

文章编号: 1674-2869(2020)04-0424-05

丁香酚纳米颗粒的制备及其最优化条件

刘 港, 李星宇, 游 峰, 成鸿静, 梅 军, 郑华明*
武汉工程大学材料科学与工程学院, 湖北 武汉 430205

摘 要: 为提高丁香酚(EG)的稳定性, 采用反溶剂沉淀法, 利用玉米醇溶蛋白(zein)封装EG, 并加入阿拉伯胶(AG)作为稳定剂, 制备载EG的复合纳米颗粒。以封装率为指标, 通过响应面分析, 对zein与EG质量比、zein与AG质量比、zein质量浓度三个工艺条件进行优化。结果表明: $m(\text{zein}):m(\text{EG})=5.23$, $m(\text{zein}):m(\text{AG})=0.23$, zein质量浓度为2.63 mg/mL时, 封装率最高为59.56%。

关键词: 丁香酚; 纳米颗粒; 反溶剂沉淀法; 响应面分析; 封装率

中图分类号: Q816; TS210.1 文献标识码: A DOI: 10.19843/j.cnki.CN42-1779/TQ.201911007

Preparation and Optimization of Eugenol Nanoparticles

LIU Gang, LI Xingyu, YOU Feng, CHENG Hongjing, MEI Jun, ZHENG Huaming*

School of Materials Science and Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China

Abstract: To improve the stability of eugenol, we prepared the compound nanoparticles embedding eugenol by reverse-solvent precipitation method where zein was used to encapsulate eugenol and gum arabic was added as stabilizer. With the encapsulation efficiency as the index, three technological parameters were optimized by response surface analysis including the mass ratios of zein to eugenol, zein to gum arabic and the mass concentration of zein. The results show that the maximum encapsulation efficiency is 59.56% at $m(\text{zein}):m(\text{eugenol})$ of 5.23, $m(\text{zein}):m(\text{gum arabic})$ of 0.23, in zein mass concentration of 2.63 mg/mL.

Keywords: eugenol; nanoparticles; reverse-solvent precipitation method; response surface analysis; encapsulation efficiency

丁香酚(eugenol, EG)是从丁香中提取的一种天然植物性酚类精油(4-烯丙基-2-甲氧基苯酚), 由于其具有超强的抗菌和抗氧化性而引起了人们的广泛关注^[1]。但EG难溶于水, 常温下极易挥发, 限制了其在实际生产中的应用^[2]。为提高该类物质的稳定性, 避免其在储存和使用过程中失活, 近年来出现了纳米封装技术^[3]。玉米醇溶蛋白(zein)中含大量的非极性氨基酸, 在结构上具有亲水性顶部和疏水外表面, 这使得它具有独特的溶解特性^[4]。由于其特殊结构和两亲性属性, 可以利

用zein装载控制生物分子^[5]。此外, zein是美国食品药品监督管理局批准的可用于食品加工过程中的少数几种疏水性材料之一^[6], 已被广泛用于封装维生素E、葡萄籽提取物、精油等生物活性化合物的技术中^[7]。Woranuch等^[8]通过乳液-离子凝胶交联法将EG封装到壳聚糖纳米颗粒中, 以此改善热塑性淀粉的耐氧化性。结果显示: 在含有同等活性物质量的条件下, 相较于含纯EG的热塑淀粉, 含EG纳米颗粒的热塑淀粉受热后, 其残余EG量是前者的8倍, 在自由基清除活性方面后者是前者

收稿日期: 2019-11-12

基金项目: 武汉工程大学科学研究基金(17QD11); 武汉工程大学第十一届研究生教育创新基金(CX2019068); 武汉工程大学教学研究项目(X2018027)

作者简介: 刘 港, 硕士研究生。E-mail: Liug135@126.com

*通讯作者: 郑华明, 博士, 副教授。E-mail: hmz_416@wit.edu.cn

引文格式: 刘港, 李星宇, 游峰, 等. 丁香酚纳米颗粒的制备及其最优化条件[J]. 武汉工程大学学报, 2020, 42(4): 424-428.

