

茶多酚/壳聚糖/海藻酸钠纳米微球的制备

陆敏¹, 王利强^{1,2}

(1.江南大学, 无锡 214122; 2.江苏省食品先进制造装备技术重点实验室, 无锡 214122)

摘要:目的 探讨各因素对制备茶多酚/壳聚糖/海藻酸钠纳米微球载药率、包埋率的影响, 研究纳米微球体外释放行为, 为后期缓释抗菌膜的制备提供基础。方法 采用单因素实验、正交实验考察海藻酸钠溶液浓度、壳聚糖溶液浓度、CaCl₂ 溶液浓度、茶多酚溶液浓度对纳米微粒载药率、包封率的影响, 并考察其体外释放率。结果 当海藻酸钠溶液、壳聚糖溶液、CaCl₂ 溶液、茶多酚溶液的质量浓度分别为 15, 10, 15, 0.8 mg/mL 时, 该工艺条件下制备的纳米微粒载药率为 22.71%, 包封率为 61.38%, 且粒径集中在 500 nm 左右, 有较好的缓释效果。结论 所得的最佳工艺制备条件为后期做缓释抗菌膜打下良好基础。
关键词: 茶多酚/壳聚糖/海藻酸钠; 纳米微粒; 载药率; 包埋率; 体外释放率
中图分类号: TB484 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3563(2017)19-0047-05

Preparation of Polyphenols/Chitosan/Alginate Nano-microspheres

LU Min¹, WANG Li-qiang^{1,2}

(1.Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2.Jiangsu Key Laboratory of Advanced Food Manufacturing Equipment and Technology, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT: The work aims to study the effects of various factors on the loading efficiency and encapsulation efficiency of polyphenol/chitosan/alginate nano-microspheres and research the in vitro release rate of nano-microspheres, so as to provide the preliminary basis for the preparation of slow release antibacterial film at later periods. Through the single factor experiment and orthogonal test, the effects of concentration of alginate, chitosan, CaCl₂, polyphenol solutions on the loading efficiency and encapsulation efficiency of nano-particles were investigated, and the in vitro release rate was studied. When the concentrations of alginate, chitosan, CaCl₂, polyphenol solutions were 15, 10, 15 and 0.8 mg/mL, the loading efficiency of nano-particles prepared under such process condition was 22.71%, the encapsulation efficiency was 61.38% and the particle size was mainly around 500 nm; the results showed that microspheres had a good sustained release effect. The optimal process preparation conditions obtained lays a good foundation for the preparation of slow release antibacterial film at later periods.

KEY WORDS: polyphenols/chitosan/alginate; nano-microspheres; loading efficiency; encapsulation efficiency; in vitro release rate

海藻酸钠是由 β -D-甘露糖基和 α -L-葡萄糖基通过 1 $\rightarrow$ 4 糖甙链连结而成的一种线状天然高分子^[1], 它是一种水溶性阴离子多聚糖, 且能与二价阳离子 (如 Ca²⁺) 反应形成具有网状结构的凝胶来包埋抗菌剂, 抗菌剂活性在海藻酸钠纳米微球中也能得到较好

的维持^[2]。壳聚糖是一种阳离子直链多聚糖^[3], 它可通过多聚糖甲壳素脱乙酰度得到^[4], 通常采用阴离子聚合物 (如海藻酸钠) 和壳聚糖共同作为药物载体来使用^[5]。茶多酚可以作为天然食品的保鲜剂, 在抑菌抗菌方面具有广谱性, 如对粘质沙雷氏菌、大肠杆菌、

收稿日期: 2017-03-14

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (JUSRP21115); 江苏省 2015 年度普通高校研究生科研创新计划 (KYLX15_1186)

作者简介: 陆敏 (1993—), 女, 江南大学硕士生, 主攻食品包装技术。

通讯作者: 王利强 (1977—), 男, 博士, 江南大学副教授, 主要研究方向为食品包装技术。

鼠伤寒沙门氏菌等微生物具有明显的抗菌效果^[6-7]。纳米微球在载药方面应用前景广阔^[8],制备方法主要有离子凝胶法^[9]、微乳液法^[10-11]等。Körpe等^[12]通过包埋 BSA (牛血清白蛋白) 和阿霉素制备了双交联的壳聚糖-海藻酸钠纳米级的核壳结构粒子,最终测得包封率分别为 45% 和 50%。Kafshgari^[13]等利用壳聚糖和海藻酸钠接枝共聚抗性淀粉包埋抗菌剂尼生素,该抗性淀粉的载抗菌剂率及其包封率较未改性海藻酸钠有增大的趋势,尼生素与海藻酸钠的质量比越大其载抗菌剂率越低,包封率越高,水凝胶的粒径越大。

