

蜂胶脂质体制备工艺优化及抗氧化活性分析

Optimization of the preparation process for propolis liposome and antioxidant activity analysis

孙思源 孔令杰 朱和权 董捷

SUN Siyuan KONG Lingjie ZHU Hequan DONG Jie

(中国农业科学院蜜蜂研究所资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室, 北京 100093)

(State Key Laboratory of Resource Insects, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy
of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

摘要: [目的] 提高蜂胶的水溶性及其生物利用率, 扩大蜂胶在食品行业的应用范围。 [方法] 以胆固醇、大豆卵磷脂为壁材, 蜂胶为芯材, 利用薄膜分散法制备蜂胶脂质体。以包封率为检验指标, 通过单因素试验及响应面分析法优化得到蜂胶脂质体的最佳制备工艺, 并对其抗氧化活性进行分析评价。 [结果] 蜂胶脂质体的最优制备工艺为大豆卵磷脂用量 2.5 g/100 mL, 大豆卵磷脂与胆固醇质量比 10.3 : 1, 蜂胶与胆固醇质量比 3.8 : 1, 蜂胶脂质体的包封率可达 93.09%。该法所得蜂胶脂质体在体积分数为 50 μ L/mL 时, 对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基、羟自由基清除率分别达 88.58%, 61.13%, 86.02%。 [结论] 试验制备的蜂胶脂质体包封率高, 水溶性好, 且具有良好的抗氧化能力。

关键词: 蜂胶; 脂质体; 薄膜分散法; 抗氧化活性

Abstract: [Objective] This study aimed to improve the water solubility of propolis, and expand the application of propolis in food industry. [Methods] By utilizing the film dispersion method, propolis liposome was prepared with cholesterol and soy lecithin as the wall material and propolis as the core component. The optimal preparation process for propolis liposome was optimized through a combination of one-factor experiments and response surface methodology with the encapsulation rate as the test index, and its antioxidant activity was also analyzed and evaluated. [Results] The optimal process for preparing propolis liposome consisted of 2.5 g/100 mL soy lecithin, a cholesterol to

soy lecithin ratio of 1 : 10.3, and a cholesterol to propolis ratio of 1 : 3.8. These optimized conditions resulted in a high encapsulation rate of 93.09% for propolis liposome. In addition, it was found that the scavenging efficiencies of the 50 μ L/mL propolis liposome were 88.60%, 60.53%, and 82.25% for clearance of DPPH radicals, ABTS⁺ radicals, and hydroxyl radicals, respectively. [Conclusion] The prepared propolis liposome has high encapsulation efficiency, good water solubility and good antioxidant capacity.

Keywords: propolis; liposome; film dispersion method; antioxidant activity

蜂胶具有抗氧化^[1]、抗菌^[2]、抗肿瘤^[3]和提高免疫力^[4]等生物活性, 但由于蜂胶水溶性较差, 常温下黏度大且含有的黄酮类化合物性质不稳定等因素的影响, 导致其生物利用率较低、贮存性能不佳和货架期短等问题, 从而一定程度上限制了蜂胶的应用。

脂质体是一种将药物包封于类脂质双分子层内而形成的微型泡囊体^[5]。作为一种输送载体, 脂质体可以有效地增加包封药物的溶解度, 提高药物的生物利用率。同时, 脂质体还具有良好的生物相容性, 可以减少药物引起的不良反应, 并且能够延长药物在体内的循环时间, 进而更好地将药物输送到目标部位^[6]。黄酮类化合物是蜂胶中的主要成分之一, 蜂胶的生物活性与蜂胶中黄酮类化合物的种类及含量存在明显的相关性。此外, 除黄酮类化合物, 蜂胶中的酚酸及其酯类化合物等也具有生物活性, 如改善免疫、调节脂代谢、调节血糖等^[7]。近年来关于蜂胶脂质体的研究多聚焦于蜂胶中黄酮类物质, 如袁菊^[8]和陶阳^[9]的研究仅对蜂胶中含有的黄酮类化合物进行了脂质体的制备; 张冰慧^[10]和郭夏丽等^[11]制备了蜂胶醇提物的脂质体, 但只以蜂胶中总黄酮含量来测定包封率。

研究拟采用高效液相色谱 (high performance liquid

基金项目: 国家蜂产业技术体系 (编号: CARS-44-KXJ19); 中国农业科学院创新工程 (编号: CAAS-ASTIP-2019 IAR)

作者简介: 孙思源, 女, 中国农业科学院蜜蜂研究所读硕士研究生。

通信作者: 董捷 (1966—), 女, 中国农业科学院蜜蜂研究所研究员, 硕士。E-mail: jiedon@126.com

收稿日期: 2023-10-18 **改回日期:** 2024-03-15

chromatography, HPLC)法,以蜂胶脂质体中总酚含量来测定蜂胶脂质体包封率,对蜂胶脂质体的制备条件进行优化,从而筛选出蜂胶脂质体的最佳制备工艺,并探究评价该方法制备的蜂胶脂质体的抗氧化活性。旨在制备出一种具有良好水溶性和稳定性,且生物利用率高的蜂胶制品,为以蜂胶作为原料的食品及日化类产品的开发与应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蜂胶:中国农业科学院蜜蜂研究所;

胆固醇、大豆卵磷脂:食品级,北京索莱宝科技有限公司;

乙醇:分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;

甲醇:99.9%赛默飞世尔科技公司。

1.2 仪器与设备

电子天平:SQP型,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;

