

蜂胶醇提物微胶囊的制备及表征

郭夏丽, 蓝雅惠, 邹艺红, 李熊, 罗丽萍

(南昌大学生命科学学院, 江西南昌 330031)

摘要: 微胶囊具有保护物质免受环境条件影响、掩盖异味和颜色、降低毒性、延长挥发性物质的储存时间, 延缓或控制囊心物的释放等功能。本文采用复凝聚技术制备蜂胶醇提物 (EEP) 海藻酸钠-壳聚糖微胶囊, 利用粒度分析仪、激光共聚焦显微镜、红外光谱仪和 X 射线衍射仪分析、体外释放试验和加速试验等表征微胶囊性状。研究表明, 制备的 EEP 微胶囊形状为大小均匀球体, 粒径大小为 265 ± 25 nm, 包埋率和载药量分别达到 $72.80\pm 3.8\%$ 和 $19.96\pm 2.4\%$, 海藻酸钠和壳聚糖反应形成微胶囊。模拟胃液和肠液条件下体外释放 8 h, 释放率 $46.60\pm 0.80\%$; HPLC 分析加速试验 EEP 微胶囊中 7 种物质含量变化为 $14.01\%\sim 39.68\%$, 显著低于 EEP 中 $37.01\%\sim 77.45\%$ 。制得的 EEP 微胶囊粒径小、稳定性良好、释放率符合肠溶体系要求, 对 EEP 中的活性物质具有一定的保护作用。

关键词: 蜂胶醇提物; 海藻酸钠; 壳聚糖; 微胶囊

文章编号: 1673-9078(2016)10-226-232

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.034

Preparation and Characterization of EEP Calcium Alginate-chitosan Microcapsules

GUO Xia-li, LAN Ya-hui, ZOU Yi-hong, LI Xiong, LUO Li-ping

(School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: Microcapsules are capable of protecting substances from harsh environment conditions, covering up odor and color, reducing toxicity, prolonging the storage of volatile substances, and delaying or controlling the release of capsule core materials. Calcium alginate-chitosan microcapsules of the ethanol extract of propolis (EEP) were prepared by complex coacervation and characterized using a particle-size analyzer, confocal laser-scanning microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction, a simulated gastrointestinal-tract model, and a temperature-accelerated test. The results showed that EEP microcapsules were spherical, with a mean particle diameter of 265 ± 25 nm, the encapsulation efficiency and loading capacity were $72.80\pm 3.8\%$ and $19.96\pm 2.4\%$, respectively, and the *in vitro* release rate over 8 h was $46.60\pm 0.80\%$. Content changes for seven compounds in EEP microcapsules analyzed by HPLC after a temperature-accelerated test ranged from 14.01% to 39.68% , which was lower than the 37.01% to 77.45% range observed in EEP. The prepared microcapsules exhibited small particle sizes and increased stability, with an appropriate release rate into the enteric system. These results indicated that the active substances encapsulated inside EEP microcapsules were well protected.

Key words: ethanol extract of propolis; alginate; chitosan; microcapsules

蜂胶是蜜蜂采集植物树脂经咀嚼加工之后, 用于蜂巢内墙保护、填充缝隙, 避免和减少昆虫与微生物入侵的芳香胶状物^[1], 由于具有抗氧化^[2], 抑菌^[3], 消炎^[4], 抗肿瘤^[5], 免疫调节^[6]等多种生物活性, 引起了研究人员的重视。蜂胶的化学成分复杂, 不同类型或产地的蜂胶的化学成分各异, 目前已鉴定的化学成分有 300 多种, 含有黄酮类、萜烯类、酮类、酯类、醇类、酚类、醚类、有机酸和大量的氨基酸、酶类、

维生素 ABC 类、以及矿物质等^[7]。目前对蜂胶的研究和利用主要以其醇提物 (Ethanol extract of propolis, EEP) 为主, 而 EEP 因气味浓烈^[8]、易氧化变质^[9]、水溶性差^[10]等缺陷, 造成了蜂胶的应用范围受限、贮存性能不佳和货架期短等问题。

微胶囊技术是一种用成膜材料把固体或液体进行包覆使其形成微小粒子的技术, 其中海藻酸钠是一种从天然褐藻中提取的聚阴离子多糖的钠盐, 由 B-1,4 结构的 D 型甘露糖醛酸的钠盐(M)和 A-1,4 结构的 L 型古罗糖醛酸的钠盐(G)共聚而成。因其具有无毒性、生物黏附性、生物相容性和生物降解性以及胶凝特性, 被广泛用于食品工业、医药工业、农业以及日用化工业, 作为细胞载体、药剂辅料和药物载体等的应用备

收稿日期: 2015-09-30

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题 (2012BDA29B01-3); 江西省农业科技支撑/江西省国际合作项目 (20121BDH80020)