这里采用反相乳液法,以食用大豆油为油相,将表面活性剂 Tween80 和 Span80 添加到油相中,搅拌形成反向胶束。同时在搅拌条件下将含有茶多酚的海藻酸钠溶液加入反应体系,再加入氯化钙进行交联反应,进而形成茶多酚/壳聚糖/海藻酸钠纳米微球,并研究各因素对其体外释放行为的影响^[14]。

1 实验

1.1 材料与仪器

主要材料:茶多酚(食品级),郑州瑞佳食品添加剂有限公司;金龙鱼非转基因大豆油,市售;海藻酸钠(AR),壳聚糖(AR),Tween80(CP),Span80(CP),氯化钙(AR),正己烷(AR),十二水磷酸三钠(AR),二水磷酸三钠(AR),醋酸(AR),均购于国药集团化学试剂有限公司。

主要仪器:AB204-N 电子分析天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;PXR-9 高温鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;RJ-TDL-50A 低速台式大容量离心机,无锡瑞江分析仪器有限公司;SZCL-30 磁力加热搅拌器,上海标本模司;SCIENTZ-50F 冷冻干燥机,宁波新芝;KTHA-015TBS 恒温恒湿干燥箱,昆山庆声电子科技有限公司;ALPHA 布鲁克红外光谱仪,布鲁克光谱仪器公司;SM-5600LV 场发射扫描电子显微镜,日本 JEOL 公司;Zetasizer Nano ZS90 型激光粒度分析仪,英国 Malvern 公司;UV-2000 型紫外-可见光光度仪,尤尼柯(上海)仪器有限公司。

1.2 方法

1) PBS 缓冲溶液的配制。称取 5.84 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 2.27 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,分别于 250 mL 的容量瓶内用蒸馏水定容,取 85 mL 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶液和 15 mL 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液倒入 100 mL 容量瓶内,配制成 pH 值为 7.5 的 PBS 缓冲溶液。

2) 茶多酚海藻酸钠溶液的配制。称取定量的海藻酸钠粉末和茶多酚倒入装有蒸馏水的烧杯中,于水浴锅内搅拌 10 h (50 °C, 300 r/min)。

3) 壳聚糖溶液的配制。称取定量壳聚糖倒入装有体积分数为 2% 的醋酸溶液烧杯内,于水浴锅内搅拌 8 h (50 °C, 300 r/min)。

4) 纳米微球的配制。取一定量的大豆油和乳化剂于烧杯中,水浴锅内搅拌 10 min (40 °C, 400 r/min),然后加入一定量茶多酚海藻酸钠溶液,搅拌 30 min,再加入 CaCl_2 溶液搅拌乳化 3 h。反应结束后,倒入正己烷搅拌 10 min (150 r/min),静置分层。取下层乳白色乳液,加入壳聚糖醋酸水溶液,并磁力搅拌 30 min。最后离心 20 min (2000 r/min),得到纳米微球。将制得的纳米微球洗涤 2 次,冷冻干燥 (-40 °C 预冻 24 h,放入冷冻干燥机中,设置温度曲线为初始温度 -40 °C,6 h 后抽真空,以 5 °C/h 的速度增长到 35 °C,恒温 3 h),即制得茶多酚/壳聚糖/海藻酸钠纳米微球。

5) 茶多酚标准曲线的绘制。配制质量浓度分别为 10, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 100 $\mu\text{g/mL}$ 的茶多酚溶液。将其与空白样在 547 nm 处进行紫外光谱扫描,测定不同质量浓度茶多酚溶液的吸光度 (A),即得标准曲线^[15]。测得茶多酚溶液质量浓度 (ρ) 和吸光度 (A) 之间的关系,见图 1,线性回归方程为 $A=0.01395\rho+0.01167$, $R^2=0.99708$,线性较好。在后续实验中,可以通过实验测定吸光度值,并按照茶多酚溶液的标准曲线来换算茶多酚的质量浓度^[16]。

