

自组装法制备茶多酚-明胶-壳聚糖纳米粒及其性质表征

张茵*, 孟晨, 常俊, 沙莎, 陈昊, 卢梭

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210023)

摘要 将茶多酚 (tea polyphenol, TP)、明胶 (gelatin, Gel) 和壳聚糖 (chitosan, Cs) 自组装成茶多酚纳米粒, 其中, 明胶与壳聚糖通过静电结合形成可溶性复合物, 茶多酚与糖基化修饰的明胶通过非共价键组装, 最后形成茶多酚-明胶-壳聚糖 (TP-Gel-Cs) 纳米粒。经工艺筛选, 3 种成分的最佳质量比为 1.5:3:1。对 TP-Gel-Cs 纳米粒进行理化性质、稳定性和体外释放特性评价。结果表明, TP-Gel-Cs 纳米粒内存在非共价键, 该体系能够有效包载茶多酚, 载药量为 26.82%, 包封率为 90.42%, 平均粒径为 971.50 nm, 分散指数为 0.22, 在中性条件下荷负电, 在 pH 5.4 条件下荷正电; 在室温下, 茶多酚的稳定性显著提高; TP-Gel-Cs 纳米粒呈现 pH 敏感且缓慢的体外释放特性。该制备工艺绿色、温和、简便, 可以发展为多酚类物质的纳米载药体系。

关键词 茶多酚; 明胶; 壳聚糖; 纳米粒; 自组装

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)02-0178-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140209

Preparation and characterization of a self-assembled tea polyphenol-gelatin-chitosan nanoparticles

ZHANG Yin*, MENG Chen, CHANG Jun, SHA Sha, CHEN Hao, LU Suo

College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China

Abstract A kind of self-assembled tea polyphenol (TP), gelatin (Gel) and chitosan (Cs) nanoparticles (TP-Gel-Cs) was prepared and evaluated *in vitro*. TP-Gel-Cs nanoparticles were fabricated based on an electrostatic bonding between Gel and Cs, together with a non-covalent interaction between TP and polysaccharide modified Gel. The optimal formulation of nanoparticles was a mass ratio of 1.5 : 3 : 1 for TP-Gel-Cs nanoparticles. The present experiments showed that the primary interaction existing within the TP-Gel-Cs matrix was non-covalent bond. The mean diameter of the particles was 971.50 nm with a polydispersity index of 0.22, the Zeta-potential was -10.44 mV at the neutral condition and +33.23 mV at pH 5.4. The entrapment efficiency and loading capacity of the particles were 90.42% and 26.82%, respectively. The stability of TP at 25 °C was significantly improved by formation of TP-Gel-Cs nanoparticles, the nanoparticles exhibit both pH-sensitive and controlled release properties. Taken together, the preparation process is simple, mild and green, which may be a promising method to encapsulation polyphenol substances.

Key words tea polyphenol; gelatin; chitosan; nanoparticles; self-assembly

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81172007) and the Natural Science Fund for Colleges and Universities in Jiangsu Province (No. 09KJB180002)

茶多酚 (tea polyphenol, TP) 是茶叶中多酚类物质的总称^[1]。作为一种天然的强抗氧化剂和抗菌剂, 其来源丰富且无副作用, 被广泛地应用于医药

和食品领域^[2]。但是茶多酚在强酸、强碱、光照和高热条件下不稳定, 而且在体内生物利用度也较低, 这些因素限制了茶多酚的应用^[3]。

* 收稿日期 2013-12-18 * 通信作者 Tel: 13851781540 E-mail: zhangyin@njnu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81172007); 江苏省高校自然科学基金资助项目 (No. 09KJB180002)

为了改善茶多酚的稳定性和提高其生物利用度,采用纳米包封技术是有效的方法^[4-5]。自组装是指分子在氢键、疏水作用、范德华力、静电力等非共价键作用力下,自发形成有序结构和形态的过程^[6]。这一反应可以在水环境下进行,反应温和,无需专门的设备,简便易行。反应过程中不需要添加有机溶剂和化学交联剂,反应迅速、可逆,因此是一种绿色、安全和可控的纳米包封技术。

