

4 种白藜芦醇蛋白纳米颗粒的生物可及性研究

宋亚楠¹, 朱玲¹, 张晖^{1*}, 吴港城¹, 刘通通²

(¹ 江南大学食品学院 江苏无锡 214122

² 滨州中裕食品有限公司 国家小麦加工产业技术创新中心 山东滨州 256600)

摘要 白藜芦醇的低水溶性和不稳定性等缺点限制了其生物利用度。本文通过探究 4 种蛋白纳米颗粒的包封性能及体外消化形式,研究其对白藜芦醇生物可及性的影响。结果表明,白藜芦醇与各蛋白主要通过疏水相互作用结合,并以无定形态包封在颗粒内部。玉米醇溶蛋白纳米颗粒(ZRNP)和酪蛋白酸钠纳米颗粒(CRNP)由于良好的疏水性,包封率在 80% 以上。在体外模拟消化过程中,ZRNP 聚集使白藜芦醇释放率低至(33.95±0.98)%;乳清分离蛋白纳米颗粒(WRNP)具有较强的抗消化能力,导致游离氨基酸释放率仅为(22.84±1.40)%。CRNP 和大豆分离蛋白纳米颗粒(SRNP)可以显著提高游离白藜芦醇的体外生物可及性达 50% 以上。结合包封性能以及体外消化过程中的作用形式,CRNP 作为白藜芦醇的包封载体,有望提高其生物可及性。本研究为提高疏水性多酚的生物利用及其在功能性食品上的应用提供理论基础。

关键词 白藜芦醇; 纳米颗粒; 生物可及性; 体外模拟消化

文章编号 1009-7848(2025)01-0103-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.01.010

白藜芦醇(Resveratrol)是一种具有抗癌、抗炎等多种生物活性的非黄酮类多酚有机化合物,广泛存在于虎杖、葡萄以及花生等植物中^[1-2]。由于白藜芦醇水溶性差、易降解等缺点,其生物利用度非常低,这严重限制了其在食品以及口服药物中的应用。

纳米颗粒可以将白藜芦醇包封在聚合物内部,使其免受胃肠酶解或其它代谢干扰,有助于白藜芦醇缓慢释放,从而提高生物可及性^[3-4]。蛋白质因优良的生物相容性、生物降解性及低毒性而被广泛应用于白藜芦醇纳米颗粒的制备,此外它可以促进白藜芦醇在小肠中的胶束化过程,从而对生物可及性产生积极影响^[5]。目前,提高白藜芦醇生物可及性的研究局限于通过蛋白改性或用其它聚合物(如多糖等)对其多层包覆^[6-7]。然而使用的包封技术以及定量、定性分析技术各有差别,并且不同来源的蛋白对白藜芦醇生物可及性的影响及其作用机制尚未探明。

本研究选取具有优良疏水性及自组装性的玉

米醇溶蛋白和酪蛋白酸钠,以及具有抗消化性的大豆分离蛋白和乳清分离蛋白 4 种蛋白为包封材料,制备白藜芦醇纳米颗粒。在横向比较其结合方式及包封性能的基础上,探究各体系在 INFOGEST 体外模拟消化过程中的消化行为,以及对白藜芦醇生物可及性的影响,为提高疏水性多酚的生物利用,及其在功能性食品上的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白藜芦醇(纯度≥99%),国药集团化学试剂有限公司;玉米醇溶蛋白(纯度≥98%),美国 Sigma-Aldrich 公司;酪蛋白酸钠(纯度≥90%),北京伊诺凯科技有限公司;大豆分离蛋白(分散型),国药集团化学试剂有限公司;乳清分离蛋白(纯度≥95%),上海颖心实验室;胃蛋白酶(1:3 000)、胰酶(USP 级),阿拉丁试剂有限公司;其它无机试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器

Prominence LC-20A 高效液相色谱系统,日本 Shimadzu 有限公司;Nano ZS 90 型纳米粒度、Zeta 电位仪,英国 Malvern 有限公司;IS10 傅里叶红外光谱仪,美国 Nicolet 公司;D2 PHASER 型 X 射线衍射仪,德国布鲁克 AXS 有限公司;F-7000

收稿日期: 2024-01-27

基金项目: “十四五”国家重点研发计划重点专项(2021YFD2100404); 云南省重大科技专项计划项目(202102AE090055)

第一作者: 宋亚楠,女,硕士

通信作者: 张晖 E-mail: zhanghui@jiangnan.edu.cn

荧光分光光度计,日本日立公司。

1.3 白藜芦醇蛋白纳米颗粒的制备

通过抗溶剂法制备白藜芦醇蛋白纳米颗粒^[8]:将玉米醇溶蛋白和白藜芦醇以 1:20 (m/m) 溶于 80% (V/V) 乙醇水溶液中,充分搅拌(800 r/min),将其以 1:4(V/V)逐滴加入水(pH 4.0)中,滴加完毕后继续搅拌 60 min。使用旋转蒸发器在 50 °C 旋蒸 30 min 后,以 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,得到蛋白质含量为 1% 的纳米分散液。白藜芦醇酪蛋白酸钠、大豆分离蛋白、乳清分离蛋白纳米颗粒^[9]则是将白藜芦醇溶于 80% 的乙醇溶液中,充分混匀后,按 1:4(V/V)逐滴加入 4 种蛋白水溶液中。其余操作同上。将部分样品置于 4 °C 下备用,剩余样品经冷冻干燥后保存。

