

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.07.002

玉米醇溶蛋白负载叶黄素纳米粒的制备与表征

Preparation and characterization of Lutein loaded in Zein nanoparticles

焦岩^{1,2} 韩赫^{1,2} 常影^{1,2} 李冲^{1,2} 高建伟^{1,2}JIAO Yan^{1,2} HAN He^{1,2} CHANG Ying^{1,2} LI Chong^{1,2} GAO Jian-wei^{1,2}

(1. 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

2. 黑龙江省玉米深加工理论与技术重点实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

(1. College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China;

2. Key Laboratory of Corn Deep Processing Theory and Technology, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

摘要:以玉米醇溶蛋白为纳米载体,通过反溶剂法制备玉米醇溶蛋白负载叶黄素纳米粒(Zein-Lutein),并对其结构表征进行解析。通过单因素和正交试验,优化玉米醇溶蛋白负载叶黄素纳米粒的制备工艺,得到了玉米醇溶蛋白负载叶黄素纳米粒制备的最佳工艺条件为:玉米醇溶蛋白与叶黄素质量比 20:1,水合时间 150 min,水合温度 50 °C,该条件下对叶黄素的包封率为 81.0%。所制备的 Zein-Lutein 纳米粒经 Nano 分析仪测得平均粒径为 398.3 nm;透射电镜(TEM)显示叶黄素被玉米醇溶蛋白包埋后,Zein-Lutein 纳米体系形态和分布发生了改变;傅里叶红外光谱(FTIR)分析证实玉米醇溶蛋白能够负载叶黄素形成纳米结构。

关键词:玉米醇溶蛋白;叶黄素;纳米粒;制备;表征

Abstract: The Zein-Lutein nanoparticles were prepared using zein as nanocarrier by anti-solvent method, and the structural characterization of the nanoparticles were studied. The optimal preparation process of Zein-Lutein was explored on the basis of single factor and orthogonal array experiments. The optimal preparation conditions were as followed: the ratio of the zein and lutein ratio was 20:1, hydration time 150 min, hydration temperature 50 °C, the coating rate of lutein 81.0%. Under the conditions, the average particle size was 398.3 nm, TEM images showed that the morphological and distribution of Zein-Lutein were changed when lutein was efficiently loaded into zein, and FT-IR spectra confirmed that lutein had been entrapped by zein and formed a nano-binding structure.

基金项目:黑龙江省教育厅基本业务专项(编号:135109258);黑龙江省自然科学基金优秀青年项目(编号:YQ2019C024);黑龙江省教育厅科研创新团队项目(编号:135309113)

作者简介:焦岩,男,齐齐哈尔大学副教授,博士。

通信作者:常影(1982—),女,齐齐哈尔大学讲师,硕士。

E-mail: achang-01@163.com

收稿日期:2019-01-29

Keywords: Zein; Lutein; nanoparticles; preparation; characterization

玉米醇溶蛋白(Zein)来自于玉米淀粉加工的副产物玉米黄粉中^[1]。Zein 的氨基酸组成具有特殊性,因 Zein 分子中有 50% 以上的疏水氨基酸使其具有两亲性,并具有独特的自组装特性。以 Zein 为载体不仅能够通过包埋与载运植物香精、功能油脂而提高功能性成分的稳定性,而且能够起到增加溶解性和控释性等方面的作用。应用反溶剂法可以制备 Zein 纳米粒,其原理为利用溶剂的极性变化改变 Zein 的构象,并辅助机械方法制备成纳米结构体系^[2]。例如,Chuacharoen 等^[3]制备了玉米醇溶蛋白负载 β -胡萝卜素纳米粒,提高了 β -胡萝卜素的化学稳定性和在胃肠液环境下的抗氧化活性,效果优于 β -胡萝卜素乳液;玉米醇溶蛋白还可用于番茄精油的微胶囊壁材,可以防止番茄红素在储存过程中的降解,并防止番茄红素在胃液环境中过多的释放^[4];Hu 等^[5]采用超临界二氧化碳法制备叶黄素/玉米醇溶蛋白纳米粒,可对叶黄进行有效包埋并显示出良好的控释效果。因此,玉米醇溶蛋白可以作为有效活性成分的载体,用于体内外输送和提高其稳定性。

叶黄素属于类胡萝卜素。叶黄素可以保护视网膜色素上皮细胞(RPE)免受光氧化,并减少年龄相关性黄斑变性疾病(AMD),还可预防心脑血管疾病、减少辐射损伤和减少癌症等多种疾病的发生^[6-8]。但是叶黄素化学结构不稳定,容易受到光、热、氧化等作用而被降解,而且叶黄素水溶性低,不易被体内消化吸收,限制了叶黄素在食品和医药领域的应用^[9]。

研究^[10]表明,玉米醇溶蛋白可以与活性物质通过自组装作用形成纳米复合物,改善稳定性和生物活性。本试验拟通过玉米醇溶蛋白的载体作用将叶黄素进行包埋与组装,制备成纳米结构体系,并解析其结构表征,旨

