

负载姜黄素的玉米醇溶蛋白-羧甲基壳聚糖纳米复合物的制备表征、体外消化及其抗氧化活性

李婷, 刘蕾, 黄敏, 任格瑞, 谢湖均*, 董丽娟*

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江杭州 310018)

摘要: 该研究利用玉米醇溶蛋白 (Zein) 和羧甲基壳聚糖 (Carboxymethylchitosan, CMCS), 通过反溶剂法制备了负载姜黄素 (Curcumin, CUR) 的纳米复合物, 以粒径、电位、包封率和多分散系数 (PDI) 等为指标优化了 Zein/CMCS-CUR 纳米复合物的制备条件。当 Zein/CMCS 与 CUR 的质量比为 10:1 时制备的纳米复合物粒径较小 (95.37 nm), 其 Zeta 电位为 -21.70 mV, 包封率和负载量分别为 96.63% 和 4.55%。采用傅里叶变换红外 (FT-IR)、差示扫描量热法 (DSC) 和 X 射线衍射 (XRD) 探讨了 Zein、CMCS 和 CUR 之间的相互作用, 利用透射电镜 (TEM)、扫描电镜 (SEM) 观察了纳米复合物的微观形貌, 结果表明氢键、静电和疏水相互作用是组装该纳米复合物的驱动力。姜黄素以非晶体状态成功包埋在 Zein/CMCS 复合物中, Zein/CMCS-CUR 纳米复合物呈球形, 且分布均匀。体外抗氧化和消化实验表明经纳米复合物包载后姜黄素仍然具有较强的抗氧化活性, 并呈现明显缓释特性。该研究可以为姜黄素在功能性食品领域的应用提供了重要的理论基础。

关键词: 玉米醇溶蛋白; 姜黄素; 羧甲基壳聚糖; 纳米复合物; 微观形貌; 热稳定性

文章编号: 1673-9078(2022)12-110-117

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.12.0990

Preparation, Characterization, *in Vitro* Digestion, and Antioxidant Activity of Curcumin-loaded Zein-carboxymethyl Chitosan Nanocomplexes

LI Ting, LIU lei, HUANG Min, REN Gerui, XIE Hujun*, DONG Lijuan*

(School of Food and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Zein and carboxymethylchitosan (CMCS) were used to prepare curcumin (CUR)-loaded nanocomplexes with the anti-solvent method. The preparation conditions of zein/CMCS-CUR nanocomplexes were optimized based on the indicators of particle size, potential, encapsulation efficiency, and polydispersity index (PDI). When the mass ratio of zein/CMCS to CUR was 10:1, the prepared nanocomplexes showed a relatively small particle size (95.37 nm), zeta potential of -21.70 mV, encapsulation efficiency of 96.63%, and loading capacity of 4.55%. The interactions among zein, CMCS, and CUR were explored through Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), differential scanning calorimetry (DSC), and X-ray diffractometry (XRD), and the micromorphology of nanocomposites was observed using transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). FT-IR showed that hydrogen bonding and electrostatic and hydrophobic interactions were the major driving forces for the assembly of nanocomplexes. DSC and XRD showed that curcumin was successfully

引文格式:

李婷,刘蕾,黄敏,等.负载姜黄素的玉米醇溶蛋白-羧甲基壳聚糖纳米复合物的制备表征、体外消化及其抗氧化活性[J].现代食品科技,2022,38(12):110-117

LI Ting, LIU lei, HUANG Min, et al. Preparation, characterization, *in vitro* digestion, and antioxidant activity of curcumin-loaded zein-carboxymethyl chitosan nanocomplexes [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(12): 110-117

收稿日期: 2022-08-07

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目 (LGN21C200012; LGN22C200014)

作者简介: 李婷 (1996-), 女, 硕士在读, 研究方向: 食品胶体与营养, E-mail: ting5252022@163.com

通讯作者: 谢湖均 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品胶体与营养, E-mail: hujunxie@gmail.com; 共同通讯作者: 董丽娟 (1984-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 食品胶体, E-mail: donglj@zjgsu.edu.cn

embedded in the zein/CMCS complex in an amorphous state. Moreover, SEM and TEM images showed that the zein/CMCS-CUR nanocomplexes were spherical and evenly distributed. *In vitro* antioxidant assay revealed that curcumin continued to exhibit potent antioxidant activity following encapsulation in the nanocomplexes, and *in vitro* digestion experiments demonstrated that sustained release of curcumin was achieved. This study can serve as a valuable reference for the application of curcumin in the field of functional foods.

Key words: zein; curcumin; carboxymethyl chitosan; nanocomplexes; micromorphology; thermal stability

姜黄素是一种从姜黄植物中分离的、具有二酮结构的天然多酚化合物,具有抗菌、抗氧化、抗病毒、抗癌等特性,在食品、药品和化妆品等领域具有广泛的应用^[1-5]。然而,姜黄素难溶于水、易溶于有机溶剂,光稳定性和热稳定性较差,在酸碱条件下容易失活,使得姜黄素的生物利用率很低^[6]。因此有必要开发合适的递送系统,改善姜黄素在体外和体内的稳定性,提高其在胃肠中的生物利用率。

多糖和蛋白是常见的天然高分子材料,利用蛋白质和多糖制备复合纳米颗粒被认为是制备食品级给药系统最有前景的方法之一^[7-10]。Elbially 等^[11]利用酪蛋白、海藻酸盐及壳聚糖制备了可以封装具有抗癌性能的姜黄素的纳米颗粒,显著提高了姜黄素的封装率(75%),且具有比合成类抗癌药物更好的生物安全性。卵白蛋白和海藻酸钠构建的纳米复合物可以有效封装姜黄素,能提高姜黄素的水溶性和生物利用度^[12]。负载姜黄素的海藻酸钠-明胶复合微纤维具有足够的抗机械性能和可降解性能,可作为伤口护理的潜在药物输送系统^[13]。