的2.7倍。Marco等^[2]采用pH和加热诱导制备zein-酪蛋白酸钠-果胶复合物包封EG,并用喷雾干燥使其能以粉末状长期稳定存在,从而在食品工业中具有更大的应用潜力。Donsi等^[6]发现酪蛋白酸钠可提高玉米黄酮胶体颗粒对表没食子儿茶素的包封率和稳定性。随着人们生活质量的提高,人们越来越关注食品的营养性及功能性,大量生物活性成分已被广泛应用于各类食品体系。但这类物质中大多数的生物可及性及生物可利用度均较低,特别是各种疏水性生物活性物质,包括脂溶性维生素(A、D、E)、多不饱和脂肪酸(EPA、DHA及CLA)、类胡萝卜素和疏水性植物多酚(茶多酚、姜黄素、异黄酮等),如何在食品中有效添加并保持其稳定性仍然是目前食品工业的一大技术难题。

为提高EG的稳定性和可利用性,本文通过反溶剂沉淀法^[9],用zein对EG进行包封,并加入阿拉伯胶(Arabic gum, AG),利用其吸附在zein纳米粒上,通过静电和疏水相互作用,增强复合颗粒的结构稳定性^[10]。通过改变zein、EG和AG三者的质量比,以及zein的质量浓度,成功制备出zein-EG-AG复合纳米颗粒,并以包封率为主要考察指标,使用响应面分析软件Design-Expert对其制备工艺进行了优化。

1 实验部分

1.1 材料与设备

Zein(北京索莱宝科技有限公司);EG、AG(上海阿拉丁试剂有限公司);福林酚试剂(上海麦克利生化科技有限公司);其他试剂(分析纯,国药集团试剂有限公司);紫外分光光度计(Lambda35, Perkin Elmer)。

1.2 复合纳米颗粒的制备

参照文献^[11],将zein和EG分别溶解在体积分数为80%的乙醇水溶液中,并以一定比例将两者混合。取3 mL混合液,在高速搅拌逐滴加入到9 mL水中,固化5 min。45 °C旋蒸5 min,除去乙醇。加水补充至原体积,调节pH为4.0。再将其加入到12 mL、pH为4.0的AG溶液中,继续搅拌10 min,即得复合纳米颗粒分散液。

1.3 复合纳米颗粒包封率的测定

参照文献^[12],取2 mL上述复合纳米颗粒分散液,加入到8 mL无水乙醇中,涡旋振荡3 min。参考文献^[6]采用福林酚试剂法检测丁香酚含量:取0.3 mL上述溶液,加入1.2 mL H₂O和0.3 mL福林酚试剂,室温下反应10 min,再加入1.2 mL质量分

数为7.5%的NaCO₃溶液,静置2 h,在765 nm处检测溶液的吸光度。根据公式 $E=1-m_1/m_0$ 计算包封率(m_1 为测得溶液中EG的游离量,mg; m_0 为处方中加入的EG总量,mg)。

1.4 单因素试验设计

采用反溶剂沉淀法制备复合纳米颗粒,研究zein与EG的质量比 $[m(\text{zein}):m(\text{EG})]$ (10:1,5:1,3:1,1:1,1:3)、zein与AG的质量比 $[m(\text{zein}):m(\text{AG})]$ (5:1,1:1,1:5,1:10)和zein的质量浓度(1.250,1.875,2.500,3.125,3.750 mg/mL)对复合纳米颗粒包封率的影响。

1.5 复合纳米颗粒响应面试验设计

在单因素试验的基础上,利用响应面分析软件Design-Expert中的Box-Behnken设计,考察 $m(\text{zein}):m(\text{EG})(A)$ 、 $m(\text{zein}):m(\text{AG})(B)$ 、zein的质量浓度(C)3个因素对复合纳米颗粒包封率工艺参数进行优化,其因素水平见表1。

表1 复合纳米颗粒包封率的响应面试验因素及水平

Tab. 1 Test factors and levels of response surface of encapsulation efficiency of composite nanoparticles