在为拓展叶黄素在食品和医药领域的应用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

叶黄素:纯度 $\geq 95\%$,上海源叶生物科技有限公司;
玉米醇溶蛋白:美国 Sigma 公司;
无水乙醇、石油醚、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 :分析纯。

1.2 仪器与设备

透射电子显微镜:F30 型,美国 FEI 公司;
粒径分析仪:Nano-Zs90 型,德国新帕泰克有限公司;
电子天平:JA2003 型,上海良平仪器仪表有限公司;
旋转蒸发仪:RE2000E 型,西安太康生物科技有限公司;
紫外分光光度计:UV2450 型,日本岛津公司;
磁力加热搅拌器:CJJ-931 型,常州万达升实验仪器有限公司;
离心机:TDL-5-A 型,上海安亭科学仪器厂;
微型旋涡混合器:WXH 型,上海跃进医疗器械厂;
傅里叶变换红外光谱仪:Spectrum One 型,美国 PE 公司。

1.3 方法

1.3.1 玉米醇溶蛋白负载叶黄素纳米粒 (Zein-Lutein) 的制备 采用反溶剂法制备 Zein-Lutein 纳米粒^[11]。将叶黄素晶体加入到 85%乙醇溶液中超声溶解得到叶黄素原液,取等体积的玉米醇溶蛋白乙醇溶液按一定比例混合,将叶黄素原液和玉米醇溶蛋白混合溶液磁力搅拌混合均匀,然后在 3 000 r/min 下离心 5 min,取上清液注入到等体积磷酸盐缓冲液中,调整 pH 并在一定温度下搅拌水合,然后经旋转蒸发除去乙醇,得到 Zein-Lutein 纳米粒溶液。

1.3.2 叶黄素标准曲线的制作及含量的测定 将梯度浓度的叶黄素制备成标准液,在最大吸收波长 445 nm 处测定吸光值,制作叶黄素标准曲线如图 1 所示。

经过绘制标准曲线计算得到叶黄素的含量与吸光值关系的标准方程为 $y=0.176 3x+0.004 4$ ($R^2=0.999 1$)。表明叶黄素的含量与吸光值呈良好的线性关系^[12]。

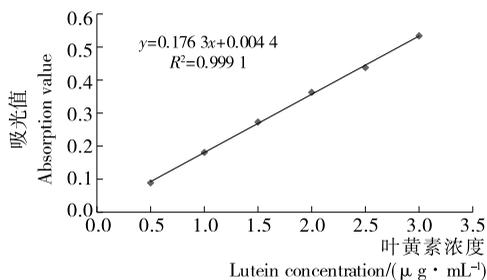


图 1 叶黄素标准曲线

Figure 1 The standard curve of Lutein

1.3.3 包封率的测定 取 3.0 mL 上述方法制备的 Zein-Lutein 溶液,加入 3 mL 石油醚震荡混匀 1.0 min,在 3 000 r/min 离心转速下离心 5.0 min,重复试验操作 3 次,回收上清溶液在 445 nm 处测吸光值,根据标准曲线计算叶黄素溶液浓度,并根据式(1)计算包封率^[13-14]。

$$EE = \left(1 - \frac{C \times V}{M}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

EE——包封率,%;

C——黄素溶液浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

M——叶黄素总量, μg ;

V——Zein-Lutein 纳米粒的总体积,mL。

1.3.4 玉米醇溶蛋白负载叶黄素纳米粒 (Zein-Lutein) 制备单因素试验

(1) 水合时间对 Zein-Lutein 制备效果的影响:将玉米醇溶蛋白与叶黄素按质量比 20:1 混合均匀,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液注入到等体积 pH 4.0 磷酸盐缓冲液中,在 50 °C 下搅拌水合 30,60,90,120,150,180 min,然后经旋转蒸发除去乙醇,得到 Zein-Lutein 纳米粒溶液。按上述方法测定包封率,研究水合时间对叶黄素包封率的影响。

(2) 温度对 Zein-Lutein 制备效果的影响:将玉米醇溶蛋白与叶黄素按质量比 20:1 混合均匀,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液注入到等体积 pH 4.0 磷酸盐缓冲液中,在 40,45,50,55,60,65 °C 下搅拌水合 120 min,然后经旋转蒸发除去乙醇,得到 Zein-Lutein 纳米粒溶液。按上述方法测定包封率,研究温度对叶黄素包封率的影响。

(3) 玉米蛋白与叶黄素质量比对 Zein-Lutein 制备效果的影响:将玉米醇溶蛋白与叶黄素分别按质量比 5:1, 10:1,15:1,20:1,25:1 混合均匀,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液注入到等体积 pH 4.0 磷酸盐缓冲液中,在 55 °C 下搅拌水合 120 min,然后经旋转蒸发除去乙醇,得到 Zein-Lutein 纳米粒溶液。按上述方法测定包封率,研究玉米蛋白与叶黄素质量比对叶黄素包封率的影响。

