

高压均质法制备 O/W 型蜂胶纳米乳液的研究

唐宏刚¹, 肖朝耿¹, 陈黎洪^{1*}, John Shi², 杨国泉³

(¹浙江省农业科学院 食品科学研究所, 浙江 杭州 310021; ²加拿大农业部圭尔夫食品研究中心, 加拿大; ³杭州德兴蜂业有限公司, 浙江 杭州 311223)

摘要:以蜂胶醇提物为原料, 橄榄油为食品级油相, 吐温 80 为表面活性剂, 无水乙醇为助表面活性剂, 在确定最佳配比的基础上制备 O/W 型蜂胶纳米乳液, 研究了不同均质压力参数 (0, 40, 80 MPa) 设定条件下乳化液的平均粒径与分布情况。研究结果表明, 均质压力对乳化液的平均粒径与分散指数具有显著影响, 经 80 MPa 高压均质处理所得的乳化液粒子平均直径为 (143.2 ± 1.4) nm, 且粒径分布均一, 具有较好的稳定性。

关键词: 高压均质; 蜂胶; 纳米乳液

中图分类号: S 896.6

文献标志码: A

文章编号: 1004-4524(2013)03-0619-04

Preparation of propolis oil-in-water nano-emulsion by high-pressure homogenization

TANG Hong-gang¹, XIAO Chao-geng¹, CHEN Li-hong^{1*}, SHI John², YANG Guo-quan³

(¹Institute of Food Science, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; ²Guelph Food Research Center, Agriculture and Agri-Food Canada, Ontario, Canada; ³Hangzhou Dexing Apiculture Co., Ltd., Hangzhou 311223, China)

Abstract: In this study, propolis ethanol extract was used as raw material while olive oil as food grade oil phase, Tween 80 as surfactant, and alcohol as cosurfactant. The propolis oil-in-water nano-emulsion was prepared on the basis of determining the best ratio of the above materials. The mean particle size and distribution of emulsions prepared with different homogenization pressure (0, 40, 80 MPa) were analyzed. As shown in the results, the effects of homogenization pressure on particle size and polydispersity index were significant. The emulsion processed under 80 MPa contained (143.2 ± 1.4) nm of average diameter, uniform size distribution and good stability.

Key words: high-pressure homogenization; propolis; nano-emulsion

蜂胶是蜜蜂从植物的嫩芽、花蕾、树皮等部位采集的树脂, 混入蜂蜡和其上鄂腺的分泌物,

经蜜蜂反复加工转化而成的一种具有芳香气味的固体胶状物质^[1]。蜂胶的成分极其复杂, 基本组成为: 树脂和树香 39% ~ 53%, 多酚类 2% ~ 3%, 蜂蜡 19% ~ 35%, 杂质 8% ~ 12%。从化合物来讲, 主要有类黄酮化合物、有机酸类化合物、酯、醛、醇类化合物以及烯、炔、萜类化合物等^[2, 3]。大量研究表明, 蜂胶具有多种生物学活性和药理功能, 如抗肿瘤、抗氧化、抗病原微生物、抗菌消炎、增强免疫、软化血管、净化血液、改

收稿日期: 2013-03-12

基金项目: 杭州市科技发展计划项目“天然蜂胶微乳关键技术研究与应用”(20110232B29); 浙江省农业科学院国际合作项目“纳米蜂胶制备关键技术研究”。

作者简介: 唐宏刚(1980—), 男, 江苏盐城人, 博士, 助理研究员, 主要从事畜产品加工、食品化学研究工作。E-mail: zjutang@gmail.com; Tel: 0571-86419071。

* 通讯作者: 陈黎洪, E-mail: cwc528@163.com; Tel: 0571-86401243

善微循环、局部麻醉、促进组织再生等,因此被广泛应用于医药、食品、化妆品、农业等领域^[4-6]。目前蜂胶已被开发成多种类型的产品,最常见的有蜂胶胶囊、蜂胶片剂、蜂胶口服液、蜂胶喷剂等。然而,蜂胶加工利用的程度仍相对较低,产品的稳定性、生物学活性以及人体吸收利用率等不理想,质量难以得到保证。

