

枸杞多糖纳米胶囊 pH 值稳定性的动态光散射分析

娄本浊

陕西理工学院物理与电信工程学院, 陕西 汉中 723003

摘要 枸杞多糖具有多种生理活性,但在胃酸或肠道中的耐受性差,使其生理活性大大削弱,而纳米胶囊化可改善这一缺陷。以微乳化技术与复合团聚法制备了枸杞多糖纳米胶囊,并通过动态光散射测量纳米胶囊在液相中的粒径大小与分布,来分析该胶囊在胃酸(pH=3.5)、储存(pH=5.5)、十二指肠(pH=6.8)及大肠(pH=7.4)等模拟环境下的稳定性。研究表明,无静置时间时枸杞多糖纳米胶囊可稳定存在于胃酸、储存、十二指肠及大肠中;静置5 h以内可稳定存在于胃酸与储存环境中;但在十二指肠中静置2 h或在大肠中静置1 h就有不稳定现象出现。以上结论说明制备的枸杞多糖纳米胶囊具有pH控制释放的效果。

关键词 测量;纳米胶囊;动态光散射;枸杞多糖;稳定性;pH值效应

中图分类号 TQ645.9;R944.5 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP51.031201

Dynamic Light Scattering Analysis of the pH-Stability of Wolfberry Polysaccharide Nanocapsules

Lou Benzhuo

School of Physics and Telecommunication Engineering, Shaanxi University of Technology,
Hanzhong, Shaanxi 723003, China

Abstract The tolerance of *Lycium barbarum* polysaccharide with a variety of biological activities is poor in the environment of gastric acid or intestinal canal, which leads the great weakening of to its biological activities. This defect can be modified by nano-encapsulation. Wolfberry polysaccharide nanocapsules are prepared by microemulsion technique and compound-agglomeration method. The particle sizes and distributions of these nanocapsules in liquid phase are measured by dynamic light scattering, which can analyze the stability of wolfberry polysaccharide nanocapsules in different simulation environments of gastric acid (pH=3.5), store (pH=5.5), dodecadactylon (pH=6.8) and large intestine (pH=7.4). The results show that, the polysaccharide nanocapsules can exist steadily in the environments of gastric acid, store, dodecadactylon and large intestine without standing time and in the environments of gastric acid and store within standing time of 5 h. However, the wolfberry polysaccharide nanocapsules become unstable in dodecadactylon with standing time of 2 h or in large intestine with standing time of 1 h. The above conclusions reveal that the prepared wolfberry polysaccharide nanocapsules have the effect of pH-controlled release.

Key words measurement; nanocapsules; dynamic light scattering; wolfberry polysaccharide; stability; pH effect

OCIS codes 120.5820; 290.5820

1 引言

枸杞多醣是一种酸性多胜肽杂多醣蛋白复合物,具有降血糖、降血脂、抗氧化、抗肿瘤、抗疲劳及调节免疫等生理功效^[1-3]。Gan等^[4]指出枸杞多醣可显著增加肿瘤小鼠体内巨噬细胞的吞噬作用、刺激脾脏细胞分泌抗体及使脾脏淋巴细胞产生增生现象,表明枸杞多醣可增强体液免疫力与细胞促成性免疫反应,并通过改善免疫系统来抑制肿瘤细胞活性以达到治疗的效果。Wang等^[5]指出枸杞多醣对于不同的发炎反应也有良好的活化作用。然而,枸杞多醣中所含蛋白质对胃酸耐受性差,也易受肠胃酵素分解,不利于口服,使其

收稿日期: 2013-10-09; 收到修改稿日期: 2013-11-19; 网络出版日期: 2014-02-20

基金项目: 国家自然科学基金(41105107)、陕西省自然科学基金(2012JM5014)、陕西省教育厅专项科研计划(2013JK0617)