1.3.5 玉米醇溶蛋白负载叶黄素纳米粒制备正交试验

在单因素试验的基础上选取水合时间、温度和玉米醇溶蛋白与叶黄素质量比 3 个主要的影响因素,以包封率为指标,采用正交试验设计,分别对 Zein-Lutein 纳米粒制备工艺进行优化。

1.3.6 Zein-Lutein 粒径和电位的测定 取上述方法制备的 Zein 和 Zein-Lutein 样品溶液,适当调整浓度后取 1.0 mL 置于 Nano-90 粒径分析仪样品池中进行分析,得到 Zein 和 Zein-Lutein 的粒径和电位分布图谱^[15]。

1.3.7 透射电子显微镜 (TEM) 观察 通过 TEM 观测 Zein 和 Zein-Lutein 纳米颗粒的形态和结构。将 2 μL 样

品放置在具有碳膜的 400 目的铜格栅上,并用红外灯烘干载 Zein 和 Zein-Lutein 纳米颗粒的铜格栅,15 min 后通过 TEM 进行观察其形态和微观结构^[16]。

1.3.8 傅里叶红外光谱(FT-IR)分析 将叶黄素和 Zein-Lutein 纳米样品溶液在真空冷冻干燥机中进行干燥。收集干燥样品在 FT-IR 中压片,在 4 000~500 cm⁻¹ 波数范围测定红外光谱,并对不同样品的红外光谱图进行分析比较^[17]。

1.3.9 数据分析 所有试验均进行 3 次平行试验,数据分析采用 SPSS 10.0 和 Excel 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 Zein-Lutein 纳米粒的制备单因素试验

2.1.1 水合时间对 Zein-Lutein 制备效果的影响 由图 2 可以看出,随着水合时间的延长,Zein 与 Lutein 结合程度增加,导致对叶黄素包封率增大,Zein 与 Lutein 充分水合 120 min 后形成的纳米粒对叶黄素的包封率达到最大,且能够均匀分散在水中形成纳米分散体系,当水合时间继续增加时,包封率趋于平稳,因此水合时间 120 min 时效果最佳。

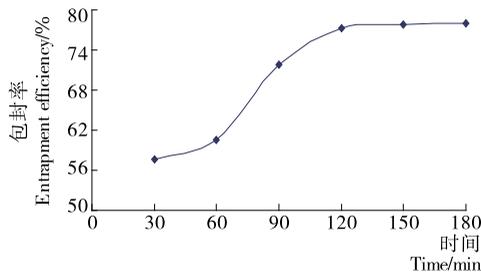


图 2 水合反应时间对包封率的影响

Figure 2 Effects of hydrolyzed reaction time on entrapment efficiency

2.1.2 温度对 Zein-Lutein 制备效果的影响 由图 3 可以得出,随着制备温度升高 Zein 对 Lutein 包封率增大,在 40~55 °C 时增加的趋势比较明显,当温度超过 55 °C 时包封率变化呈下降趋势。因为 Zein 在加热的条件下对 Lutein 能够较好包埋形成纳米结构,当温度超过 55 °C 时,

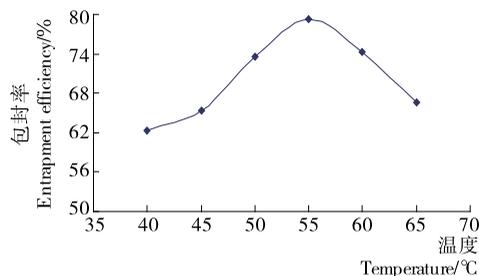


图 3 制备温度对包封率的影响

Figure 3 Effects of prepared temperature on entrapment efficiency

蛋白质开始变性且容易聚集,且高温会导致叶黄素发生损失,使得对叶黄素的包封率下降,因此 55 °C 为最适温度。

2.1.3 玉米蛋白与叶黄素质量比对 Zein-Lutein 制备效果的影响 由图 4 可知,随着 Zein 与 Lutein 的质量比增大,叶黄素包封率增大,质量比为 15 : 1 时包封率达到最高,当 Zein 用量继续增加时,包封率不再增加,是因为过量的 Zein 在溶液中容易聚集,导致对 Lutein 包封效率略有下降,因此 Zein 与 Lutein 质量比为 15 : 1 时效果最佳。