茶多酚的多元酚羟基结构使其能够与蛋白质发生作用,形成复合物^[7],蛋白质中脯氨酸含量越高,越容易与茶多酚结合甚至沉淀析出^[8]。明胶(gelatin, Gel)来源于胶原蛋白,具有良好的生物相容性、生物可降解性和成膜性,是一种优良的药物载体,同时明胶富含脯氨酸,能够与茶多酚自组装成纳米粒^[8-11],但是两者直接形成的纳米粒子尺寸分布较广、载药量较低并且容易发生絮凝沉淀,影响应用^[12-13]。研究发现蛋白质与多糖结合之后,与茶多酚之间相互作用减弱,从而改善了纳米粒子的稳定性和均匀性,提高了其载药量^[10,14-15]。壳聚糖(chitosan, Cs)是一种碱性多糖,在弱酸性条件下,能够成为聚阳离子与B型明胶发生复合凝聚,通过静电组装的方法对明胶进行糖基化修饰^[16],而且壳聚糖无毒、无免疫原性,具有很好的生物可降解度、成膜性和黏膜黏附性,是缓释给药系统中优良的药物载体^[17]。壳聚糖与明胶结合之后不仅可以削弱明胶与茶多酚之间的强烈作用,防止纳米粒子絮凝,而且可以改善明胶的溶胀和力学性能^[18],使形成的纳米粒子具有长效缓释的功能。

本研究成功构建了新型茶多酚-明胶-壳聚糖(TP-Gel-Cs)纳米粒,制备过程温和、无毒、安全。通过对其载药工艺、理化性质、体外释放特性等进行了系统的研究。实验证明多酚类物质与多糖改性后的明胶在水溶液中可自组装成纳米粒,这为构建多酚类物质纳米载药系统提供了新方法。

1 材 料

1.1 药品与试剂

明胶(国药集团化学试剂有限公司);壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 90\%$, 国药集团化学试剂有限公司);茶多酚(南京泽郎医药科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$);溶菌酶(10 000 U/mg, 上海惠兴生化试剂有限公司);透析袋(MWCO = 12 000 ~ 14 000, 上海绿鸟科技发

展有限公司)。其余试剂均为化学纯。

1.2 仪 器

UV-5100 型紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);FA-2004 电子天平(上海精密仪器有限公司);FE20 型数字酸度计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);JY92-2D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技有限公司);GL-21M 高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度仪(英国马尔文仪器有限公司);JSM-5610LV 型扫描电子显微镜(日本电子公司);Nexus 670 型红外光谱仪(美国尼高力公司);Diamond 型差热扫描分析仪(美国 Perkin Elmer 公司)。

2 方 法

2.1 没食子酸乙酯(GE)标准曲线的制备

以GE为标准品配制一系列浓度的标准溶液,按照酒石酸亚铁比色法测定其含量^[19],以GE的吸收度(A)对其质量浓度(c)线性回归得标准曲线: $A = 0.569\ 9c - 0.002\ 5$, $r = 0.999\ 9$, GE和TP经验换算系数是1.5,即1.0 mg/mL GE的吸收度相当于1.5 mg/mL TP的吸收度。

2.2 明胶与壳聚糖可溶性复合物的制备

称取一定量的明胶和壳聚糖,分别溶解在0.2 mol/L醋酸钠缓冲液(pH 5.4)中,配制成0.2%明胶溶液和0.2%壳聚糖溶液,用0.22 μm 微孔滤膜过滤除去不溶性物质。在25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,将0.2%明胶溶液缓慢滴入0.2%壳聚糖溶液10 mL中(明胶溶液与壳聚糖溶液的体积比分别为0.5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1),两者混合后继续搅拌30 min,转速为300 r/min。以0.2%壳聚糖溶液作测定的空白对照,测定各种比例的混合液在600 nm的吸收度。以浊度为评价指标,考察明胶与壳聚糖发生复合凝聚后形成可溶性复合物的最适比例。

2.3 TP-Gel-Cs 纳米粒的制备

称取一定量的茶多酚,溶解在0.2%壳聚糖溶液,在50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,缓慢滴入0.2%明胶溶液中(体系中茶多酚与明胶的质量比分别为1:10, 1:8, 1:6, 1:4, 1:2, 1:1),两者混合后继续搅拌30 min,转速为300 r/min,即得TP-Gel-Cs纳米粒的悬浮液。以粒径、分散指数(polydispersity index, PDI)和包封率为评价指标,考察茶多酚与明胶的质量比

对形成 TP-Gel-Cs 纳米粒的影响。

2.4 包封率的测定

吸取一定量按照“2.3”项下方法制备的 TP-Gel-Cs 纳米粒悬浮液,加入超滤离心管(截留相对分子质量为 3 000),在 12 000 r/min 的条件下,离心 30 min,取超滤离心管中下层清液,按照“2.1”项的方法计算茶多酚的含量,计算包封率。