作者简介: 娄本浊(1982—),男,硕士,讲师,主要从事光散射技术在生化材料领域中的应用方面的研究。

E-mail: benzhuolou@163.com

生理功效大为削弱。用于口服药物的载体多为自然或合成的聚合物所组成的次微米胶体载体,以此增加药物的生物利用率,改善其在消化道的吸收特性,并具有可控制药物释放的功能^[6-7]。故纳米胶囊化可以保护枸杞多糖在通过胃肠道时不受胃酸与消化酵素的破坏,而在胃肠道中呈现其生理活性与免疫调节功能而达到保健效果。

动态光散射技术是一种用来表征纳米颗粒在溶液中动态行为的最有效方法^[8],近年开始应用于纳米胶囊的安定性分析中。Jones等^[9]将 β -乳球蛋白与果胶形成生物聚合复合物,利用动态光散射测得复合物颗粒平均粒径随果胶浓度增加在pH=3~7间约为300 nm,有良好的稳定性;这是因为在高pH值时 β -乳球蛋白与果胶带大量负电,良好的静电排斥力可阻止颗粒之间互相靠近而聚集。Gu等^[10]利用 β -乳球蛋白- ι -红藻胶-明胶形成分别形成二、三级乳化系统后,利用动态光散射技术分析不同pH值下乳化系统的安定性;结果发现一级乳化系统在小于或大于 β -乳球蛋白等电点时安定,二级和三级系统在pH=3~5时相当安定,而pH=7~8时乳化液滴间开始聚集而且出现乳油分离现象。这是因为pH值大于 β -乳球蛋白等电点时乳化液滴表面会带负电,而使带负电的 ι -红藻胶无法吸附在安定的乳化液滴表面,造成有非常高浓度且未吸附的 ι -红藻胶存在于乳化系统的连续相中,因而产生空乏凝絮作用的液滴聚集现象,并且会带有乳油迅速分离的不安定情形发生。本文利用微乳化技术与复合团聚法制备纳米胶囊,将枸杞多糖包埋于纳米胶囊中,利用动态光散射技术分析枸杞多糖纳米胶囊在胃肠与储存环境下的pH安定性以及细胞培养液的影响。

2 动态光散射粒径测量原理

在动态光散射中,光强自相关函数 $G^{(2)}(\tau)$ 与电场自相关函数 $g^{(1)}(\tau)$ 之间满足^[11,12]

$$G^{(2)}(\tau) = A \left[1 + \beta \left| g^{(1)}(\tau) \right|^2 \right], \quad (1)$$

式中 A 为基线, β 为空间相干因子, τ 为延迟时间。对单分散颗粒系统而言,有

$$g^{(1)}(\tau) = \exp(-k^2 D \tau), \quad (2)$$

式中 D 为平移扩散系数, k 为散射波矢的大小,且有

$$k = 4\pi n \sin(\theta/2)/\lambda, \quad (3)$$

式中 n 为散射介质折射率, θ 为散射角, λ 为入射光波长。对于多分散颗粒系统而言,有

$$g^{(1)}(\tau) = \int_{D_{\min}}^{D_{\max}} P(D) \exp(-k^2 D \tau) dD, \quad (4)$$

式中 $P(D)$ 为颗粒平移扩散系数的概率分布函数。故由实验测得的光强自相关函数 $G^{(2)}(\tau)$,利用相关反演算法即可求得散射颗粒平移扩散系数的概率密度分布 $P(D)$ 。若令散射颗粒的直径为 d ,则根据Stokes-Einstein公式可知扩散系数 D 与粒径大小 d 的关系为

$$D = k_B T / 3\pi\eta d, \quad (5)$$

式中 k_B 为Boltzmann常数, T 为热力学温度, η 为溶剂的黏滞系数,由该式即可得粒径大小。

3 实 验

3.1 纳米胶囊的制备

以湿式球磨法将30 g枸杞与300 mL去离子水混合物磨成悬液状,在100 °C热水浴中萃取30 min后高速离心35 min,将残渣过滤后的滤液在45 °C下减压浓缩至30 mL,用去离子水将附着在容器壁上的多糖洗下并定量至50 mL,加入5倍体积的95%(体积分数)乙醇沉淀,在4 °C下静置10 h后再次高速离心30 min,将乙醇去除后即可得枸杞粗多糖。