玉米醇溶蛋白(Zein)是一种高度疏水的蛋白质,是疏水活性物质的理想载体。它不仅能够通过疏水作用与姜黄素(CUR)形成复合物,提高姜黄素的水溶性和生物利用度^[14,15];而且制备 Zein-CUR 纳米复合物不需要大量有机溶剂,有利于实现姜黄素的安全使用。但玉米醇溶蛋白纳米颗粒在水中的再分散性差,在某些环境应力下(pH 值接近等电点、高离子强度和高温等)容易聚集。采用静电沉积或反溶剂沉淀等方法将多糖包覆在玉米醇溶蛋白纳米颗粒上,可以有效解决这个问题^[16-18]。羧甲基壳聚糖(CMCS)是壳聚糖的水溶性衍生物,具有良好的生物相容性,可以用来稳定玉米蛋白纳米颗粒。CMCS 包覆玉米醇溶蛋白的纳米粒子已被证明是一种有前途的递送系统,可改善疏水性营养素(如维生素 D₃)的释放并增强其稳定性^[9],还可封装纳他霉素改善其水分散性并用于采后水果保鲜^[20]。

本文以粒径、电位、封装率、负载量和多分散系数(PDI)为指标,优化了 Zein/CMCS-CUR 纳米复合物的制备条件。利用傅里叶变换红外(FT-IR)、差示扫描量热法(DSC)和 X 射线衍射(XRD)探讨了 Zein、CMCS 和 CUR 之间的相互作用,并通过透射电镜

(TEM)和扫描电镜(SEM)研究了纳米复合物的微观形貌变化。通过体外模拟消化实验考查了纳米复合物在模拟胃肠道中的稳定性和缓释性,同时还分析了 Zein/CMCS-CUR 纳米复合物的稳定性及抗氧化能力。通过以上研究,以期开发出用于功能食品和药物的姜黄素纳米输送系统。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

玉米醇溶蛋白(Zein),购自 Sigma 公司;羧甲基壳聚糖(CMCS,脱乙酰度 96%,取代度 65%),购自南通兴成生物制品有限公司;姜黄素(CUR)、胃蛋白酶(3816 units/mg)、猪胰脏胰蛋白酶(283 units/mg)、Na₂PO₄·2H₂O(AR, ≥98%)、NaCl(AR, 99.5%)和 NaH₂PO₄(AR, 99.0%),购自阿拉丁有限公司。

1.2 仪器与设备

MX-E 漩涡振荡器,北京大龙;UV-2600 紫外-可见分光光度计,日本 Shimadzu 公司;Zetasizer Nano-ZS 激光粒度仪,英国 Malvern 公司;高度冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;红外光谱仪,德国 Thermo Scientific 公司;差示扫描量热仪,法国 Setaram 公司。

1.3 方 法

1.3.1 Zein/CMCS-CUR 纳米复合物的制备

Zein(0.04 g)和不同质量的姜黄素(CUR)溶于 20 mL 乙醇-水溶液(80:20, V/V)中, Zein 与 CUR 的质量比分别为 30:1、20:1、10:1 和 5:1,分别在 400 r/min 磁力搅拌 2 h,然后与 CMCS(0.04 g)在 600 r/min 混合 2 h,用 HCl 和 NaOH 溶液将复合物溶液体系的 pH 值调节至 6.5,搅拌 2 h 后用旋转蒸发仪将乙醇蒸发(45 °C, 8 min),制备得到负载不同浓度 CUR 的 Zein/CMCS-CUR 纳米复合物溶液。固态 Zein/CMCS-CUR 纳米复合物采用冷冻干燥法制得。Zein 与 CUR 的比例为 30:1、20:1、10:1 和 5:1 的样品分别表示为 Zein/CMCS-CUR_{30:1}、Zein/CMCS-CUR_{20:1}、Zein/CMCS-CUR_{10:1}、和 Zein/CMCS-CUR_{5:1}。

1.3.2 粒径与电位

实验使用 Nano-ZS 型激光粒度仪检测样品的粒径和 Zeta 电位。所测样品的粒子粒径和分散性指数 (PDI) 是通过 Stokes-Einstein 方程计算得到的, 同时利用 Smoluchowski 模型计算出所测样品的 Zeta 电位。实验在室温下进行, 测量前平衡 120 s, 每次测量扫描 12 次, 每个样品平行测量三次, 最终取数据平均值。

1.3.3 包封率及负载量的测定

将适量的 CUR 溶解在无水乙醇中, 漩涡震荡 10 min 后超声 30 min 置于冰箱过夜, 使其充分溶解, 分别配制成不同浓度 (2、4、6、8、10 mg/L) 的 CUR 溶液。利用紫外分光光度计在 425 nm 处测得 CUR 的吸收值, 并绘制标准曲线。

采用超滤离心的方式测定纳米复合物中 CUR 的包封率 (Encapsulation Efficiency, *EE*) 和负载量 (Loading Capacity, *LC*), 具体操作如下: 吸取一定体积包封 CUR 的纳米复合物溶液于超滤离心管 (滤膜的截留分子量为 3 ku) 中, 5 000 r/min 下离心 20 min, 收集下管滤液, 利用紫外分光光度计在 425 nm 处进行测定。分别通过以下等式 (1) 和 (2) 计算 *EE* 和 *LC*。

$$EE = \frac{\text{Total CUR-Free CUR}}{\text{Total CUR}} \times 100\% \quad (1)$$

$$LC = \frac{\text{Total CUR-Free CUR}}{\text{Total Weight of Zein/CMCS complex}} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.4 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 测定