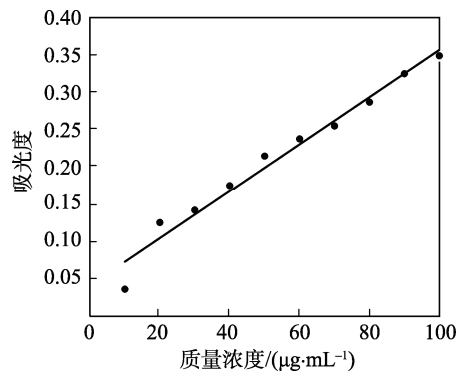


图1 茶多酚标准曲线

Fig.1 Standard curve of polyphenol solution

6) 样品溶液的制备及测定。取 30 mg 的载药微球,加入 10 mL 二氯甲烷,超声震荡处理 10 min,使茶多酚完全释放于溶液中,准确吸取 0.1 mL 上清液并用二氯甲烷定容至 10 mL,得待测溶液。用相同方式处理空白微球可得空白样。载药微球的载药率 (γ) 和包封率 (η) 的计算公式为: $\gamma = \frac{m_t}{m_n} \times 100\%$;

$\eta = \frac{m_t}{m_{at}} \times 100\%$ 。其中 m_t 为纳米粒子中茶多酚质量;
 m_n 为纳米粒子的质量; m_{at} 为实际投入茶多酚质量。

7) 体外药物释放度的测定。称取一定量纳米微粒置于装有 200 mL 的 PBS 缓冲溶液的烧杯中,并在

恒温水浴锅中振荡 (100 r/min, 37 ℃)。在不同时间点取 20 mL 溶液, 并补入等量新鲜介质, 在 547 nm 处测试样品吸光度, 同时绘制茶多酚-时间的释放动力学曲线。释放度 (θ) 的计算为: $\theta = \frac{m_s}{m} \times 100\%$ 。其中 m_s 为某时间点药物累积释放量; m 为初始微囊内理论总药量。

8) 扫描电镜测试。将纳米微粒均匀撒在导电胶上, 吹去表面的多余粉末, 喷金后在扫描电镜上进行表面形貌分析。

9) 激光粒度分析。对制备的纳米微粒微乳液进行激光粒度分析, 观察粒径分布。

2 结果与分析

2.1 单因素对纳米微球效果的影响

制备茶多酚/壳聚糖/海藻酸钠纳米微球的单因素水平实验。分别考察海藻酸钠溶液、壳聚糖溶液、CaCl₂ 溶液、茶多酚溶液质量浓度对纳米微球效果的影响。

2.1.1 海藻酸钠溶液质量浓度

分别采用 5, 10, 15, 20 mg/mL 的海藻酸钠溶液制备纳米微球, 其中壳聚糖溶液、CaCl₂ 溶液、茶多酚溶液的质量浓度分别为 20, 15, 0.8 mg/mL, 测得结果见图 2。可知, 纳米微球的载药率和包封率随着海藻酸钠质量浓度的增长呈先增长后降低的趋势, 且载药率最大值为 22.03%, 包封率最大值为 51.20%。载药率和包封率降低的原因主要是当海藻酸钠质量浓度过高时, 乳化效果变差。

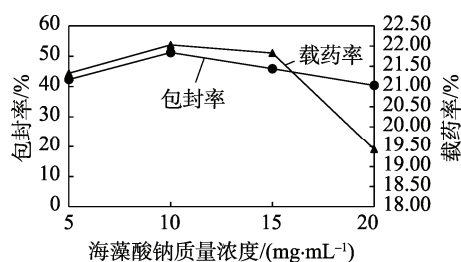


图 2 海藻酸钠溶液浓度的影响

Fig.2 The influence of alginate solution concentration

2.1.2 壳聚糖溶液质量浓度

分别采用 5, 10, 15, 20 mg/mL 的壳聚糖溶液制备纳米微球, 其中海藻酸钠溶液、CaCl₂ 溶液、茶多酚溶液的质量浓度分别为 20, 15, 0.8 mg/mL, 测得结果见图 3。纳米微球的载药率和包封率均随着壳聚糖浓度的增长呈先增长后降低的趋势, 且载药率最大值为 21.34%, 包封率最大值为 47.63%, 此时壳聚糖溶液质量浓度为 10 mg/mL。造成此结果的原因在于当壳聚糖质量浓度过高时, 与海藻酸钠发生反应的