2.5 TP-Gel-Cs 纳米粒载药量的测定

将最优工艺制备的 TP-Gel-Cs 纳米粒悬浮液于 20 000 r/min 条件下,离心 40 min,沉淀用双蒸水洗涤 1 次,以 15% 海藻糖为冻干保护剂,采用冷冻干燥法制备 TP-Gel-Cs 纳米粒的冻干制剂。精密称取一定量的冻干产品,用双蒸水复溶,超声破碎 TP-Gel-Cs 纳米粒,超声频率为 400 W,工作时间 3 s,间歇时间 3 s,总时间 5 min,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除去不溶性物质,按照“2.1”项的方法计算纳米粒中茶多酚的含量,计算载药量。

2.6 TP-Gel-Cs 纳米粒形态、粒径、PDI 和 Zeta 电位的测定

称取一定量 TP-Gel-Cs 纳米粒冻干产品采用扫描电子显微镜观察纳米粒形态。称取一定量的 TP-Gel-Cs 纳米粒冻干产品,用双蒸水复溶,采用激光粒径测定仪测定纳米粒的粒径、PDI 和 Zeta 电位。吸取适量 TP-Gel-Cs 纳米粒悬浮液,测定其粒径和 PDI。

2.7 红外光谱分析

分别称取一定量明胶、壳聚糖、茶多酚粉末和 TP-Gel-Cs 纳米粒冻干产品,分别加入溴化钾后进行研磨,压成片状,置于红外光谱仪上 500 ~ 4 000 cm^{-1} 范围内进行扫描。

2.8 差示热量扫描分析

以明胶、壳聚糖、茶多酚粉末、三者混合物 (TP-Gel-Cs, 1.5:3:1) 和 TP-Gel-Cs 纳米粒冻干产品为样品,进行差示热量扫描 (DSC) 分析。温度扫描范围 25 ~ 225 $^{\circ}\text{C}$,升温速率 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,氮气流保护,测试样品质量范围 3 ~ 4 mg。

2.9 稳定性

称取一定量的茶多酚粉末和 TP-Gel-Cs 纳米粒冻干产品,冻干产品的载药量与称取的茶多酚质量相等,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,在预定的时间点取样 (0、1、2、3、4 和 5 d),按照“2.1”项下方法计算茶多酚粉末中茶多酚含量,“2.4”项下方法计算冻干

产品中茶多酚的含量(将 0 d 茶多酚的含量作为 100%)。

2.10 体外释放动力学

采用透析法考察 TP-Gel-Cs 纳米粒的体外释放动力学特性。称取 TP-Gel-Cs 纳米粒冻干粉 250 mg,分散于相应的溶出介质 5 mL 中,置于透析袋 (MWCO = 12 000 ~ 14 000),然后将透析袋置于盛有溶出介质 [0.1 mol/L HCl 溶液 (pH 1.2), PBS 缓冲溶液 (pH 7.4), 10 000 U/mL 溶菌酶 pH 5.4 0.2 mol/L 醋酸钠缓冲液] 100 mL 的小烧杯中,在水浴恒温振荡器中进行释放实验,振荡频率为 120 r/min,温度为 (37 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。在预定时间点取样 (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 48, 72 h),补充新鲜溶出介质。以 0 h 取的样品作测定的空白对照,计算溶出介质中茶多酚的含量,以累积释放百分率对时间绘制释放度曲线。

2.11 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间差异的比较在 Origin 8.0 软件中用 Student's *t* 检验进行统计学处理。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果与讨论

3.1 制备明胶与壳聚糖可溶性复合物

前期实验确定了 pH 5.4 和 0.2% 是明胶和壳聚糖发生复合凝聚较为合适的条件。明胶等电点为 pH 4.8,在此条件下带负电荷,壳聚糖在 pH 5.4 的环境中溶解性和流动性较好并且带正电荷,可以与明胶发生静电组装,明胶和壳聚糖的浓度影响两者复合凝聚物的尺寸和产率。结果(图 1)表明,随着明胶的加入,体系的浊度缓慢上升,当明胶与壳聚糖的体积比为 3:1 时,体系呈现出乳光,继续增加明胶,体系的浊度增加较快,并且开始出现少量沉淀。复合凝聚反应分为两个阶段:第 1 个阶段明胶和壳聚糖之间仅发生有限的静电组装,形成可溶性复合物,其尺寸为纳米级;继续增加明胶,进入第 2 个阶段两者质量比达到静电中和点,形成不溶性复合物,尺寸为微米级^[20]。根据浊度曲线,本实验选择明胶与壳聚糖的质量比为 3:1,既通过静电力使明胶被糖基化,从而改变其表面性质,又可以形成纳米尺寸的粒子,虽然可溶性复合物不具有规则的形态,粒径不均一,并且容易絮凝^[20],但是可通过茶多酚与明胶的作用力使其网络结构趋于紧密