数控超声波清洗器:KQ-500DE型,江苏昆山市超声仪器有限公司;

旋转蒸发器:RE-20000B型,上海亚荣生化仪器厂;

高效液相色谱仪:LC-6AD型,日本岛津公司;

小型台式高速冷冻离心机:5417R型,德国Eppendorf公司;

紫外/可见分光光度计:UV-2550型,日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 脂质体制备 参考文献[12]采用薄膜分散法制备蜂胶脂质体。精密称取蜂胶、大豆卵磷脂和胆固醇置于圆底烧瓶中,向烧瓶中加入二氯甲烷对其进行充分溶解。溶解后于37℃水浴旋转蒸发除去溶剂,瓶壁上形成均匀透明的薄膜。用氮气流除尽残留溶剂,再加入预热的磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.2~7.4),于减压状态下(-0.1 MPa)充分旋转洗膜。试验过程中,分别保持大豆卵磷脂在磷酸盐缓冲液(50 mL)中的质量浓度为0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 g/100 mL,按照不同的大豆卵磷脂与胆固醇、蜂胶与胆固醇比例,调整加入的胆固醇和蜂胶用量。

1.3.2 包封率测定

(1) 游离蜂胶和蜂胶脂质体分离:采用鱼精蛋白凝聚法[13]。

(2) HPLC 色谱分析条件:采用 HPLC 法。液相色谱柱为 Phenomenex Gemini C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温 35℃;检测波长 280 nm;进样量 20 μL;总流速 1 mL/min;流动相:A相为含有2%乙酸的水溶液,B相为含有2%乙酸的甲醇溶液。梯度洗脱程序:0~25 min, 22%~36% B; 25~55 min, 36%~52% B; 55~

90 min, 52%~63% B; 90~115 min, 63%~70% B; 115~135 min, 70%~75% B; 135~150 min, 75%~80% B^[14]。

(3) 脂质体包封率计算:根据 NY/T 629—2018《蜂胶及其制品》中的方法分别计算蜂胶脂质体中总蜂胶含量以及游离蜂胶质量浓度,再按式(1)计算蜂胶脂质体包封率。

$$E_E = \frac{\rho_1 - \rho_2}{\rho_1} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

E_E ——蜂胶脂质体包封率,%;

ρ_1 ——蜂胶脂质体中蜂胶总质量浓度,g/100 mL;

ρ_2 ——蜂胶脂质体中游离蜂胶质量浓度,g/100 mL。

1.3.3 单因素试验

分别研究大豆卵磷脂在磷酸盐缓冲液(50 mL)中的质量浓度(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 g/100 mL)、大豆卵磷脂与胆固醇质量比(2:1, 4:1, 6:1, 8:1, 10:1, 12:1)、蜂胶与胆固醇质量比(2:1, 4:1, 6:1, 8:1, 10:1, 12:1)3个因素对脂质体包封率的影响;有机溶剂(氯仿, 二氯甲烷, 乙醇)和表面活性剂(氢化蓖麻油, 吐温-20, 吐温-80)2个因素对脂质体成膜效果的影响。各因素固定时的取值为大豆卵磷脂用量 1.2 g/100 mL, 大豆卵磷脂与胆固醇质量比 4:1, 蜂胶与胆固醇质量比 4:1, 有机溶剂为 30 mL 二氯甲烷, 表面活性剂为 0.1 g 吐温-80。

1.3.4 响应面试验 根据单因素试验结果,确定蜂胶脂质体包封率的3个主要影响因素,分别为大豆卵磷脂用量、胆固醇与大豆卵磷脂比例、胆固醇与蜂胶比例,以包封率为响应值,设计三因素三水平 Box-Behnken 试验。

1.3.5 蜂胶脂质体中化合物成分分析比较 对相同浓度的蜂胶醇提物(75%乙醇)、蜂胶脂质体以及蜂胶水溶物中化合物成分进行分析和比较。

1.3.6 抗氧化能力测定

(1) 清除 DPPH 自由基能力:根据 Ilhami 等^[15]的方法,修改如下:取 2 mL 不同体积分数的样品溶液(5, 10, 20, 30, 40, 50 μL/mL)分别与 2 mL 0.1 mmol/L DPPH 溶液混匀,于避光条件下反应 30 min。在 516 nm 下对反应后的样品溶液进行吸光度的测定。按式(2)计算 DPPH 自由基清除率。

$$R_1 = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R_1 ——DPPH 自由基清除率,%;

A_0 ——2 mL DPPH 溶液和 2 mL 甲醇混合后的吸光度;

A_1 ——2 mL 样品溶液和 2 mL 甲醇混合后的吸光度;

A_2 ——2 mL 样品溶液和 2 mL DPPH 溶液反应后的吸光度。

(2) 清除 ABTS^+ 自由基能力: 根据李进等^[16]的方法, 修改如下: 将 7 mmol/L ABTS 溶液和 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液以相同的体积混合均匀, 然后在避光的条件下反应 14 h, 最终得到 ABTS^+ 溶液。取 1 mL ABTS^+ 溶液, 加入适量水稀释, 直至在 734 nm 下的吸光度值为 0.70 ± 0.02 , 得到 ABTS^+ 储备液。将 0.2 mL 不同体积分数的样品溶液 (5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 分别与 3.8 mL 的 ABTS^+ 储备液混匀, 在避光条件下反应 6 min 后, 于 734 nm 下测定吸光度。按式(3)计算 ABTS^+ 自由基清除率。

$$R_2 = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

R_2 —— ABTS^+ 自由基清除率, %;

