



(10) 授权公告号 CN 115192541 B

(45) 授权公告日 2023. 10. 13

(21) 申请号 202210819521.4

(22) 申请日 2022.07.12

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115192541 A

(43) 申请公布日 2022.10.18

(73) 专利权人 广东省农业科学院蚕业与农产品
加工研究所

地址 510507 广东省广州市天河区东莞庄
一横路133号

专利权人 江西瑞龙药业有限公司

(72) 发明人 徐玉娟 温靖 刘昊澄 袁钟
黄国东 余元善 胡腾根 黄雯倩
李俊

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限
公司 44202

专利代理师 王姣

(51) Int.Cl.

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 31/655 (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

A23L 33/10 (2016.01)

A23P 10/30 (2016.01)

(56) 对比文件

US 2009155409 A1, 2009.06.18

CN 105295439 A, 2016.02.03

CN 105361141 A, 2016.03.02

CN 112007013 A, 2020.12.01

Jun Wu等 .Stability evaluation of
gardenia yellow pigment in the presence
of different antioxidants or
microencapsulating agents.《J Food Sci .》
.2022,第87卷(第7期),3036-3047.

倪慧艳等.中药栀子研究与开发概述.《中
国中药杂志》.2006,第31卷(第7期),538-541.

审查员 蔡放

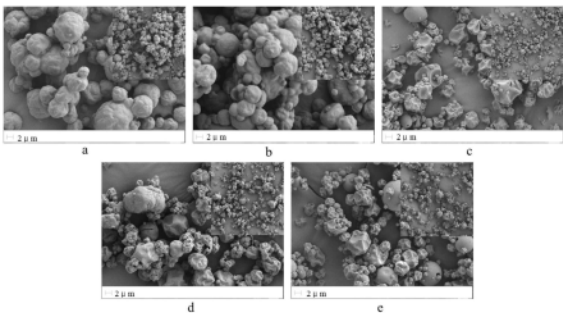
权利要求书1页 说明书11页 附图6页

(54) 发明名称

一种栀子黄色素微胶囊及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种栀子黄色素微胶囊及其制备方法和应用,属于栀子黄色素制备技术领域。本发明提供的栀子黄色素微胶囊,包括芯材和壁材,所述芯材包括栀子黄色素,所述壁材为麦芽糊精、乳清蛋白、阿拉伯胶、大豆分离蛋白中的至少一种;所述栀子黄色素与壁材的质量比为:栀子黄色素:壁材=1:(8~12)。本发明的栀子黄色素微胶囊具有较高的载药量和包埋率,能够显著提高栀子黄色素的热稳定性、光稳定性和pH稳定性。



1. 一种栀子黄色素微胶囊,包括芯材和壁材,其特征在于,所述芯材包括栀子黄色素,所述壁材为麦芽糊精和乳清蛋白的混合物;所述栀子黄色素微胶囊的制备方法,包括以下步骤:

(1) 将麦芽糊精、乳清蛋白分别在0.1M的磷酸盐缓冲溶液溶解,麦芽糊精、乳清蛋白的质量浓度为10%,搅拌,然后将所获得的溶液于4℃储存过夜,完全水合,得麦芽糊精溶液、乳清蛋白溶液;

(2) 将4g栀子黄色素、100mL乳清蛋白溶液和300mL麦芽糊精溶液均质,得乳液;

(3) 采用喷雾干燥机对所得乳液喷雾干燥,即得所述栀子黄色素微胶囊。

2. 根据权利要求1所述的栀子黄色素微胶囊,其特征在于,所述步骤(1)中,所述搅拌的转速为200rpm~300rpm,时间为1h~3h。

3. 根据权利要求1所述的栀子黄色素微胶囊,其特征在于,所述步骤(2)中,所述均质先在常压下均质1min~5min,再采用高压均质3-5次;所述高压均质的压力为180Mpa~220Mpa。

4. 根据权利要求1所述的栀子黄色素微胶囊,其特征在于,所述步骤(3)中,所述喷雾干燥机的入口温度为165℃~175℃,出口温度为75℃~85℃,泵速为1mL/min~2mL/min。

5. 权利要求1所述的栀子黄色素微胶囊在制备调节免疫活性药物中的应用。

一种栀子黄色素微胶囊及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于栀子黄色素制备技术领域,具体涉及一种栀子黄色素微胶囊及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 免疫是人体的一种生理功能,人体依靠这种功能识别“自己”和“非己”成分,从而破坏和排斥进入人体的抗原物质(如病毒、细菌等),或人体本身所产生的损伤细胞和肿瘤细胞等,以维持人体的健康、抵抗或防止微生物或寄生物的感染或其它所不希望的生物侵入的状态。因此,免疫力被定义为人体识别和排除异己成分的生理反应,人体免疫功能失调时不仅会出现疲倦、周身不适等疲劳症状,而且免疫功能低下时易发生各种感染性疾病、消化系统功能紊乱等健康问题。因此增强机体免疫功能、开发各种可以调节机体免疫功能以及提高机体抵抗力的药物或营养保健品具有非常重要的意义。