从而具有规则的形态和较好的稳定性^[10,21]。

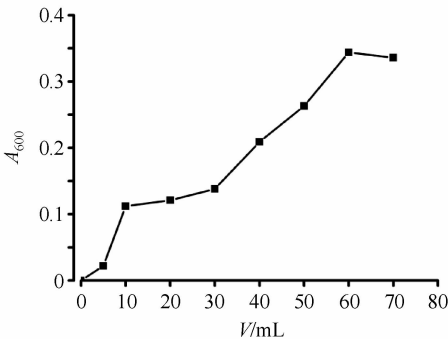


Figure 1 Effect of biopolymers mixing ratio on the turbidity of the gelatin-chitosan soluble complex formation

3.2 TP-Gel-Cs 纳米粒的制备

对纳米粒载药性能分析的结果(表 1)显示,随着茶多酚药载比的增加,包封率增大,粒径也在增大,PDI 先趋于减小后又略有增加,较高的包封率能够满足茶多酚纳米粒持续的抗氧化活性,但是随着药载比的增加,粒径超出了纳米粒的要求尺寸,而且悬浮液的稳定性下降,综合考虑三者的关系,将茶多酚和明胶的最佳投料质量比定为 1:2。

Table 1 Parameters of nanoparticles at different Gel-TP mass ratio evaluated by different assays

<i>m</i> (Gel)/ <i>m</i> (TP)	Particle size/nm	PDI	EE/%
1:1	1 408.10	0.29	92.28
2:1	971.50	0.22	90.42
4:1	840.90	0.34	87.51
6:1	624.70	0.40	83.85
8:1	408.40	0.41	78.96
10:1	360.40	0.49	72.01

Gel:Gelatin;TP:Tea polyphenol

茶多酚的多元酚羟基结构能够与明胶的酮亚氨基产生强烈的氢键作用^[22],并且苯环能够与明胶的脯氨酸残基产生疏水作用力^[13],这些非共价键作用力促使明胶和茶多酚自组装成一定尺寸和形状的颗粒^[11]。但是两者之间的作用力过于强烈,当明胶浓度和茶多酚/明胶质量比超出阈值就会发生絮凝沉淀。对明胶进行糖基化修饰,可以提高其与茶多酚发生絮凝的阈值^[15],这对于制备具有合适包封率的茶多酚纳米粒是有利的。壳聚糖在 pH 5.4 的条件下与明胶发生复合凝聚,这个过程是迅速自发的,也许两者之间还有氢键作用^[7],使壳聚糖-明胶结合得更加牢固,亲水性的糖链削弱了茶多酚与明胶之间的疏水作用,同时由于空

间效应阻碍了茶多酚对明胶的架桥作用^[10,15]。茶多酚和明胶可以多点结合,它们之间的反应过程分为 3 个阶段:当茶多酚比例较低时,它起交联剂的作用既可以使明胶伸展的长链收缩,又可以使明胶分子间形成寡聚体,所以形成的粒子小,均一性差;当茶多酚的比例增加时,明胶有足够的结合位点可以负载更多的茶多酚,虽然形成粒子的尺寸会增加,但茶多酚被包封在粒子中,并且粒子的 PDI 下降;当茶多酚的比例继续增大时,茶多酚可以在粒子之间起架桥作用,粒子聚集最终产生沉淀^[12,23]。在本研究中,按照壳聚糖、明胶、茶多酚质量比为 1:3:1.5 制备的纳米粒悬浮液为呈乳光的较稳定的体系,而以相同的质量比将茶多酚与明胶混合呈现非均相的体系(图 2A),明胶与茶多酚则形成絮凝团沉淀(照片未显示)。

3.3 形态观察

图 2B 是对 TP-Gel-Cs 冻干产品经 SEM 观察的结果,可见纳米粒为规则的球形,表面光滑,具有较好的分散性。其中还显示粒径小于动态光散射测定的结果,这可能因为 SEM 法是在干燥状态下观察的,而动态光散射是在水环境下测定的平均水合粒径,因此,两者的测定结果存在差异。