A_0 ——0.2 mL 水和 3.8 mL ABTS^+ 溶液混合后的吸光度;

A_1 ——0.2 mL 样品溶液和 3.8 mL 水混合后的吸光度;

A_2 ——0.2 mL 样品溶液和 3.8 mL ABTS^+ 溶液混合后的吸光度。

(3) 清除羟自由基能力: 根据陈杰^[17]的方法, 修改如下: 取 1 mL 不同浓度的样品溶液 (5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 和 1 mL 9.0 mmol/L 水杨酸溶液、1 mL 9.0 mmol/L 硫酸亚铁溶液混匀, 然后加入 1.0 mL 8.8 mmol/L 过氧化氢溶液启动反应, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 30 min, 于 510 nm 下测定吸光度。按式(4)计算羟自由基清除率。

$$R_3 = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

R_3 ——羟自由基清除率, %;

A_0 ——1 mL 水代替样品溶液混合后的吸光度;

A_1 ——1 mL 样品溶液与 1 mL 水代替过氧化氢溶液混合后的吸光度;

A_2 ——1 mL 样品溶液反应后的吸光度。

1.4 数据处理

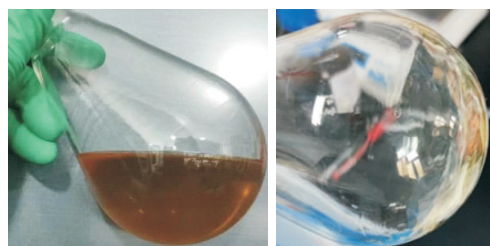
所有试验均进行 3 次平行测定, 结果取平均值。采用 Origin 2017 作图, 使用 Design-Expert 13 软件进行响应面试验设计及分析。

2 结果与分析

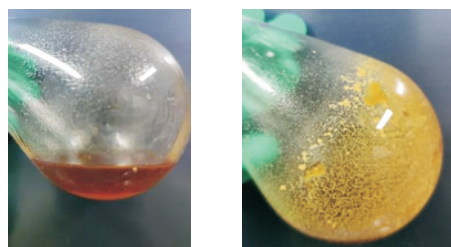
2.1 单因素试验

2.1.1 有机溶剂选择 试验发现, 使用氯仿和二氯甲烷作为溶剂时, 原料溶解充分, 且在旋转蒸发时, 成膜的效果

最好[图 1(a)]。使用乙醇作为溶剂时, 原料无法完全溶解, 且成膜速度慢, 持续有沉淀析出[图 1(b)]。氯仿和二氯甲烷在溶解情况和成膜效果上非常相似, 但由于氯仿的毒性较高, 因此选择二氯甲烷作为有机溶剂。



(a) 氯仿及二氯甲烷



(b) 乙醇

图 1 不同有机溶剂溶解情况及成膜效果

Figure 1 Solubility and film forming effect with different organic solvent

2.1.2 大豆卵磷脂用量对蜂胶脂质体包封率的影响 由图 2 可知, 随大豆卵磷脂用量增加, 蜂胶脂质体包封率先增加后逐渐减少。当大豆卵磷脂质量浓度为 2.5 g/100 mL 时, 平均包封率最高, 达到 94.58%。这可能是由于大豆卵磷脂用量增加, 载药能力增加, 包封率上升。大豆卵磷脂用量过大时, 大豆卵磷脂浓度过高, 引起脂质体聚集产生沉淀, 导致脂质体包封率无法继续提升, 甚至出现降低的情况。因此, 响应面试验中大豆卵磷脂用量的 3 个水平选择 2.0, 2.5, 3.0 g/100 mL。

2.1.3 大豆卵磷脂与胆固醇质量比对蜂胶脂质体包封率的影响 由图 3 可知, 随着大豆卵磷脂与胆固醇质量比

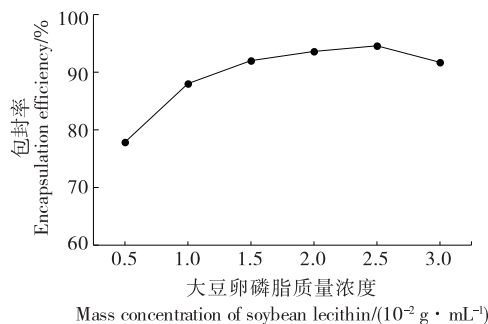


图 2 大豆卵磷脂用量对蜂胶脂质体包封率的影响

Figure 2 Effects of lecithin dosage on the encapsulation rate of propolis liposomes

的增加,蜂胶脂质体包封率呈先增加后减少的趋势。当大豆卵磷脂与胆固醇质量比为 10 : 1 时,蜂胶脂质体包封率达到了最高值,为 96.62%。这可能是因为胆固醇过多,大豆卵磷脂过少时,胆固醇通过高渗现象进入磷脂双分子层,挤压蜂胶的空间,使得蜂胶脂质体的包封率较低。而当胆固醇过少,大豆卵磷脂过多时,脂质膜结构稳定性受到影响,同样导致了包封率的降低。因此,响应面试验中大豆卵磷脂与胆固醇质量比的 3 个水平选择 8 : 1,10 : 1,12 : 1。