将36 g鞣酸溶于200 g聚山梨酯80中,加入50 g碱处理明胶与70 g水在80 °C下均匀混合形成水相部分;将30 g失水山梨醇脂肪酸酯80、20 g聚山梨酯20与30 g鱼油均匀混合形成油相部分。将水相与油相在45 °C水浴中均匀混合形成油/水微乳液,然后在45 °C下用高压均质机以 2×10^8 Pa的压力将微乳液均质两循环形成单层包覆纳米胶囊;将该胶囊置于30 °C水浴中1 h使其固化后,加入去除乙醇的1.0 g粗多糖液、固定比例的 κ -红藻胶、刺槐豆胶及阿拉伯胶,再用 KH_2PO_4 缓冲液将pH值调至5.5后在45 °C水浴中初化3 h,最

后在 5℃ 环境中隔夜冷藏即可得到包覆枸杞多醣的纳米胶囊。

3.2 动态光散射实验

本文设计搭建的半经典半光纤式动态光散射系统如图 1 所示。从 30 mW 固态激光器发出的 532nm 连续光束经滤光片与偏振片后变为垂直偏振光,接着由扩束镜(Lens1)与傅里叶透镜(Lens2)将光束会聚在方形样品池中。悬浮颗粒样品产生的散射光经光阑限束后被短焦透镜(Lens3)与耦合器耦合进保偏型单模光纤中,之后传输至光电倍增管(PMT),散射信号经放大甄别处理形成 TTL 等幅脉冲后输送至 BI9000 型数字相关器中,数字相关器将 TTL 信号在单位时间内计数并进行自相关与基线运算,将光强自相关函数送至计算机中反演可得被测颗粒的粒径大小与分布。

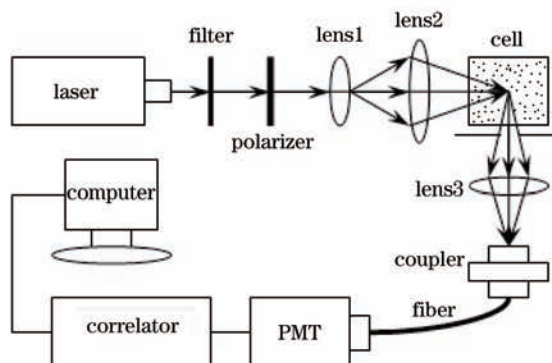


图1 动态光散射系统

Fig.1 Dynamic light scattering system

为分析枸杞多糖纳米胶囊在胃酸(pH=3.5)、储存(pH=5.5)、十二指肠(pH=6.8)及大肠(pH=7.4)环境下的稳定性,用pH值分别为3.5、5.5、6.8与7.4且浓度为0.025 mol/L的 KH_2PO_4 缓冲液将0.1 g枸杞多醣纳米胶囊稀释至10 g后,再用上述动态光散射系统测量其粒径大小与分布,散射角设为 90° ,测量时间为2.5 min,所有实验均在室温下进行。

4 结果与讨论

4.1 pH值的影响

如图2所示的是在不同pH值环境下由动态光散射技术即时测得的纳米胶囊粒径大小与分布。由该图可以看出,当pH值分别为3.5、5.5、6.8与7.4时,所得对应纳米胶囊的平均粒径分别为10.32、10.56、10.41、