作者简介: 郭夏丽 (1986-), 女, 硕士, 讲师

通讯作者: 罗丽萍 (1972-), 女, 博士, 教授

受关注^[11]。海藻酸钠的分子中含有-COO-基, 当向海藻酸钠的水溶液中添加二价阳离子时, G 单元(α -L-古罗糖醛酸)中的 Na^+ 会与这些二价阳离子发生交换^[12], 使海藻酸钠溶液向凝胶转变, 因此用 Ca^{2+} 交联制备海藻酸钠微胶囊是最常见方法。壳聚糖(chitosan)是直链阳离子聚合物, 由甲壳素(chitin)经脱乙酰化反应脱去 50% 以上乙酰基制备而成, 它无毒、生物相容、可生物降解。可与聚阴离子海藻酸钠在静电作用下形成海藻酸钠/壳聚糖微胶囊, 且具有很好的生物相容性。

樊英^[13]等通过喷雾式锐孔凝固浴方法制备黄芪多糖-海藻酸钠微胶囊, 得到的微胶囊在柠檬酸钠溶液和不同 PH 磷酸缓冲液中进行药物缓释研究; 李沙^[14]等采用乳化胶凝制备方法, 以牛血清白蛋白为模型研究海藻酸钠-壳聚糖微胶囊成型机理及其对大分子药物的载药及释药特性, 得到的微胶囊平均粒径是 $(59.7 \pm 0.9) \mu\text{m}$, 包埋率最高为 38.12%。Mirian^[8]采用复凝聚技术包埋蜂胶提取物微胶囊, 以大豆蛋白和果胶为原料, 可有效封装蜂胶提取物, 获得稳定的具有抗氧化、抗金黄色葡萄球菌能力的微胶囊以及在食品中控制释放的可能性。

目前, 研究微胶囊的粒径大小通常在 2~200 μm , 而理论上制成粒径为 $10^2 \sim 10^4 \mu\text{m}$ 是可行的^[15], 但在这方面研究较少, 且蜂胶纳米微胶囊的研究目前还尚未发现。纳米微胶囊具有其比表面积大, 利于分离扩散, 具有良好的缓释作用, 利于人体吸收利用的特定功效。

樊英^[13]等的研究中发现, 药物在不同的释药介质中释药性能差异很大。李沙^[14]等在释药研究中发现药物在前 1 h 突释, 且已释放超过 80% 的药物, 这显然不符合肠溶药物的要求。为了更好地研究载药微胶囊在人体中的释药特性, 释药介质有必要进一步完善, 达到更加接近人体胃肠道环境的要求。

为了解决蜂胶的应用范围受限、贮存性能不佳和货架期短等问题, 拓展蜂胶应用范围, 本研究以蜂胶醇提物为材料, 采用复凝聚技术制备 EEP 微胶囊, 再通过粒度分析仪、激光共聚焦显微镜、红外光谱仪和 X 射线衍射仪分析、体外释放试验、加速试验等对制备的微胶囊进行表征, 从而评价其稳定性及保护内含物能力。本研究结果将有利于蜂胶以 EEP 微胶囊的形式在药物、日化行业中的应用, 使得蜂胶宝贵的药用价值得到进一步开发利用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

EEP 浸膏: 本实验室自制。以 1:20(m/V)比例将青

海大通蜂胶粉末溶于 60% 无水乙醇于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴提取 3 次, 合并上清液后真空条件 50 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至无水状态^[16]。

PBS 缓冲液 (pH 6.5) 实验室自制, 壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 95\%$, 粘度 100~200 MPa·s)、海藻酸钠(CP, 粘度 200 ± 20 MPa·s)、Tween 80(分析纯)、 CaCl_2 (分析纯)、胰蛋白酶和脂肪酶购自阿拉丁试剂, 表儿茶素和桑黄素购自中国药品生物制品检定所(北京), p-香豆酸、肉桂酸、柚皮素、阿魏酸和槲皮素购自中药固体制剂制造技术国家工程研究中心(江西), 3, 4-二甲氧基肉桂酸、生松素、白杨素、胆粉、胃蛋白酶和胰酶购自 Sigma-Aldrich。

1.2 仪器与设备

LSM 710 激光扫描共聚焦显微镜(Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM): 德国 CARL ZEISS; 多功能 X-射线衍射仪: 英国 Bede 公司; 美国 Agilent 1200 型高效液相色谱仪, 光电二极管阵列检测器 (DAD), G2170BA LC 化学工作站; Nicolet 5700 傅里叶变换红外光谱仪: 美国热电尼高力公司; Nicomp380 ZLS 超细微粒粒度分析仪: 美国 PSS 粒度仪公司, California, USA; 紫外可见分光光度计: 北京普析通用仪器有限责任公司; JAC-300 超声波振荡仪: 山东奥波超声电器有限公司; RE52-05 旋转蒸发器: 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-III 型循环水真空泵: 上海亚荣生化仪器厂; B13-3 型磁力加热搅拌器: 上海司乐仪器有限公司; KQ-50E 型超声波清洗器: 昆山市超声仪器有限公司。