将新鲜制备的样品进行冷冻干燥后, 与溴化钾按照 1:100 的比例混合研磨, 然后进行压片。设置扫描范围为 4 000~400 cm^{-1} , 分辨率为 4 cm^{-1} , 累计扫描 32 次, 环境温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.5 差示扫描量热法 (DSC)

称取约 5 mg 的冻干后的样品放入铝坩埚进行分析, 加热温度设置为 20~200 $^{\circ}\text{C}$, 升温速率设置为 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 氮气的流速设定为 20 mL/min 。

1.3.6 X 射线衍射 (XRD)

将样品充分研磨至粉末后, 放入 X 射线衍射仪中。采用 Cu-K α 辐射, 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 、40 kV 和 50 mA 的条件下, 以 10 $^{\circ}/\text{min}$ 的频率在 20~80 $^{\circ}$ 的范围内进行扫描。

1.3.7 透射电镜 (TEM) 分析

样品用超纯水稀释适当倍数, 混合均匀后取 10 μL 稀释液滴在带有碳支持膜的铜网上, 静置自然干燥后, 使用质量分数 2% 的磷钨酸溶液负染色 4 min, 多余的磷钨酸用超纯水进行冲洗, 继续在室温下干燥。之后使用透射电子显微镜进行观察, 加速电压为 200 kV。

1.3.8 扫描电镜 (SEM) 分析

将样品用双面粘合剂粘贴, 安装在不锈钢上, 并在观察之前使用溅射涂布机涂覆金层, 用扫描电子显

微镜 (SEM) 在 15.0 kV 的加速电压下观察这些样品的微观表面形态。

1.3.9 抗氧化能力测定

(1) ABTS 自由基清除活性

ABTS 自由基是由 ABTS (7.4 mmol/L) 与过硫酸钾 (2.6 mmol/L) 以 1:1 (*V/V*) 的比例混合在暗处反应 16 h 生成的。用 PBS 溶液 (10 mmol/L, pH 值 7.4) 将上述混合物稀释至吸光度值为 0.70 \pm 0.01 (734 nm 处), 获得 ABTS 工作溶液。将样品 (40 μL) 与 4 mL ABTS 工作溶液混合均匀并反应 5 min。 A_c 为 4 mL ABTS 与 40 μL PBS 溶液混合 5 min 后的吸光值, A_s 为 4 mL ABTS 与 40 μL 样品反应 5 min 的吸光值。使用公式 (3) 确定 ABTS 自由基的清除能力 (记为 *D*, %)。

$$D = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\% \quad (3)$$

(2) DPPH 自由基清除能力测定

选择 DPPH 自由基清除活性实验来评估含有不同浓度 CUR 的样品的自由基清除能力。称量一定量的 DPPH, 并将其溶解在无水乙醇 (0.1 mmol/L) 中。将 5 mL 样品与 5 mL 新鲜制备的 DPPH 乙醇溶液混合。在涡旋振荡器上震荡 10 min 后, 将其置于黑暗环境中 30 min。通过紫外-可见光谱在 538 nm 处测量样品吸光度 (A_{sample}), A_{blank} 为 5 mL 样品与等量乙醇混合后的吸光值, A_{control} 为 5 mL 的 DPPH 与等量的磷酸盐缓冲液混合后的吸光值。使用公式 (4) 确定 DPPH 自由基的清除能力 (记为 *F*, %)。

$$F = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \right) \times 100\% \quad (4)$$

1.3.10 体外消化实验

根据 Minekus 等^[21]和 Hur 等^[22]的实验研究, 建立了本复合体系的体外模拟消化实验, 条件如下:

模拟胃液的配制: 取 0.5 mL 的浓盐酸定容至 25 mL, 在该盐酸溶液中加入 1 g 胃蛋白酶和 0.2 g NaCl 后, 用超纯水定容至 100 mL 并超声 10 min 制得模拟胃液 (SGF)。

模拟肠液的配制: 将 0.68 g NaH_2PO_4 和 1 g 胰蛋白酶用超纯水溶解定容至 100 mL, 超声 10 min 后低温离心 10 min, 制得模拟肠液 (SIF)。

将样品按照 1:1 (*V/V*) 的比例置于配好的模拟胃液中并调 pH 值为 2.0, 然后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 的恒温水浴摇床中进行模拟消化实验, 分别在 0、0.5、1、1.5 h 后取样进行测定。按照 1:1 (*V/V*) 的比例像上述消化液中加入模拟肠液, 调 pH 值为 6.8, 然后分别在 0.5、1、1.5 和 2 h 后取样进行测定。模拟胃肠道消化的总消化时间为 3.5 h。累积 CUR 释放量通过以下公式计算:

$$\text{Cumulative release} = \frac{C \times V}{M} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

C —— T 时刻混合溶液释放的 CUR 的浓度, mg/L;

V —— T 时刻混合溶液体积, mL;

M ——复合物中所含 CUR 的量, mg。

1.4 统计学分析

每个样品至少测定 3 次,以平均值±标准偏差表示,用 SPSS 18.0 软件进行显著性分析, $p < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 CUR 浓度对纳米复合物的影响

Zein/CMCS 与 CUR 的质量比对 Zein/CMCS-CUR

表 1 Zein、Zein-CMCS、Zein-CUR 和 Zein/CMCS-CUR 复合物的粒径、电位、包封率和负载量

Table 1 The particle size, Zeta potential, EE and LC of Zein, Zein-CMCS, Zein-CUR and Zein/CMCS-CUR nanoparticles