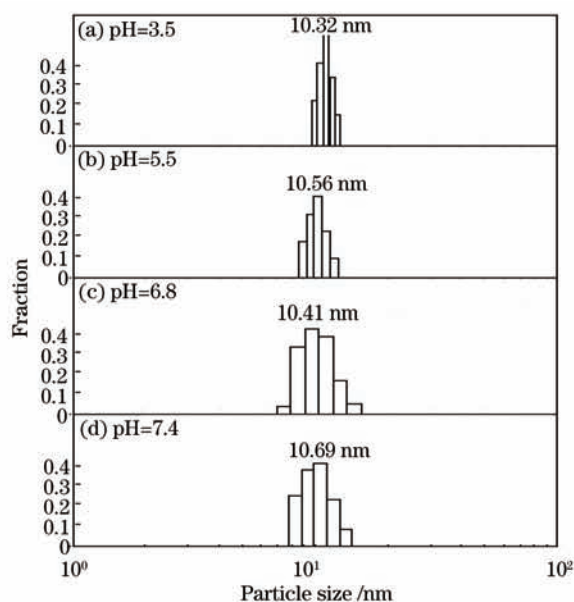


图2 不同pH值环境下即时测得的纳米胶囊粒径大小与分布

Fig.2 Real-time measurement results of particle size and distribution of nanocapsules at different pH values

10.69 nm,彼此间无明显差异,且均为单一粒径分布状态,说明枸杞多糖纳米胶囊能稳定地分散在 K_2HPO_4 缓冲液中,并于 $pH \leq 7.4$ 环境下非常安定。这是因为碱处理明胶的等电点在 $pH=6.5$ 左右,故在 $pH < 6.5$ 环境下碱处理明胶表面带正电,可与表面带负电的 β -红藻胶产生良好的静电相互作用,而使纳米胶囊处于稳定状态,而且不会使 κ -红藻胶包覆层脱落,也不会有瓦解现象产生。当 $pH=6.8$ 时稍大于碱处理明胶的等电点,这会使碱处理明胶表面带负电的比例略为增大;但稀释后即时测量粒径时明胶表面仍带有足够多的正电与 κ -红藻胶产生较强的静电相互作用,故 $pH=6.8$ 时纳米胶囊仍可暂时维持在稳定状态。当 $pH=7.4$ 时远大于碱处理明胶的等电点,这时碱处理明胶表面带负电的比例大大增加,从而破坏了与 κ -红藻胶之间的静电相互作用,使其从纳米胶囊表面脱落,理论上将致使纳米胶囊瓦解并有聚集现象产生。然而,实验表明 $pH=7.4$ 时纳米胶囊仍可维持在稳定状态;这是因为在纳米胶囊制备中增添枸杞多醣与提高50%的碱处理明胶,使得碱处理明胶仍可与枸杞多醣存在相当强的相互作用,故仍能保持稳定。

4.2 静置时间的影响

如图3所示的是在 $pH=3.5$ 环境下静置0、1、3、5 h后由动态光散射技术测得的纳米胶囊粒径大小与分布。由该图可以发现,静置时间为0、1、3、5 h时所得平均粒径分别为10.93、10.71、10.76、10.65 nm,彼此间无明显差异,且均为单一粒径分布状态。这表明在胃酸环境($pH=3.5$)中长时间静置时,碱处理明胶表面所带正电荷数较稳定,与带负电的 κ -红藻胶之间始终保持较强的静电相互作用,而使枸杞多糖纳米胶囊表现非常稳定,不会产生瓦解或聚集现象。

如图4所示的是在 $pH=5.5$ 环境下静置0、1、3、5 h后由动态光散射技术测得的纳米胶囊粒径大小与分布。由该图可以看出,静置时间为0、1、3、5 h时所得平均粒径分别为10.56、10.51、10.43、10.97 nm,彼此间也没有明显差异,且均为单一粒径分布状态。这说明在储存环境($pH=5.5$)与胃酸环境($pH=3.5$)中一样,长时间放置对于碱处理明胶表面所带正电荷数没有影响,枸杞多糖纳米胶囊可以长时间稳定储存。