水平	A	B	C / (mg/mL)
-1	3	0.1	1.875
0	5	0.2	2.500
1	7	0.3	3.125

1.6 数据统计与分析

所有试验数据用Excel进行初步整理,并用Origin 8.0作图;采用Box-Behnken设计响应面试验,结合Design-Expert8.0软件进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 不同影响因素下复合纳米颗粒的包封率

2.1.1 Zein与丁香酚的质量比对复合纳米颗粒的包封率的影响 保持 $m(\text{zein}):m(\text{AG})=1:1$,zein质量浓度=2.500 mg/mL不变,探究zein与EG的质量比对复合纳米颗粒包封率的影响,结果如图1(a)所示,随着EG的相对含量增加,纳米粒子对EG的包封率先增加后减小。其原因可能是zein含有2/3的 α 螺旋结构和1/3的 β 折叠结构,具有一定的亲水亲油能力,EG能够缔合于zein的疏水微区^[13]。在EG含量较低时,所形成的纳米粒子空腔体积较小,与zein结合的位点相对较少,对EG的包埋量就会变小;当 $m(\text{zein}):m(\text{EG})=5:1$ 时,zein的量足够负载EG,并且所形成的纳米粒子空腔体积也相对合适,此时包封率最大; $m(\text{zein}):m(\text{EG})<5:1$ 时,随着EG含量继续增大,zein的负载能力下降^[14],

游离的EG量将增多,故包封率下降。

2.1.2 Zein与阿拉伯胶的质量比对复合纳米颗粒的包封率的影响 保持 $m(\text{zein}):m(\text{EG})=5:1$, zein质量浓度为2.500 mg/mL不变,探究zein与AG的质量比对复合纳米颗粒包封率的影响,结果如图1(b)所示。当 $m(\text{zein}):m(\text{AG})>1:5$,在pH 4.0时由于zein带正电荷,AG带负电荷,二者静电络合,随AG量增加,颗粒结构更加稳定,包封率增大;AG量继续增加,体系黏度增加,阻碍体系反应

进行,包封率下降^[15]。

2.1.3 Zein浓度对复合纳米颗粒的包封率的影响 保持 $m(\text{zein}):m(\text{EG})=5:1$, $m(\text{zein}):m(\text{AG})=1:5$ 不变,探究zein的质量浓度对复合纳米颗粒包封率的影响。结果如图1(c)所示,zein质量浓度低于20 mg/mL时,随zein质量浓度增大,能被包埋的EG增多,包封率增大,zein质量浓度进一步增大后,zein自组装成中空粒子与形成复合纳米颗粒产生竞争^[16],故包封率下降。

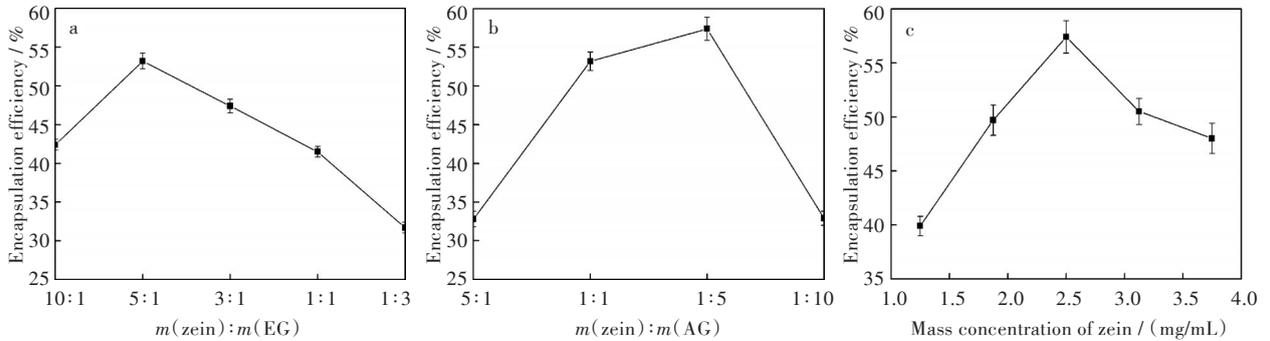


图1 影响包封率的因素:(a)zein与EG质量比,(b)zein与AG质量比,(c)zein质量浓度

Fig. 1 Effects of factors on encapsulation efficiency:(a)mass ratio of zein/EG, (b)mass ratio of zein/AG, (c)mass concentration of zein