Sample	Size/nm	PDI	ζ -potential/mV	EE/%	LC/%
Zein	86.42±1.87 ^c	0.38±0.05 ^b	25.60±0.10 ^a	/	/
Zein/CMCS	151.88±1.07 ^b	0.16±0.02 ^c	-30.30±0.20 ^h	/	/
Zein-CUR	1 198.41±30.22 ^a	1.96±0.13 ^a	8.50±0.10 ^b	68.21±4.21 ^c	10.32±0.30 ^a
Zein/CMCS-CUR _{5:1}	106.03±0.50 ^{cd}	0.16±0.01 ^c	-24.70±0.20 ^f	95.01±1.53 ^a	8.63±0.21 ^b
Zein/CMCS-CUR _{10:1}	95.37±1.03 ^{de}	0.12±0.01 ^c	-21.70±1.40 ^e	96.63±0.96 ^a	4.55±0.14 ^c
Zein/CMCS-CUR _{20:1}	103.00±1.08 ^{cd}	0.12±0.03 ^c	-20.20±0.30 ^d	92.56±1.87 ^a	2.23±0.06 ^d
Zein/CMCS-CUR _{30:1}	98.66±0.87 ^{de}	0.18±0.01 ^c	-18.20±0.30 ^c	85.73±2.43 ^b	1.40±0.10 ^f

注: 同列不同的小写字母表示具有显著差异 ($p < 0.05$)。

如表 1 所示, Zein/CMCS 纳米复合物的 Zeta 电位为 -30.30 mV。当 Zein/CMCS 与 CUR 的比值从 30:1 降低到 5:1 时, 其电势从 -18.20 mV 变化到 -24.70 mV, 这是因为 CUR 浓度的增加会加强 CUR 与 Zein 的疏水相互作用, 使得包载在纳米复合物的姜黄素增多, 从而引起电位的变化。由表 1 可知含有不同浓度姜黄素的 Zein/CMCS-CUR 纳米复合物包封率差异不明显, 只有样品 Zein/CMCS-CUR_{30:1} 的包封率低于 90%。但从纳米复合物的稳定性考虑, 选择粒径最小、包封率较高的 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 为最优比例。

2.2 红外分析

红外光谱中, 3 200~3 400 cm^{-1} 的波段是由 O-H 伸缩振动引起的。从图 1 可以看出, Zein 的特征峰为 3 413 cm^{-1} , Zein/CMCS 和 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 的特征峰分别移到 3 415 cm^{-1} 和 3 423 cm^{-1} , 表明 Zein、CMCS 和 CUR 之间发生了氢键相互作用^[24]。Zein 的酰胺 I 带和酰胺 II 带分别位于 1 654 cm^{-1} 和 1 535 cm^{-1} 处, 当形

成 Zein/CMCS 复合物后, 特征峰分别移动到 1 652 cm^{-1} 和 1 546 cm^{-1} 处; 形成 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 纳米复合物后, 特征峰分别移动到 1 653 cm^{-1} 和 1 541 cm^{-1} 处, 这表明 Zein、CUR 和 CMCS 之间发生了一定程度的静电相互作用^[25]; 以前的研究结果表明 Zein 与 CUR 之间存在疏水相互作用, 因此疏水作用是生成 Zein/CMCS-CUR 纳米复合物的另外一个驱动力^[26,27]。综上所述, 氢键、静电和疏水相互作用是纳米复合物形成的驱动力。

CUR 的特征吸收峰则分别位于 3 508、1 031、1 279、1 511 和 1 599 cm^{-1} 处, 其中 3 508 cm^{-1} 特征吸收峰由酚羟基的拉伸振动引起, 但是在图中 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 纳米复合物中未观察到这些峰^[28]。Zhang 等^[29]也观察到了类似的结果, CUR 经 Zein 和岩藻多糖包埋以后特征峰消失。这是因为 CUR 与蛋白和多糖发生氢键或疏水作用后, 限制了 CUR 中化学键的拉伸和弯曲, 导致纳米复合物中 CUR 的大多数特征峰消失, 表明 CUR 已成功包封在纳米复合物中。

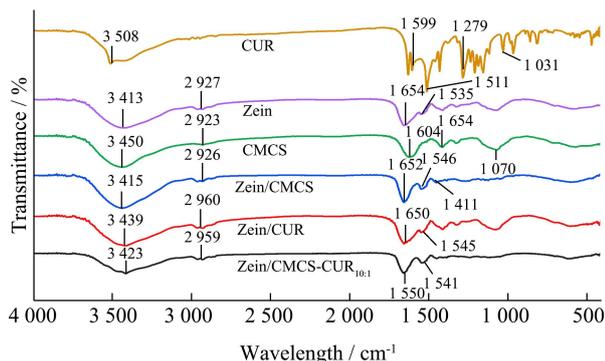


图1 Zein、CMCS、Zein-CUR 和 Zein/CMCS-CUR 样品的红外光谱图

Fig.1 Infrared spectra of Zein CMCS, Zein-CMCS, Zein-CUR, CMCS-CUR and Zein/CMCS-CUR samples