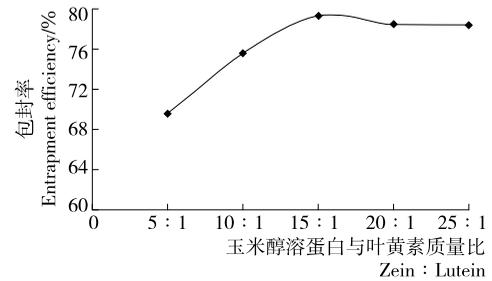


图 4 玉米蛋白与叶黄素质量比对包封率的影响

Figure 4 Effects of Zein and Lutein ratio on entrapment efficiency

2.2 正交试验

按上述方法进行正交试验,优化 Zein-Lutein 制备的最佳条件,正交试验设计及分析结果如表 1 和表 2 所示。

表 1 正交试验设计表

Table 1 The orthogonal array design

水平	A 水合时间/ min	B 温度/ °C	C 玉米醇溶蛋白与 叶黄素质量比
1	90	50	10 : 1
2	120	55	15 : 1
3	150	60	20 : 1

表 2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal array experimental results

试验号	A	B	C	包封率/%
1	1	1	1	70.67
2	1	2	2	76.77
3	1	3	3	72.00
4	2	1	2	80.73
5	2	2	3	77.21
6	2	3	1	74.32
7	3	1	3	81.00
8	3	2	1	71.44
9	3	3	2	73.45

K ₁	73.147	77.467	72.137	
K ₂	77.413	75.140	76.983	
K ₃	75.297	73.250	76.737	
R	4.266	4.217	4.846	

从表 2 可知,玉米醇溶蛋白对叶黄素包封率影响因素大小顺序为 C(玉米醇溶蛋白与叶黄素质量比)>A(水合时间)>B(温度),最优组合为 A₂B₁C₂。将 A₂B₁C 组合进行了 3 次平行验证实验,得到的平均包封率为 80.23%,小于正交试验 A₃B₁C₃ 组合中的 81.0%,说明 A₃B₁C₃ 组合优于 A₂B₁C₂ 组合。因此可确定玉米醇溶蛋白与叶黄素质量比为 20:1,水合时间 150 min,水合温度 50 ℃ 条件下玉米醇溶蛋白对叶黄素的包封率最大,制备效果最佳。

2.3 Zein-Lutein 粒径和电位分析

2.3.1 Zein-Lutein 粒径分析 采用 Nano-Zs 90 粒径分析仪测得 Zein 和 Zein-Lutein 的粒径大小分布如表 3 所示,可以看出 Zein 粒径大小分布,颗粒度大小在 171.0~741.9 nm 范围内的比例分别为:0.4%,2.0%,5.2%,9.3%,13.5%,16.4%,17.1%,15.1%,11.1%,6.1%,2.0%。平均粒径为(482.20±8.25) nm。而 Zein-Lutein 颗粒度大小范围主要分布在 198.0~859.2 nm 范围(表 4),比例分别为:1.3%,4.1%,8.1%,12.1%,15.1%,

表 3 Zein 粒径分布百分比

Table 3 Percentage of particle size of Zein

粒径 r/nm	百分比/ %								
0.200 0	0.0	1.561	0.0	12.18	0.0	95.07	0.0	741.9	2.0
0.231 6	0.0	1.808	0.0	14.11	0.0	110.1	0.0	859.2	0.0
0.268 2	0.0	2.093	0.0	16.34	0.0	127.5	0.0	995.1	0.0
0.310 6	0.0	2.424	0.0	18.92	0.0	147.7	0.0	1 152	0.0
0.359 7	0.0	2.807	0.0	21.91	0.0	171.0	0.4	1 335	0.0
0.416 6	0.0	3.251	0.0	25.37	0.0	198.0	2.0	1 545	0.0
0.482 5	0.0	3.765	0.0	29.39	0.0	229.3	5.2	1 790	0.0
0.558 7	0.0	4.360	0.0	34.03	0.0	265.6	9.3	2 073	0.0
0.647 0	0.0	5.050	0.0	39.41	0.0	307.6	13.5	2 400	0.0
0.749 3	0.0	5.848	0.0	45.64	0.0	356.2	16.4	2 780	1.9
0.867 8	0.0	6.772	0.0	52.85	0.0	412.5	17.1	3 219	0.0
1.005	0.0	7.843	0.0	61.21	0.0	477.7	15.1	3 728	0.0
1.164	0.0	9.083	0.0	70.89	0.0	553.2	11.1	4 317	0.0
1.348	0.0	10.52	0.0	82.09	0.0	640.7	6.1	5 000	0.0