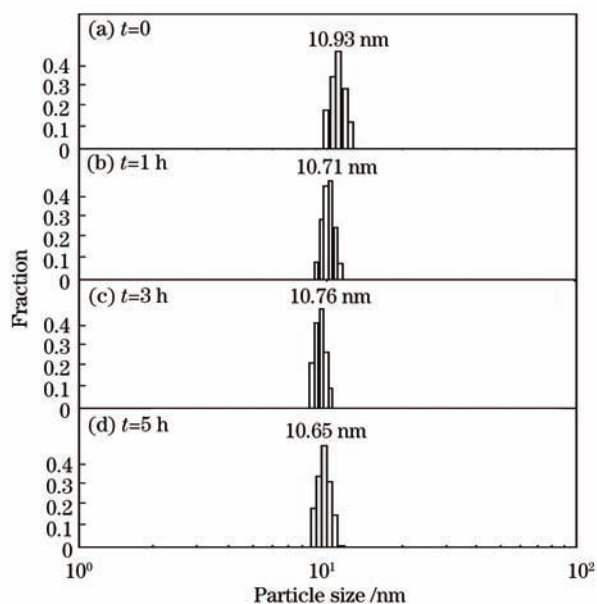


图3 在 $pH=3.5$ 环境下静置时间对纳米胶囊粒径大小与分布的影响

Fig.3 Effect of standing time on particle size and distribution of nanocapsules at $pH=3.5$

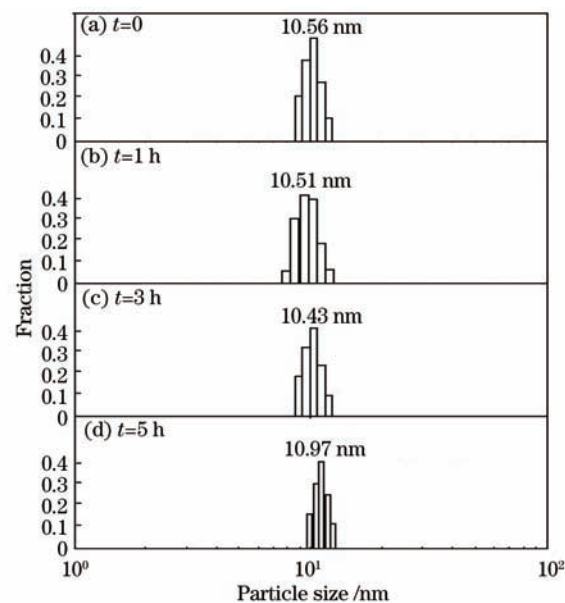


图4 在 $pH=5.5$ 环境下静置时间对纳米胶囊粒径大小与分布的影响

Fig.4 Effect of standing time on particle size and distribution of nanocapsules at $pH=5.5$

如图5所示的是在 $pH=6.8$ 环境下静置0、0.5、1、2 h后由动态光散射技术测得的纳米胶囊粒径大小与分布。由该图可以看出,静置时间为0、0.5、1 h时所得平均粒径分别为10.41、10.87、10.62 nm,彼此间也无明显差异,仍然呈单一粒径分布。然而,静置2 h时所得结果明显存在两种粒径的族群分布,其平均粒径大小分别为3.68 nm(占87%)与9.78 nm(占13%),这表明纳米胶囊在 $pH=6.8$ 环境下静置2 h后会有不稳定现象产生;其原因是 $pH=6.8$ 略大于碱处理明胶的等电点,且在胆盐的作用下,纳米胶囊表面的碱处理明胶带负电,