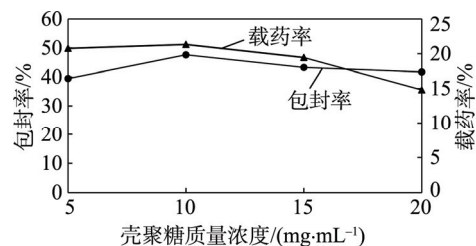


图 3 壳聚糖溶液浓度的影响

Fig.3 The influence of chitosan solution concentration

壳聚糖分子增多, 从而造成纳米微球壁厚增大, 粒径变大, 因此单位质量的纳米微球载药率和包埋率变小。

2.1.3 CaCl₂ 溶液质量浓度

分别采用 5, 10, 15, 20 mg/mL 的 CaCl₂ 溶液制备纳米微球, 其中壳聚糖溶液、海藻酸钠溶液、茶多酚溶液的质量浓度分别为 20, 20, 0.8 mg/mL, 测得结果见图 4。微球的载药率和包封率均随着 CaCl₂ 浓度的增长呈先增长后降低的趋势, 且载药率最大值为 19.78%, 包封率最大值为 47.26%, 此时壳聚糖溶液的质量浓度为 15 mg/mL。当 CaCl₂ 浓度过高时, 载药率和包封率反而降低的原因在于其与海藻酸钠溶液交联过度, 造成纳米微球孔洞过小。

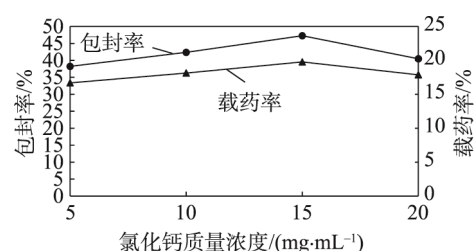


图 4 CaCl₂ 溶液浓度的影响

Fig.4 The influence of CaCl₂ solution concentration

2.1.4 茶多酚溶液质量浓度

分别采用 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL 的茶多酚溶液制备纳米微球, 其中壳聚糖溶液、海藻酸钠溶液、CaCl₂ 溶液质量浓度为 20, 20, 15 mg/mL, 测得结果见图 5。纳米微球的载药率和包封率均随着茶多酚浓度的增长呈先增长后降低的趋势, 且载药率最大值为 21.38%, 包封率最大值为 50.27%, 此时茶多酚质量浓度为 0.8 mg/mL, 造成该结果的原因可能是茶多酚浓度过高使得纳米微球空隙堵塞。

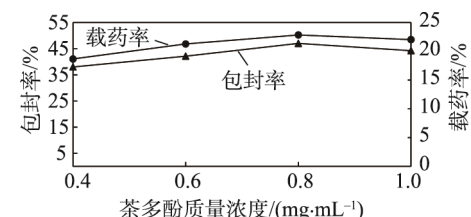


图 5 茶多酚浓度的影响

Fig.5 The influence of polyphenol concentration

2.2 正交实验结果分析

为找出纳米微粒的最佳制备条件,进行正交试验,见表1。正交试验表明,壳聚糖溶液和海藻酸钠溶液质量浓度对纳米微粒的包封率和载药率影响最大, CaCl_2 溶液质量浓度影响最小,影响程度大小依次为 $B > A > D > C$ 。由表1可知纳米微粒最优制备条件是 $A_2B_1C_3D_2$,即海藻酸钠溶液、壳聚糖溶液、 CaCl_2 溶液、茶多酚溶液质量浓度分别为15,10,15,0.8 mg/mL。

表1 正交实验水平与因素
Tab.1 Levels and factors of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	载药率/%	包封率/%
1	1	1	1	1	20.11	48.17
2	1	2	2	2	21.67	50.13
3	1	3	3	3	22.12	51.67
4	2	2	3	1	25.03	56.05
5	2	3	1	2	20.08	47.71
6	2	1	2	3	26.78	57.12
7	3	3	2	1	16.36	39.43
8	3	1	1	2	24.86	54.39
9	3	2	3	3	19.77	46.72
K_1	21.30	23.92	21.68	20.50		
K_2	23.96	22.16	21.60	22.20		
K_3	20.33	19.52	22.31	22.89		
R	3.63	4.40	0.70	2.39		

注: A 表示海藻酸钠溶液质量浓度,该列中1,2,3分别表示10,15,20 mg/mL; B 表示壳聚糖溶液质量浓度,该列中1,2,3分别表示10,15,20 mg/mL; C 表示 CaCl_2 溶液质量浓度,该列中1,2,3分别表示5,10,15 mg/mL; D 表示茶多酚溶液质量浓度,该列中1,2,3分别表示0.6,0.8,1.0 mg/mL