2.3 热稳定性分析

如图 2 显示, Zein、CMCS 分别在 95.2 °C 和 122.9 °C 处出现特征吸热峰, 是样品中结合水蒸发时的能量吸收所致。CUR 在 179.2 °C 处出现一个明显的吸热峰, 与 Cai 等^[30]获得的结果相似 (184 °C), 这是由 CUR 晶体熔化引起的。对于 Zein、CMCS 和 CUR 的物理混合物, 由于物理混合物中姜黄素含量仅为 10 wt%, 稀释效应导致吸热峰强度急剧降低, 并向低温方向移动, 因此三者的物理混合物吸热峰出现在 129.3 °C。而 DSC 图显示了 Zein-CUR、Zein/CMCS-CUR_{10:1} 纳米复合物的吸热峰对应的温度为 72.7 °C、101.8 °C, 在其曲线中未观察到 CUR 的吸热峰, 这意味着 CUR 以非晶态封装在纳米复合物中^[31], 并不是单纯的物理混合。而 CMCS 的加入, 使得 Zein-CUR 的吸热峰 72.7 °C 升至 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 时的 101.8 °C。Dai 等^[32]的研究中也有类似的结果, 加入卵磷脂后增强了纳米复合物中不同组分之间的疏水作用和静电相互作用, 导致吸热峰温度高, 从而增加了蛋白质的热稳定性。

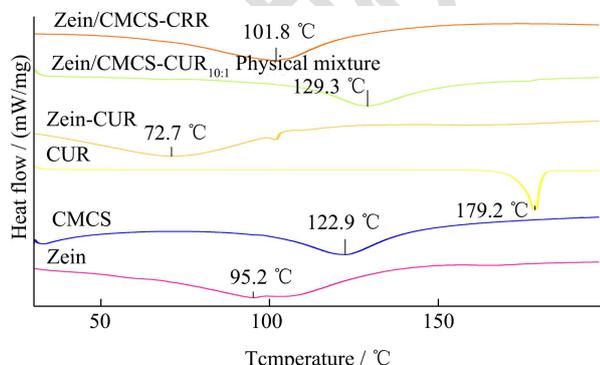


图2 Zein、CMCS、CUR、Zein-CUR、Zein/CMCS-CUR_{10:1} 物理混合物和 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 样品的 DSC 图

Fig.2 DSC plots of Zein, CMCS, CUR, Zein-CUR, Zein/CMCS-CUR_{10:1} physical mixtures and Zein/CMCS-CUR_{10:1} samples

2.4 XRD 分析

XRD 可用于检测姜黄素的结晶状态。如图 3 所示, Zein 的衍射角在 10.1° 和 21.9° 附近时, 在 XRD 图谱中可以观察到两个宽峰。CMCS 在 21.4° 附近也出现一个宽峰。这些结果表明 Zein 和 CMCS 以无定型形式存在, 纯 CUR 特征晶体吸收峰主要分布在 2θ=7.7°、17.3° 和 25.1° 处, 显示出具有尖锐特征衍射峰的结晶状态, 这一结果与 Ren 等^[33]的研究相一致。当用 Zein 对 CUR 进行封装以后, Zein-CUR 显示出相对平坦的图像, 没有明显的姜黄素衍射峰。而这种现象在 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 中表现更加明显, 表明姜黄素从结晶状态转变为非晶态, 并很好地封装在 Zein/CMCS 纳米复合物中^[34]。

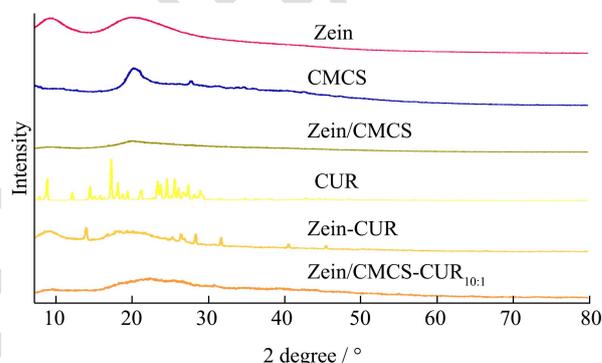


图3 Zein、CMCS、Zein/CMCS、CUR、Zein-CUR 和 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 样品的 XRD 图

Fig.3 XRD patterns of Zein, CMCS, Zein/CMCS, CUR, Zein-CUR and Zein/CMCS-CUR_{10:1} samples

2.5 微观形貌分析

图 4 的透射电镜测量中可以观察到 Zein 为光滑的球形, 大概粒径在 80~100 nm 左右。Zein/CMCS-CUR_{10:1} 纳米复合物呈球形, 大多数颗粒的粒径范围为 100~200 nm, 这与粒径结果一致。粒径的增加可能是由于 CMCS 的表面吸附导致的, Meng 等^[34]利用玉米醇溶蛋白和羧甲基葡聚糖包载姜黄素的研究中也有类似的结果。从图像中可以观察到 Zein-CUR 体系的分散性较差, 存在粒子聚集的现象。粒子聚集可能是由蛋白自身的团聚和小分子物质的姜黄素附着在蛋白上造成的。而 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 呈现出均匀、稳定的状态, 可能是 CMCS 和 Zein 之间存在的静电相互作用形成了稳定的复合物, 从而阻止了蛋白的聚集。

通过扫描电镜对 Zein、CMCS、Zein-CUR 和 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 的微观结构进行了表征, 结果如图 5 所示。Zein 呈球形, 分布较均匀^[34], CMCS 呈薄片状, 而 Zein-CUR 的图像显示其表面较为粗糙且多为聚

集状态,可能是多余的 CUR 通过疏水作用附着在 Zein 的表面,这从图 4 的 Zein-CUR 体系中可以观察到。而加入 CMCS 后, Zein/CMCS-CUR_{10:1} 纳米复合物表面变得光滑,这可能是由于 CMCS 通过与蛋白作用,从而防止了蛋白聚集,形成了较均匀的纳米复合物,这与 TEM 中的结论一致。此外, SEM 样品需要经过冷冻干燥处理,而 TEM 样品经稀释后直接制样,制备方法存在不同,因而观察到的样品微观形貌也存在差异。