故长时间静置会减弱纳米胶囊表面蛋白质与 κ -红藻胶及枸杞多醣之间的相互作用力,甚至增加局部负电荷,从而使 κ -红藻胶从纳米胶囊表面脱落,且胆盐(含磷脂质)会取代胶囊表面乳化剂,而使枸杞多醣也会从纳米胶囊表层脱附,因此枸杞多糖纳米胶囊(PENs)表面仅剩下单层包覆的碱处理明胶,导致絮凝的不安定现象发生,故导致纳米胶囊粒径由10.62 nm降至3.68 nm与9.78 nm两种粒径分布族群。

同样地,在添加1%(质量分数)胆盐的pH=7.4环境下静置1 h后所得粒径明显呈两种粒径分布的族群,其平均粒径大小分别为6.17 nm(占78%)与11.31 nm(占22%),如图6所示。这表明在pH值远大于等电点的环境下,碱处理明胶表面带负电的比例大大增加,使之与带负电的 κ -红藻胶分子间的静电排斥力增强,再加上胆盐作用,导致枸杞多醣从纳米胶囊表面脱落,而使其粒径变小(6.17nm)与絮凝变大(11.31nm)的现象发生,因此纳米胶囊表面仅剩下单层包覆的碱处理明胶。

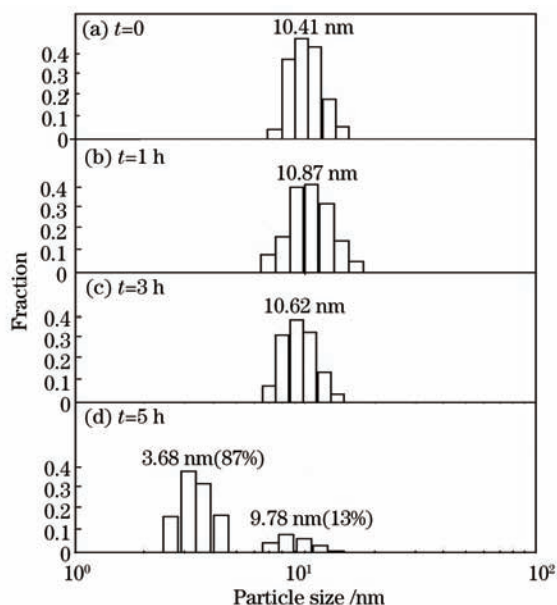


图5 在pH=6.8环境下静置时间对纳米胶囊粒径大小与分布的影响

Fig.5 Effect of standing time on particle size and distribution of nanocapsules at pH=6.8

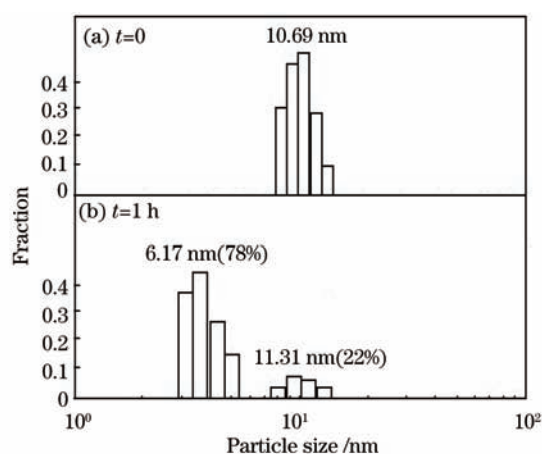


图6 在pH=6.8环境下静置时间对纳米胶囊粒径大小与分布的影响

Fig.6 Effect of standing time on particle size and distribution of nanocapsules at pH=6.8