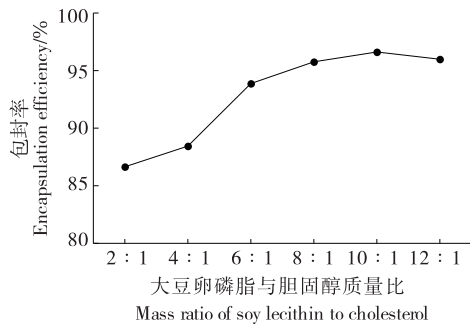


图 3 大豆卵磷脂与胆固醇质量比对蜂胶脂质体包封率的影响

Figure 3 Effects of the ratio of soy lecithin to cholesterol on the encapsulation rate of propolis liposomes

2.1.4 蜂胶与胆固醇质量比对蜂胶脂质体包封率的影响

由图 4 可知,随着蜂胶与胆固醇质量比的增加,蜂胶脂质体的包封率先急速上升后缓慢下降。当蜂胶与胆固醇质量比为 4 : 1 时,包封率最高,为 81.78%。这可能是因为添加蜂胶的量过多,导致脂质膜结构无法将蜂胶全部包封进去。因此,响应面试验中蜂胶与胆固醇质量比的 3 个水平选择 2 : 1,4 : 1,6 : 1。

2.1.5 表面活性剂对蜂胶脂质体包封率的影响 表面活性剂可以增加脂质体的稳定性,试验发现添加吐温-20、氢化蓖麻油、吐温-80 作为表面活性剂和不添加表面活性剂制备的蜂胶脂质体的包封率分别为 63.05%,88.58%,

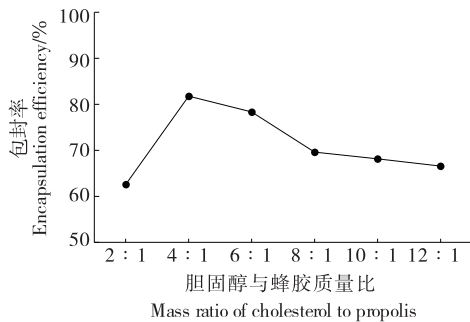


图 4 蜂胶与胆固醇质量比对蜂胶脂质体包封率的影响

Figure 4 Effects of propolis to cholesterol ratio on the encapsulation rate of propolis liposomes

92.84%,4.65%。添加吐温-20 作为表面活性剂时,旋转蒸发时起泡少,但加入 PBS 洗脱时洗脱性差[图 5(a)]。添加氢化蓖麻油作为表面活性剂时,加入 PBS 洗脱时洗脱性好,但旋转蒸发时大量起泡[图 5(b)]。用吐温-80 作为表面活性剂时,旋转蒸发时起泡少,且加入 PBS 洗脱时洗脱性好[图 5(c)]。而不添加任何表面活性剂时,旋转蒸发时不起泡,但加入 PBS 洗脱时洗脱性差。因此,最终选择吐温-80 作为表面活性剂。

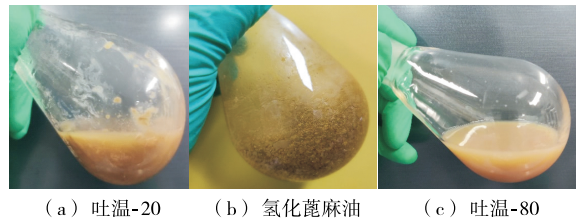


图 5 不同表面活性剂的旋蒸及洗脱情况

Figure 5 The spin evaporation and elution effects of different surfactants on experimental phenomena

2.2 响应面优化试验

2.2.1 响应面试验设计与结果 试验因素及水平设计见表 1,试验结果见表 2。

运用 Design Expert 13 软件对表 2 中数据进行回归分析。经过二次回归拟合后,得到蜂胶脂质体的包封率对大豆卵磷脂用量、大豆卵磷脂与胆固醇质量比、蜂胶与胆固醇质量比的二次多项回归方程:

$$Y=92.88-0.061\ 3A+2.11B-1.23C-1.65AB-3.06AC-2.34BC-6.78A^2-7.93B^2-8.52C^2。 \quad (5)$$

2.2.2 响应面回归模型方差分析 由表 3 可知,响应面回归模型达到了极显著水平,表明该拟合有较高的精度,可以利用该响应面近似模型进行后续的优化设计。失拟项不显著,表明回归方程无失拟因素存在,回归方程拟合较好。决定系数 $R^2=0.982\ 2$,进一步说明该响应面模型拟合度良好,预测结果和实际数据具有较高的相关性,可用于制备蜂胶脂质体工艺优化的分析及预测。由 P 值可知,模型中 BC 对蜂胶脂质体包封率的影响为显著, B 、 AC 、 A^2 、 B^2 、 C^2 对蜂胶脂质体包封率的影响极显著。同

表 1 响应面试验因素及水平

Table 1 The response surface design factor and level

水平	A 大豆卵磷脂用量/ ($10^{-2}\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	B 大豆卵磷脂与 胆固醇质量比	C 蜂胶与胆固 醇质量比
-1	2.0	8 : 1	2 : 1
0	2.5	10 : 1	4 : 1
1	3.0	12 : 1	6 : 1

时,根据 F 值的大小可以推断出,在蜂胶脂质体中,大豆卵磷脂与胆固醇质量比对蜂胶脂质体包封率的影响最为显著,其次为蜂胶与胆固醇质量比和大豆卵磷脂用量,即大豆卵磷脂与胆固醇质量比>蜂胶与胆固醇质量比>大豆卵磷脂用量。

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果
Table 2 Box-Behnken experimental design and results

