

王莹, 张龙, 刘天晴. 金雀异黄素壳聚糖纳米粒子的制备与释放性能研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 226–229.

金雀异黄素壳聚糖纳米粒子的制备与释放性能研究

王莹¹, 张龙^{1,2}, 刘天晴¹

(1. 扬州大学化学化工学院, 江苏扬州 225002; 2. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300)

摘要:以壳聚糖为壁材、聚乙二醇 400 为助溶剂, 采用离子诱导法制备油溶性药物金雀异黄素纳米粒子, 通过负染-电镜、傅里叶红外光谱、紫外-可见分光光度法等方法对该纳米粒子的形貌、组成、包裹率及载药率、体外释放性能进行测定。结果表明: 根据优化工艺制备的该纳米粒子的粒径为 200~300 nm, 包裹率和载药率分别为 37.1% 和 9.3%; 所获得的金雀异黄素纳米粒子对药物具有明显的缓释效果。

关键词:金雀异黄素; 壳聚糖; 纳米粒子; 制备; 药物缓释

中图分类号: TQ460.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0226-03

金雀异黄素是大豆异黄酮的主要成分, 又称染料木素、染料木黄酮, 是源于豆类植物和齿状植物的异黄酮类化合物, 其化学名为 4, 5, 7-三羟异黄酮, 具有多种生理或药理活性^[1-2]。金雀异黄素在分子的相对两极带有 2 个酚羟基, 溶于乙醇等有机溶剂, 不易溶于水, 因此直接口服生物利用率较低。壳聚糖是由自然界广泛存在的几丁质经过脱乙酰作用得到的, 不仅是具有良好生物相容性和可降解性的天然生物材料, 也是自然界中唯一大量存在的阳离子聚合物, 由于其特有的性质且价格低廉, 已成为新型的纳米药物载体。目前, 利用壳聚糖为包壁材料制备药物微胶囊的方法有共价交联法、离子诱导法以及自组合法等。其中共价交联法由于经常使用的交联剂如甲醛、戊二醛等有机物含有一定的毒性, 无法适用于体内给药; 自组合法虽对控制大分子药物的释放具有一定的优势, 但其制备方法较为繁琐; 离子诱导法是制备壳聚糖纳米粒最为普遍的 1 种方法, 制备条件温和、工艺简单、条件可控^[3-7], 但该方法一般只适用于亲水性药物。本研究首次将离子诱导法用于疏水性药物, 采用壳聚糖离子诱导法制备疏水性药物金雀异黄素纳米粒子乳液, 以三聚磷酸钠为离子交联剂对其进行物理交联、包覆, 制备金雀异黄素纳米粒子, 并对其载药率和包裹率、释放性能进行了探讨。

1 材料与与方法

1.1 试验试剂与仪器

试剂: 壳聚糖(CS, AR, 国药集团化学试剂有限公司), 冰醋酸(AR, 国药集团化学试剂有限公司), 金雀异黄素(原药, 纯度>99%, 上海融合医药科技发展有限公司), 聚乙二醇 400(PEG400, CP, 国药集团化学试剂有限公司), 三聚磷酸钠(TPP, AR, 国药集团化学试剂有限公司), 二次蒸馏水。

仪器: 透射电子显微镜(TECNAI 12 Philip Apparatus Co.,

USA), 紫外-可见分光光度计(UV-2550, 日本岛津公司), 傅里叶红外光谱仪(Tensor27, 德国 BRUKER 公司), 粒径分布仪(ZEN3690, 英国 Malvern 公司), 恒温槽(DK-S22, 上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 金雀异黄素壳聚糖纳米粒子的制备 采用离子诱导法制备金雀异黄素纳米粒子, 称取适量壳聚糖溶于醋酸中, 调节 pH 值, 获得壳聚糖醋酸溶液。将三聚磷酸钠水溶液与含有金雀异黄素的 PEG400 水溶液混合后, 缓慢加入到壳聚糖醋酸溶液中, 搅拌反应 1 h, 即可得金雀异黄素纳米粒子乳液。考察壳聚糖与三聚磷酸钠的质量比、体系 pH 值和 PEG400 的浓度对所获得的纳米粒子的粒径、载药率及药物包裹率的影响, 筛选最佳制备工艺条件。