将所得样品分别命名为 ZRNP(玉米醇溶蛋白纳米颗粒)、CRNP(酪蛋白酸钠纳米颗粒)、SRNP(大豆分离蛋白纳米颗粒)、WRNP(乳清分离蛋白纳米颗粒)。由于白藜芦醇的光异构性,制备过程中均处于避光环境。

1.4 白藜芦醇蛋白纳米颗粒的表征

1.4.1 粒径分析和 Zeta 电位测定 样品经超纯水稀释至适当浓度,振荡均匀后置于纳米激光粒度仪中,其平均粒径、多分散性指数(PDI)和 Zeta 电位由动态光散射方法测定^[10]。每个样品均在常温下至少重复测定 3 次。

1.4.2 白藜芦醇封装性能的测定 参考 Syahdi 等^[11]的白藜芦醇定量测定方法,高效液相色谱(HPLC)条件为:流动相为 0.1% 甲酸超纯水(V/V)和乙腈;以 75:25(V/V)进行等度洗脱;色谱柱 Waters C18 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流速 0.8 mL/min;柱温 35 °C;进样量 5 μL;检测波长 306 nm;分析时间 20 min;样品均置于 4 °C 下。白藜芦醇标准品在 0~50 μg/mL 范围内呈线性关系,根据峰面积对标准浓度计算出其标准曲线为 $y = 43970x - 18.81$,相关系数 R^2 为 0.9995。

将各蛋白纳米分散液使用 Millipore 超滤离心管(3 ku)离心 10 min 以得到游离白藜芦醇^[12]。将游离白藜芦醇与原样品分别用甲醇稀释 5 倍后,过 0.22 μm 滤膜,经 HPLC 分析,分别测得样品中白藜芦醇的游离量以及总量。封装率(Encapsulation efficiency,EE)以及负载率(Load efficiency,

LE)计算如下。

$$EE(\%) = \frac{M - M_1}{M_2} \times 100 \quad (1)$$

$$LE(\%) = \frac{M - M_1}{M_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: M 为样品中白藜芦醇的含量,μg; M_1 为样品中白藜芦醇的游离量,μg; M_2 为制备过程中白藜芦醇的添加量,μg; M_0 为制备过程中物质的总添加量,μg。

1.4.3 荧光光谱(FS) 样品经超纯水稀释至蛋白质量浓度为 0.5 mg/mL,通过 F-7000 荧光光谱仪测定^[13]:激发波长 280 nm,发射波长 290~500 nm,扫描速度 1 200 nm/min,扫描间隔 1 nm,激发狭缝 5 nm,发射狭缝为 5 nm。

1.4.4 傅里叶变换红外光谱(FTIR) 为了解纳米颗粒内部的相互作用,将冻干样品与白藜芦醇标准品通过 FTIR 光谱仪分析^[14]:波数范围 4 000~600 cm^{-1} ,分辨率 4 cm^{-1} ,采样 32 次。

1.4.5 X 射线衍射图谱(XRD) 将冻干样品粉末通过 XRD 分析其晶体衍射图^[14]:加速电压 40 kV,电流 100 mA,扫描速度 0.05°/s,扫描衍射角 2θ ,扫描范围为 5°~40°。

1.5 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒消化行为的影响

1.5.1 INFOGEST 静态体外模拟消化方法 模拟胃消化液(Simulated gastric fluid,SGF)和小肠消化液(Simulated intestinal fluid,SIF)的配制如表 1 所示^[15]。

体外模拟胃肠道消化^[16]:首先向 10 mL 样品中加入 8 mL SGF,0.005 mL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$,调 pH 值至 3.0 后,加入 2 000 U/mL 胃蛋白酶,加超纯水至 20 mL,置于 37 °C 振荡培养箱中以 200 r/min 分别反应 40,80,120 min。反应后向 20 mL 胃消化物中加入 16 mL SIF,0.04 mL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$,调 pH 值至 7.0 后,加入 100 U/mL 胰酶以及 179.45 mg 胆盐,加超纯水至 40 mL,置于 37 °C 振荡培养箱中,以 200 r/min 分别反应 160,200,240 min。

1.5.2 白藜芦醇释放率 收集预定时间间隔的模拟胃肠液消化样品,并通过调节 pH 值抑制样品消化行为。测定各样品消化过程中释放的白藜芦醇含量,方法同 1.4.2 节。白藜芦醇释放率计算如下:

表 1 模拟胃液和小肠消化液的组成

Table 1 Compositions of simulated gastric and intestinal digestion fluids

盐种类	浓度/(mol/L)	模拟胃液 SGF(pH 3.0)		模拟肠液 SIF(pH 7.0)	
		制备 0.4 L/mL	浓度/(mmol/L)	制备 0.4 L/mL	浓度/(mmol/L)
KCl	0.50	6.900	6.90	6.80	6.80
KH ₂ PO ₄	0.50	0.900	0.90	0.80	0.80
NaHCO ₃	1.00	12.500	25.00	42.50	85.00
NaCl	2.00	11.800	47.20	9.60	38.40
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0.15	0.400	0.12	1.10	0.33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0.50	0.500	0.50	—	—
HCl	6.00	1.300	15.60	0.70	8.40
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	0.30	0.005	0.15	0.04	0.60

注：“—”表示 SIF 中没有该盐种类。

$$\text{RES}(\%) = \frac{M_a - M_1}{M_b} \times 100 \quad (3)$$

式中： M_a 为样品消化过程中释放的游离白藜芦醇含量， μg ； M_1 为样品消化前白藜芦醇的游离量， μg ； M_b 为样品消化液中白藜芦醇的含量， μg 。