试验号	A	B	C	包封率/%
1	-1	-1	0	74.56
2	0	0	0	93.87
3	0	0	0	93.45
4	0	-1	-1	72.75
5	-1	0	-1	76.18
6	-1	0	1	78.24
7	-1	1	0	82.76
8	1	0	1	72.85
9	0	-1	1	76.58
10	0	1	1	75.44
11	0	0	0	94.66
12	1	-1	0	76.88
13	1	1	0	78.48
14	0	0	0	91.15
15	1	0	-1	83.04
16	0	1	-1	80.96
17	0	0	0	91.28

表 3 回归模型方差分析[†]
Table 3 Analysis of variance of the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	970.86	9	107.87	42.87	<0.000 1	* *
A	0.03	1	0.03	0.01	0.916 1	
B	35.57	1	35.57	14.14	0.007 1	* *
C	12.05	1	12.05	4.79	0.064 8	
AB	10.89	1	10.89	4.33	0.076 0	
AC	37.52	1	37.52	144.91	0.006 2	* *
BC	21.86	1	21.86	8.69	0.021 5	*
A ²	193.75	1	193.75	77.00	<0.000 1	* *
B ²	264.68	1	264.68	105.19	<0.000 1	* *
C ²	305.72	1	305.72	121.50	<0.000 1	* *
残差	17.61	7	2.52			
失拟项	7.59	3	2.53	1.01	0.475 9	
纯误差	10.03	4	2.51			
总离差	988.48	16				

[†] “*”代表差异显著, $P<0.05$; “**”代表差异极显著, $P<0.01$; $R^2=0.982\ 2$ 。

2.2.3 响应面分析 由图 6 可知:大豆卵磷脂用量和蜂胶与胆固醇质量比两个因素的响应曲面倾斜度较高,等高线呈明显的椭圆形,这两个因素之间的交互作用为极显著($P<0.01$)。大豆卵磷脂与胆固醇质量比和蜂胶与胆固醇质量比两个因素的响应曲面倾斜度较高,坡度较为陡峭,可以看出等高线为椭圆形,这两个因素之间的交互作用为显著($P<0.05$)。而大豆卵磷脂用量和大豆卵磷脂与胆固醇质量比两个因素的响应曲面等高线则接近圆形,表示这两个因素之间的交互作用不显著。

2.2.4 验证实验 运用 Design Expert 13 软件优化得出脂质体的最佳制备工艺条件为大豆卵磷脂用量 2.499 g/100 mL,大豆卵磷脂与胆固醇质量比 10.293 : 1,蜂胶与胆固醇质量比 3.815 : 1。结合实际操作情况,将制备条件调整为大豆卵磷脂用量 2.5 g/100 mL,胆固醇与大豆卵磷脂质量比 10.3 : 1,胆固醇与蜂胶质量比 3.8 : 1。在此工艺条件下蜂胶脂质体包封率预测值为 93.09%。按最佳制备工艺条件制备 3 批蜂胶脂质体,测得这 3 批蜂胶脂质体包封率分别为 93.86%,94.00%,93.39%,平均包封率为 93.75%。该结果与响应面交互作用分析预测的结果相对误差仅为 0.71%,说明实际验证值与响应面模型的预测值具有较高的吻合度。袁菊^[8]制备的蜂胶黄酮脂质体包封率为 91.67%,张冰慧^[10]制备的蜂胶脂质体包封率为 $(90.69\pm 0.41)\%$,试验制备的蜂胶脂质体包封率略高。

2.2.5 蜂胶脂质体中化合物成分分析比较 目前已在蜂胶乙醇提取物中鉴定出约 40 种多酚类化合物成分,主要包括黄酮、酚酸及其酯类化合物^[15]。采用高效液相色谱法对蜂胶醇提取物(75%乙醇)、蜂胶脂质体、蜂胶水溶物中化合物成分进行分析和比较,结果如图 7 所示。将蜂胶脂质体与蜂胶醇提取物(75%乙醇)中的化合物成分进行比较分析发现,试验制备的蜂胶脂质体中含有的多酚类化合物在成分组成上与蜂胶醇提取物(75%乙醇)几乎一致,仅在化合物的含量上略有所降低。而蜂胶水溶物中的多酚类化合物无论是在组成还是含量上相比于蜂胶醇提取物(75%乙醇)都明显减少。说明制备的蜂胶脂质体能有效地保留蜂胶中的大部分黄酮、酚酸及其酯类化合物成分。

2.3 抗氧化活性评价

由图 8 可知,随着蜂胶脂质体体积分数的增加,蜂胶脂质体对于 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基以及羟自由基清除能力也呈增强趋势。当样品体积分数为 50 $\mu\text{L/mL}$ 时,样品的 DPPH 自由基清除率为 88.58%、ABTS⁺ 自由基清除率为 61.13%、羟自由基清除率为 86.02%。而相同浓度的蜂胶水溶物的 DPPH 自由基清除率为 22.7%、ABTS⁺ 自由基清除率为 19.98%、羟自由基清除率为 15.5%,表明制备的蜂胶脂质体的抗氧化能力远高于相同浓度的蜂胶水溶物。孙丽萍等^[18]对蜂胶不同溶剂提取物

进行了清除 DPPH 自由基能力的测定,发现自由基清除率最高的丙酮提取物可以达到 88.013%;谭曜等^[19]测定了蜂胶乙醇溶液(1 g/L)对于羟自由基的清除率为