近年来,纳米技术在医药上的许多研究成果正逐步应用于食品行业,并在该行业中发挥着很大的作用,如食品工艺的改进优化、新型食品以及具有更好功效和特殊功能保健食品的开发等^[7-8]。纳米乳液是一种液相以液滴形式分散于第二相的胶体分散体系,属于非热力学稳定体系,呈透明或半透明状,粒度尺寸在 50~200 nm^[9]。纳米乳液具有抗沉降和乳析的动力学稳定特性,吸收迅速完全,能增强保健效果,降低毒副作用,具有很大的发展潜力^[10]。目前,国内外对蜂胶的研究主要集中于化学成分分析、生物学活性评定以及提纯技术的优化等,有关蜂胶纳米化加工方面的研究报道极少^[11-13]。本研究以蜂胶为主要原料,通过筛选食品级油相、表面活性剂等配方比例,采用高压均质方法制备水包油(O/W)型蜂胶纳米乳液,分析其平均粒径与分布情况。通过本研究,为进一步提升蜂胶资源深加工技术水平、利用蜂胶开发相关功能性保健品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蜂胶,由杭州德兴蜂业有限公司提供;橄榄油、吐温 80(食品级),购于食品市场;芦丁、没食子酸标准品,购于上海百灵威化学技术有限公司;Folin-Ciocalteu 酚试剂,购于华东医药股份有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 蜂胶有效活性成分的提取

将预先冷冻的蜂胶原料用高速万能粉碎机粉碎并过筛,精确称取定量的蜂胶粉末置于三角瓶中,按料液比 1:10 的比例加入 80% 乙醇溶液,于 50℃ 水浴中提取 20 h。提取完毕后超声处理 30 min,过滤。滤液放置于 -20℃ 冰箱过夜,再进行过滤以除去其中所含的蜂蜡。提取液经旋转

蒸发仪回收溶剂到无液滴流出,对所得的蜂胶乙醇提取物浸膏进行冷冻干燥处理,最终得到褐色粉末状样品,于 -20℃ 冰箱冷冻保存备用。

1.3 总多酚与总黄酮含量测定

总多酚含量的测定采用 Folin-Ciocalteu 方法^[14]。取 1 mL 适量浓度的样品醇溶液与 0.5 mL Folin-Ciocalteu 酚试剂以及 0.5 mL 10% Na₂CO₃ 溶液混合均匀,室温下置于暗处反应 1 h,然后在 740 nm 处测定吸光度。以没食子酸为标准品作标准曲线,依据标准曲线计算样品中总多酚的含量。

总黄酮含量的测定参考文献[15]的方法:取 0.5 mL 适量浓度的样品醇溶液与 0.1 mL 10% 硝酸铝溶液、0.1 mL 1 mol·L⁻¹ 醋酸钾、4.3 mL 80% 乙醇溶液混合均匀,于室温下反应 40 min,在 415 nm 处测定吸光度。以芦丁为标准品作标准曲线,依据标准曲线计算样品中总黄酮的含量。

1.4 蜂胶纳米乳液的制备

在前期试验研究的基础上,确定纳米乳液的制备配方,具体比例为:m(蜂胶提取物):V(无水乙醇):V(吐温 80):V(橄榄油):V(水)=1g:3 mL:6 mL:5 mL:86 mL。其中橄榄油为食品级油相,吐温 80 为表面活性剂,无水乙醇作为助表面活性剂。首先于室温下用无水乙醇充分溶解蜂胶提取物,然后边搅拌边依次慢慢滴加吐温 80、橄榄油和超纯水。磁力搅拌器搅拌均匀后,采用 1.5 万 r·min⁻¹ 高速剪切分散 2 min,作为未高压均质处理的粗乳化液。粗乳化液经微射流均质机 Microfluidizer 进行处理,所设置的压力为 40~80 MPa,分别均质 3 次,收集产物样品用于测定粒径与分布情况。

1.5 粒径与分布情况分析

采用动态激光散射技术,通过纳米粒度分析仪 Zetasizer Nano-ZS90(Malvern,英国)测定蜂胶乳化液平均粒径及其分布。样品预先用 Milli-Q 超纯水稀释 1 000 倍,设置仪器的测定角度为 90°,测定温度 25℃,测定重复 3 次。粒径用累积平均直径(z-average)表示,粒径分布情况以多分散指数(polydispersity index, PDI)表示。

1.6 数据分析

运用 SPSS 11.0 软件,采用 t-检验方法对数据进行差异显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 蜂胶醇提取物总多酚与黄酮含量

酚类化合物特别是黄酮类化合物是我国大多数蜂胶中的主要化学成分,其含量高低能代表蜂胶的生物学活性。总酚类化合物和总黄酮化合物的含量已成为目前衡量蜂胶品质高低的重要评价指标^[16]。蜂胶的总酚类化合物含量测定均以没食子酸为对照品,采用 Folin-Ciocalteu 试剂处理的方法;而总黄酮含量的测定方法比较多样,对照品、检测波长等方面则都有差异,造成了测定的结果较大差异。