1.3 EEP 微胶囊制备

在 Pakamon C^[17] 的方法基础上稍作改进。取 0.6 mL 的 EEP 甲醇溶液(10 mg/mL)缓慢滴入 20 mL 海藻酸钠水溶液[0.6 mg/mL, 其中含有 1% (m/V) Tween 80], 40 $^{\circ}\text{C}$ 、450 r/min 的搅拌速度下超声 20 min, 待温度自然降至室温后, 加入 4 mL CaCl_2 溶液(0.67 mg/mL), 550 r/min 搅拌 30 min 得到的微胶囊悬浮液, 向悬浮液中加入 4 mL 的壳聚糖溶液[0.3 mg/mL, 其中含有 1% (V/V) 醋酸溶液], 40 $^{\circ}\text{C}$ 、550 r/min 搅拌 30 min 形成微胶囊悬浮液, 真空冻干后获得装载有 EEP 的海藻酸钠-壳聚糖微胶囊粉末, 简称为 EEP 微胶囊(图 1)。

1.4 EEP 微胶囊形态观察、尺寸分布、包埋率、

载药量和得率测定

采用异硫氰酸荧光素 (Fluorescein Isothiocyanate,

FITC) 标记壳聚糖, 壳聚糖与 FITC 质量比为 25:1, 将 FITC 加入壳聚糖溶液中, 在 25 °C 条件下反应 4 h 后即可标记壳聚糖溶液。再用此壳聚糖溶液按 1.3 法制备微胶囊, 制得微胶囊溶液置于 PBS 缓冲液中透析 4 次以上, 至透析液清亮去除游离 FITC, 在 CLSM 下观察微胶囊壁膜形态。

尺寸分布测定用 NICOMP380/ZLS 激光纳米粒度分析仪, 测试角度 90 °, 测试温度为(25±0.1) °C, 测试光波长为 632.8 nm。样品在测试前用去离子水稀释 10 倍。

包埋率 (Encapsulation efficiency, EE): 分别取两等份的微胶囊悬液, 一份用透析法透析 8 h (前期实验证明透析 8 h 后透析完全) 后取透析内液采用无水乙醇破坏乳化剂 Tween 80 的方法充分破乳后进行总酚量测定, 即为微胶囊内包埋蜂胶总酚量 W_1 ; 另一份不经过透析直接充分破乳进行总酚测定, 即为加入总蜂胶的总酚量 W_2 。载药量按公式 (1) 计算。

$$EE\% = \left(\frac{W_1}{W_2} \right) \times 100\% \quad (1)$$

载药量 (Drug loaded content, DLC): 取一定质量的 EEP 微胶囊, 称量其质量记为 W_3 , 将其充分破乳后测定其总酚含量, 通过福林试剂法测得的 EEP 中总酚含量, 推算出包埋的 EEP 质量为 W_4 。按公式 (2) 计算载药量。

$$DLC\% = \left(\frac{W_3}{W_4} \right) \times 100\% \quad (2)$$

得率 (Yield percent, YP): 取一定质量配方比原材料, 称量其总质量记为 W_5 , 按照“1.3”制备 EEP 微胶囊悬浮液, 得到悬浮液冷冻干燥得微胶囊粉末, 称量其质量记为 W_6 。按公式 (3) 计算载药量。

$$YP\% = \left(\frac{W_5}{W_6} \right) \times 100\% \quad (3)$$

1.5 采用 FTIR 和 X 射线衍射仪分析评价微胶囊形成与否

取海藻酸钠、壳聚糖、EEP 微胶囊 3 种样品进行 FTIR 分析。取 1~2 mg 样品加入到 200 mg KBr 粉末(经过研磨并干燥)中, 在红外灯照射下置于玛瑙研钵中研磨 2~3 min, 使其充分混合。将研磨好的混合物粉末压片后置于红外光谱仪内全波段扫描 (扫描范围 4000 cm^{-1} ~ 400 cm^{-1}), 获得红外光谱图。

将海藻酸钠、壳聚糖、EEP、EEP 微胶囊样品研磨为粉末, 采用 X 射线衍射仪分析, Cu 靶, 管压 43 kV, 管流 100 mA, 扫描范围 3~20 °。

1.6 体外释放研究-模拟猪胃肠环境中的释放率 (Release%, R%) [13]

1% EEP 微胶囊加入模拟猪胃液 (Simulated Gastric Fluid, SGF) (m/V), SGF 由 3 g/L NaCl、1.1 g/L KCl、0.15 g/L CaCl_2 、0.6 g/L NaHCO_3 、3 g/L SDS、0.21 g/L 胃蛋白酶和 0.25 g/L 脂肪酶组成, 用 1.0 M HCl 分别在 0、5、30、120、180 min 的时间将 pH 值调整至 6.0、3.5、3.0、2.5 和 2.0。整个试验是在 39.0 ± 0.5 °C, 100 rpm 搅拌速度的条件下进行。分别在 0、5、10、20、30、40、60、80、100、120、180、210 和 240 min 时取 1 mL 溶液, 福林试剂法测定总酚含量, 每次取样后即添加等量新鲜 SGF。240 min 后, 添加 1 mL 胰蛋白酶溶液 (2 mg/mL), 14 mL 胆汁溶液 (40 mg/mL), 7.5 mL 的胰腺溶液, 和 7.5 mL 的模拟猪肠液 (Simulated Intestinal Fluid, SIF) (0.6 g/L KCl、5.0 g/L NaCl、0.23 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 3 g/L SDS) 至 SGF 中。分别在 240 min 和 300 min 时使用 1 M NaHCO_3 调整 pH 值到 5 和 6.5。4 h 内在预定时间间隔 (30 min) 收集 1 mL 的溶液用来测量吸光度, 每次测定添加等量新鲜 SIF 补充。