表 4 Zein-Lutein 粒径分布百分比

Table 4 Percentage of particle size of Zein-Lutein

粒径 r/nm	百分比/ %								
0.200 0	0.0	1.561	0.0	12.18	0.0	95.07	0.0	741.9	4.6
0.231 6	0.0	1.808	0.0	14.11	0.0	110.1	0.0	859.2	1.5
0.268 2	0.0	2.093	0.0	16.34	0.0	127.5	0.0	995.1	0.0
0.310 6	0.0	2.424	0.0	18.92	0.0	147.7	0.0	1 152	0.0
0.359 7	0.0	2.807	0.0	21.91	0.0	171.0	0.0	1 335	0.0
0.416 6	0.0	3.251	0.0	25.37	0.0	198.0	1.3	1 545	0.0
0.482 5	0.0	3.765	0.0	29.39	0.0	229.3	4.1	1 790	0.0
0.558 7	0.0	4.360	0.0	34.03	0.0	265.6	8.1	2 073	0.0
0.647 0	0.0	5.050	0.0	39.41	0.0	307.6	12.1	2 400	0.0
0.749 3	0.0	5.848	0.0	45.64	0.0	356.2	15.1	2 780	1.9
0.867 8	0.0	6.772	0.0	52.85	0.0	412.5	16.4	3 219	0.0
1.005	0.0	7.843	0.0	61.21	0.0	477.7	15.5	3 728	0.0
1.164	0.0	9.083	0.0	70.89	0.0	553.2	12.7	4 317	0.0
1.348	0.0	10.52	0.0	82.09	0.0	640.7	8.7	5 000	0.0

16.4%, 15.5%, 12.7%, 8.7%, 4.6%, 1.5%, 平均粒径为 (398.3 ± 5.42) nm。由上述粒径的测定结果可知, Zein 与 Zein-Lutein 纳米粒粒径分布具有一致性, 均在纳米级范围内, 且分布比较集中和均匀(如图 5 所示)。Zein-Lutein 颗粒大小分布变化较小, 但所形成的纳米颗粒粒径略有减小, 可能是 Zein 和叶黄素二者通过吸附和疏水部位紧密结合, 减小了醇溶蛋白间的疏水性聚集作用, 形成纳米颗粒后在水中分散性有所改善, 因此形成的纳米粒径有所减小^[18]。

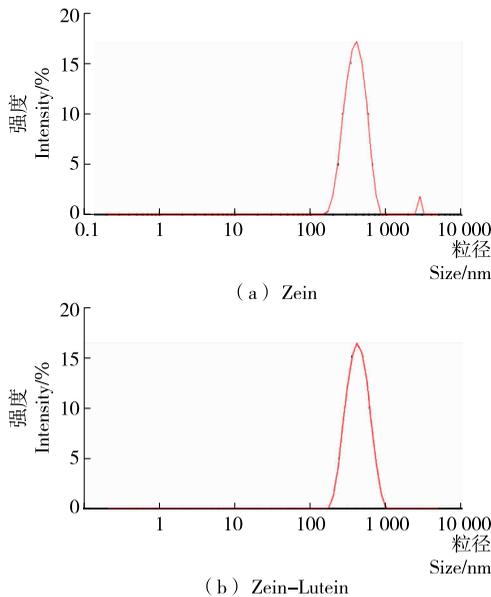


图 5 Zein 和 Zein-Lutein 的粒径分析图

Figure 5 Particle size distribution of Zein and Zein-Lutein

2.3.2 Zein-Lutein 电位分析 纳米粒子电位分析可反映出包埋前后电势电位的变化。从图 6 可知, 玉米醇溶蛋白颗粒的平均电势为 (43.70 ± 2.56) mV, 而 Zein-Lutein 纳米粒的平均电势为 (44.30 ± 2.53) mV, 电势电位略有升高, 说明带有正电荷的叶黄素与 Zein 的结合后, 所形成的纳米粒带电荷量增加, 进而说明 Zein 与 Lutein 能够有效结合, 形成对叶黄素的包埋作用。

2.4 透射电子显微镜 (TEM) 结果与分析

采用 H-7650 透射电子显微镜对 Zein 和 Zein-Lutein 微观结构进行分析。如图 7 所示, Zein 呈球形颗粒状态, 大小分布比较一致, 由于其疏水性较强在溶解液中呈聚集态, 蛋白颗粒较大。当 Zein 对 Lutein 进行包埋以后, 能够形成 Zein-Lutein 纳米复合体结构, 且粒径变小, 大小分布不均匀, 与 Nano 粒径分析仪测得结果一致。说明脂溶性叶黄素能够与疏水性玉米醇溶蛋白结合, 形成对叶黄素包埋的体系, 同时改善了叶黄素的溶解分散性, 有效地减小了叶黄素的降解和损失^[19]。