1.2.2 金雀异黄素壳聚糖纳米粒子的形貌表征 通过透射电子显微镜观察与分析, 可获得金雀异黄素壳聚糖纳米粒子的形貌、大小及分布。

1.2.3 金雀异黄素壳聚糖纳米粒子的成分分析 用傅里叶红外光谱仪对金雀异黄素壳聚糖纳米粒子的成分进行分析、测定。

1.2.4 包裹率及载药率的测定 包裹率和载药率是评价粒子好坏的重要指标之一, 包裹率和载药率经计算而得。

包裹率 $B = \text{实际药物质量} / \text{理论药物质量} \times 100\%$ (1)

载药率 $Z = \text{药物质量} / \text{药物微粒的质量} \times 100\%$ (2)

1.2.5 金雀异黄素纳米粒子体外释放性能测定 采用透析法考察金雀异黄素壳聚糖纳米粒子的体外释放性能。金雀异黄素为疏水性药物, 选择 40% 乙醇 PBS 缓冲溶液为释放介质, 将金雀异黄素对照品和金雀异黄素壳聚糖纳米粒子分别装入处理过的透析袋中, 加入 20 mL 释放介质, 将透析袋置于装有 200 mL 释放介质中, 在 37℃ 恒温水浴中旋转搅拌, 定时取样 5 mL, 并同时补充等量的释放介质。样液使用紫外分光光度法测定金雀异黄素含量, 并计算累积药物释放量。

2 结果与分析

2.1 金雀异黄素壳聚糖纳米粒子的制备与表征

2.1.1 金雀异黄素壳聚糖纳米粒子的粒径分布 图 1 为金雀异黄素壳聚糖纳米粒子的粒径(R_h)分布图, 在制备工艺的

收稿日期: 2013-10-31

基金项目: 江苏省研究生科技创新计划(编号: CXZZ13_0893)。

作者简介: 王莹(1988—), 女, 江苏镇江人, 硕士研究生, 主要从事胶体与界面化学研究。E-mail: yingw1988@126.com。

通信作者: 刘天晴, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事胶体与界面化学研究。Tel: (0514) 87975290; E-mail: tqliu@yzu.edu.cn。

筛选中,纳米粒子粒径大小是重要的影响因素之一。由图 1 可知,该粒径分布范围在 100 ~ 350 nm,平均粒径大小约为 200 nm。

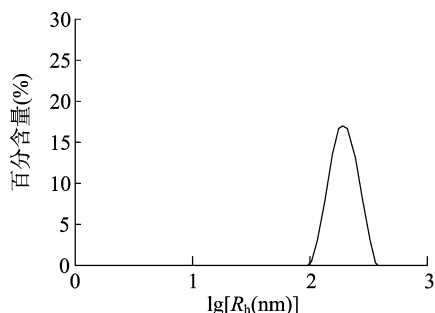


图1 金雀异黄酮壳聚糖纳米粒子的粒径分布

2.1.2 CS/TPP 质量比对金雀异黄酮壳聚糖纳米粒子粒径和包裹率、载药率的影响 图 2、图 3 分别为 CS/TPP 质量比对纳米粒子粒径和包裹率、载药率的影响。从图 2 可以看出,当质量比 $m(\text{CS})/m(\text{TPP})$ 为 4 ~ 6 时,粒径在 200 ~ 300 nm 范围,明显低于 $m(\text{CS})/m(\text{TPP})$ 为 3 时的微米级粒径。图 3 表明,质量比 $m(\text{CS})/m(\text{TPP})$ 与药物包裹率和载药率成反比,当质量比为 3 时包裹率和载药率为最大,分别为 44.5% 和 11.1%,但此时粒径也最大,达微米级;当质量比为 4 时,粒径在 200 nm 左右且包裹率和载药率分别为 38.5% 和 9.6%,因此,选择 $m(\text{CS})/m(\text{TPP})$ 为 4 比较合适。