第 n 次测定的总酚含量推算至 EEP 质量记为 W_n , 第 n 次测定时的模拟环境中体积记为 V_n , 最初加入的微胶囊质量记为 W , 微胶囊质量 W 与载药量 DLC% 相乘即可得到加入 EEP 质量。释放率计算公式如下。

$$R\% = \frac{W_n \times V_n}{W \times \text{DLC}\%} \times 100\% \quad (4)$$

1.7 加速试验测定 EEP 微胶囊稳定性

表 1 梯度洗脱流动相比例

Table 1 Ratios of mobile phases for gradient elution

时间/min	0	5	6	7	40	50	55	60
流动相 A: 甲醇/%	5	30	30	40	47	55	65	25
流动相 B: 0.1% 甲酸-水/%	95	70	70	60	53	45	35	75

取一定量 EEP 甲醇溶液和包埋等量 EEP 的微胶囊悬浮液放入 60 ± 0.5 °C 的恒温培养箱进行 9 d 加速试验, 加速试验结束后微胶囊悬浮液充分破乳后, 两者均用甲醇溶剂定容于 50 mL 容量瓶, HPLC 法测定其中咖啡酸、表儿茶素、*p*-香豆酸、阿魏酸、3,4-二甲氧基肉桂酸、山奈酚、白杨素 7 种物质含量变化, 通过标准品标准曲线计算上述物质的保留量。HPLC 色谱条件为色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB C18 色谱柱 4.6 mm×150 mm×5 μm; 流动相: 甲醇 (流动相 A) 和 0.1% 甲酸-水溶液 (流动相 B); 流速: 1.0 mL/min; 柱温:

35 °C；检测波长：256 nm、280 nm；进样量 20 μL。采用梯度洗脱，条件见表 1。

1.8 数据处理

利用 Excel 绘制各对照品标准曲线，获得线性回归方程及相关系数。所有试验平行三次，取平均值。

2 结果与讨论

2.1 EEP 微胶囊形态观察和尺寸分布、包埋率、载药量和得率

经过冷冻干燥得到的微胶囊粉末（图 1）易溶于水。微胶囊形成过程中海藻酸钙可壳聚糖发生络合反应形成一层薄膜（图 2 中 a 部分）。该薄膜的形态会影响药物的缓释性能，膜厚度不均一易引起微胶囊的不可控破裂，造成药物的突释。可见壳聚糖全部包裹在微胶囊外表面均匀分布，且微胶囊呈规则球形。粒度分析仪测得微胶囊粒径为 265±25 nm，多分散系数（PDI）值为 0.3419±0.025，较低的 PDI 证明制得的微胶囊粒径大小均匀。

EEP 海藻酸钠/壳聚糖微胶囊 EE、DLC 和 YP 分别为 72.80±3.8%，19.96±2.4%，11.06±8.2%。相同的壁材包埋不同的物质时 EE、DLC 各有不同。Azevedo^[18]用海藻酸钠和壳聚糖作为壁材包封维生素 B₂ 的 EE、DLC 分别为 55.9±5.6%和 2.2±0.6%。李胜^[19]使用海藻酸钠/壳聚糖包埋 β-榄香烯的 EE、DLC 分别为 70.8%和 9.5%，虽然它具有较高的包埋率，但它微胶囊粒径尺寸为 98.7 μm，显著高于本试验的 265 nm。通过本试验研究方法，获得的 EEP 海藻酸钠/壳聚糖微胶囊具有较高的包埋率和载药量。

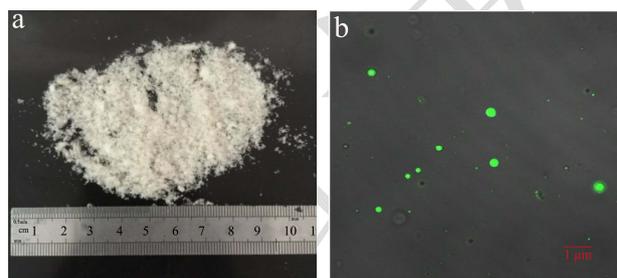


图 1 微胶囊粉末 (a) 及其 CLSM (b) 照片

Fig.1 EEP microcapsule powder (a) and CLSM photograph of the EEP microcapsule powder (b)