在最优制备条件下制得茶多酚/壳聚糖/海藻酸钠纳米微粒,得到最优工艺条件下的载药率为22.71%,包封率为61.38%。采用激光粒度分析仪对制备的纳米微球微乳液进行测定,见图6—7。可以看出,所得纳米微球的球形度较好,且粒径分布均一,集中在500 nm左右。

根据测定结果绘制释放曲线,见图8。茶多酚在3 h内的释放率达到80%,3 h后释放较缓慢,表明该纳米微粒有一定的缓释作用。药物在前3 h释放较快,主要来自于吸附在微球表面的茶多酚,随后溶剂通过微球空隙渗入球内,包封于微球中的茶多酚溶解于溶剂并从空隙中缓慢释放,从而达到缓释作用^[17]。

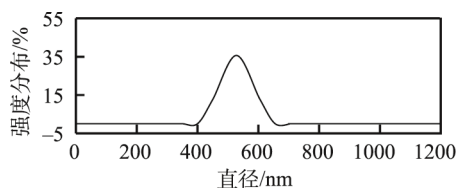


图6 纳米微球微乳液激光粒度分析
Fig.6 Laser particle size analysis of nano-microsphere and microemulsion

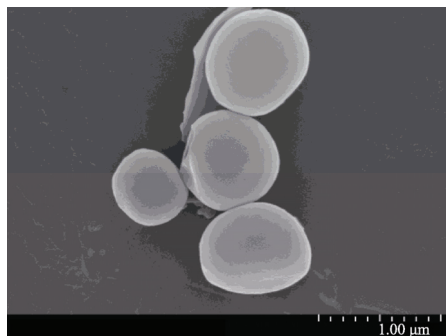


图7 纳米微球扫描电镜
Fig.7 The scanning electronic microscope of nano-microsphere

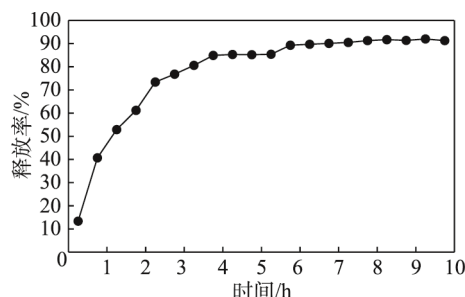


图8 累积释放量-时间的曲线
Fig.8 The cumulative release amount-time curve

3 结语

当海藻酸钠溶液、壳聚糖溶液、 CaCl_2 溶液、茶多酚溶液质量浓度为15,10,15,0.8 mg/mL时,该工艺为茶多酚/壳聚糖/海藻酸钠微球的最佳制备条件,此时载药率为22.71%,包封率为61.38%。茶多酚在3 h内释放率达到80%左右,3 h后释放较缓慢,表明该纳米微粒有一定的缓释作用。纳米微粒粒径分布均一,集中在500 nm左右,所得结果为制备缓释抗菌膜等在包装领域的应用提供前期试验的基础与参考。

参考文献:

- [1] 郝宇华,黄震,刘珈伊,等. 聚乙烯醇/海藻酸钠复合膜性能的正交优化[J]. 包装工程,2016,37(23): 39—43.
HAO Yu-hua, HUANG Zhen, LIU Jia-yi, et al. Orthogonal Optimization of Properties of Polyvinyl Alcohol/Sodium Alginate Composite Films[J]. Packaging Engineering, 2016, 37(23): 39—43.
- [2] MEERA G, ABRAHAM T E. Polyionic Hydrocolloids for the Intestinal Delivery of Protein Drugs: Alginate and Chitosan: a Review[J]. Journal of Controlled Release, 2006, 114(1): 1—14.
- [3] 欧丽娟,李立,杨辉,等. 复合壳聚糖保鲜液膜对冷鲜肉保鲜的研究[J]. 包装工程,2015,36(5): 21—25.
OU Li-juan, LI Li, YANG Hui, et al. Preservative Ef-