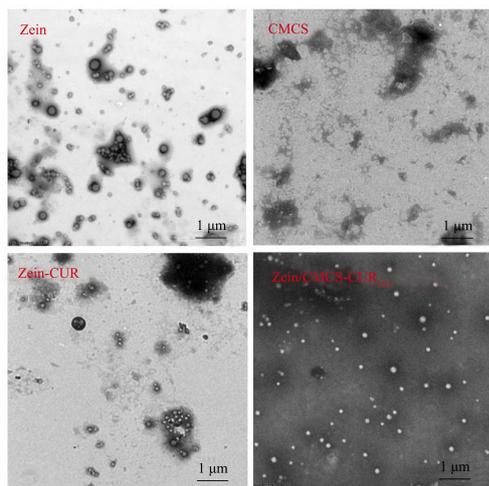


图 4 Zein, CMCS, Zein-CUR 和 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 的 TEM 图像

Fig.4 TEM images of Zein, CMCS, Zein-CUR and Zein/CMCS-CUR_{10:1}

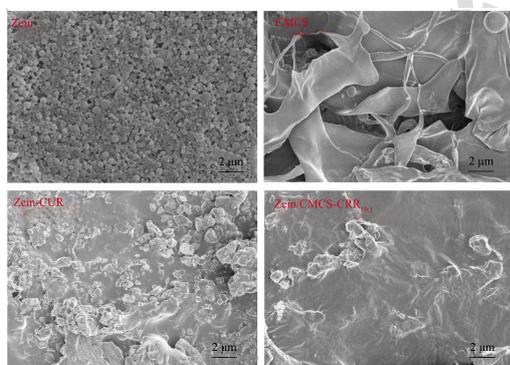


图 5 Zein, CMCS, Zein-CUR 和 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 的 SEM 图像

Fig.5 SEM images of Zein, CMCS, Zein-CUR and Zein/CMCS-CUR_{10:1}

2.6 Zein/CMCS-CUR 纳米复合物的抗氧化活性

图 6 为不同处理条件下 CUR 的抗氧化活性。如图所示, CUR、Zein-CUR、Zein/CMCS-CUR_{10:1} 的 DPPH 自由基清除能力分别为 55.62%、65.50%和 87.12%。Zein-CUR 和 DPPH 自由基清除活性高于水中游离的 CUR,说明疏水性蛋白 Zein 能使 CUR 更好地分散在水中。此外, Zein/CMCS-CUR_{10:1} 纳米复合物比 Zein-CUR 复合物表现出更强的自由基清除能力,可能是 Zein/CMCS 复合物使 CUR 的共轭二烯结构更容易电离

出氢质子与 DPPH 反应,从而增强了 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 纳米复合物的自由基清除能力^[36]。Zein/CMCS-CUR_{10:1} 纳米复合物在 ABTS 测定中也表现出最强的自由基清除能力(84.41%)。这些结果表明,在 Zein/CMCS 中封装 CUR 是增强其抗氧化能力的有效途径。

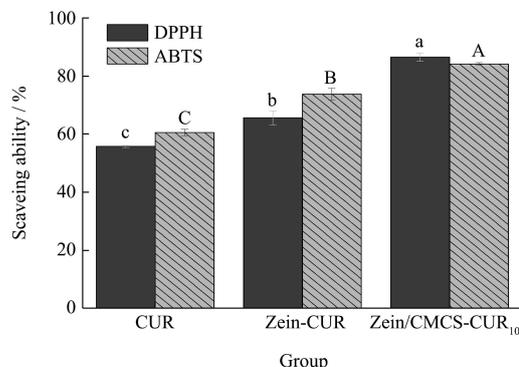


图 6 CUR, CMCS-CUR, Zein-CUR 和 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 的抗氧化活性

Fig.6 Antioxidant activity of CUR, CMCS-CUR, Zein-CUR and Zein/CMCS-CUR_{10:1}

注:英文上注中不同的大写字母表示 ABTS 具有显著差异;不同的小写字母表示 DPPH 具有显著差异 ($p < 0.05$)。

2.7 Zein/CMCS-CUR 纳米复合物的体外缓释

如图 7 所示,将 CUR 分别包载在 Zein 和 Zein/CMCS 中,经胃液消化 1.5 h 后释放率分别为 26.42%和 11.17%,表明 Zein/CMCS 复合物在胃液中对 CUR 有保护作用,在连续消化 3.5 h 后, Zein-CUR 和 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 中 CUR 的释放率分别为 50.41%和 65.28%。实验结果表明 Zein/CMCS 有保护 CUR 的作用,有利于 CUR 在肠道内的释放。胃蛋白酶通过剪切蛋白质中的疏水氨基酸的肽键使蛋白质结构发生改变,而蛋白质和多糖复合物可保护蛋白质的疏水氨基酸,减少蛋白质损坏。Zein 的疏水内核中包载了大部分的姜黄素,在模拟胃液下, Zein/CMCS-CUR_{10:1} 纳米复合物阻碍了胃蛋白酶对 CUR 的消化,只有少量的 CUR 被释放。当 Zein/CMCS-CUR_{10:1} 纳米复合物转移到模拟肠液中时,环境的 pH 的改变致使 Zein 与 CMCS 的相互作用减弱,此时,胰蛋白酶将蛋白质结构破坏, CUR 得以释放。Huang 等^[37]研究表明经溶菌酶-κ-卡拉胶复合物包埋的姜黄素在模拟胃液中的释放率为 17.91%,在模拟肠液中前 1.5 h 内可以快速释放出姜黄素,释放率达到 62.56%。因此溶菌酶-κ-卡拉胶复合物可以为姜黄素在模拟胃液中提供屏障和保护作用,而在模拟肠液中快速释放出姜黄素。Xue 等^[38]的研究结果表明玉米醇溶蛋白-鼠李糖复合体系在胃液中对 CUR 有保护作用,当样品从胃液转移到肠液时, CUR 能够快速释放可能是由于涂覆在纳米颗粒表面的鼠李