1.5.3 氨基酸释放率 参考 Jarunglumlert 等^[17]的方法，使用茚三酮比色法测定消化过程中释放的游离氨基酸(Free amino acid, FAA)含量，以此来评估蛋白质的消化行为。将 1 mL 的 5% 三氯乙酸与 1 mL 的消化样品混合，8 000 r/min 离心 10 min，以沉淀其中的蛋白质和大分子肽。取 200 μL 上清液与 600 μL 0.15 mol/L 茚三酮溶液和 200 μL 0.4 mol/L 乙酸钠缓冲液 (pH 5.0) 混合后，在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min。通过酶标仪在波长 570 nm 处记录吸光度。样品中的总氨基酸含量是样品与 HCl 溶液 (pH 2.0) 在水解管中混合，在 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热 24 h 后测定。根据吸光度对亮氨酸标准浓度计算出其标准曲线为 $y=6.1115x+0.0024$ ，相关系数 R^2 为 0.9982。FAA 释放率计算如下^[18]。

$$\text{FAA}(\%) = \frac{F_a}{P} \times 100 \quad (4)$$

式中： F_a 为样品消化过程中释放的游离氨基酸含量， mg ； P 为样品消化液中总氨基酸含量， mg 。

1.5.4 荧光特性变化 收集预定时间间隔的模拟胃肠液消化样品，经超纯水稀释至蛋白质质量浓度为 0.5 mg/mL ，通过 F-7000 荧光光谱仪测定^[13]，方法同 1.4.3 节。

1.5.5 生物可及性 参考 Gan 等^[19]的方法，将预定时间间隔的模拟胃肠液消化样品在 10 000 r/min

离心 30 min，取上清液测定白藜芦醇含量，方法同 1.4.2 节。生物可及性(Bioaccessibility, BC)计算如下。

$$\text{BC}(\%) = \frac{M_R - M_1}{M_b} \times 100 \quad (5)$$

式中： M_R 为样品消化后上清液中白藜芦醇的含量， μg ； M_1 为样品消化前白藜芦醇的游离量， μg ； M_b 为样品消化液中白藜芦醇的含量， μg 。

1.6 数据处理

用 Origin 2019 软件进行数据及图像分析，SPSS 19.0 软件进行方差分析，Duncan 检验方法 ($P < 0.05$) 对结果进行显著性分析，所有样品均平行测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒表征的影响

2.1.1 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响 如表 2 所示，各样品均是纳米体系的分散液。其中 ZRNP 由于良好的疏水性，在反溶剂法制备过程中形成粒径为 (102.67 \pm 0.23) nm 并且稳定存在 (PDI<0.3) 的颗粒，这也说明其具有优良的自组装性^[13]。WRNP 由于乳清分离蛋白的溶解度低，纳米颗粒体系稳定性较差。其余蛋白由于疏水性较弱，形成较大粒径 (200~300 nm) 的颗粒。各蛋白等电点均在 4.5~5.0，ZRNP 在酸性环境下表面带正电荷，其余蛋白在中性环境下表面均带负电荷^[20]。其中 ZRNP 与 CRNP 的电位绝对值较高，这也有利于纳米颗粒在分散液中的稳定存在。

表2 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒粒径、Zeta 电位和 PDI 的影响

Table 2 Effects of different proteins on resveratrol nanoparticle size, Zeta potential, and PDI

样品	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
ZRNP	102.67 ± 0.23 ^c	0.27 ± 0.03 ^c	26.23 ± 0.72 ^a
CRNP	374.15 ± 10.35 ^a	0.42 ± 0.06 ^{ab}	-20.77 ± 0.59 ^c
SRNP	268.10 ± 6.22 ^b	0.36 ± 0.05 ^b	-13.90 ± 0.87 ^b
WRNP	123.23 ± 27.94 ^c	0.47 ± 0.01 ^a	-19.20 ± 2.95 ^c

注:不同字母表示在同一指标中不同处理的蛋白样品之间具有显著性差异($P < 0.05$)。

2.1.2 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒封装性能的影响 目前测定游离白藜芦醇含量的方法,一是采用有机溶剂萃取,如用乙酸乙酯萃取及氮气吹干后,将所得固形物用甲醇复溶,经 HPLC 或紫外分光光度计测定其中白藜芦醇的含量^[13],而该方法可能造成已包覆在纳米颗粒内部的白藜芦醇重

新被浸提到有机溶剂中,并且由于繁杂的步骤使微量的白藜芦醇损失。二是高速离心取上清液测定游离白藜芦醇^[21],高速离心无法将纳米体系中已包覆的纳米颗粒沉积在底部。这会导致测定量偏高,无法准确测定游离白藜芦醇含量。研究发现超滤离心可以利用离心力及不同分子质量超滤膜的作用,使样品中的小分子物质分离出来,从而得到纯净物质^[22]。因此,本研究选取超滤离心和 HPLC 共同测定白藜芦醇含量。

如表 3 所示,各蛋白对白藜芦醇的封装率为 ZRNP 最优,可达(89.23±2.05)%,CRNP 次之,为(81.89±3.10)%。而 SRNP 和 WRNP 则由于其溶解度差^[23],在白藜芦醇添加量相同的条件下,制备过程中体系裹挟部分白藜芦醇发生沉降,导致封装率和负载率均较低。然而对于白藜芦醇生物可及性的探究不能仅凭封装性能判断,还需对其结合方式以及消化特性作进一步探究。