- fect of Treatment with Different Composite Chitosan Coatings on Storage of Chilled Beef[J]. *Packaging Engineering*, 2015, 36(5): 21—25.
- [4] PIYAKULAWAT P, PRAPHAIRAKSIT N, CHANTARASIRI N, et al. Preparation and Evaluation of Chitosan/Carrageenan Beads for Controlled Release of Sodium Diclofenac[J]. *Aaps Pharmscitech*, 2007, 8(4): 120.
- [5] 徐明悦, 李洪军, 贺稚非, 等. 玉米淀粉—壳聚糖可食膜对冷藏兔肉品质的影响[J]. *包装工程*, 2015, 36(15): 34—39.
XU Ming-yue, LI Hong-jun, HE Zhi-fei, et al. Influence of Corn Starch-chitosan Films Coating on Rabbit Meat Quality after Cold Storage[J]. *Packaging Engineering*, 2015, 36(15): 34—39.
- [6] YI S, WANG W, BAI F, et al. Antimicrobial Effect and Membrane-active Mechanism of Tea Polyphenols Against *Serratia Marcescens*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(2): 451—460.
- [7] LIANG J, LI F, FANG Y, et al. Response Surface Methodology in the Optimization of Tea Polyphenols-loaded Chitosan Nanoclusters Formulations[J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 231(6): 917—924.
- [8] 薛琼, 刘跃军, 向贤伟, 等. 肉桂精油微囊化及其在果蔬保鲜中的应用[J]. *包装工程*, 2016, 37(5): 50—54.
XUE Qiong, LIU Yue-jun, XIANG Xian-wei, et al. Microcapsulation of Cinnamon Essential Oil and Its Application in Preservation of Fruits and Vegetables[J]. *Packaging Engineering*, 2016, 37(5): 50—54.
- [9] 莫尊理, 胡葱葱, 王雅雯, 等. 抗菌材料及其抗菌机理[J]. *材料导报*, 2014, 28(1): 50—52.
MO Zun-li, HU Re-re, WANG Ya-wen, et al. Review of Antibacterial Materials and Their Mechanisms[J]. *Materials Review*, 2014, 28(1): 50—52.
- [10] 李炜罡, 吕维平, 王海滨, 等. 抗菌材料进展[J]. *化工新型材料*, 2003, 31(3): 7—10.
LI Wei-gang, LYU Wei-ping, WANG Hai-bin, et al. Progress of Antibacterial Materials[J]. *New Chemical Materials*, 2003, 31(3): 7—10.
- [11] 刘耀斌, 李彦锋, 拜永孝. 高聚物抗菌材料的研究现状及展望[J]. *材料导报*, 2010, 24(7): 123—127.
LIU Yao-bin, LI Yan-feng, BAI Yong-xiao. Research Status and Prospect of Polymeric Antimicrobial Material[J]. *Materials Review*, 2010, 24(7): 123—127.
- [12] KÖRPE D A, MALEKGHA SEMI S, AYDIN U, et al. Fabrication of Monodispersive Nanoscale Alginate-Chitosan Core-shell Particulate Systems for Controlled Release Studies[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2014, 16(12): 1—9.
- [13] KAFSHGARI M H, KHORRAM M, MANSOURI M, et al. Preparation of Alginate and Chitosan Nanoparticles Using a New Reverse Micellar System[J]. *Iranian Polymer Journal*, 2012, 21(2): 99—107.
- [14] LYN S Y, KWON Y J, JOO H J, et al. Preparation of Alginate/chitosan Microcapsules and Enteric Coated Granules of Mistletoe Lectin[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2004, 27(1): 118—126.
- [15] 孟祥, 李保国. 茶多酚微胶囊化的试验研究[J]. *茶叶科学*, 2006, 26(4): 275—279.
MENG Xiang, LI Bao-guo. Experimental Study on Microencapsulation of Tea Polyphenols[J]. *Journal of Tea Science*, 2006, 26(4): 275—279.
- [16] 陈莉敏, 李柱来, 王津. 萘普生缓释微球制备工艺及性能研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2007, 19(5): 878—880.
CHEN Li-min, LI Zhu-lai, WANG Jin. Preparation Technology and Characterization of Naproxen Microspheres[J]. *Natural Product Research & Development*, 2007, 19(5): 878—880.
- [17] 孙秋香, 肖婷. 茶叶中茶多酚的提取、测定及应用[J]. *湖北第二师范学院学报*, 2009, 26(8): 47—49.
SUN Qiu-xiang, XIAO Ting. The Extraction, Determination and Application of the Tea Polyphenols in Tea[J]. *Journal of Hubei University of Education*, 2009, 26(8): 47—49.