4.3 细胞培养液的影响

为了确认枸杞多糖纳米胶囊与细胞共培养时其在细胞培养液中的稳定性,在pH=7.4的细胞培养液稀释后分别静置0、1、3、24 h再以动态光散射技术测量其粒径大小与分布,结果如图7所示。由该图可以发现,置于pH=7.4的细胞培养液中静置0、1、3 h后所得纳米胶囊的平均粒径为10.51、10.88、10.83 nm,彼此间无明显差异,且皆为单一粒径分布,这表明枸杞多糖纳米胶囊在细胞培养液中放置3 h时相当安定,胶囊粒径大小基本没有改变。而在细胞培养液中静置24 h时所得粒径虽仍然呈单一分布,但可以发现其粒径有变小且分布变窄的趋势,平均粒径约为9.62 nm。这是因为pH=7.4时远大于碱处理明胶的等电点,纳米胶囊表面的碱处理明胶会带大量负电,使它与带负电的 κ -红藻胶分子间失去静电相互作用,而此时纳米胶囊表面仍有带负电的枸杞多醣,由于枸杞多醣分子同时带有7.58%的蛋白质,会吸附于胶囊乳化剂界面中而使枸杞多醣的糖基端延伸于水中,而枸杞多醣会与 κ -红藻胶之间产生静电斥力,又因 κ -红藻胶与碱处理明胶之间静电引力减弱,故 κ -红藻胶会从蛋白质表面剥落。

在pH>6.8时只有带负电的枸杞多醣附着在胶囊表面而形成像毛发状的表层。当两胶囊靠近时,两胶囊表面像毛发的枸杞多醣会发生重叠现象,由于渗透压会增加,这时水会移动进入重叠的区域而产生立体排斥力,使胶囊分开而不会互相靠近而产生聚集的现象,故会使胶囊安定于pH=7.4的细胞培养液中,但静置24h后粒径稍微变小,这表明纳米胶囊在pH=7.4的细胞培养液中静置24 h后仍能相当安定。这一结果与前述在pH=7.4的 KH_2PO_4 缓冲液中静置时间的作用效果明显不同,其原因是在pH=7.4的 KH_2PO_4 缓冲液中静

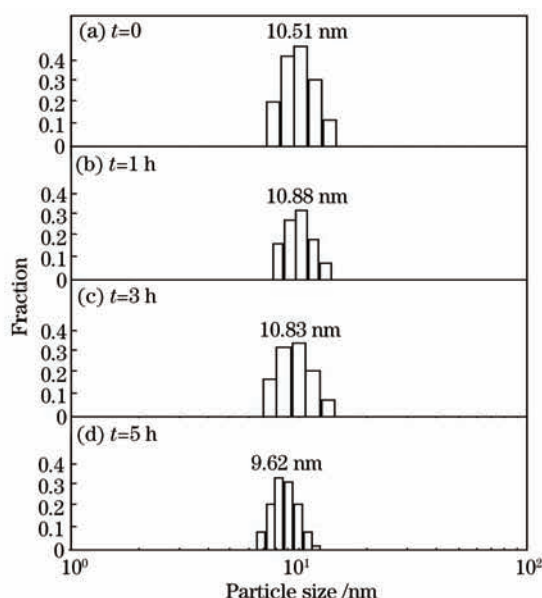


图7 在 pH=7.4 的细胞培养液中静置时间对纳米胶囊粒径大小与分布的影响

Fig.7 Effect of standing time on particle size and distribution of nanocapsules in cell culture fluid of pH=7.4

置时间实验是为了模拟肠道环境,所以调整至肠道的 pH 值并添加胆盐,这时会因 pH 值与胆盐的破坏使纳米胶囊的胶体结构不稳定而有瓦解现象发生。

5 结 论

利用微乳化技术与复合团聚法制备了枸杞多糖纳米胶囊,并通过动态光散射技术分析了该种纳米胶囊在在胃酸(pH=3.5)、储存(pH=5.5)、十二指肠(pH=6.8)及大肠(pH=7.4)环境下的稳定性。研究表明,在无静置时间动态光散射测量下,枸杞多糖纳米胶囊在胃酸(pH=3.5)、储存(pH=5.5)、十二指肠(pH=6.8)及大肠(pH=7.4)模拟环境下所得平均粒径大小彼此间无明显差异,且均呈单一粒径分布状态,表明此时在枸杞多糖胶囊在胃肠或储存环境下具有较高的稳定性。由不同静置时间下的动态光散射测量发现,枸杞多糖纳米胶囊在胃酸(pH=3.5)与储存(pH=5.5)环境下静置 5h 仍可维持稳定状态,但在十二指肠(pH=6.8)环境下静置 2h 或在大肠(pH=7.4)环境下静置 1h 就有颗粒聚集的不稳定现象出现。在 pH=7.4 的细胞培养液中静置 24h 时所得胶囊状态虽仍呈单一粒径分布,但相对于其他静置时间而言有粒径变小与分布变窄的趋势。