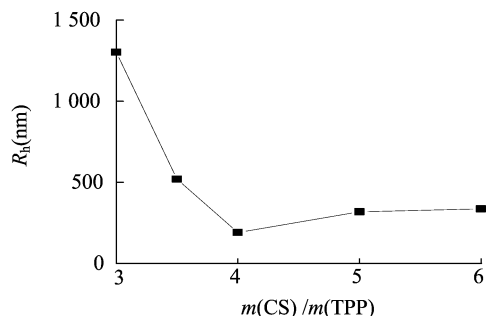


图2 CS与TPP质量比对粒径的影响

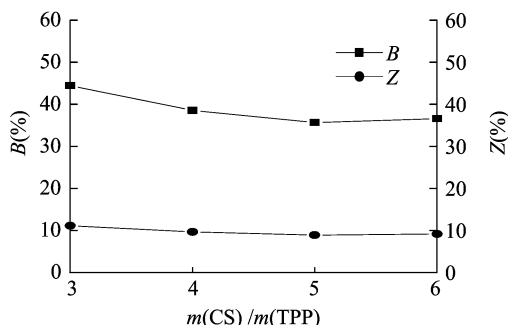


图3 CS与TPP质量比对包裹率(B)及载药率(Z)的影响

2.1.3 pH 值对金雀异黄酮壳聚糖纳米粒子粒径和包裹率、载药率的影响 图 4、图 5 分别为体系 pH 值对纳米粒子粒径和包裹率、载药率的影响。从图 4 可见,纳米粒子的平均粒径与体系 pH 值成正比关系,pH 值为 2 ~ 4 时,粒径在 200 ~ 300 nm 之间;当 pH 值为 5 ~ 6 时,粒子粒径在 700 ~ 800 nm 之间。从图 5 可以看出,粒子的包裹率和载药率随体系 pH 值增大出现缓慢下降的趋势,这是由于随着 pH 值增大,壳聚糖

溶液中带正电荷的离子减少,在三聚磷酸钠中负电荷一定的情况下正电荷与负电荷之间的作用力就相应减弱,药物的包裹率及载药率则相应下降。因此,试验时,通常选择体系 pH 值为 3,这时制备粒子的包裹率及载药率最大,分别为 37.1% 和 9.3%。

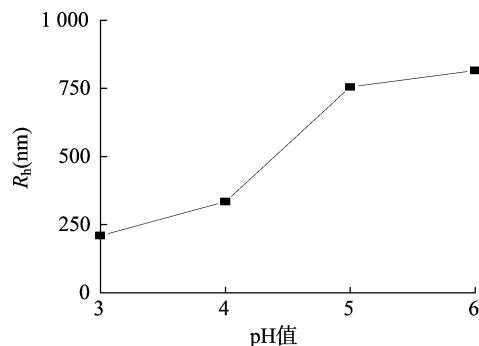


图4 pH值对粒径的影响

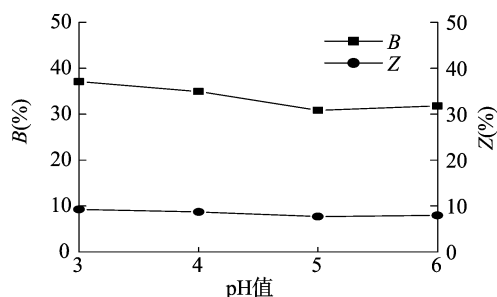


图5 pH值对包裹率(B)及载药率(Z)的影响

2.1.4 PEG400 浓度对金雀异黄酮壳聚糖纳米粒子粒径和包裹率、载药率的影响 图 6、图 7 分别为在 CS 与 TPP 质量比为 4 : 1、壳聚糖溶液 pH 值为 3 的条件下,考察助溶剂 PEG400 浓度的改变对形成纳米粒子粒径和包裹率、载药率的影响。从图 6 可以看出,在 $C(\text{PEG400})$ 为 0.49 mol/L 时,粒径最大,为 500 ~ 600 nm;随着 PEG400 浓度的增大,纳米粒子的粒径减小, $C(\text{PEG400})$ 为 0.81 mol/L 时粒径为 200 ~ 300 nm。从图 7 可见,在 $C(\text{PEG400})$ 为 0.81 mol/L 时,包裹率和载药率达到最大;但随着 PEG400 浓度继续增大时,溶解金雀异黄酮的 PEG 用量就会增加,使得溶解在水中的金雀异黄酮的浓度减小,导致被包裹的药物量减少,包裹率和载药率就会相应下降,因此,试验时选择 $C(\text{PEG400})$ 为 0.8 mol/L。