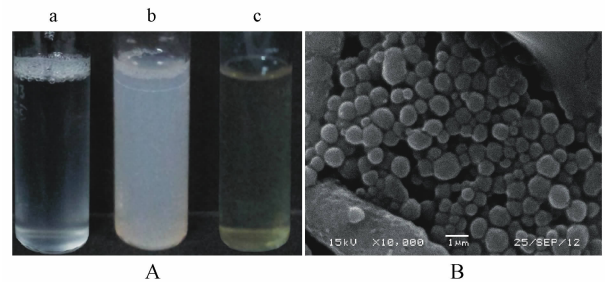


Figure 2 Solubility and the profile of TP-Gel-Cs nanoparticles. A, Gel-Cs soluble complexes (a), TP-Gel-Cs nanoparticles (b), TP in water (c); B, A representative image of TP-Gel-Cs nanoparticles obtained by scanning electron microscopy

3.4 载药量、包封率、粒径、PDI 和 Zeta 电位

采用最优工艺制备的 TP-Gel-Cs 纳米粒,载药量和包封率分别为 26.82% 和 90.42%。纳米粒的冻干产品用双蒸水复溶后,动态光散射法测定的平均粒径为 971.50 nm,PDI 为 0.22。TP-Gel-Cs 纳米粒冻干产品复溶后测得 PDI 较其悬浮液的略大(数据未显示),可能在冻干过程中发生了纳米粒的絮凝,导致复溶后纳米粒的均一性下降。在双蒸

水中测得纳米粒的 Zeta 电位为 -10.44 mV, 而 pH 5.4 条件下制备的茶多酚-明胶-壳聚糖纳米粒悬浮液测得 Zeta 电位为 $+33.23$ mV。B 型明胶等电点为 pH 4.8, 壳聚糖的 pK_b 为 6.5 ~ 7.0, 纳米粒在水中, 其 Zeta 电位主要来自于明胶, 而在 pH 5.4 条件下, 则主要来自于壳聚糖, 一般而言, Zeta 电位的绝对值大于 30 mV, 粒子不易发生聚集, 所以 TP-Gel-Cs 纳米粒在 pH 5.4 条件下更稳定。

3.5 红外光谱

红外光谱分析结果如图 3。

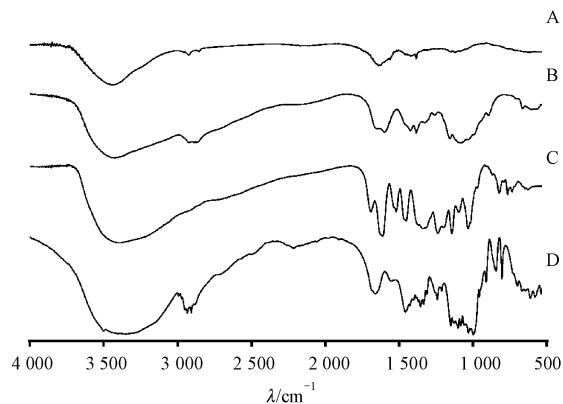


Figure 3 FTIR spectra for Gel (A), Cs (B), TP (C) and TP-Gel-Cs nanoparticles (D)

在 TP-Gel-Cs 纳米粒图谱中出现了 1457 cm^{-1} 新峰, 而壳聚糖图谱中的 1597 cm^{-1} - NH_2 峰消失了, 表明明胶的-COOH 与壳聚糖- NH_2 之间形成了 C-N 键^[7]。茶多酚图谱中 3387 cm^{-1} 是-OH 峰, 在

纳米粒图谱的 $3500 \sim 3300$ cm^{-1} 范围内出现一个宽峰, 说明茶多酚在纳米粒中形成较强的氢键。明胶图谱中 1635 cm^{-1} 位置是 C=O 伸缩振动峰, 茶多酚图谱中 1095 cm^{-1} 位置是 C-O 伸缩振动峰, 而在纳米粒图谱中两者分别位移至 1663 cm^{-1} 和 1083 cm^{-1} , 表明茶多酚和明胶之间有氢键作用^[14]。壳聚糖图谱中 1155 cm^{-1} 是 C-O 伸缩振动峰, 在纳米粒图谱中位移至 1150 cm^{-1} , 说明壳聚糖在纳米粒中也存在较弱的氢键。