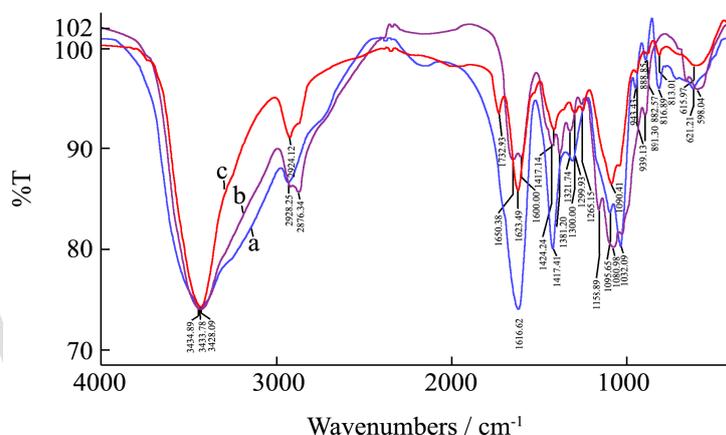


图 2 海藻酸钠 (a)、壳聚糖 (b)、EEP 微胶囊 (c) 的 FTIR 图谱

Fig.2 FTIR spectra of sodium alginate (a), chitosan (b), EEP microcapsules (c)

2.2 FTIR 分析

图 2a 可见海藻酸钠特有官能团的特征峰：在 1616 cm⁻¹ 由不对称伸缩振动引起的宽峰，在 1417 cm⁻¹ 处由对称伸缩引起的窄峰，在 1032 cm⁻¹ 处有一个更宽的吸收峰是由于 COH 的伸缩振动。壳聚糖在 3434 cm⁻¹ 左右出现了一个较宽的吸收峰（图 2b），是因为它在酸性条件下合成，壳聚糖的氨基带上了电荷（基本就是 NH₃⁺）所产生的。在 1650、1600 和 1424 cm⁻¹ 处的峰也是主要振动方式为 NH₃⁺ 的对称和不对称的弯曲振动产生峰。图 2c 中，壳聚糖-海藻酸钠微胶囊在 1623

cm⁻¹ 处出现尖峰，这是因为海藻酸钠的 COO⁻基团使得壳聚糖的氨基在 1600 cm⁻¹ 处的吸收峰消失了。同样的，可能是因为微胶囊表面的 COH 和 NH₃⁺ 基团之间的离子间作用，在 1080 cm⁻¹ 附近处的小吸收峰也消失了。这表明了壳聚糖中的氨基和海藻酸钠中的羧基发生了静电相互作用，由此可知，所制得的微胶囊是壳聚糖-海藻酸钠微胶囊。

2.3 X 射线衍射仪分析

在微胶囊 XRD 图谱（图 3）中，可以观察到海藻酸钠、壳聚糖、EEP 的主要衍射峰基本消失，表明反

应进行得很完全，并且微胶囊（图 3d）在 27°处出现特征锐峰，表明新的物相生成。这些变化说明形成的微胶囊体系不存在海藻酸钠、壳聚糖和 EEP 的物理混合物，而是海藻酸钠和壳聚糖发生反应形成微胶囊，也验证了红外光谱分析的结果。