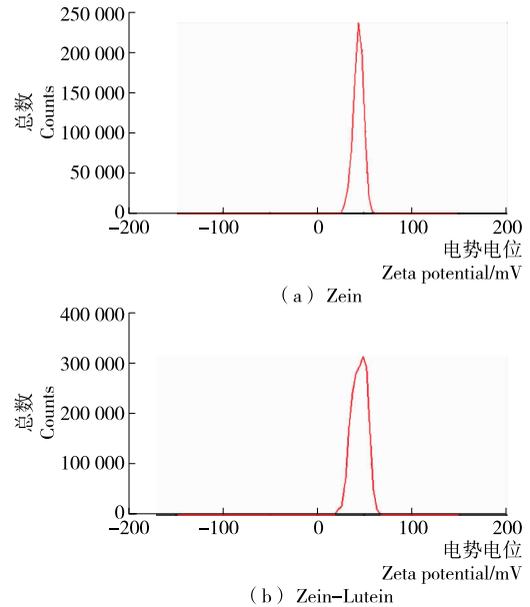


图 6 Zein 和 Zein-Lutein 的电势电位分布

Figure 6 Zeta potentiometric of Zein and Zein-Lutein

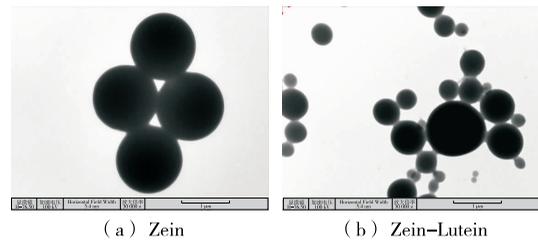


图 7 Zein 和 Zein-Lutein 的透射电子显微镜图

Figure 7 Transmission electron microscope (TEM) of Zein and Zein-Lutein

2.5 傅里叶红外光谱 (FT-IR) 解析

由图 8(a)可知, 叶黄素在 2957 cm^{-1} 波数处有 O—H 伸缩振动吸收峰, 在 $2920, 2848\text{ cm}^{-1}$ 波数处有 C—H 伸缩振动吸收峰, 在 1715 cm^{-1} 波数处有 C=C 伸缩振动吸收峰, 此红外光谱为叶黄素分子基团的特征吸收光谱^[20]。图 8(b)显示出玉米醇溶蛋白的红外特征吸收光谱: 分别在 3406 cm^{-1} 波数处有 O—H 振动吸收峰, 1656 cm^{-1} 处有酰胺 I 带—NH 弯曲振动, 2920 cm^{-1} 波数处有 C—H 伸缩振动吸收峰, 在 1115 cm^{-1} 波数处有 C—O 伸缩振动的红外特征吸收峰^[21]。叶黄素经玉米醇溶蛋白包埋后 [图 8(c)], 分别在 $2957, 2918, 2848, 1715\text{ cm}^{-1}$ 波数有特征伸缩振动吸收峰, 该特征光谱证明了在玉米醇溶蛋白负载的纳米粒中存在叶黄素结构。而且在 3406 cm^{-1} 波数处 O—H 伸缩振动, 2920 cm^{-1} 波数处 C—H 伸缩振动和 1115 cm^{-1} 波数处有 C—O 伸缩振动吸收峰分别明显增强。且在 3406 cm^{-1} 处的 O—H 伸缩振动峰移至 3422 cm^{-1} 处, 在 1115 cm^{-1} 处的 C—O 伸缩振动吸收峰移至 1118 cm^{-1} 处。上述结果表明, 叶黄素与玉米醇溶

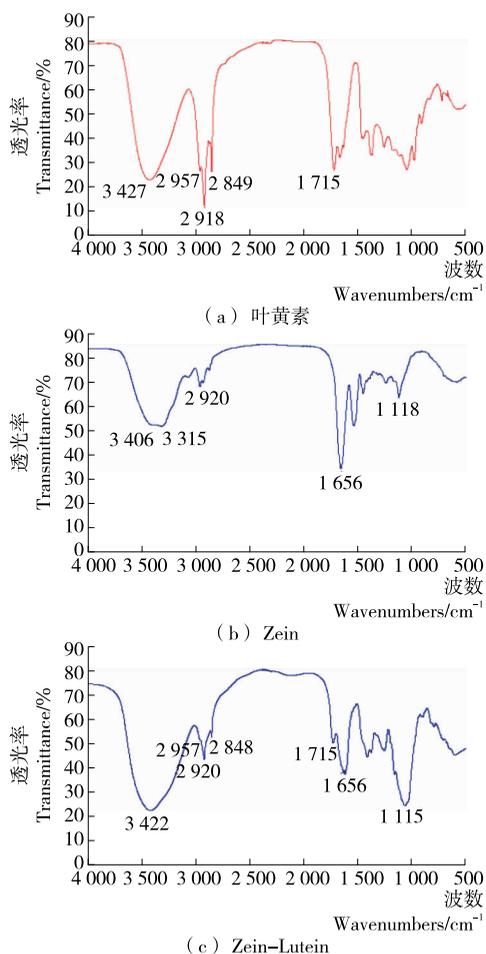


图 8 叶黄素、Zein 和 Zein-Lutein 的红外光谱图
Figure 8 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) of Zein-Lutein

蛋白结合以后,并未明显改变 Zein 的二级结构,而是二者通过 O—H 键和 C—O 等疏水性基团相互作用结合在一起,加强了叶黄素与 Zein 分子间的相互作用而形成纳米结合体结构^[22]。因此,叶黄素与玉米蛋白是以包埋方式结合而形成的纳米结构体系。

