 567-580.
- [6] YAO T, DONG X, WANG X, et al. Engineering exosomes for mRNA delivery: a review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 316: 144662.
- [7] SCHWARZ G, REN X, XIE W, et al. Engineered exosomes: a promising drug delivery platform with therapeutic potential [J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2025, 12: 1583992.
- [8] PICCIOTTO S, BARONE ME, FIERLI D, et al. Isolation of Extracellular Vesicles from Microalgae: Towards the Production of Sustainable and Natural Nanocarriers of Bioactive Compounds [J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(8): 2917-2930.
- [9] WANG S, WU S, YANG G, et al. A Review on the Progress, Challenges and Prospects in Commercializing Microalgal Fucoxanthin [J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 53: 107865.
- [10] 欧阳贵锦,王海燕,杨沈涛,等.来源于裂壶藻渣的外泌体制备、鉴定及其抗黑色素生成功效初探[J].厦门大学学报(自然科学版),2024,63(5):972-977.
- [11] TIAN F, LIU J, WANG P, et al. Engineering *Phaeodactylum tricornutum* exosomes to enhance intracellular fucoxanthin delivery [J]. *Food Bioscience*, 2024, 59: 104164.
- [12] CAO C, WANG Y, DENG X, et al. Exosomes containing miR-152-3p targeting FGFR3 mediate SLC7A7-induced angiogenesis in bladder cancer [J]. *npj Precision Oncology*, 2025, 9(1): 71.
- [13] RAO H, CHEN F, LIN L, et al. Construction of galangin-loaded soy extract nanoparticles using pH-driven method: Process optimization, stability evaluation, and structure characterization [J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 145: 109155.
- [14] JI Y, HAN C, LIU E, et al. Pickering emulsions stabilized by pea protein isolate-chitosan nanoparticles: fabrication, characterization and delivery EPA for digestion *in vitro* and *in vivo* [J]. *Food Chemistry*, 2022, 378: 132090.
- [15] GUO Y, WANG H, MA L, et al. Construction of glycosylated zein-based colloids to simultaneously improve fucoxanthin's thermal processing adaptability, digestive stability, and oral bioavailability [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2025, 245: 114334.
- [16] WANG L, WEI Z, XUE C, et al. Fucoxanthin-loaded nanoparticles composed of gliadin and chondroitin sulfate: Synthesis, characterization and stability [J]. *Food Chemistry*, 2022, 379: 132163.
- [17] RICHA R, ROY CHOUDHURY A. Exploration of polysaccharide based nanoemulsions for stabilization and entrapment of curcumin [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 156: 1287-1296.
- [18] DONG R, HUANG Z, MA W, et al. Fabrication of nanocomplexes for anthocyanins delivery by ovalbumin and differently dense sulphate half-ester polysaccharides nanocarriers: Enhanced stability, bio-accessibility, and antioxidant properties [J]. *Food Chemistry*, 2024, 432: 137263.
- [19] 赵雪.越橘花色苷稳态化载体的构建及靶向递送研究[D].大连:大连工业大学,2021.
- [20] LEE YJ, SHIN KJ, CHAE YC. Regulation of cargo selection in exosome biogenesis and its biomedical applications in cancer [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2024, 56(4): 877-889.
- [21] CHEN YF, LUH F, HO YS, et al. Exosomes: a review of biologic function, diagnostic and targeted therapy applications, and clinical trials [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2024, 31(1): 67.
- [22] WEISS A, MEISSNER AF, BOROS FARA, et al. Transmission Electron Microscopy-based characterization of Extracellular Vesicles

- from plasma and serum from Parkinson's Disease patients [J]. *Cell Communication and Signaling*, 2025, 23(1): 395.
- [23] MARJANI AA, NADER ND, AGHANEJAD A. Exosomes as targeted diagnostic biomarkers: Recent studies and trends [J]. *Life Sciences*, 2024, 354: 122985.
- [24] GE Q, RONG S, YIN C, et al. Calcium ions induced ι-carrageenan-based gel-coating deposited on zein nanoparticles for encapsulating the curcumin [J]. *Food Chemistry*, 2024, 434: 137488.
- [25] NOGUEIRA PCA, BOMBARDA-ROCHA VRA, TAVARES-HENRIQUES R, et al. Structure Meets Function: Dissecting Fucoxanthin's Bioactive Architecture [J]. *Marine Drugs*, 2025, 23(11): 440.
- [26] RÁZGA F, VNUKOVÁ D, NÉMETHOVÁ V, et al. Preparation of chitosan-TPP sub-micron particles: Critical evaluation and derived recommendations [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 151: 488-499.
- [27] GUO Y, DING L, LANG X, et al. Dual-targeting chemoimmunotherapy co-delivery system based on self-assembly and core-shell structure [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2025, 188: 118156.
- [28] ZENG L, WANG H, SHI W, et al. Aloe derived nanovesicle as a functional carrier for indocyanine green encapsulation and phototherapy [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 439.
- [29] SENTIS MPL, FELTIN N, LAMBENG N, et al. Investigation of nanoparticle dispersibility and stability based on TiO₂ analysis by SMLS, DLS, and SEM [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2024, 26(3): 55.
- [30] LU Y, JIN J, YANG Y, et al. Royal jelly exosomes as a stable and bioavailable carrier for fucoxanthin: A novel approach for antimelanoma therapy [J]. *Food Bioscience*, 2025, 71: 107118.
- [31] CHIANG KY, MATSUMURA F, YU CC, et al. True Origin of Amide I Shifts Observed in Protein Spectra Obtained with Sum Frequency Generation Spectroscopy [J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2023, 14(21): 4949-4954.
- [32] PUHAN D, CASFORD MTL, DAVIES PB. Evaluation of Structural and Compositional Changes of a Model Monoaromatic Hydrocarbon in a Benchtop Hydrocracker Using GC, FTIR, and NMR Spectroscopy [J]. *ACS Omega*, 2023, 8(39): 35988-36000.
- [33] VINITA NM, DEVAN U, DURGADEVI S, et al. Triphenylphosphonium conjugated gold nanotriangles impact Pi3K/AKT pathway in breast cancer cells: a photodynamic therapy approach [J]. *Scientific reports*, 2023, 13(1): 2230.
- [34] SCHNITZLER JG, BERNELOT MOENS SJ, TIESENS F, et al. Nile Red Quantifier: a novel and quantitative tool to study lipid accumulation in patient-derived circulating monocytes using confocal microscopy [J]. *Journal of lipid research*, 2017, 58(11): 2210-2219.
- [35] SACKETT DL, WOLFF J. Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces [J]. *Analytical biochemistry*, 1987, 167(2): 228-234.
- [36] DAI C, XU Q, LI L, et al. Milk Extracellular Vesicles: Natural Nanoparticles for Enhancing Oral Drug Delivery against Bacterial Infections [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2024, 10(4): 1988-2000.
- [37] ZHANG Y, BELAID M, LUO X, et al. Probing milk extracellular vesicles for intestinal delivery of RNA therapies [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 406.