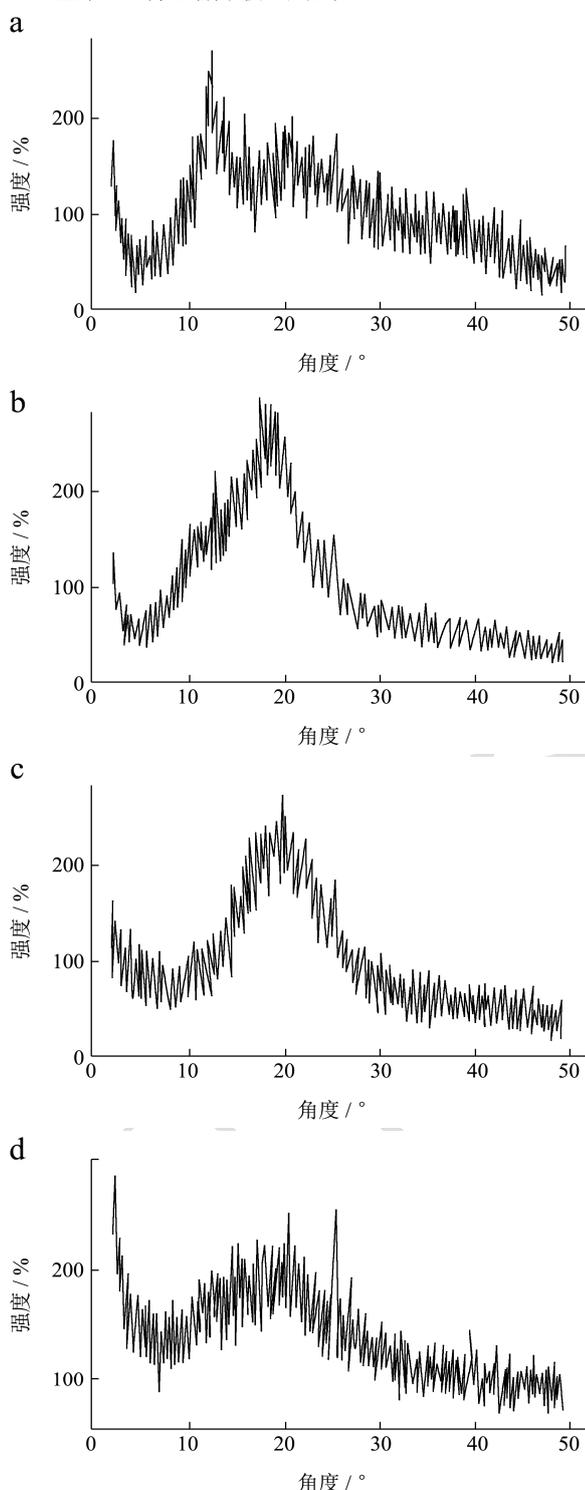


图3 海藻酸钠(a)、壳聚糖(b)、EEP(c)、EEP微胶囊(d)的X射线衍射图

Fig.3 X-ray diffraction patterns of (a) sodium alginate, (b) chitosan, (c) EEP, and (d) EEP microcapsules

2.4 模拟猪胃肠液环境中的释放率

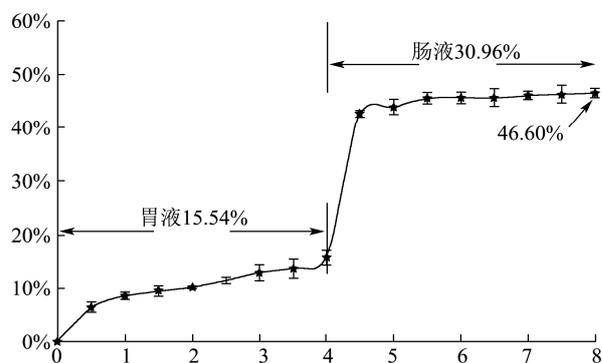


图4 模拟猪胃液和肠液条件8 h内 EEP 微胶囊释放率(%)

Fig.4 EEP-microcapsule release profile in SGF and SIF over 8 h (%)

由图 4 可见，在模拟猪胃液环境中停留 240 min 后，微胶囊中酚类物质的释放率为 15.54±1.42%，而微胶囊在肠液中共有 30.96±2.32%的酚类物质被释放。说明在酸性条件下，微胶囊表面的壳聚糖膜及壳聚糖与海藻酸钠的复合膜遭到破坏，导致内容物释放，被包埋物分子量越小，释放率越高。此外，在酸性溶液中停留时间越长，微胶囊表面的复合膜破坏越严重，对被包埋物的扩散限制作用越差，进而导致微胶囊在模拟肠液环境中的控释能力降低，释放率较高。EEP 的释放主要是靠酸性溶液对外层壳聚糖的溶解，因此模拟胃液中表现为缓释及较小的释放量。

当将微胶囊移入近中性模拟肠液环境中时，由于外层壳聚糖在模拟胃液中的溶解，且剩余的部分壳聚糖发生了脱质子化作用，因此尽管海藻酸盐羧酸根离子解离度增大，两者结合力也呈下降趋势。微胶囊的 EEP 包裹作用主要是靠海藻酸钠核心来完成的，核心中交联剂钙离子与海藻酸钠分子中的羧基相结合，处于羧酸根负离子的包围之中，常被称为“鸡蛋箱”模型。而模拟肠液中的钠离子能与钙离子发生交换反应，使其与海藻酸钠的交联减弱；同时由于海藻酸盐羧酸根离子解离度增加，分子间斥力增大，微胶囊网孔变大，结构疏松而迅速膨胀，通透性增大；另外由于“鸡蛋箱”模型中钙离子的去除，微胶囊发生瓦解，海藻酸盐由于大分子间斥力的增大也逐渐发生溶解。这时，EEP 主要靠微胶囊的瓦解及海藻酸盐核心的溶解而大量释放，因此在模拟肠液中后期表现为缓释及较大的释放量。在模拟猪胃肠体液条件下释放 8 h，微胶囊中 EEP 总释放率为 46.60±0.80%。

对比 Pakamon C^[13]相同体外模拟条件下的微胶囊释放率为 89.5%~91.6%，以及 J P Meunie^[20]的微胶囊释放率为 87.2±4.3%，本试验制得的微胶囊释放率较

低, 8 h 在胃肠体系内无法释放完全, 可能的原因是本试验采用的壁材与以上两者不同, 胃肠液对壁材的消融需要时间较长; 在整个模拟体系中, 微胶囊的投放量较大, 体系中的溶液与微胶囊之间接触面较小。

2.5 EEP 微胶囊的稳定性

加速试验过程中, EEP 中的酚类化合物由于氧化反应等原因而减少。HPLC 对其中的 7 种化合物测定结果表明 (表 2 和图 5), 9 d 加速试验后的 EEP 微胶囊中咖啡酸、表儿茶素、p-香豆酸、阿魏酸、山奈酚、白杨素含量较新鲜 EEP 分别下降了 38.67、39.68、34.18、36.17、25.48、19.37 和 14.01%, 而未经微胶囊包埋的 EEP, 9 d 加速试验后其中的咖啡酸、表儿茶素、p-香豆酸、阿魏酸、山奈酚、白杨素含量分别下降了 77.45、86.56、58.16、63.01、48.40、43.28 和 37.01%, 未包埋 EEP 中酚类化合物含量损失比微胶囊内 EEP 中相应化合物多了 50%以上。说明微胶囊包埋对 EEP 中的酚类化合物具有良好的保护作用。