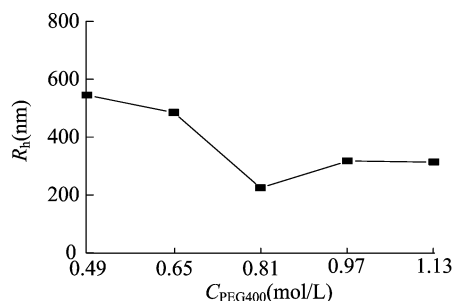
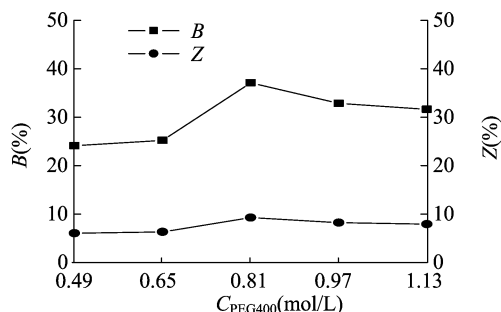


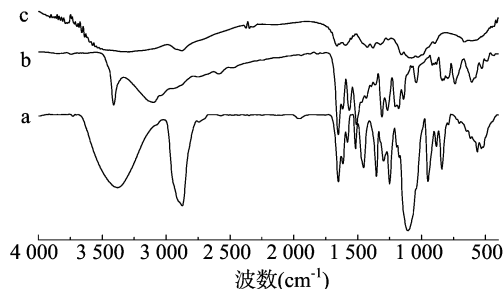
图6 PEG400浓度对粒径的影响

综上所述,制备金雀异黄酮壳聚糖纳米粒子的最佳条件是 $m(\text{CS})/m(\text{TPP})$ 为 4 : 1、体系 pH 值为 3、 $C(\text{PEG400})$ 为 0.8 mol/L、金雀异黄酮用量为 10 mg。最佳工艺制备的金雀

图7 PEG400浓度对包裹率(B)及载药率(Z)的影响

异黄酮壳聚糖纳米粒子的包裹率和载药率分别为 37.1% 和 9.3%。

2.1.5 金雀异黄酮壳聚糖纳米粒子的红外光谱特征 通过金雀异黄酮壳聚糖纳米粒子、金雀异黄酮和壳聚糖的红外光谱(图 8),可以看出在 $3\,400\text{ cm}^{-1}$ 附近有较大的吸收峰,在 $800 \sim 1\,750\text{ cm}^{-1}$ 附近出现了较多的吸收峰。不难看出,纳米粒子的红外光谱是壳聚糖和金雀异黄酮红外图谱的叠加,但峰强度又较之强很多,这是因为金雀异黄酮较少吸附在粒子表面,而被一起包裹在壳聚糖内部,并且相对含量较少。



a—纳米粒子 b—金雀异黄酮 c—壳聚糖

图8 金雀异黄酮壳聚糖纳米粒子的红外光谱图

2.1.6 金雀异黄酮壳聚糖纳米粒子的形貌特征 图 9 为金雀异黄酮壳聚糖纳米粒子的透射电镜图。由图 9 可见,纳米粒子呈圆球状,形状较规整,粒径分布在 $200 \sim 300\text{ nm}$ 左右;粒子中间黑色部分为包裹的金雀异黄酮,外围淡黑色部分为壳聚糖与三聚磷酸钠交联形成的壁壳。

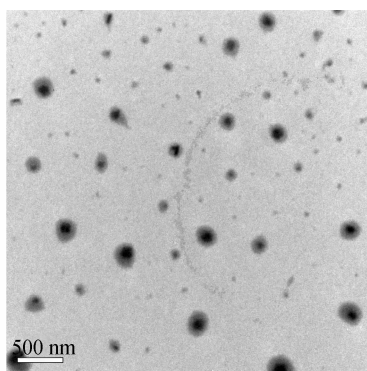


图9 金雀异黄酮壳聚糖纳米粒子透射电镜图

2.2 金雀异黄酮壳聚糖纳米粒子的体外释放特征

图 10 和图 11 分别为金雀异黄酮对照品和金雀异黄酮纳米粒子的体外释放曲线。从图 10 可以看出,金雀异黄酮对照品的体外释放几乎与释放时间呈线性关系,在 7 h 内释放量