蜂胶所含的酚类和黄酮类活性成分,由于地域不同而存在一定的差异,且受蜜蜂所采集的树种和季节的影响较大^[17]。据研究报道^[18],中国蜂胶乙醇提取物的多酚含量约为 200~300 mg·g⁻¹,各省份蜂胶乙醇提取物的黄酮含量具有较大差异,变异范围为 8.3~188.0 mg·g⁻¹。本研究测定的蜂胶醇提取物总多酚和黄酮含量分别为(289 ± 4.2), (177 ± 2.3) mg·g⁻¹,试验测定结果在文献报道范围内,且原料总多酚和黄酮含量相对较高,具有较好的抗氧化生物活性。

2.2 蜂胶纳米乳液的制备工艺

纳米乳液分为 3 种类型,分别为油包水(W/O)型、水包油(O/W)型和双连续型(B.C.型)^[19]。因蜂胶的水溶性不佳,与有机溶剂提取物相比,水提取物中所含的有效活性成分更少。本试验采用有机溶剂乙醇对蜂胶进行提取,以蜂胶醇提取物为原料制备纳米乳液,故结构为 O/W 型。为制备 O/W 型纳米乳液,选择的乳化剂应具有乳化效果好、亲水疏水平衡值(HLB 值)较高的特点^[20]。本研究选择了安全性好、亲水性强的食品级非离子性表面活性剂——吐温 80(HLB 值 = 15)。橄榄油不仅含大量的单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸,还含有对人体健康非常有益的多酚、脂多糖等成分,为强化纳米乳液的保健功能,因而选择其作为油相。

纳米乳液是非平衡体系,它的形成需要外加能量,一般来自机械设备或来自化学制剂的结构潜能。利用机械设备的能量制备纳米乳液的一

类方法被称为高能乳化法,主要有微流乳化、超声乳化以及高压均质乳化等^[9]。高压均质技术已成功应用于纳米乳液的工业化生产,故采用此方法制备蜂胶纳米乳液。

2.3 粒子平均直径及其分布

由图 1 和表 1 可以看出,未高压均质处理的粗乳化液具有较大的粒子平均直径,达到(454.5 ± 22.2) nm;而经 40、80 MPa 高压均质后的乳化液粒径分别为(155.6 ± 0.8), (143.2 ± 1.4) nm。与粗乳化液相比,高压均质制备的纳米乳液粒径以及粒径分布系数均显著降低($P < 0.05$),粒径分布情况相对更加均一。

纳米乳液的粒径与分布是评价其稳定性的重要指标,受到包括所选用乳化剂种类、乳化剂浓度以及制备工艺参数等在内的多种因素影响^[20]。研究表明,高压均质采用的压力参数对粒径的大小具有显著影响。在高压均质过程中,分散相颗粒在巨大剪切、撞击、空穴效应的作用下,粒径不断减小;均质压力越高,机械作用力越强,颗粒粒径越小^[21]。本试验研究发现,随着高压均质压力参数的增加,蜂胶纳米乳液的粒径显著降低,但粒径分布系数未受到显著影响,这与毛立科等^[22]研究结果一致。考虑到实际应用过程当

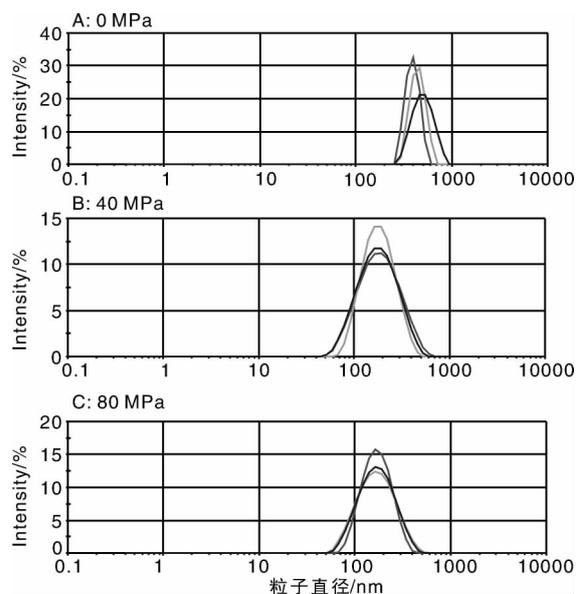


图 1 不同压力(0,40,80 MPa)处理的蜂胶乳化液粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of propolis emulsions processed under different pressure (0,40,80 MPa)

表 1 不同压力处理的蜂胶乳化液粒径与分布系数比较

Table 1 Comparison of particle size and polydispersity index of propolis emulsions processed under different pressure