3.6 差示热量扫描图谱

如图 4 所示, 茶多酚在 102.40 $^{\circ}\text{C}$ 出现了一个宽的吸热峰, 可能因为茶多酚是多酚类物质的混合物, 在 151.44 $^{\circ}\text{C}$ 有一个小的吸热峰, 明胶在 79.12 $^{\circ}\text{C}$, 106.59 $^{\circ}\text{C}$ 和 223.01 $^{\circ}\text{C}$ 分别有 3 个小的吸热峰, 壳聚糖只在 82.79 $^{\circ}\text{C}$ 出现了一个吸热峰, 三者的物理混合物在 74.45 $^{\circ}\text{C}$ 出现了一个宽的吸热峰, 推测这是明胶、壳聚糖和茶多酚第一个吸热峰融合的结果, 在 227.70 $^{\circ}\text{C}$ 有一个小的吸热峰, 这与明胶的第 3 个吸热峰位置相近, 而 TP-Gel-Cs 纳米粒在 118.71 $^{\circ}\text{C}$ 有一个尖锐的吸热峰, 而说明三者之间存在强烈的相互作用, 这些作用力促使它们组装成纳米粒, 并且纳米粒的热稳定性提高。这与红外光谱的结果相符。在纳米粒的图谱中还有 1 个小的吸热峰, 与前期实验中明胶-壳聚糖复合凝聚物的吸热峰位置相近, 说明也许在 TP-Gel-Cs 纳米粒中存在少量明胶-壳聚糖的复合凝聚物。

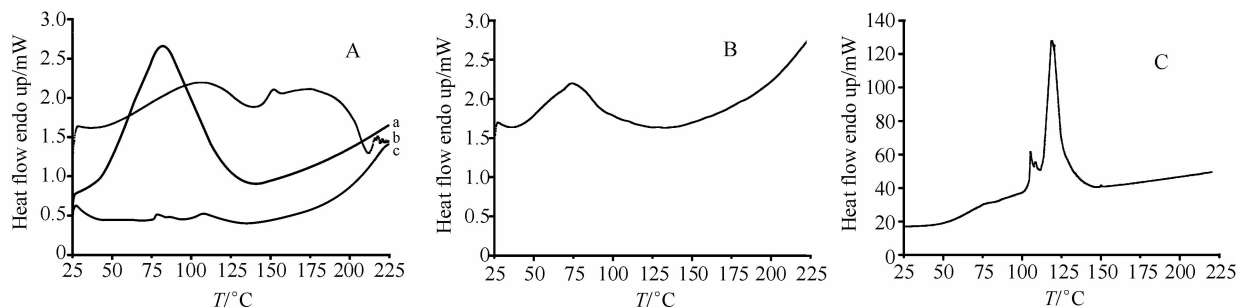


Figure 4 DSC thermograms for Cs (A, a), TP (A, b), Gel (A, c), physical mixture of Gel, Cs and TP (B) and TP-Gel-Cs nanoparticles (C)

3.7 稳定性

将茶多酚粉末和 TP-Gel-Cs 纳米粒的冻干产品 25 $^{\circ}\text{C}$ 下避光贮存 5 d, 结果发现茶多酚粉末吸湿结块, 随着时间的延长, 逐渐被氧化, 结果如图 5 所示, 5 d 后剩余的茶多酚仅为初始的 45.19%。冻

干产品也略有吸湿, 在双蒸水中复溶较好, 5 d 后纳米粒载药量为初始载药量的 83.57%, 显著高于茶多酚组。说明制备的纳米粒能够保护茶多酚, 提高其在空气中的稳定性。

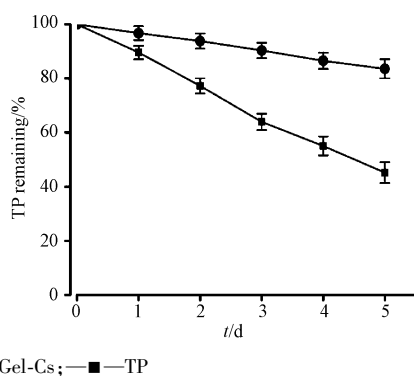


Figure 5 Degradation curves of TP in the free and nanoencapsulated TP at 25 °C ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.8 体外释药动力学