糖的溶解,致使玉米醇溶-鼠李糖体系对 CUR 的保护减弱而造成的。其他学者也有相似报道^[39,40]。

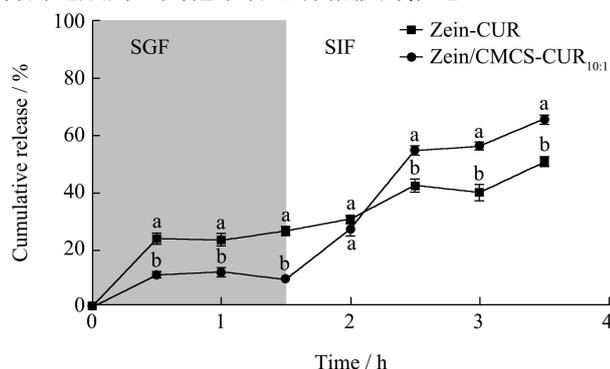


图7 CUR在模拟胃液和肠液中的累计释放率

Fig.7 Cumulative release rate of CUR in simulated gastric and intestinal fluids

注:同组数据不同小写字母表示差异性显著, $p < 0.05$ 。

3 结论

本文以玉米醇溶蛋白和羧甲基壳聚糖为壁材,制备了 Zein/CMCS-CUR 纳米复合物,考察了 Zein/CMCS 与 CUR 的质量比对粒径和包封率的影响,分析了 CUR 在模拟胃肠道消化的释放行为。当 Zein/CMCS 与 CUR 的比例为 10:1 时制备的纳米复合物粒径较小 (95.37 nm),其 zeta 电位为 -21.70 mV,包封率和负载量分别为 96.63% 和 4.55%。微观形貌观察发现 Zein-CUR 体系呈现表面粗糙且多为聚集的状态,而 Zein/CMCS-CUR 纳米复合物呈光滑的球形,且分布均匀。进一步研究 Zein、CMCS、CUR 三者之间的相互作用,发现静电相互作用和氢键是组装该纳米复合物的主要驱动力。与游离的姜黄素相比,纳米复合物负载的姜黄素具有更强的 DPPH 自由基清除能力和 ABTS 自由基清除能力。纳米复合物的体外缓释实验也显示了 Zein/CMCS 有保护 CUR 的作用,有利于 CUR 在肠道内的释放。基于以上实验结果,本研究制备的负载姜黄素的纳米复合物具有应用于功能性食品和药物等领域的潜力。

参考文献

[1] Almeida Claudio M R, Magalhaes Julia M C, Souza Hileia K S, et al. The role of choline chloride-based deep eutectic solvent and curcumin on chitosan films properties [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 81: 456-466

[2] Chen H Y, Jin Y M, Ding X L, et al. Improved the emulsion stability of phosvitin from hen egg yolk against different pH by the covalent attachment with dextran [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39: 104-112

[3] Delfanian M, Sahari M. Improving functionality,

bioavailability, nutraceutical and sensory attributes of fortified foods using phenolics-loaded nanocarriers as natural ingredients [J]. Food Research International, 2020, 137: 09555

[4] Ezati P, Rhimm J W. pH-responsive pectin-based multifunctional films incorporated with curcumin and sulfur nanoparticles [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 230: 115638

[5] 陈建平,李琳,苏健裕.姜黄素的抗氧化及抗肿瘤活性研究[J].现代食品科技,2014,30(12):11-15

[6] Sahu A, Kasoju N, Goswami P, et al. Encapsulation of curcumin in pluronic block copolymer micelles for drug delivery applications [J]. Journal of Biomaterials Applications, 2011, 25(6): 619

[7] Chen S, Li Q, McClements C, et al. Co-delivery of curcumin and piperine in zein-carrageenan core-shell nanoparticles: Formation, structure, stability and in vitro gastrointestinal digestion [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 99: 105-334

[8] Liu W J, Wu W, Selomulya C, et al. Facile spray-drying assembly of uniform microencapsulates with tunable core-shell structures and controlled release properties [J]. Langmuir, 2011, 27(21): 12910-12915

[9] Musigakun P, Thongngam M. Characteristics and functional properties of sorghum protein (kafirin) [J]. Kasetsart Journal: Natural Science, 2007, 313-318

[10] Wei Y, Li C, Zhang L, et al. Influence of calcium ions on the stability, microstructure and *in vitro* digestion fate of zein-propylene glycol alginate-tea saponin ternary complex particles for the delivery of resveratrol [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 106: 105886

[11] Elbially N S, Aboushoushah S F, Mohamed N. Bioinspired synthesis of protein/polysaccharide-decorated folate as a nanocarrier of curcumin to potentiate cancer therapy [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2022, 613: 121420

[12] Feng J, Xu H Q, Zhang L X, et al. Development of nanocomplexes for curcumin vehiculization using ovalbumin and sodium alginate as building blocks: Improved stability, bioaccessibility, and antioxidant activity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67: 379-390

[13] Sharma A, Mittal A, Puri V, et al. Curcumin-loaded, alginate-gelatin composite fibers for wound healing applications [J]. Biotech, 2020, 10: 364

[14] Ganguly R, Kumar S, Kunwar A, et al. Structural and therapeutic properties of curcumin solubilized pluronic F127 micellar solutions and hydrogels [J]. Journal of Molecular Liquids, 2020, 314: 113591