3 结论

本研究对反溶剂法制备玉米醇溶蛋白负载叶黄素纳米粒的工艺进行了探讨,并对其结构表征进行了初步解析。得到了玉米醇溶蛋白负载叶黄素纳米粒的最佳制备工艺条件为:玉米醇溶蛋白与叶黄素质量比 20 : 1,水合时间 150 min,温度 50 °C,此条件下玉米醇溶蛋白对叶黄素的包封率最大为 81.0%。通过粒径分析仪测得所制备的玉米醇溶蛋白负载叶黄素纳米粒粒径分布在 198.0~859.2 nm,平均粒径为 398.3 nm,平均电势为 44.3 mV;TEM 显示叶黄素充分被包裹在 Zein 内部而形成纳米球形结构,在水溶液体系中分散性提高;通过 Zein 载入叶黄素后的 FT-IR 光谱特征证明了叶黄素能够以氢键和疏水

性作用嵌入 Zein 中形成纳米结合体,并通过包埋作用对叶黄素进行负载和保护,此纳米体系中 Zein 的二级结构未发生明显改变。因此,可将可食性的玉米醇溶蛋白作为有效载体制备玉米醇溶蛋白负载叶黄素自组装纳米粒,对叶黄素进行包埋和保护,可提高叶黄素的稳定性和分散性,有助于保护叶黄素的生物活性和吸收利用率^[23]。

参考文献

- [1] 王晓杰, 刘晓兰, 丛万锁, 等. 玉米醇溶蛋白酶法糖基化修饰及产物性质研究[J]. 中国食品学报, 2018, 18(11): 135-142.
- [2] 孙翠霞. 基于玉米醇溶蛋白的复合胶体颗粒制备、表征及其应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2018: 3-12.
- [3] CHUACHAROEN T, SABLIOV C M. The potential of Zein nanoparticles to protect entrapped β -carotene in the presence of milk under simulated gastrointestinal (GI) conditions[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 72: 302-309.
- [4] XUE Feng, LI Chen, LIU Yan-long, et al. Encapsulation of tomato oleoresin with Zein prepared from corn gluten meal[J]. Journal of Food Engineering, 2013, 119(3): 439-445.
- [5] HU Dao-de, LIN Chang-chun, LIU Liang, et al. Preparation, characterization, and in vitro release investigation of Lutein/Zein nanoparticles via solution enhanced dispersion by supercritical fluids[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 109(3): 545-552.
- [6] NWACHUKWU I D, UDENIGWE CC, ALUKO R E. Lutein and zeaxanthin: Production technology, bioavailability, mechanisms of action, visual function, and health claim status[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 49: 74-84.
- [7] CHEW E Y, CLEMONS T E, SANGIOVANNI J P, et al. Secondary analyses of the effects of Lutein/zeaxanthin on age-related macular degeneration progression: AREDS2 report No. 3[J]. JAMA Ophthalmology, 2014, 132(2): 142-149.
- [8] 孙玉敬, 乔丽萍, 钟烈洲, 等. 类胡萝卜素生物活性的研究进展[J]. 中国食品学报, 2012, 12(1): 160-166.
- [9] DAVIDOV-PARDO G, GUMUS C E, MCCLEMENTS D J. Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of pH and temperature on physical and chemical stability[J]. Food Chemistry, 2016, 196: 821-827.
- [10] 黄晓霞, 黄旭琳, 胡坤. 负载姜黄素的玉米醇溶蛋白-果胶纳米颗粒制备及抗氧化活性研究[J]. 广东农业科学, 2015, 42(18): 88-92.
- [11] 刘凯, 童达君, 何媛. 白藜芦醇纳米混悬液的制备及固化[J]. 药学研究, 2016, 35(4): 222-225.
- [12] 彭文, 赵丛丛, 曾里, 等. 纳米微囊化水溶性叶黄素稳定性的研究[J]. 食品工业, 2009(5): 38-40.
- [13] 周浙贇, 吴启月, 冯所兰, 等. 黑米麸皮花青素脂质体冻干粉的制备[J]. 食品与机械, 2016, 32(3): 178-182.
- [14] NALAWADE P B, GAJJAR A K. Microencapsulation of lutein extracted from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) using full factorial design[J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2016, 33: 75-87.