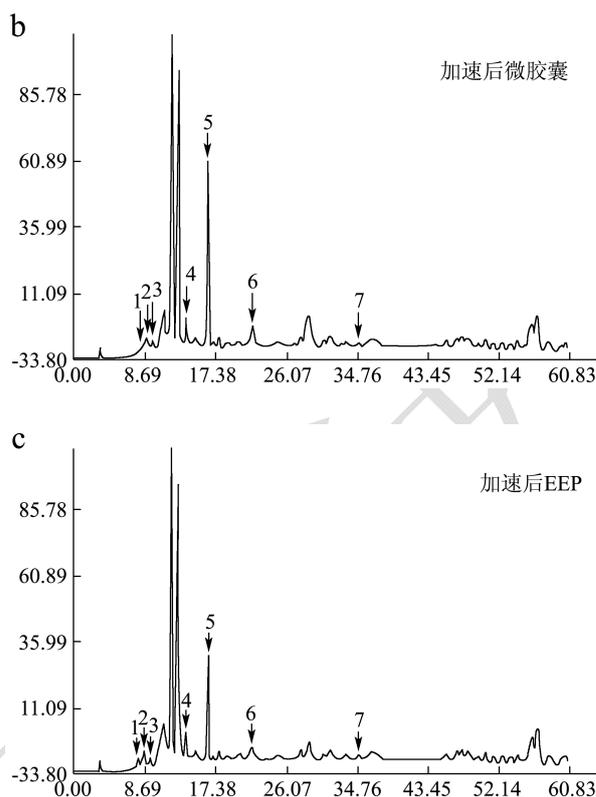
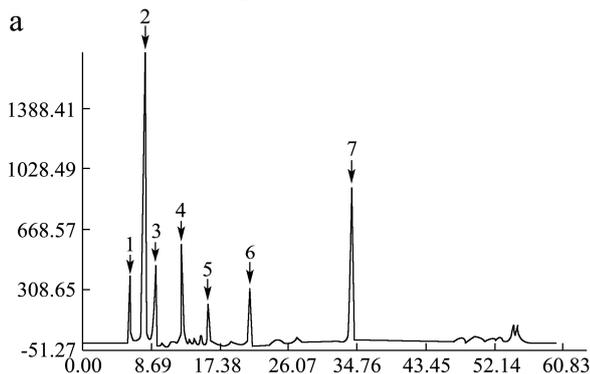


图 5 280 nm 下加速试验后的对照品色谱图 (a)、EEP 微胶囊 (b) 和 EEP 色谱图 (c)

Fig.5 HPLC chromatograms (280 nm) of mixtures of (a) seven standards, (b) EEP microcapsules, (c) and EEP after acceleration testing

注: 1, 咖啡酸; 2, 表儿茶素; 3, p-香豆酸; 4, 阿魏酸; 5, 3,4-二甲氧基肉桂酸; 6, 山奈酚; 7, 白杨素。

表 2 9 d 加速试验后 EEP 和 EEP 微胶囊中 7 种标准对照品含量 (mg/g EEP)

Table 2 Content of seven standards in EEP and EEP microcapsules over a 9-day acceleration test

	咖啡酸	表儿茶素	p-香豆酸	阿魏酸	3,4-二甲氧基肉桂酸	山奈酚	白杨素
新鲜 EEP	9.18	3.20	1.96	6.11	3.14	16.52	32.04
加速试验后 EEP 微胶囊	5.63	1.93	1.29	3.90	2.34	13.32	27.55
加速试验后 EEP	2.07	0.43	0.82	2.26	1.62	9.37	20.18

3 结论

本研究以海藻酸钠和壳聚糖为壁材包埋 EEP, 成功制备 EEP 海藻酸钠壳聚糖微胶囊, 制得微胶囊粒径大小为 265 ± 25 nm, 包埋率和载药量达到 $72.80 \pm 3.8\%$ 和 $19.96 \pm 2.4\%$, 外观为大小均匀球体; 并通过 FITR、X 射线衍射仪验证海藻酸钠和壳聚糖反应形成微胶囊; 在模拟猪胃液和肠液条件下微胶囊 8 h 释放率达到 $46.60 \pm 0.80\%$; HPLC 分析表明微胶囊对包埋物质 EEP 中的生物活性成分具有良好的保护作用。EEP 具有良好的生物活性, 将 EEP 制成水溶性的微胶囊产品, 既保护其活性成分, 又利于人体吸收, 更便于进

一步制成具有保健功能的食品或药品。这将吸引越来越多的研究人员将 EEP 应用到食品和化妆品的封装实验中, 并提高蜂胶在药物递送系统中的利用潜能。

参考文献

[1] Lopez B G, Schmidt E M, Eberlin M N, et al. Phytochemical markers of different types of red propolis [J]. Food Chem., 2014, 146, 174-80