91.5%,均与试验制备的蜂胶脂质体的自由基清除能力较为接近,说明制备的蜂胶脂质体具有与有机溶剂蜂胶提取物相似的抗氧化能力。

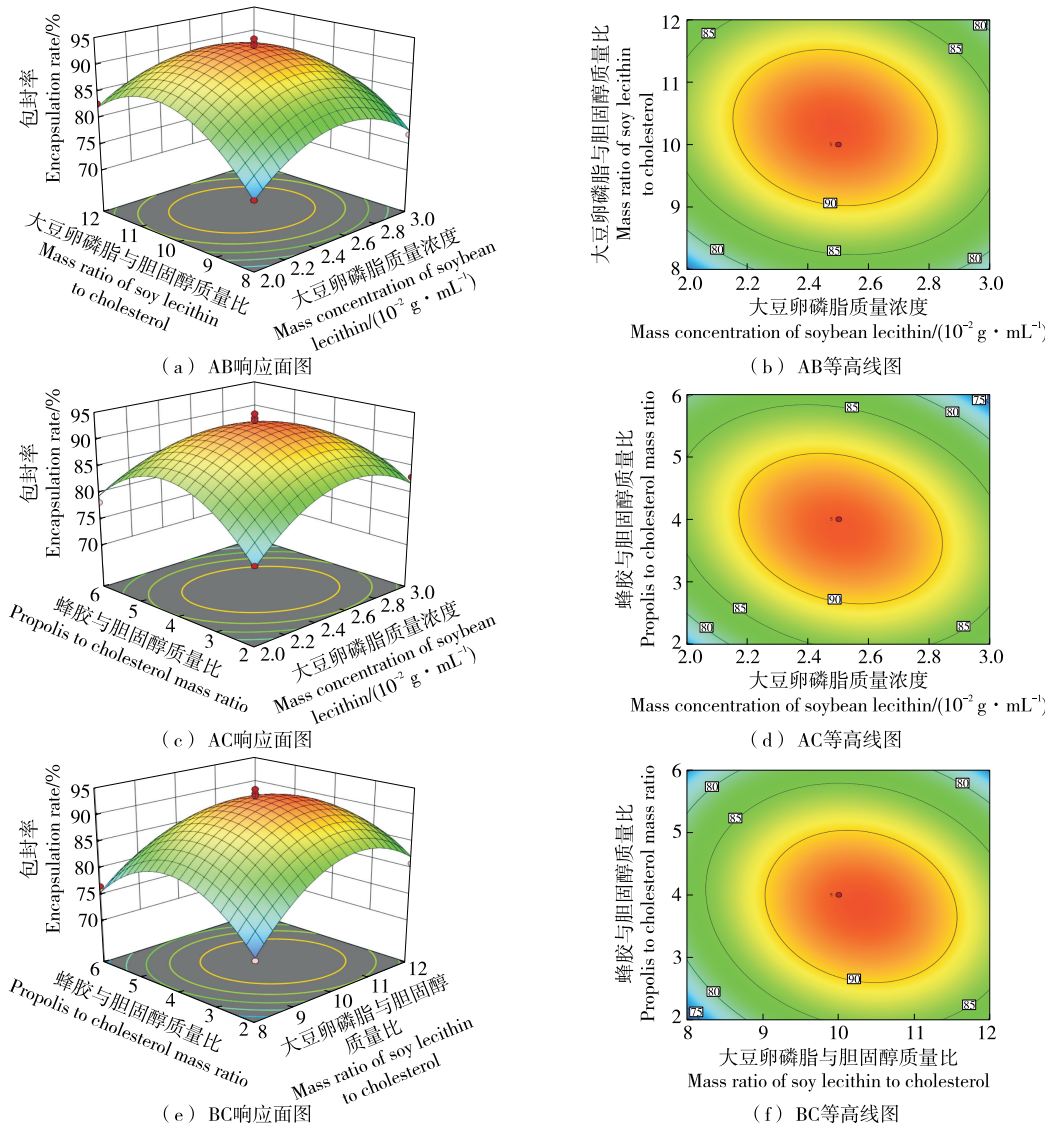


图 6 3 个因素之间交互作用对蜂胶脂质体包封率影响的响应面图及等高线图

Figure 6 The response surface graph and contour map of the interaction among three factors on the encapsulation rate of propolis liposomes

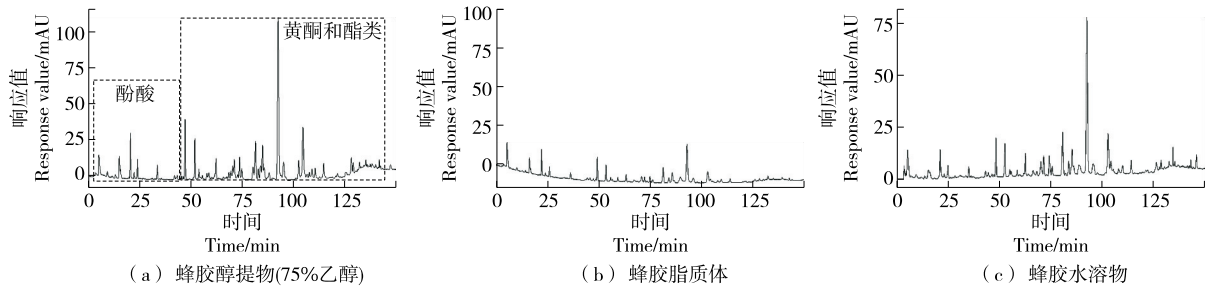
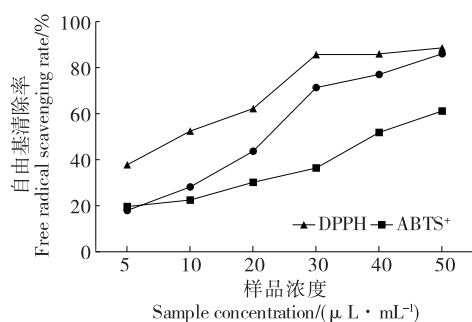
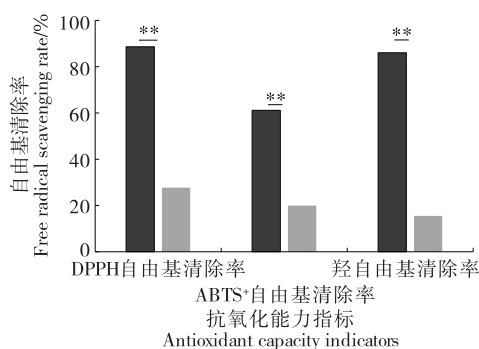