2.2 复合纳米颗粒包封率的响应面实验

2.2.1 回归模型的建立 在单因素试验结果基础上,根据Box-Behnken设计17组试验,试验设计与结果见表2。

表2 响应面实验设计及结果

Tab. 2 Test design and results of response surface

试验号	A	B	C / (mg/mL)	包封率 / %
1	-1	0	-1	45.9
2	-1	-1	0	36.0
3	-1	1	0	36.6
4	-1	0	1	41.6
5	0	1	1	48.6
6	1	0	1	49.7
7	0	-1	-1	32.8
8	1	0	-1	33.9
9	0	-1	1	29.0
10	0	0	0	60.1
11	1	-1	0	24.7
12	1	1	0	47.1
13	0	0	0	58.6
14	0	0	0	57.4
15	0	1	-1	43.4
16	0	0	0	58.5
17	0	0	0	57.7

行二次回归拟合,得到复合纳米颗粒的包封率(Y)对 $m(\text{zein}):m(\text{EG})(A)$ 、 $m(\text{zein}):m(\text{AG})(B)$ 和zein质量浓度(C)3个因素之间的回归模型为:

$$Y=58.46-0.59A+6.65B+1.61C+5.45AB+5.03AC+2.25BC-9.02A^2-13.34B^2-6.67C^2$$

由表3可知,模型 $P<0.01$,说明Y与A、B、C的回归方程关系极显著,即模型极显著。根据结果分析,各因素对复合纳米颗粒包封率的影响顺序为: $m(\text{zein}):m(\text{AG})>\text{zein}$ 质量浓度 $>m(\text{zein}):m(\text{EG})$ 。

表3 回归模型方差分析

Tab. 3 Analysis of variance of regression model

项目	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	2 030.84	9	225.65	63.58	<0.000 1
A	2.76	1	2.76	0.78	0.407 0
B	353.78	1	353.78	99.68	<0.000 1
C	20.80	1	20.80	5.86	0.046 0
AB	118.81	1	118.81	33.48	0.000 7
AC	101.00	1	101.00	28.46	0.001 1
BC	20.25	1	20.25	5.71	0.048 3
A ²	342.38	1	342.38	96.47	<0.000 1
B ²	749.57	1	749.57	211.19	<0.000 1
C ²	187.18	1	187.18	52.74	0.000 2
残差	24.84	7	3.55		
失拟项	20.43	3	6.81	6.17	0.055 5
净误差	4.41	4	1.10		
总和	2 055.68	16			

利用Design-Expert8.0软件对表2试验数据进

2.2.2 响应曲面图以及等高线图 根据回归方程绘制响应面曲线图及等高线图,考察 zein 与 EG 的质量比(A)、zein 与 AG 的质量比(B)、zein 质量浓度(C)3个因素的交互作用。由图2可知:AB、AC的