表3 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒封装率及负载率的影响

Table 3 Effects of different proteins on encapsulation efficiency and loading efficiency of resveratrol nanoparticles

样品	白藜芦醇质量浓度/(μg/mL)		封装率/%	负载率/%
	总	游离		
ZRNP	492.15 ± 13.05 ^a	46.02 ± 5.17 ^b	89.23 ± 2.05 ^a	4.25 ± 0.10 ^a
CRNP	502.43 ± 14.67 ^a	91.45 ± 13.52 ^a	81.89 ± 3.10 ^{ab}	3.90 ± 0.15 ^{ab}
SRNP	422.81 ± 9.67 ^b	32.07 ± 9.15 ^c	78.15 ± 0.10 ^b	3.72 ± 0.01 ^b
WRNP	271.82 ± 45.14 ^c	17.68 ± 5.00 ^d	50.83 ± 17.31 ^c	2.42 ± 0.42 ^c

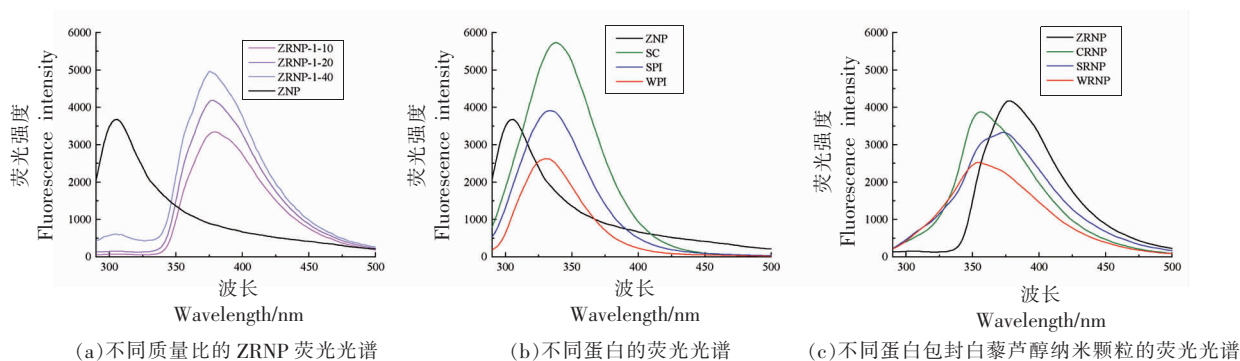
注:不同字母表示在同一指标中不同处理的蛋白样品之间具有显著性差异($P < 0.05$)。

2.1.3 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒荧光光谱的影响 如图 1 所示,当白藜芦醇负载于蛋白纳米颗粒时,最大吸收波长(λ_{\max})均出现不同程度的红移现象,这是由于局部环境中极性的增加而引起峰波长的位移。其中,ZRNP 由于良好的疏水性, λ_{\max} 红移效果最显著,由 305 nm 红移到 380 nm。这表明疏水相互作用是蛋白质与白藜芦醇之间的主要分子作用力,它改变了蛋白质的荧光发色基团。另一方面,荧光猝灭效果表现出 CRNP>ZRNP>SRNP>WRNP,这与表 3 中各样品的白藜芦醇游离量相关,原因是随着白藜芦醇质量浓度的增加,游离量增加,对蛋白中酪氨酸的荧光猝灭作用增强,因此荧光强度下降^[10,21,24]。

2.1.4 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒 FTIR 的影

响 如图 2a 所示,当白藜芦醇负载于蛋白纳米颗粒时,它位于 3 197 cm^{-1} (羟基-OH 拉伸)和 1 583 cm^{-1} (烯烃-C=C-拉伸)以及 1 200~800 cm^{-1} (苯环等)的光谱特征峰变得模糊^[25],并在 3 280,1 630,1 515 cm^{-1} 附近产生特征峰,分别与 O-H 拉伸振动、酰胺 I 波段和酰胺 II 波段有关^[26]。这表明白藜芦醇与蛋白之间发生氢键相互作用和疏水相互作用,并成功地被包裹在复合纳米颗粒中^[10]。

2.1.5 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒 XRD 的影响 如图 2b 所示,当白藜芦醇负载于蛋白纳米颗粒时,它在 6.619°,16.369°,20.310°的特征结晶峰消失^[13],形成没有明显尖峰的宽峰。这表明白藜芦醇不仅成功地与蛋白质相互作用,被包覆在纳米颗粒内部,而且由结晶形转化为无定形状态。



注:(a)ZRNP-1-10,1-20 和 1-40 分别表示白藜芦醇与玉米醇溶蛋白的质量比分别为 1:10,1:20,1:40 的纳米颗粒;ZNP 表示不添加白藜芦醇的玉米醇溶蛋白纳米颗粒;(b)SC、SPI、WPI 分别表示不添加白藜芦醇的酪蛋白酸钠纳米颗粒、大豆分离蛋白纳米颗粒和乳清分离蛋白纳米颗粒。

图 1 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒荧光特性的影响

Fig.1 Effects of different proteins on the fluorescence characteristics of resveratrol nanoparticles