对 TP-Gel-Cs 纳米粒在 3 种溶出介质中的释放行为进行模型拟合,结果显示都符合 Probit 释放模型。在 pH 1.2、pH 7.4 和 pH 5.4 并且有溶菌酶的释放条件下,拟合的曲线方程分别为 $F = 100\Phi [-2.716 + 0.206\log(t)]$ (Φ 代表正态分布函数), $R = 0.9294$, $F = 100\Phi [-3.027 + 0.194\log(t)]$, $R = 0.9745$, 和 $F = 100\Phi [-2.778 + 0.189\log(t)]$, $R = 0.9538$ 。拟合结果如图 6 所示,茶多酚在 pH 1.2 和 pH 5.4 并有溶菌酶的介质中释放速度比较快,3 h 的累积释放量分别为 47.70% 和 38.72%,随着时间的延长,其释放量不断增加,72 h 的累积释放量分别为 86.58% 和 68.81%。在 pH 7.4 的条件下,释放较为缓慢,3 h 的累积释放量为 18.46%,随着时间的延长,持续缓慢释放,72 h 的累积释放量为 35.68%。

上述结果表明,TP-Gel-Cs 纳米粒的体外释放特性呈现一定的 pH 敏感性。这可能是由于在酸性条件下明胶和壳聚糖容易吸水溶胀^[24-25],在纳米粒的网络结构中形成释放通道,水溶性的茶多酚容易扩散到介质中。另一方面在酸性条件下,明胶容易水解,导致明胶与茶多酚之间的氢键作用逐渐减弱,茶多酚缓慢从网络结构中溶解下来,扩散到介质中。在 pH 7.4 的条件下,明胶和壳聚糖的溶胀性能明显减弱,溶蚀速度也缓慢^[7],并且在此条件下茶多酚的酚羟基易缓慢氧化成醌,与明胶和壳聚糖链上的氨基形成共价键^[26],导致茶多酚与网络结构逐渐结合得更加紧密,释放缓慢。pH 5.4 有溶菌酶的溶出介质是模拟口腔环境,用以考察 TP-Gel-Cs 纳米粒的释放性能。溶菌酶能够降解壳聚糖,从而破坏网络结构,茶多酚容易溶解到介质。

但是随着茶多酚释放,溶菌酶的活性会受到抑制^[27],从而减慢了壳聚糖降解速度,茶多酚的释放速度随之趋缓。

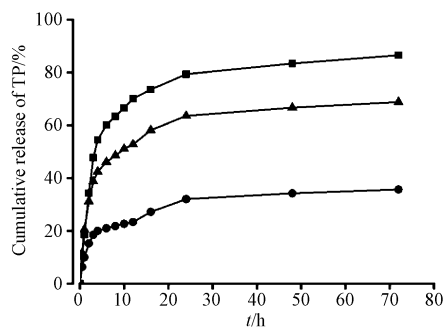


Figure 6 Release pattern of TP-Gel-Cs nanoparticles in different buffers

4 结论

本实验摸索了明胶与壳聚糖、明胶与茶多酚的最适质量比,通过自组装的方法制备了 TP-Gel-Cs 纳米粒。其制作过程简单、温和、绿色,为构建多酚类物质的纳米载药体系提供了一个新思路。红外扫描和差示热量扫描结果表明,茶多酚在纳米粒中既是芯材也参与了纳米体系的构建。稳定性实验表明,TP-Gel-Cs 纳米粒对茶多酚具有保护作用,模拟口腔环境中 TP-Gel-Cs 纳米粒能够缓慢释放并且带正电荷,具有一定的生物黏膜黏附性。本实验只是初步考察了 TP-Gel-Cs 纳米粒的部分体外特性,其药理学作用还有待深入研究。

参考文献

- [1] Dube A, Ng K, Nicolazzo JA, *et al.* Effective use of reducing agents and nanoparticle encapsulation in stabilizing catechins in alkaline solution[J]. *Food Chem*, 2010, **122**(3): 662 - 667.
- [2] Bao SB, Xu SY, Wang Z. Antioxidant activity and properties of gelatin films incorporated with tea polyphenol-loaded chitosan nanoparticles[J]. *J Sci Food Agric*, 2009, **89**(15): 2 692 - 2 700.
- [3] Zhang LY, Kosaraju SL. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants[J]. *Eur Polym J*, 2007, **43**(7): 2 956 - 2 966.
- [4] Shpigelm A, Israeli G, Livney YD. Thermally-induced protein-polyphenol co-assemblies: beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG[J]. *Food Hydrocolloid*, 2010, **24**(8): 735 - 743.
- [5] Siddiqui IA, Mukhtar H. Nanochemoprevention by bioactive food components: a perspective[J]. *Pharm Res*, 2010, **27**(6): 1 054