参 考 文 献

- 1 Xu Yinyue, He Biao, Zhang Fenghua, *et al.*. Adjuvant effect of Lycium barbarum polysaccharide to intranasally administered split pandemic (H1N1) 2009 influenza vaccine [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2012, 21(6): 516-527.
许馨月, 贺彪, 张风华, 等. 枸杞多糖对甲型 H1N1 流感裂解疫苗黏膜接种的免疫增强作用[J]. *激光生物学报*, 2012, 21(6): 516-527.
- 2 X M Li, X L Li, A G Zhou. Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from Lycium barbarum fruits in vitro[J].*European Polymer Journal*,2007, 43(2): 488-497.
- 3 Cai Huizhen, Liu Fukang, Lu Huixia, *et al.*. Short-term intervention of Lycium barbarum polysaccharide on type 2 diabetes[J].*Food Science*, 2012, 33(13): 259-262.
蔡慧珍, 刘福康, 芦慧霞, 等. 枸杞多糖对 2 型糖尿病病人的短期干预[J]. *食品科学*, 2012, 33(13): 259-262.
- 4 L Gan, S H Zhang, X L Yang, *et al.*. Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide-protein complex from Lycium barbarum [J]. *International Immunopharmacology*, 2004, 4(4): 563-569.
- 5 Y R Wang, H Zhao, X S Sheng, *et al.*. Protective effect of Fructus lycii polysaccharides against time and hyperthermia-induced damage in cultured seminiferous epithelium [J]. *J Ethnopharmacology*, 2002, 82(2-3): 169-175.
- 6 S Rathore, P M Desai, C V Liew. Microencapsulation of microbial cells [J]. *J Food Engineering*, 2013, 116(2): 369-381.
- 7 L Q Zheng, Z S Ding, M Zhang, *et al.*. Microencapsulation of bayberry polyphenols by ethyl cellulose: Preparation and

- characterization [J]. *J Food Engineering*, 2011, 104(1): 89-95.
- 8 B Z Lou. Particle sizing with PCS mixed of self-beating mode and heterodyne mode [J]. *Particle & Particle Systems Characterization*, 2009, 25(5-6): 414-419.
- 9 O G Jones, E A Decker, D J McClements. Formation of biopolymer particles by thermal treatment of β -lactoglobulin-pectin complexes [J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(5): 1312-1321.
- 10 Y S Gu, L Regnier, D J McClements. Influence of environmental stresses on stability of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by β -lactoglobulin- κ -carrageenan membranes [J]. *J Colloid and Interface Science*, 2005, 286(2): 551-558.
- 11 Lou Benzhou, Sun Yanqing, Huang Chaojun, *et al.*. Study on the aggregation behavior of AM/AMPSNa/ α -MSt based on dynamic light scattering technique [J]. *Applied Chemical Industry*, 2011, 40(7): 1138-1141.
娄本焄, 孙彦清, 黄朝军, 等. 三元聚合物 AM/AMPSNa/ α -MSt 聚集行为的动态光散射研究[J]. *应用化工*, 2011, 40(7): 1138-1141.
- 12 H Xia, Y Y Xiao, H Huang, *et al.*. Particle sizing of colloidal suspensions by low-coherence fiber optic dynamic light scattering [J]. *J Colloid and Interface Science*, 2012, 367(1): 527-530.