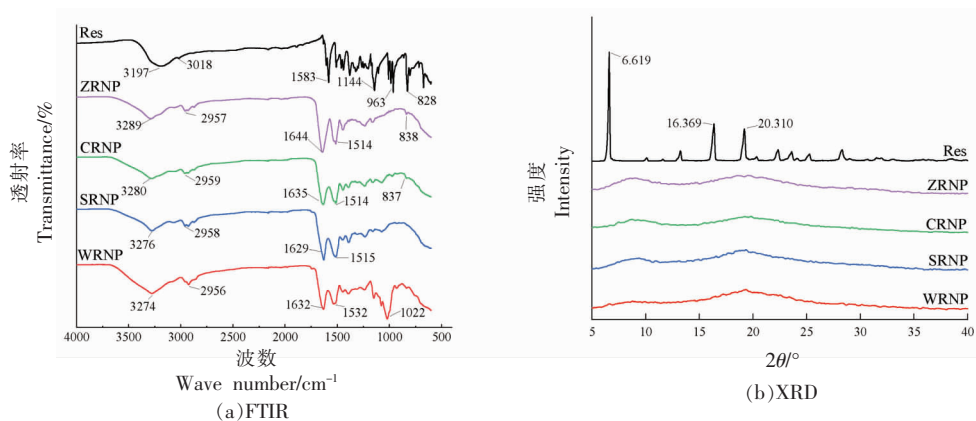


图 2 白藜芦醇及其蛋白纳米颗粒的图谱

Fig.2 Spectrum of resveratrol and protein nanoparticles

2.2 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒消化行为的影响

目前针对白藜芦醇体外生物可及性的探究,所使用的消化方法及酶的用量等均存在差异。因此本研究采用 INFOGEST 静态体外模拟消化方法进行探究,该方法通过恒定的盐离子、酶浓度等条件可以更为准确地评估并横向比较不同体系中白藜芦醇纳米颗粒的消化行为,为进一步提高白藜芦醇的生物可及性提供理论依据^[15]。

2.2.1 不同蛋白对纳米颗粒消化过程中白藜芦醇释放率的影响 各蛋白纳米颗粒在模拟胃肠道消化过程中白藜芦醇的释放情况如图 3 所示。各蛋白封装的白藜芦醇在 SGF 的前 40 min 内快速释

放,随后释放较慢;进入 SIF 后释放较快,这是由于各样品在 SIF 中被胰酶快速水解,所得水解产物在胆盐交联作用下转化为胶束,有利于肠道吸收。这与 Yang 等^[10]在玉米醇溶蛋白对白藜芦醇纳米颗粒的体外消化试验结果相一致。然而 ZRNP 在胃液的极端酸性环境中发生聚集,裹挟着白藜芦醇并没有进入胶束中,导致释放率较低^[27],仅为 $(33.95 \pm 0.98)\%$ 。而 SRNP 中的 7S 和 11S 球蛋白以及 WRNP 中的 β -乳球蛋白和 α -乳清蛋白,使两者具有较优的抗消化性,使其可以保护白藜芦醇进入胶束,释放率呈现出 $WRNP > SRNP > CRNP > ZRNP$ 。各样品在 SGF 消化过程中的稳定性以及在 SIF 消化过程中的快速水解,确保了体系可以将白

藜芦醇运送到肠道,有利于其发挥靶向作用^[28]。

2.2.2 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒消化过程中氨基酸释放率的影响 通过茚三酮反应来探究各样品在模拟胃肠道消化过程中氨基酸的释放情况,如图4所示。在SGF中,ZRNP聚集会使蛋白结构被破坏,导致其水解产生的游离氨基酸释放率偏高;而其余蛋白更耐胃蛋白酶水解,游离氨基酸释放率较低。在进入SIF后,所有样品的界面蛋白均在最初的40 min内快速消化,释放的游离氨基酸含量稳定增加直到消化结束,氨基酸释放率和白藜芦醇释放率呈反比^[18],WRNP的游离氨基酸释放率仅为 $(22.84\pm 1.40)\%$ 。这也说明蛋白纳米颗粒必须在胃消化条件下保持其结构完整性,才能将白藜芦醇输送到肠道中进行吸收^[29]。

2.2.3 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒消化过程中荧光特性的影响 如图5所示,随着由SGF进入SIF阶段,ZRNP、CRNP和SRNP的 λ_{\max} 发生蓝移,说明蛋白发色基团被包埋在分子内部;而WRNP λ_{\max} 则发生红移,说明蛋白发色基团暴露^[30]。另一方面,ZRNP、CRNP和WRNP在进入SGF后,由于体系中蛋白分子结构展开,展现出更多的胰蛋白酶结合位点,导致荧光强度增加;SRNP进入SGF后荧光强度显著下降,则表明在胰蛋白酶的作用下,蛋白水解后产生的肽段通过二硫键形成的聚集体增多,疏水相互作用导致荧光猝灭^[31]。总之,各蛋白纳米颗粒内部氨基酸残基等所处的环境极性发生变化,这说明白藜芦醇在消化阶段特别是SIF阶段持续释放,这也有利于白藜芦醇生物可及性的提高。

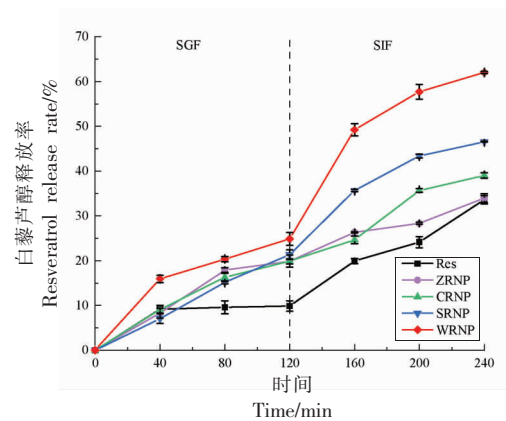


图3 不同蛋白对纳米颗粒消化过程中白藜芦醇释放率的影响

Fig.3 Effects of different proteins on resveratrol release rate during nanoparticle digestion