Q 达到 94.05%,之后的释放量 Q 保持不变,说明 7 h 内金雀异黄酮对照品几乎释放完毕。图 11 是金雀异黄酮壳聚糖纳米粒子的体外释放曲线,可以看出在 60 h 之后的释放量 Q 达到 96.07%,表明金雀异黄酮壳聚糖纳米粒子具有明显的缓释效果。

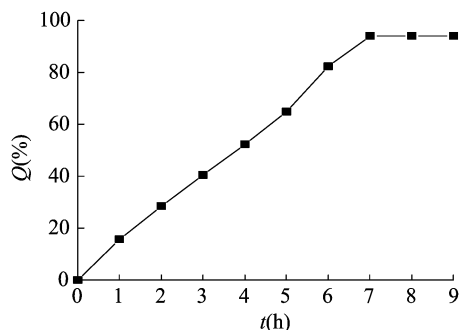


图10 金雀异黄酮对照品体外释放曲线

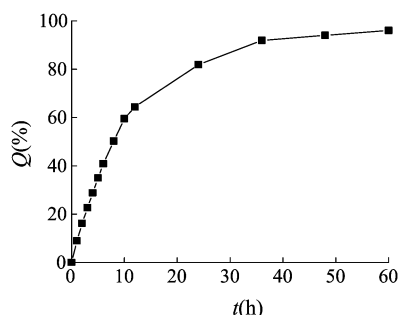


图11 金雀异黄酮纳米粒子体外释放曲线

3 结论

采用壳聚糖离子诱导法制备了 1 种新的疏水性药物金雀异黄酮纳米粒子,以三聚磷酸钠为离子交联剂对其进行交联包裹形成纳米粒子,该法条件温和、工艺简单,克服了使用醛类交联剂和有机溶剂带来的毒性;壳聚糖是无毒无害可生物降解的天然高分子,可以增加药物对生物膜的通透性;三聚磷酸钠是一种食品中常用的添加剂,在人体内有较好的生物降解性。根据条件的考察确定制备金雀异黄酮纳米粒子的最佳工艺是在室温条件下,壳聚糖与三聚磷酸钠质量比为 4 : 1、体系 pH 值为 3、PEG400 浓度为 0.8 mol/L 、金雀异黄酮用量为 10 mg 时,制备出的纳米粒子粒径为 $200 \sim 300\text{ nm}$,药物包裹率和载药率分别为 37.1% 和 9.3%,且药物的结构和性质没有发生变化;释放性能试验表明,该法制备的纳米粒子具有明显的缓释效果。这为疏水性药物金雀异黄酮纳米粒子的制备和缓释研究提供了 1 种新的方法。

参考文献:

- [1] Kumar N B, Cantor A, Allen K, et al. The specific role of isoflavones on estrogen metabolism in premenopausal women[J]. Cancer, 2002, 94(4): 1166 - 1174.
- [2] Yu Z L, Tang Y N, Hu D S, et al. Inhibitory effect of genistein on mouse colon cancer MC - 26 cells involved TGF β /Smad pathway[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 333(3): 827 - 832.

司俊玲,李 红,郑坚强,等. 小米杂粮酸乳发酵剂的优选研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):229-231.

小米杂粮酸乳发酵剂的优选研究

司俊玲,李 红,郑坚强,申瑞玲

(郑州轻工业学院食品与生物工程学院,河南郑州 450001)

摘要:通过试验优选出小米杂粮酸乳发酵剂的最佳配比为丁 0.90% 二酮链球菌、0.62% 嗜热链球菌、1.60% 嗜酸乳杆菌,并研究了各发酵剂对小米杂粮酸乳品质的影响;经检测,嗜酸乳杆菌数达到 4.0×10^8 CFU/mL 以上。