样品	平均粒径/nm	分布系数
A(0 MPa)	454.5 ± 22.2 a	0.367 ± 0.404 a
B(40 MPa)	155.6 ± 0.8 b	0.207 ± 0.020 b
C(80 MPa)	143.2 ± 1.4 c	0.202 ± 0.008 b

注:同一列不同行数据后没有相同小写字母者表示差异显著($P < 0.05$)

中,均质压力设置过高将导致乳化液的温度明显上升,从而影响到其中所含黄酮类等活性成分的稳定性,一般采用的压力不宜高于 100 MPa。在本试验中,乳化液于 80 MPa 压力下均质 3 次后,溶液的温度未发生明显变化,揭示样品的生物学活性没有受到破坏。样品置于室温下 4 000 g 离心 15 min 后,无相分离现象产生,说明具有较好的物理稳定性。

3 小结

以蜂胶为主要原料,按照 m(蜂胶提取物):V(无水乙醇):V(吐温 80):V(橄榄油):V(水) = 1g:3 mL:6 mL:5 mL:86 mL 的配方,经高压均质(压力 80 MPa)处理 3 次,制得的蜂胶纳米乳液粒子平均直径达到 143.2 nm,且粒径分布均一,具有较好的物理稳定性。蜂胶纳米乳液的生物学活性、吸收利用率的评定有待于今后作进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] 符军放,曹伟,索志荣,等. 高效液相色谱法识别蜂胶特征组分及定量对比[J]. 西北大学学报:自然科学版, 2006, 36(4): 587-591.
- [2] Vassya S, Bankova V. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin [J]. *Apidologie* 2000, 31: 3-15.
- [3] 王亚群,任永新. 蜂胶的化学成分及其保健作用[J]. 食品与药品, 2006, 8(12): 75-76.
- [4] 胡福良,玄红专. 蜂胶化学成分的最新研究进展[J]. 养蜂科技, 2003, 37(1): 27.
- [5] Valencia D, Alday E, Robles-Zepeda R, et al. Seasonal effect

- on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis [J]. *Food Chemistry* 2012, 131: 645-651.
- [6] Wu JJ, Shen CT, Jong TT, et al. Supercritical carbon dioxide anti-solvent process for purification of micronized propolis particulates and associated anti-cancer activity [J]. *Separation and Purification Technology* 2009, 70: 190-198.
- [7] 谷俊华,田呈瑞. 纳米技术及其在食品工业中的应用[J]. 农产品加工·学刊, 2009, (9): 87-91.
- [8] 李倩,刘晨光. 纳米技术在食品科学中的应用研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(6): 24-29.
- [9] 康波,齐军茹,杨晓泉,等. 纳米乳液的制备及稳定性研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2008, (3): 102-104.
- [10] 侯振建,付子林,陈俊生,等. 蜂胶纳米化技术研究[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 199-200.
- [11] 鲁传华,吴鸿飞,闵智伟. 纳米蜂胶水分散体的制备工艺与配方研究[J]. 中成药, 2008, 30(5): 674-677.
- [12] 玄红专,吴玉厚,桑青,等. 纳米蜂胶抗氧化活性的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(9): 3500-3515.
- [13] 李雅晶,胡福良. 纳米蜂胶的体外药剂学性质研究[J]. 中国蜂业, 2007, 58(7): 5-6.
- [14] Moreira L, Dias LG, Pereira JA, et al. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46: 3482-3485.
- [15] Marcucci MC, Woisky RG, Salatino A. Use of aluminium chloride in the avonoids quantification of propolis samples [J]. *Mensagem Doce*, 1998, 46: 3-9.
- [16] 李熠. 我国不同地区蜂胶黄酮类物质差异性分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- [17] 王秀清,申树芳,张英锋,等. 蜂胶的有效成分与功效[J]. 渤海大学学报:自然科学版, 2010, 31(3): 219-224.
- [18] Ahn M, Kumazawa S, Usui Y, et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China [J]. *Food Chemistry* 2007, 101: 1383-1392.
- [19] 颜秀花. β -胡萝卜素微乳制剂的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [20] 袁媛,毛立科,高彦祥. Tween 系列乳化剂对 β -胡萝卜素纳米乳液粒径及稳定性的影响[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 181-186.
- [21] Jafari SM, He Y, Bhandari B. Optimization of nano-emulsions production by microfluidization [J]. *European Food Research and Technology*, 2007, 225: 733-741.
- [22] 毛立科,许朵霞,杨佳,等. 不同乳化剂制备 β -胡萝卜素纳米乳液的研究[J]. 食品工业科技, 2008, (4): 64-67.

(责任编辑 陈华平)