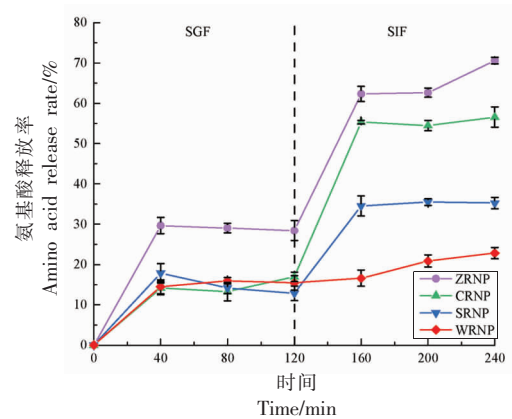
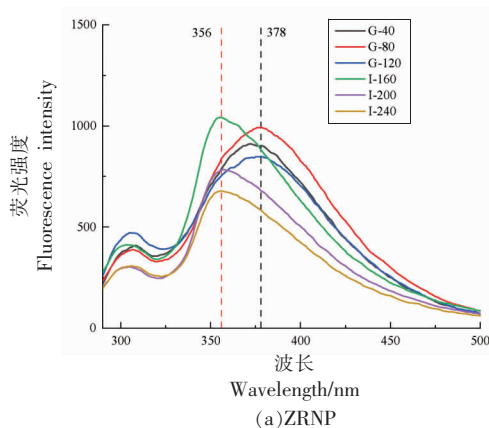
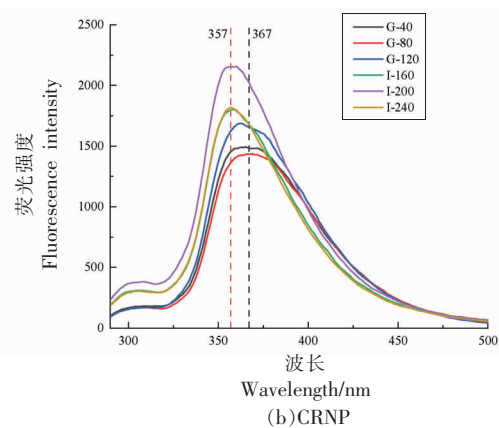


图4 不同蛋白对纳米颗粒消化过程中氨基酸释放率的影响

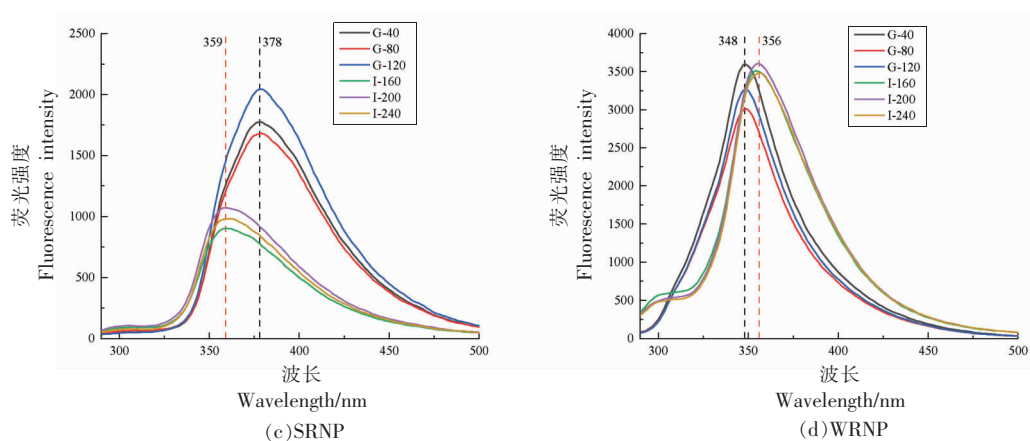
Fig.4 Effects of different proteins on amino acid release rate during nanoparticle digestion



(a) ZRNP



(b) CRNP



注:G-40、G-80 和 G-120 表示各样品在 SGF 中分别反应 40,80,120 min 的模拟胃消化样品;I-160、I-200 和 I-240 表示各样品在 SIF 中继续分别反应至 160,200,240 min 的模拟肠消化样品。

图 5 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒消化过程中荧光特性的影响

Fig.5 Effects of different proteins on fluorescence properties during the digestion of resveratrol nanoparticles

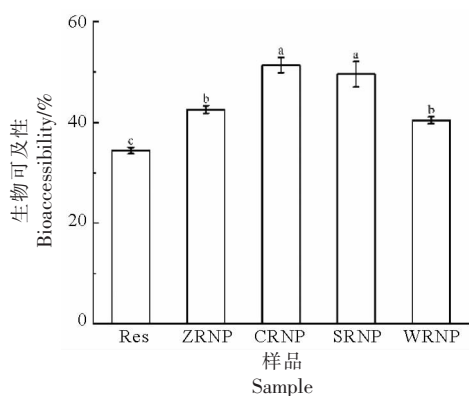
2.2.4 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒生物可及性的影响 白藜芦醇在水中的溶解度仅为 0.03 mg/mL,并且在胃中酸性条件下不稳定,容易降解,因此其生物可及性较低^[5]。而蛋白纳米颗粒由于其为无定形态,在胆盐和胰酶的作用下容易形成胶束,可以提高白藜芦醇的溶解度,使其易于被血液吸收并能被组织器官利用,从而提高生物利用度^[5,32]。在白藜芦醇添加量相同的条件下,由于 ZRNP 在消化过程中易聚集沉降,造成白藜芦醇释放率较低;WRNP 虽有较强的抗消化能力,但是由于其在制备过程中白藜芦醇损失,导致其白藜芦醇含量较少,因此两者的生物可及性均较低。而 CRNP 和 SRNP 则不仅在制备过程中封装性能好,