关键词:小米;杂粮酸乳;发酵剂;最佳配比

中图分类号:TS252.54 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)02-0229-03

酸乳因其营养价值高、口感细腻、含有健康功能因子而深受人们喜爱。近年来,我国相关研究者为了提高杂粮的营养功效,对我国特有的杂粮产品进行了部分研究,开发了杂粮酸乳制品,为市场上提供了新型的酸乳制品^[1-3]。加入杂粮(小米)降低了鲜奶中蛋白质的含量,只用传统发酵剂(嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌)会影响酸乳的滋味和香气,而丁二酮乳酸链球能够增加香味成分。嗜酸乳杆菌能在肠道内定殖,可以改善肠道菌群,抑制致癌物质的产生,起到整肠作用;嗜酸乳杆菌及其代谢物活化了免疫功能,可抑制癌细胞的形成和增殖^[4-5]。因此,本研究在传统发酵剂的基础上添加嗜酸乳杆菌和丁二酮乳酸链球菌,研究适合小米杂粮酸乳的新型发酵剂,为杂粮发酵制品的开发提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

小米选用山西省长治市沁州黄小米;鲜奶由河南农业大学畜牧站提供。

1.2 供试菌种

嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、丁二酮乳酸链球菌(*Str diacetylactis*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)由中国食品发酵工业研究院提供,由冻干菌种活化 5 代制成工业发酵剂。

1.3 方法

1.3.1 杂粮发酵原料液制备^[6]

1.3.1.1 制备工艺

小米→净化→熟化→磨浆
鲜牛奶→净化→标准化 } 调配→杀菌→冷却→均质→冷却
→无菌包装

1.3.1.2 杂粮发酵原料液的配比 小米熟化液(小米:水=1 g:9 mL)25%,鲜奶 75%。

1.3.2 杂粮发酵产品的制作 在已研制出的米奶产品^[6]中分别按照设计的添加量加入菌种,加糖量为 7.0%,在 38~42℃ 恒温箱中发酵。以滴定酸度 0.7%~0.8% 为发酵终点。

1.3.3 杂粮发酵制品的质量评定 采用感官评分(60%)、酸度滴定(30%)和乳酸菌数(10%)的综合评价方法。

发酵制品的感官评定标准为 60 分,由 10 个经培训的感官小组人员从以下 5 个方面随机评价编码的酸乳:(1)色。色泽为乳白色或略带淡黄色(5 分)。(2)香。天然乳脂香气浓郁,有食欲感(15 分)。(3)味。酸中有甜、甜中带酸、酸甜含香的复合滋味(15 分)。(4)形。凝固如玉,用勺取出部分观察,切面呈瓷状,表面光滑,无粗颗粒或杂质出现,于手中不是一触就散,是凝固而不破坨;取出后,杯内出现凹坑深而不变形,约 20 min 后,坑底有少量乳清析出,但坑仍不变形(20 分)。(5)异味。无霉味、酵母味或非酸乳味(5 分)。

1.3.4 微生物测定 乳酸菌总数测定采用 MRS 培养基,温度 37℃,时间 24~48 h^[7]。

1.3.5 酸度测定 pH 值用 pH 酸度计测定;TA(滴定酸度)用 0.1 mol/L 的 NaOH 滴定。

1.3.6 全营养杂粮小米酸乳复合发酵剂的优选试验 全营养杂粮小米酸乳所需发酵剂为丁二酮乳酸链球菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌。试验采用三因子二次通用旋转组合设计,编码水平见表 1。

收稿日期:2013-06-11

基金项目:河南省教育厅科技攻关项目(编号:2011A550016)。

作者简介:司俊玲(1976—),女,山西孝义人,硕士,副教授,主要从事谷物杂粮研究。E-mail:jlsj76@126.com。

[3] Prabakaran M, Mano J F. Chitosan - based particles as controlled drug delivery systems[J]. Drug Delivery, 2005, 12(1): 41-57.

[4] Shu X Z, Zhu K J. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads; the influence of anion structure[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2002, 233(1/2): 217-225.

[5] Prego C, Torres D, Fernandez - Megia E, et al. Chitosan - PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery; Effect of chitosan pegylation degree[J]. Journal of Controlled Release, 2006, 111(3):

299-308.

[6] Kim J H, Kim Y S, Park K, et al. Antitumor efficacy of cisplatin - loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor - bearing mice[J]. Journal of Controlled Release, 2008, 127(1): 41-49.

[7] Gan Q, Wang T, Cochrane C, et al. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan - TPP nanoparticles intended for gene delivery [J]. Colloids and Surfaces B - Biointerfaces, 2005, 44(2/3): 65-73.