[2] 张茜, 郭夏丽, 陈滨, 等. 不同来源中国蜂胶水提物的化学组成及抗氧化性[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24: 444-449

ZHANG Xi, GUO Xia-li, CHEN Bin, et al. Chemical compositions and antioxidant activities of water extract of

- propolis in different seasons and areas of China [J]. Natural Product Research and Development, 2012, 24: 444-449
- [3] Sharaf S, Higazy A, Hebeish A. Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 59: 408-416
- [4] Valenzuela-Barra G, Castro C, Figueroa C, et al. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in región metropolitana de santiago, chile [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 168: 37-44
- [5] Sobočanec S, Balog T, Šarić A, et al. Antitumor effect of croatian propolis as a consequence of diverse sex-related dihydropyrimidine dehydrogenase (dpd) protein expression [J]. Phytomedicine, 2011, 18: 852-858
- [6] LI B, WEI K, YANG S, et al. Immunomodulatory effects of taishan pinus massoniana pollen polysaccharide and propolis on immunosuppressed chickens [J]. Microbial Pathogenesis, 2015, 78: 7-13
- [7] Escriche I, Garcia-Pinchi R, Andrés A, et al. Osmotic dehydration of kiwi fruit(*actinidia chinensis*): fluxes and mass transfer kinetics [J]. Journal of Food Process Engineering, 2002, 23(3): 191-205
- [8] Nori M P, Favaro-Trindade C S, Alencar S M D, et al. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation [J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44: 429-435
- [9] YUAN J, LIU J, HU Y, et al. The immunological activity of propolis flavonoids liposome on the immune response against nd vaccine [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51: 400-405
- [10] Da Silva Felipe C, da Fonseca Carolina Rodrigues, de Alencar Severino Matias, et al. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum arabic and osa starch-based carrier systems [J]. Food and Bioproducts Processing, 2013, 91: 28-36
- [11] 吴秋惠,吴皓,王令充,等.海藻酸钠微球的制备及其在药物载体中的应用进展[J].中华中医药杂志,2011,26:1791-1794
WU Qiu-hui, WU Hao, WANG Ling-chong, et al. Review on preparation and application of alginate microspheres as drug carrier [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2011, 26: 1791-1794
- [12] 高春梅,柳明珠,吕少瑜,等.海藻酸钠水凝胶的制备及其在药物释放中的应用[J].化学进展,2013,25(6):1012-1022
GAO Chun-mei, LIU Ming-zhu, LV Shao-yu, et al. Preparation of sodium alginate hydrogel and its application in drug release [J]. Progress in Chemistry, 2013, 25(6): 1012-1022
- [13] 樊英,许拉,于晓清,等.黄芪多糖-海藻酸钠微胶囊的制备及释放性能研究[J].饲料研究,2011,11:6-8
FAN Ying, XU La, YU Xiao-qing, et al. Preparation and release properties of astragalus polysaccharides-alginate microcapsule[J]. Feed Research, 2011, 11: 6-8
- [14] 李沙,侯新朴.海藻酸钠-壳聚糖微囊成型机理及其对大分子药物的载药、释药研究[J].药学学报,2003,38(5):380-383
LI Sha, HOU Xin-pu. Studies on the formation mechanism of alginate-chitosan microcapsule and its drug-loading and release properties on macromolecular drug [J]. Acta Pharmaceutica Sinica 2003, 38(5): 380-383
- [15] 王东辉,赵裕蓉.微胶囊的应用及研究进展[J].化工新型材料,1999,27(7):11-14
WANG Dong-hui, ZHAO Yu-rong. Application and recent progress of microencapsulation [J]. New Chemical Materials, 1999, 27(7): 11-14
- [16] 丽艳.中国不同地区蜂胶醇提物化学组成及抗氧化活性[D].南昌大学,2008
LI Yan. Chemical compositions and antioxidant activities of ethanol extract of propolis from different areas of China [D]. Nanchang University, 2008
- [17] Chitprasert P, Sutaphanit P Holy Basil (*Ocimum sanctum* Linn). Essential oil delivery to swine gastrointestinal tract using gelatin microcapsules coated with aluminum carboxymethyl cellulose and beeswax [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62: 12641-12648
- [18] Azevedo M A, Bourbon A I, Vicente A A, et al. Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 71: 141-146
- [19] 李胜,许有威,任东文,等. β -榄香烯海藻酸钙-壳聚糖微囊的制备[J].中国医药工业杂志,2004,35(11):657-660
LI Sheng, XU You-wei, REN Dong-wen, et al. Preparation of β -elemene calcium alginate-chitosan microcapsules [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2004, 35(11):657-660
- [20] Meunier J P, Cardot J M, Manzanilla E G, et al. Use of spray-cooling technology for development of microencapsulated capsicum oleoresin for the growing pig as an alternative to in-feed antibiotics: a study of release using *in vitro* models [J]. Journal of Animal Science, 2007, 85: 2699-2710

现代食品科技