且两者抗消化性能也较好,可以显著提高白藜芦醇的体外生物可及性至 50%以上。

3 结论

本研究通过抗溶剂法将白藜芦醇封装在 4 种蛋白的纳米颗粒内部,使其由结晶形转化为易于肠道吸收的无定形态,疏水相互作用是两者结合的主要方式。其中,ZRNP 和 CRNP 具有良好的自组装性,封装率可达 80%~90%;WRNP 和 SRNP 的溶解度差,封装率较低。进一步探究各蛋白纳米颗粒在 INFOGEST 静态体外模拟的消化行为,结果发现各样品的内部氨基酸残基所处的环境极性发生变化,并且在胆盐交联作用下转化为胶束,有利于白藜芦醇的缓释。而 ZRNP 在 SGF 中蛋白裹挟着白藜芦醇发生沉降,造成白藜芦醇释放率偏低,仅为 $(33.95 \pm 0.98)\%$;WRNP 在制备过程中存在白藜芦醇的损耗,且抗消化能力过强,游离氨基酸释放率仅为 $(22.84 \pm 1.40)\%$ 。CRNP 和 SRNP 在消化过程中显示出了较优的缓释速率,并可提高白藜芦醇生物可及性至 50%以上。

结合封装性能以及体外消化过程中的作用形式,CRNP 作为白藜芦醇的封装载体,有望提高其生物可及性。在后续的研究中,将通过酪蛋白酸钠外层包覆多糖,为进一步改善其在消化过程中的缓释性能,提高白藜芦醇的生物利用度提供理论基础。



注:Res 表示未封装的白藜芦醇样品。不同小写字母表示不同样品间差异显著($P < 0.05$)。

图 6 不同蛋白对白藜芦醇纳米颗粒生物可及性的影响

Fig.6 Effects of different proteins on resveratrol nanoparticle bioaccessibility

参 考 文 献

- [1] AMRI A, CHAUMEIL J C, SFAR S, et al. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations[J]. *Journal of Controlled Release*, 2012, 158(2): 182–193.
- [2] PANNU N, BHATNAGAR A. Resveratrol: From enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 109: 2237–2251.
- [3] CHENG H, DONG H H, WUSIGALE, et al. A comparison of beta-casein complexes and micelles as vehicles for trans-/cis-resveratrol[J]. *Food Chemistry*, 2020, 330: 127209.
- [4] CHUNG I M, SUBRAMANIAN U, THIRUPATHI P, et al. Resveratrol nanoparticles: A promising therapeutic advancement over native resveratrol [J]. *Processes*, 2020, 8(4): 458–487.
- [5] HU Y, LIN Q Z, ZHAO H, et al. Bioaccessibility and bioavailability of phytochemicals: Influencing factors, improvements, and evaluations[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 135: 108165.
- [6] FAN Y T, ZENG X X, YI J, et al. Fabrication of pea protein nanoparticles with calcium-induced cross-linking for the stabilization and delivery of antioxidative resveratrol [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 152: 189–198.
- [7] LIU Y X, GAO L Y, YI J, et al. α -Lactalbumin and chitosan core-shell nanoparticles: Resveratrol loading, protection, and antioxidant activity[J]. *Food & Function*, 2020, 11(2): 1525–1536.
- [8] YE G Y, WU T L, LI Z H, et al. Preparation and characterization of novel composite nanoparticles using zein and hyaluronic acid for efficient delivery of naringenin[J]. *Food Chemistry*, 2023, 417: 135890.
- [9] CHEN S, WU Q, MA M Y, et al. Designing biocompatible protein nanoparticles for improving the cellular uptake and antioxidation activity of tetrahydrocurcumin[J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2021, 63: 102404.
- [10] YANG Z Y, MCCLEMENTS D J, PENG X W, et al. Co-encapsulation of quercetin and resveratrol in zein/carboxymethyl cellulose nanoparticles: Characterization, stability and in vitro digestion[J]. *Food & Function*, 2022, 13(22): 11652–11663.
- [11] SYAHDI R R, NADYANA R, PUTRI R H, et al. Application of green extraction methods to resveratrol extraction from peanut (*Arachis hypogaea* L.) skin [J]. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 2020, 12: 38–42.
- [12] LI D Z, WU G C, ZHANG H, et al. Preparation of crocin nanocomplex in order to increase its physical stability [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 120: 106415.
- [13] LIU Q Y, QIN Y, JIANG B, et al. Development of self-assembled zein-fucoidan complex nanoparticles as a delivery system for resveratrol[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2022, 216: 112529.
- [14] ZHU L, YANG F, LI D Z, et al. Preparation, structure and stability of protein-pterostilbene nanocomplexes coated by soybean polysaccharide and maltodextrin[J]. *Food Bioscience*, 2022, 49: 101899.
- [15] BRODKORB A, EGGER L, ALMINGER M, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion [J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(4): 991–1014.
- [16] 施杰煜. 玉米醇溶蛋白-白藜芦醇共价复合物制备表征及应用[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2022.
- SHI J Y. Preparation, characterization and application of zein-resveratrol covalent complexes [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2022.
- [17] JARUNGLUMLERT T, NAKAGAWA K, ADACHI S. Digestibility and structural parameters of spray-dried casein clusters under simulated gastric conditions[J]. *Food Research International*, 2015, 75: 166–173.
- [18] 陈羚. β -胡萝卜素蛋白纳米载体的生物利用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- CHEN L. Study on the bioavailability of β -carotene loaded in protein-based nanocarriers[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [19] GAN C F, LIU Q, ZHANG Y, et al. A novel phytosterols delivery system based on sodium caseinate-pectin soluble complexes: Improving stability and bioaccessibility [J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 124: 107295.
- [20] YIN X, CHENG H, WUSIGALE, et al. Resveratrol stabilization and loss by sodium caseinate, whey and soy protein isolates: Loading, antioxidant activity, oxidability [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11