- 1 060.
- [6] Whitesides G M, Grzybowski B. Self-assembly at all scales[J]. *Science*, 2002, **295**(5 564): 2 418 - 2 421.
- [7] Kim SW, Nimni ME, Yang Z, *et al.* Chitosan/Gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin[J]. *J Biomed Mater Res Appl Biomater*, 2005, **75**(2): 442 - 450.
- [8] Zou T, Percival SS, Cheng Q, *et al.* Preparation, characterization, and induction of cell apoptosis of cocoa procyanidins-gelatin-chitosan nanoparticles[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, **82**(1): 36 - 42.
- [9] Shutava TG, Balkundi SS, Vangala P, *et al.* Layer-by-layer-coated gelatin nanoparticles as a vehicle for delivery of natural polyphenols[J]. *ACS Nano*, 2009, **3**(7): 1 877 - 1 885.
- [10] Zhou HH, Sun XY, Zhang LL, *et al.* Fabrication of biopolymeric complex coacervation core micelles for efficient tea polyphenol delivery via a green process[J]. *Langmuir*, 2012, **28**(41): 14 553 - 14 561.
- [11] Chen YC, Yu SH, Tsai GJ, *et al.* Novel technology for the preparation of self-assembled catechin/gelatin nanoparticles and the characterization[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, **58**(11): 6 728 - 6 734.
- [12] Jöbstl E, O'Connell J, Fairclough JPA, *et al.* Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions[J]. *Biomacromolecules*, 2004, **5**(3): 942 - 949.
- [13] Frazier RA, Deaville ER, Green RJ, *et al.* Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins[J]. *J Pharm Biomed*, 2010, **51**(2): 490 - 495.
- [14] Zhang LY, Dudhani A, Lundin L, *et al.* Macromolecular conjugate based particulates: preparation, characterisation and evaluation of controlled release properties[J]. *Eur Polym J*, 2009, **45**(7): 1 960 - 1 969.
- [15] Pascal C, Poncet-Legrand C, Cabane B, *et al.* Aggregation of a proline-rich protein induced by epigallocatechin gallate and condensed tannins: effect of protein glycosylation[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, **56**(15): 6 724 - 6 732.
- [16] Li KG, Wang Y, Miao ZC, *et al.* Chitoan/gelatin composite micro-carrier for hepatocyte culture[J]. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**(11): 879 - 883.
- [17] Takeuchi H, Yasuji T, Yamamoto H, *et al.* Spray-dried lactose composite particles containing an ion complex of alginate-chitosan for designing a dry-coated tablet having a time-controlled releasing function[J]. *Pharm Res*, 2000, **17**(1): 94 - 99.
- [18] Liu ZY, Ge XJ, Lu Y, *et al.* Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine-based films[J]. *Food Hydrocolloid*, 2012, **26**(1): 311 - 317.
- [19] Song H. *Pharmaceutical Engineering Specialty Experiment* (制药工程专业实验)[M]. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2005: 151 - 152.
- [20] Lv Y. *Perparation of jasmine essence micro/nano-capsule via complex coacervation and its mechanism research* (复合凝聚反应制备茉莉香精微/纳米胶囊及其机理研究)[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012.
- [21] Strauss G, Gibson SM. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients[J]. *Food Hydrocolloid*, 2004, **18**(1): 81 - 89.
- [22] Xing FB. *Study on the microcapsules and nanocapsules of gelatin-acacia-tannin containing capsaicin* (辣素/明胶-阿拉伯胶-单宁微囊和纳囊的研究)[D]. Tianjin: Tianjin University, 2003.
- [23] Passcal C, Poncet-Legrand C, Imbert A, *et al.* Interaction between a non glycosylated human proline-rich protein and flavan-3-ols are affected by protein concentration and polyphenol/protein ratio[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, **55**(12): 4 895 - 4 901.
- [24] Bao SB. *Study on gelatin films incorporated with tea polyphenol loaded nanoparticles* (茶多酚纳米粒复合明胶膜的研究)[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009.
- [25] Dudhani AR, Kosaraju SL. Bioadhesive chitosan nanoparticles: preparation and characterization[J]. *Carbohydr Polym*, 2010, **81**(2): 243 - 251.
- [26] Chen TH, Embree HD, Brown EM, *et al.* Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: potential for *in situ* applications[J]. *Biomaterials*, 2003, **24**(17): 2 831 - 2 841.
- [27] Rocasalbas G, Francesco A, Touriño S, *et al.* Laccase-assisted formation of bioactive chitosan/gelatin hydrogel stabilized with plant polyphenols[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, **92**(2): 989 - 996.