图 7 HPLC 色谱图

Figure 7 HPLC chromatograms



(a) 不同体积分数蜂胶脂质体的自由基清除能力



(b) 50 μL/mL蜂胶脂质体和蜂胶水溶物清除自由基能力

* * . 差异极显著 (P < 0.01)

图 8 抗氧化活性评价

Figure 8 Evaluation of antioxidant activities

3 结论

研究以蜂胶为芯材,胆固醇和大豆卵磷脂为壁材,采用薄膜分散法制备具有高包封率的蜂胶脂质体。通过单因素试验及响应面分析法,对大豆卵磷脂用量、大豆卵磷脂与胆固醇质量比、蜂胶与胆固醇质量比进行了优化,获得最优制备工艺:大豆卵磷脂用量 2.5 g/100 mL,大豆卵磷脂与胆固醇质量比 10.3 : 1、蜂胶与胆固醇质量比 3.8 : 1,该条件下蜂胶脂质体的包封率可达 93.09%。此外,制备所得的蜂胶脂质体还表现出良好的抗氧化活性。试验仅对蜂胶脂质体的抗氧化性进行了研究,蜂胶脂质体的稳定性以及其他生物活性还有待进一步研究。

参考文献

- [1] RIVERA-YAÑEZ C R, RUIZ-HURTADO P A, MENDOZA-RAMOS M I, et al. Flavonoids present in propolis in the battle against photoaging and psoriasis[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10 (12): 2 014.
- [2] BOUCHELAGHEM S. Propolis characterization and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: a review[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2022, 29(4): 1 936-1 946.
- [3] RUIZ-BUSTOS P, ALDAY E, GARIBAY-ESCOBAR A, et al. Propolis: antineoplastic activity, constituents, and mechanisms of action[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2023, 23(18): 1 953-1 764.
- [4] AL-HARIRI M. Immune's-boosting agent: immunomodulation potentials of propolis[J]. *J Family Community Med*, 2019, 26(1): 57-60.
- [5] 代旭栋, 李云, 李双双, 等. 皮肤外用脂质体的研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2020, 47(11): 914-921.
- [6] 颜红, 宫思璿, 于亮, 等. 脂质体作为药物载体的最新研究进展

[J]. *药物生物技术*, 2023, 30(3): 325-330.

YAN H, GONG S J, YU L, et al. Recent advances in the study of liposomes as drug carriers[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Biotechnology*, 2023, 30(3): 325-330.

- [7] 葛怡青, 汪浅, 全涛. 蜂胶功能成分及生物活性研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(4): 1 027-1 035.

GE Y Q, WANG Q, TONG T. Research progress on functional components and bioactivities of propolis[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022, 13(4): 1 027-1 035.

- [8] 袁菊. 蜂胶黄酮脂质体的制备及免疫增强作用的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 17-28.

YUAN J. Studies on immunological adjuvanticity of propolis flavonoids liposome[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012: 17-28.

- [9] 陶阳. 蜂胶黄酮脂质体免疫增强活性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015: 15-24.

TAO Y. The studies on immunological adjuvanticity of propolis flavonoids liposome[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015: 15-24.

- [10] 张冰慧. 蜂胶脂质体的制备及其对高血糖小鼠降糖作用的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009: 9-19.

ZHANG B H. Study on preparation of propolis liposome and its hypoglycemic effect[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2009: 9-19.

- [11] 郭夏丽, 蓝雅惠, 邹艺红, 等. 蜂胶醇提物微胶囊的制备及表征[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(10): 226-232.

GUO X L, LAN Y H, ZOU Y H, et al. Preparation and characterization of eep calcium alginate-chitosan microcapsules[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(10): 226-232.

- [12] 刘璐, 孙敬蒙, 景啸澜, 等. 改良一薄膜分散法优化栀子提取物类脂质体的制备工艺[J]. *华西药学杂志*, 2019, 34(2): 131-135.

LIU L, SUN J M, JING X L, et al. Optimization of the gardenia extract liposome based on Modified - film dispersion method[J]. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 34(2): 131-135.