- (4): 647–667.
- [21] WEI Y, YU Z P, LIN K S, et al. Fabrication and characterization of resveratrol loaded zein–propylene glycol alginate–rhamnolipid composite nanoparticles: Physicochemical stability, formation mechanism and *in vitro* digestion[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 95: 336–348.
- [22] 张锐, 温沁楠, 关志宇, 等. 以三七总皂苷壳聚糖纳米颗粒为例探讨超滤离心法在包封率评价中的可靠性[J]. *中国药理学杂志*, 2022, 57(16): 1367–1373.
- ZHANG R, WEN Q N, GUAN Z Y, et al. Reliability of ultrafiltration centrifugation in the evaluation of entrapment efficiency: A case study of *Panax* notoginseng saponins chitosan nanoparticles[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 57(16): 1367–1373.
- [23] O'FLYNN T D, HOGAN S A, DALY D F M, et al. Rheological and solubility properties of soy protein isolate[J]. *Molecules*, 2021, 26 (10): 3015–3029.
- [24] WEI Y, YANG S F, ZHANG L, et al. Fabrication, characterization and *in vitro* digestion of food grade complex nanoparticles for co-delivery of resveratrol and coenzyme Q10[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 105: 105791.
- [25] KHAN M A, CHEN L Y, LIANG L. Improvement in storage stability and resveratrol retention by fabrication of hollow zein–chitosan composite particles[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 113: 106477.
- [26] WEI Y, LI C, DAI L, et al. The construction of resveratrol-loaded protein–polysaccharide–tea saponin complex nanoparticles for controlling physicochemical stability and *in vitro* digestion[J]. *Food & Function*, 2020, 11(11): 9973–9983.
- [27] 张子豪, 徐硕, 逢格雨, 等. 玉米醇溶蛋白纳米颗粒的体外消化特性[J]. *食品工业科技*, 2023, 44 (13): 1–8.
- ZHANG Z H, XU S, PANG G Y, et al. *In vitro* digestive properties of curcumin–zein nanoparticles[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44 (13): 1–8.
- [28] LIU Q G, SUN Y X, CUI Q, et al. Characterization, antioxidant capacity, and bioaccessibility of coenzyme Q10 loaded whey protein nanoparticles[J]. *LWT*, 2022, 160: 113258.
- [29] LIU Q G, CHENG J J, SUN X M, et al. Preparation, characterization, and antioxidant activity of zein nanoparticles stabilized by whey protein nanofibrils[J]. *International Journal Biological Macromolecules*, 2021, 167: 862–870.
- [30] PALLARÈS I, VENDRELL J, AVILÉS F X, et al. Amyloid fibril formation by a partially structured intermediate state of α -chymotrypsin [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 342(1): 321–331.
- [31] FERRER E G, GÓMEZ A V, AÑÓN M C, et al. Structural changes in gluten protein structure after addition of emulsifier. A Raman spectroscopy study [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011, 79(1): 278–281.
- [32] HUANG X L, LIU Y, ZOU Y, et al. Encapsulation of resveratrol in zein/pectin core–shell nanoparticles: Stability, bioaccessibility, and antioxidant capacity after simulated gastrointestinal digestion[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 93: 261–269.

Studies on Bioavailability of Four Resveratrol Protein Nanoparticles

SONG Yanan¹, ZHU Ling¹, ZHANG Hui^{1*}, WU Gangcheng¹, LIU Tongtong²

¹School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

²Binzhou Zhongyu Food Company Limited, National Industry Technical Innovation Center for Wheat Processing, Binzhou 256600, Shandong)

Abstract Resveratrol's disadvantages such as low water solubility and instability limit its bioavailability. The encapsulation properties and *in vitro* digestion forms of four protein nanoparticles were explored to investigate their effects on resveratrol bioaccessibility. The results showed that resveratrol and various proteins mainly bound by hydrophobic interaction and were encapsulated in an amorphous state. Zein nanoparticles (ZRNP) and sodium caseinate nanoparticles (CRNP) have an encapsulation efficiency of more than 80% due to their good hydrophobicity. During *in vitro* simulated

digestion, ZRNP aggregation reduced the resveratrol release rate to $(33.95\pm 0.98)\%$. Whey protein isolate nanoparticles (WRNP) have strong anti-digestion ability, resulting in the release rate of free amino acids was only $(22.84\pm 1.40)\%$. CRNP and soy protein isolate nanoparticles (SRNP) can significantly improve the *in vitro* bioaccessibility of free resveratrol by more than 50%. Combined with encapsulation properties and forms of action during *in vitro* digestion, CRNP is expected to improve its bioaccessibility as an encapsulation carrier for resveratrol. This study provides a theoretical basis for improving the bioavailability of hydrophobic polyphenols and their further application in food and oral drugs.

Keywords resveratrol; nanoparticle; bioaccessibility; *in vitro* digestion