交互作用图为椭圆,且 $P < 0.001$,交互作用及其显著^[17]。而BC的P值虽然小于0.05,但交互作用图接近圆形,交互作用的显著性较差。

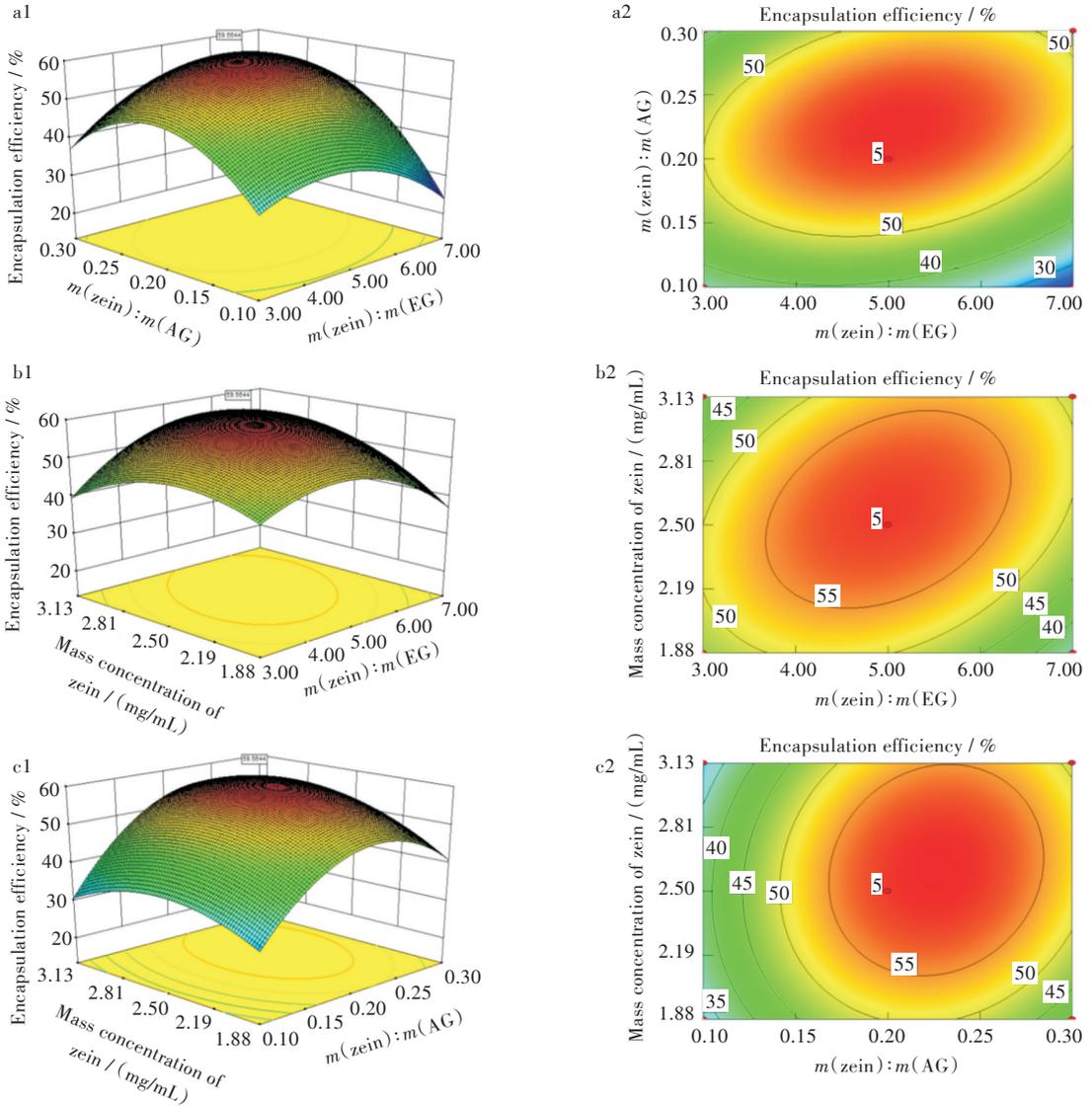


图2 各因素交互作用对包封率影响的响应面及等高线图:(a1,a2)zine与EG质量比和zein与AG质量比,(b1,b2)zine与EG质量比和zein质量浓度,(c1,c2)zein与AG质量比和zein质量浓度

Fig. 2 Response surfaces and contour plots of encapsulation efficiency caused by interaction of various factors:

(a1,a2)mass ratio of zein to eugenol and zein to gum arabic,(b1,b2)mass ratio of zein to eugenol and mass concentration of zein,(c1,c2)mass ratio of zein to gum Arabic and mass concentration of zein

2.2.3 模型预测最优方案及其验证 模型预测的复合纳米颗粒最大包封率为59.56%,该条件下的工艺参数为: $m(zein):m(EG)=5.23$, $m(zein):m(AG)=0.23$,zein质量浓度为2.63 mg/mL。在此工艺参数下制备丁香酚纳米颗粒,对该模型下的预测值进行验证。该条件下丁香酚纳米颗粒的实际包封率为60.90%,与模型预测值极为接近,说明该模型具有一定的可靠性。