(下转第 97 页)

2.7 扩展不确定度

置信概率约为 95%，取包含因子 $k=2$ ，高效液相色谱串联质谱法检测生乳中 L-羟脯氨酸的相对扩展不确定度为： $u_{rel}=k \times u_{rel}(X)=2 \times 0.0687=0.1374 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3 测量结果及其不确定度的报告

用高效液相色谱串联质谱法测定生乳中 L-羟脯氨酸含量，测定结果可表示为： $X=(375.1235 \pm 0.1374) \mu\text{g}/\text{kg}$ ， $k=2$ 。

4 结论

高效液相色谱串联质谱法检测生乳中 L-羟脯氨酸过程中的不确定度，主要来源于前处理的过程、天平的称量过程、标准溶液的配制过程及浓度、回收率、重复性 5 个分量。对这 5 个分量进行不确定度评定，最终得出扩展不确定度为 $0.1374 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，当包含因子 $k=2$ 、生乳中 L-羟脯氨酸检测值为 $375.1235 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时，测定结果可表示为： $(375.1235 \pm 0.1374) \mu\text{g}/\text{kg}$ ， $k=2$ （置信概率约为 95%）。

检测结果的不确定度主要来源于最小二乘法拟合的标准曲线、重复性及回收率，因此，可以采取增加标准曲线的进样次数、增加平行样品的测试，选择精度更高的器皿来代替普通的器皿，优化前处理过程等措施来减少各不确定度分量对检测结果的影响，增加检测结果的可信度。

参考文献

- [1] 金萍, 丁洪流, 陈英, 等. 乳制品中异种蛋白掺假检测的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(12): 135-138.
- [2] 李景红, 孟祥晨. 高效液相色谱法检测牛乳中掺加的胶原蛋白水解蛋白[J]. 中国乳品工业, 2008(11): 56-59.

(上接第 12 页)

- [15] 郭夏丽, 蓝雅惠, 邹艺红, 等. 蜂胶提取物脂质体制备及表征[J]. 食品科学, 2016, 37(13): 47-52.
- [16] CHUACHAROEN T, SABLIOV C M. Stability and controlled release of Lutein loaded in Zein nanoparticles with and without lecithin and pluronic F127 surfactants[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2016, 503: 11-18.
- [17] ZOU Li-qiang, LIU Wei, LIU Wei-lin, et al. Characterization and bioavailability of tea polyphenol nanoliposome prepared by combining an ethanol injection method with dynamic high-pressure microfluidization[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62: 934-941.
- [18] WANG Yong-hui, WANG Jin-mei, YANG Xiao-quan, et al. Amphiphilic Zein hydrolysate as a novel nano-delivery vehicle for curcumin[J]. Food & Function, 2015, 6(8): 2636-2645.

- [3] 蔡梅, 吉文亮, 刘华良, 等. 氨基酸自动分析仪对牛乳中羟脯氨酸快速测定方法研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(6): 542-545.
- [4] 全国食品安全整顿工作办公室. 关于公布食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单(第五批)的公告[EB/OL]. (2011-01-03) [2017-07-01]. http://www.gov.cn/zwggk/2011-01/25/content_1792065.htm.
- [5] 由丹青. 纯牛奶中动物水解蛋白 L-羟脯氨酸含量测定[J]. 中国奶牛, 2014(Z2): 48-50.
- [6] 王娣, 毛琰, 张会军. 分光光度法测定酸奶中 L(-)-羟脯氨酸含量的不确定度评定[J]. 食品工业科技, 2013, 34(12): 76-80.
- [7] 胡文辉, 童孟新, 陈跃跃, 等. 婴幼儿配方乳粉中黄曲霉 B₁ 质量分数测定的不确定度[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(10): 43-45.
- [8] FERRARI A, GUTIÉRREZ S, SIN G. Modeling a production scale milk drying process: parameter estimation, uncertainty and sensitivity analysis[J]. Chemical Engineering Science, 2016, 152: 301-310.
- [9] 肖利龙, 花锦. 高效液相色谱法测定花生酱中黄曲霉毒素 B₁ 结果不确定度的评定[J]. 食品与机械, 2018, 34(3): 79-81.
- [10] 汤丽华. 液相色谱—串联质谱法测定牛奶中地塞米松残留量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(13): 3258-3262.
- [11] GONZALES-GUSTAVSON E, CÁRDENAS-YOUNGS Y, CALVO M, et al. Characterization of the efficiency and uncertainty of skimmed milk flocculation for the simultaneous concentration and quantification of water-borne viruses, bacteria and protozoa[J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 134: 46-53.
- [12] 黄宝莹, 余之蕴, 沈宏林, 等. 发酵乳中乳酸菌数测定的不确定度评估[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(11): 41-44.

- [19] 田倚凡, 陈芳, 谭小路, 等. 萝卜硫素—玉米醇溶蛋白纳米水分散体制备及性质[J]. 食品与发酵工业, 2019(1): 121-127.
- [20] ZHAO Chang-dong, CHENG Hui, JIANG Peng-fei, et al. Preparation of Lutein-loaded particles for improving solubility and stability by Polyvinylpyrrolidone (PVP) as an emulsion-stabilizer[J]. Food Chemistry, 2014, 156: 123-128.
- [21] CHANG Chao, WANG Tao-ran, HU Qiao-bin, et al. Pectin coating improves physicochemical properties of caseinate/Zein nanoparticles as oral delivery vehicles for curcumin[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 70: 143-151.
- [22] PATEL A R, VELIKOV K P. Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2014, 19(5): 450-458.
- [23] 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.