[0003] 巨噬细胞是人体先天免疫的第一道防线,通过吞噬自体受损细胞或外源病原体在机体发育、免疫、炎症反应和多种疾病发生中发挥重要作用,维持机体平衡。此外,当机体受到机械性损伤或病理性刺激时,巨噬细胞会被激活并分泌大量生物活性物质进行防御,如NO、TNF- α 、IL-10、COX-2等细胞因子参与病原微生物的清除。当今,从天然物质中提取的化合物越来越多的应用于免疫调节研究中,有相关研究表明,从桦褐孔菌中分离出的水溶性黑色素能够刺激巨噬细胞分泌免疫因子,发挥抗炎和免疫调节的双重功能。Hosein等的研究表明甜菜碱可显著抑制LPS诱导的小胶质细胞功能,从而发挥免疫调节作用。但是,目前植物提取物存在稳定性差、活性易丧失等问题。

[0004] 因此,有必要对不同植物提取物的免疫调节活性进行深入探究,挖掘出不同种植物及其提取物在保健食品和药物中的应用潜力;并且提供一种使得植物提取物贮藏稳定、活性高的保护方法能够大大提升植物提取物的应用范围,具有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服上述现有技术中存在的问题,提供一种栀子黄色素微胶囊及其制备方法和应用。

[0006] 本发明是通过下述技术方案进行实现的:

[0007] 本发明提供一种栀子黄色素微胶囊,包括芯材和壁材,所述芯材包括栀子黄色素,所述壁材为麦芽糊精、乳清蛋白、阿拉伯胶、大豆分离蛋白中的至少一种;所述栀子黄色素与壁材的质量比为:栀子黄色素:壁材=1:(8~12)。

[0008] 本发明所述壁材为麦芽糊精、乳清蛋白、阿拉伯胶、大豆分离蛋白中的至少一种;麦芽糊精是一种水解淀粉,具有溶解度高、粘度低、成膜能力强、等优点;阿拉伯胶具有优异的成膜能力和乳化特性,可提高玻璃化转变温度;乳清蛋白具有赋予分散体高溶解度和低粘度的能力;大豆分离蛋白成本低、营养价值高和功能特性好。栀子黄色素是从栀子果实中提取的一种天然水溶性类胡萝卜素,具有较强的抗氧化活性,但其对温度、光照及pH较敏

感,色素颜色较易减弱,且生理活性容易降低甚至消失。本发明采用麦芽糊精、乳清蛋白、阿拉伯胶、大豆分离蛋白中的至少一种作为壁材,得到了稳定性好、包埋率高、理化特性稳定的栀子黄色素微胶囊,拓宽了栀子黄色素在食品领域的应用范围。

[0009] 优选地,所述壁材为麦芽糊精和乳清蛋白、阿拉伯胶、大豆分离蛋白三者中的至少一种的混合物。麦芽糊精虽然溶解度高、粘度低、成膜能力强,但乳化能力较低,因此将其与具有良好乳化和成膜能力的乳清蛋白、阿拉伯胶、大豆分离蛋白结合作为壁材,能够使得栀子黄色素微胶囊具有更高的包埋率和载药量。

[0010] 作为本发明所述栀子黄色素微胶囊的优选实施方式,所述芯材还包括玉米油和聚甘油蓖麻醇酸酯,所述芯材中栀子黄色素的质量浓度为3%~5%。

[0011] 作为本发明所述栀子黄色素微胶囊的优选实施方式,所述微胶囊的载药量为1.59 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ~3.45 $\mu\text{g}/100\text{g}$;包埋率为58.73%~91.29%。优选地,所述微胶囊的载药量为3.25 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ~3.45 $\mu\text{g}/100\text{g}$;包埋率为78.28%~91.29%。

[0012] 本发明的又一目的在于提供上述栀子黄色素微胶囊的制备方法,包括以下步骤:

[0013] (1)将所述壁材在磷酸盐溶液中溶解,混匀,低温水合,得壁材溶液;

[0014] (2)取所得壁材溶液和所述芯材混合,均质,得乳液;

[0015] (3)取所得乳液喷雾干燥,即成。

[0016] 本发明采用微胶囊化技术,制备了稳定性高的栀子黄色素微胶囊。本发明将壁材麦芽糊精、乳清蛋白、阿拉伯胶、大豆分离蛋白在低温下充分水合,形成保护载体,后通过喷雾干燥技术包埋芯材栀子黄色素,使得栀子黄色素免受不利环境条件的影响。本发明制备方法成本低、操作简单,可以减少栀子黄色素在加工过程中的损失及降解,制得的微胶囊包埋效果好、稳定性高。