[15] Chang C, Wang T, Hu Q B, et al. Pectin coating improves

- physicochemical properties of caseinate/zein nanoparticles as oral delivery vehicles for curcumin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 70: 143-151
- [16] Cheng C, Jones OG. Stabilizing zein nanoparticle dispersions with ι-carrageenan [J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 69: 28-35
- [17] Huang X L, Dai Y Q, Cai J X, et al. Resveratrol encapsulation in core-shell biopolymer nanoparticles: Impact on antioxidant and anticancer activities [J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 64: 157-165
- [18] Zhang L T, Zhang F, Fang Y, et al. Alginate-shelled SPI nanoparticle for encapsulation of resveratrol with enhanced colloidal and chemical stability [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 90: 313-320
- [19] Luo Y C, Teng Z, Wang Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3 [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2012, 60(3): 836-843
- [20] Lin M H, Fang S, Zhao X J, et al. Natamycin-loaded zein nanoparticles stabilized by carboxymethyl chitosan: Evaluation of colloidal/chemical performance and application in postharvest treatments [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 106: 05871
- [21] Minekus M, Almingerl M, Alviltro P, et al. A standardized static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus [J]. *Food & Function*, 2014, 5(6): 1113-1124
- [22] Hur S J, Lim B O, Decker E A, et al. *In vitro* human digestion models for food applications [J]. *Food Chemistry*, 2011, 125(1): 1-12
- [23] Xie H J, Liu C Z, Gao J, et al. Fabrication of Zein-Lecithin-EGCG complex nanoparticles: Characterization, controlled release in simulated gastrointestinal digestion [J]. *Food Chemistry*, 2021, 365: 130542
- [24] Dai L, Li R R, Wei Y, et al. Fabrication of zein and rhamnolipid complex nanoparticles to enhance the stability and *in vitro* release of curcumin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 77: 617-628
- [25] Chen F P, Ou S, Tang C H. Core-shell soy protein-soy polysaccharide complex (Nano) particles as carriers for improved stability and sustained release of curcumin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(24): 5053-5059
- [26] Xie H J, Zhang Y T, Cao M N, et al. Fabrication of PGFE/CN-stabilized β-carotene-loaded peppermint oil nanoemulsions: Storage stability, rheological behavior and intelligent sensory analyses [J]. *LWT Food Science and Technology*, 2021, 138: 110688
- [27] Zhang H, Fu Y, Niu F G, et al. Enhanced antioxidant activity and *in vitro* release of propolis by acid-induced aggregation using heat-denatured zein and carboxymethyl chitosan [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 81: 104-112
- [28] Wu Z Z, He D Y, Cui B, et al. Ultrasensitive detection of microcystin-LR with gold immunochromatographic assay assisted by a molecular imprinting technique [J]. *Food Chemistry*, 2019, 283: 517-521
- [29] Zhang H, Jiang L Y, Tong M D, et al. Encapsulation of curcumin using fucoidan stabilized zein nanoparticles: Preparation, characterization, and *in vitro* release performance [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2021, 329: 115586
- [30] Cai T M, Xiao P, Yu N X, et al. A novel pectin from *Akebia trifoliata* var. *australis* fruit peel and its use as a wall-material to coat curcumin-loaded zein nanoparticle [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 152: 40-49
- [31] Xiao J, Nian S, Huang Q R. Assembly of kafirin/carboxymethyl chitosan nanoparticles to enhance the cellular uptake of curcumin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 51: 166-175
- [32] Dai L, Sun C X, Li R R, et al. Structural characterization, formation mechanism and stability of curcumin in zein-lecithin composite nanoparticles fabricated by antisolvent co-precipitation [J]. *Food Chemistry*, 2017, 237(15): 1163
- [33] Ren G R, He Y, Liu C Z, et al. Encapsulation of curcumin in ZEIN-HTCC complexes: Physicochemical characterization, *in vitro* sustained release behavior and encapsulation mechanism [J]. *LWT Food Science and Technology*, 2022, 155: 112909
- [34] Meng R, Wu Z Z, Xie Q T, et al. Preparation and characterization of zein/carboxymethyl dextrin nanoparticles to encapsulate curcumin: Physicochemical stability, antioxidant activity and controlled release properties [J]. *Food Chemistry*, 2021, 340: 12789
- [35] 赖婵娟,吴磊燕,胡林芳.不同溶剂中玉米醇溶蛋白的聚集状态和结构性质[J].*现代食品科技*,2021,37(6):115-123
- [36] Liang J, Yan H, Wang X L, et al. Encapsulation of epigallocatechin gallate in zein/chitosan nanoparticles for controlled applications in food systems [J]. *Food Chemistry*, 2017, 231: 19-24
- [37] Huang W N, Wang L H, Wei Y Q, et al. Fabrication of lysozyme/κ-carrageenan complex nanoparticles as a novel carrier to enhance the stability and *in vitro* release of curcumin [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 146, 444-452
- [38] Xue J L, Zhang Y Q, Huang G R, et al. Zein-caseinate composite nanoparticles for bioactive delivery using curcumin as a probe compound [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 83: 25-35
- [39] Zhang H, Fu Y, Niu F G, et al. Enhanced antioxidant activity and *in vitro* release of propolis by acid-induced aggregation using heat-denatured zein and carboxymethyl chitosan [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 81: 104-112
- [40] Zhang D C, Jiang F Y, Ling J H, et al. Delivery of curcumin using a zein-xanthan gum nanocomplex: Fabrication, characterization, and *in vitro* release properties [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 204: 111827

现代食品科技