3 结 论

通过响应面分析研究了 zein 与 EG 的质量比、zein 与 AG 的质量比、zein 质量浓度对复合纳米颗粒包封率的影响,并得到包封率与试验参数相关的数学模型。方差分析结果表明,所得模型高度显著($P < 0.01$),并对复合纳米颗粒包封率进行工艺优化。优化结果显示, $m(zein):m(EG)=5.23$ 、

$m(\text{zein}):m(\text{AG})=0.23$ 、zein质量浓度为2.63 mg/mL时,对应包封率为59.56%。在此条件下制备样品,实际测得包封率为60.90%,结果相近,表明该模型具有很好的可靠性。该研究为丁香酚及其它疏水性生物活性物质在现代食品工业生产中的应用起到一定的理论指导意义。

参考文献

- [1] DEVI K P, NISHA S A, SAKTHIVEL R, et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 130(1):107-115.
- [2] VENERANDA M, HU Q, WANG T, et al. Formation and characterization of zein-caseinate-pectin complex nanoparticles for encapsulation of eugenol [J]. *Food Science and Technology*, 2018, 89:596-603.
- [3] SHAHRIARI M H, ATAI M, ZANDI M, et al. Preparation and characterization of eugenol-loaded oligochitosan nanoparticles through sol-gel and emulsion/sol-gel methods [J]. *Polymer Bulletin*, 2018, 75(7):3035-3051.
- [4] PALIWAL R, PALAKURTHI S. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering [J]. *Journal of Controlled Release*, 2014, 189:108-122.
- [5] NONTHANUM P, LEE Y, PADUA G W. Effect of γ -zein on the rheological behavior of concentrated zein solutions [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(7):1742-1747.
- [6] DONSI F, VOUDOURIS P, VEEN S J, et al. Zein-based colloidal particles for encapsulation and delivery of epigallocatechin gallate [J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 63:508-517.
- [7] JOYE I J, DAVIDOV-PARDO G, LUDESCHER R D, et al. Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadin: towards a more rational approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins [J]. *Food Chemistry*, 2015, 185:261-267.
- [8] WORANUCH S, YOKSAN R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 96(2):578-585.
- [9] 王丽娟. 玉米醇溶蛋白胶体颗粒的制备及应用研究[D]. 广州:华南理工大学, 2014.
- [10] DAI L, SUN C X, WEI Y, et al. Characterization of Pickering emulsion gels stabilized by zein/gum arabic complex colloidal nanoparticles [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 74:239-248.
- [11] 黄旭琳, 黄晓霞, 钟南京, 等. 负载姜黄素的玉米醇溶蛋白-多糖纳米颗粒的制备及生物活性研究[J]. *广东药学院学报*, 2016, 32(5):545-549.
- [12] DAI L, ZHOU H L, WEI Y, et al. Curcumin encapsulation in zein-rhamnolipid composite nanoparticles using a pH-driven method [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 93:342-350.
- [13] 褚翔宇, 王小勇. 玉米蛋白/吐温-20复合纳米颗粒对姜黄素的包载作用[J]. *化学通报*, 2018, 81(7):625-629.
- [14] 许雪儿, 李娟, 陈正行, 等. 玉米醇溶蛋白-阿拉伯胶纳米颗粒的制备及性质表征[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(7):179-184.
- [15] 张力. 自组合法制备丁香酚纳米微粒及其在冷鲜肉保鲜中的应用[D]. 咸阳:西北农林科技大学, 2017.
- [16] TSAI Y H, YANG Y N, HO Y C, et al. Drug release and antioxidant/antibacterial activities of silymarin-zein nanoparticle/bacterial cellulose nanofiber composite films [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 180:286-296.
- [17] HU S Q, WANG T R, FERNANDEZ M L, et al. Development of tannic acid cross-linked hollow zein nanoparticles as potential oral delivery vehicles for curcumin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 61:821-831.

本文编辑:苗 变