(下转第 232 页)

- [48] 高应娟, 罗舒, 宋怡, 等. 灵芝抗炎机制研究进展[J]. 中国食用菌, 2021, 40(9): 1-4, 10.
- GAO Y J, LUO S, SONG Y, et al. Research progress on anti-inflammatory mechanisms of *Ganoderma lucidum*[J]. *Edible Fungi of China*, 2021, 40(9): 1-4, 10.
- [49] 林伟龙, 李兆安, 蔡金艳. 复方赤灵芝营养粉对小鼠抗疲劳作用和氧化损伤模型小鼠的影响[J]. 广东药科大学学报, 2019, 35(2): 242-245.
- LIN W L, LI Z A, CAI J Y. Effect of compound red *Ganoderma* nutrition powder on anti fatigue and oxidative damage model mice [J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2019, 35(2): 242-245.
- [50] 张维珂, 张丛丛. 泰山赤灵芝延缓运动员运动性疲劳的实验研究[J]. 体育科技, 2014, 35(6): 77-78, 87.
- ZHANG W K, ZHANG C C. Experimental study on the effect of Taishan *Ganoderma* on delaying sports fatigue[J]. *Sport Science and Technology*, 2014, 35(6): 77-78, 87.
- [51] 李晨, 吕晨曦, 吴磊. 泰山赤灵芝对重复运动后骨骼肌微损伤的保护作用研究[J]. 泰山医学院学报, 2014, 35(8): 711-716.
- LI C, LU C X, WU L. Study on the protective effect of Taishan *Ganoderma* on skeletal muscle microinjury after repeated exercise [J]. *Journal of Taishan Medical College*, 2014, 35(8): 711-716.
- [52] 李盼, 曾祥权, 李倩倩, 等. 块菌多糖的提取、结构、功能及应用研究进展[J]. 食品与机械, 2024, 40(2): 213-220.
- LI P, ZENG X Q, LI Q Q, et al. Research progress on extraction, structural, functional properties and application of Tuber polysaccharides[J]. *Food & Machinery*, 2024, 40(2): 213-220.
- [53] 张文婧, 刘欢, 李红波, 等. 富硒平菇菌种筛选、发酵优化及菌丝特性评价[J/OL]. 食品与生物技术学报. (2024-03-07) [2024-04-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1751.TS.20240304.1100.002.html>.
- ZHANG W J, LIU H, LI H B, et al. Screening, fermentation optimization, and mycelia characterization of selenium-enriched *Pleurotus ostreatus* strains [J/OL]. *Journal of Food Science and Biotechnology*. (2024-03-07) [2024-04-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1751.TS.20240304.1100.002.html>.
- [54] ZHAO C, ZHANG C C, ZHENG X, et al. Pharmacological effects of natural *Ganoderma* and its extracts on neurological diseases: a comprehensive review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 1 160-1 178.
-
- (上接第 198 页)
- [13] 谢佳秀, 巫小媚, 陈红丽, 等. 三七总皂苷脂质体的制备及表征研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(3): 610-613.
- XIE J X, WU X M, CHEN H L, et al. Preparation and characterization of liposomes of Panax ginseng total saponin[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2021, 32(3): 610-613.
- [14] 罗照明. 中国蜂胶中多酚类化合物的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013: 11.
- LUO Z M. Polyphenolic composition of Chinese propolis [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013: 11.
- [15] ILHAMI G, ERCAN B M, HILAL S, et al. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(8/9): 2 227-2 238.
- [16] 李进, 刘世军, 罗锐, 等. 大枣叶水提醇沉物的抗氧化活性研究[J]. 陕西农业科学, 2023, 69(7): 1-7, 17.
- LI J, LIU S J, LUO R, et al. Antioxidant activity of water-extraction alcohol-precipitation extracts from jujube leaves [J]. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 69(7): 1-7, 17.
- [17] 陈杰. 不同产地灵芝子实体化学成分及抗氧化活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2016: 35-36.
- CHEN J. The components and antioxidant activity of *ganoderma lucidum* from different origins[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2016: 35-36.
- [18] 孙丽萍, 徐响, 黄少康, 等. 蜂胶不同溶剂萃取物组成和抗氧化性的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 75-78.
- SUN L P, XU X, HUANG S K, et al. Chemical compositions and antioxidant activity of different solvent extracts from propolis[J]. *Food Science*, 2009, 30(21): 75-78.
- [19] 谭曜, 方爱琴, 谢建敏, 等. 蜂胶乙醇溶液体外清除羟基自由基能力的测定[J]. 广东化工, 2021, 48(12): 189-190, 182.
- TAN Y, FANG A Q, XIE J M, et al. Study on effect of propolis ethanol solution on scavenging hydroxyl radical in vitro [J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2021, 48(12): 189-190, 182.
-
- (上接第 212 页)
- [23] 张鹏, 刘璐, 王虹, 等. 姜黄素白蛋白纳米粒的制备与评价[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(7): 719-722, 731.
- ZHANG P, LIU R, WANG H, et al. Preparation and preliminary characterization of curcumin albumin nanoparticles [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2018, 38(7): 719-722, 731.
- [24] ISBISTER G K, FRIBERG L E, HACKETT L P, et al. Pharmacokinetics of quetiapine in overdose and the effect of activated charcoal[J]. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2007, 81(6): 821-827.
- [25] 阮仕洋, 陈慧, 曾凡丽, 等. 柠檬苦素固体脂质纳米粒冻干粉制备及质量评价[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(23): 2 493-2 499.
- RUAN S Y, CHEN H, ZENG F L, et al. Preparation and quality evaluation of limonin solid lipid nanoparticle lyophilized powder[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2022, 42(23): 2 493-2 499.
- [26] LI Y, ZHAO R N, LI Y, et al. Limonin enhances the antifungal activity of eugenol nanoemulsion against *penicillium italicum* in vitro and in vivo tests[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(5): 969.