[0017] 作为本发明所述栀子黄色素微胶囊的制备方法的优选实施方式,所述步骤(1)中,所述磷酸盐溶液中壁材的质量浓度为5%~15%。

[0018] 作为本发明所述栀子黄色素微胶囊的制备方法的优选实施方式,所述步骤(1)中,所述混匀采用搅拌,所述搅拌的转速为200rpm~300rpm,时间为1h~3h;所述低温水合的温度为2℃~6℃,时间为24h~48h。

[0019] 优选地,所述步骤(1)中,所述磷酸盐溶液中壁材的质量浓度为10%;所述磷酸盐溶液的摩尔浓度为0.1M,pH为6.0;所述搅拌的转速为250rpm,时间为2h;所述低温水合的温度为4℃。

[0020] 作为本发明所述栀子黄色素微胶囊的制备方法的优选实施方式,所述步骤(2)中,所述芯材的制备方法为:将所述栀子黄色素、玉米油和聚甘油蓖麻醇酸酯混合,均质,即得;所述芯材中栀子黄色素的质量浓度为3%~5%。具体的,将栀子黄色素、玉米油和聚甘油蓖麻醇酸酯(PGPR)混合,使用均质机以10000rpm的转速均质2min得芯材;所述玉米油和PGPR的体积比为:玉米油:PGPR=1:6。

[0021] 作为本发明所述栀子黄色素微胶囊的制备方法的优选实施方式,所述步骤(2)中,所述均质先在常压下均质1min~5min,再采用高压均质3-5次;所述高压均质的压力为180Mpa~220Mpa。

[0022] 所述均质先采用均质机均质1min~5min,再采用高压均质机均质3-5次;所述采用均质机均质的转速为8000rpm~12000rpm;所述采用高压均质机均质的压力为180Mpa~

220Mpa。

[0023] 优选地,所述步骤(2)中,所述常压下均质采用均质机,所述均质机均质的转速为8000rpm~12000rpm,时间为2min;所述采用高压均质机均质的压力为200Mpa。

[0024] 作为本发明所述栀子黄色素微胶囊的制备方法的优选实施方式,所述步骤(3)中,所述喷雾干燥采用喷雾干燥机,所述喷雾干燥机的入口温度为165℃~175℃,出口温度为75℃~85℃,泵速为1mL/min~2mL/min。

[0025] 优选地,所述步骤(3)中,所述喷雾干燥机的入口温度为170℃,出口温度为80℃,泵速为1.5mL/min。

[0026] 本发明的再一目的在于提供栀子黄色素、所述栀子黄色素微胶囊及其制备方法在制备调节免疫活性药物和/或保健食品中的应用。

[0027] 作为本发明所述应用的优选实施方式,所述调节免疫活性具体为促进巨噬细胞的增殖以及增强巨噬细胞的吞噬活性,更具体地,所述调节免疫活性具体为促进巨噬细胞分泌细胞因子一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和细胞白介素-10(IL-10)。

[0028] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0029] (1) 本发明的栀子黄色素微胶囊的载药量为1.59 μ g/100g~3.45 μ g/100g;包埋率为58.73%~91.29%,具有良好的热稳定性、光稳定性和pH稳定性,能够显著提升栀子黄色素的贮藏稳定性。

[0030] (2) 本发明的制备方法中采用均质和喷雾干燥技术,将栀子黄色素包埋进微胶囊中,包埋效果好、稳定性高。显著提高了栀子黄色素的稳定性,避免其因不利环境而活性丧失,提高其利用价值。

[0031] (3) 本发明的实验结果表明,栀子黄色素可以显著促进巨噬细胞RAW264.7的增殖以及增强巨噬细胞的吞噬活性,促进巨噬细胞分泌NO、TNF- α 和IL-10细胞因子。进一步的,本发明的实验结果表明栀子黄色素可应用于制备调节免疫活性药物和/或保健食品中。本发明对栀子黄色素免疫活性的探究拓宽了栀子黄色素的应用领域。

附图说明

[0032] 图1为实施例1-5的栀子黄色素微胶囊的扫描电子显微镜图,其中a为实施例1的WP-0微胶囊;b为实施例2的WP-MD-0微胶囊;c为实施例3的WP-MD微胶囊;d为实施例4的SPI-MD微胶囊;e为实施例5的GA-MD微胶囊;

[0033] 图2为实施例1-5的栀子黄色素微胶囊的傅里叶红外光谱图,其中图2a为实施例1的WP-0微胶囊;图2b为实施例2的WP-MD-0微胶囊;图2c为实施例3的WP-MD微胶囊;图2d为实施例4的SPI-MD微胶囊;图2e为实施例5的GA-MD微胶囊;

[0034] 图3为RAW264.7细胞在不同浓度的栀子黄色素影响下的显微镜图;

[0035] 图4为不同浓度的栀子黄色素对RAW264.7细胞增殖的影响统计图;

[0036] 图5为不同浓度的栀子黄色素对RAW264.7细胞吞噬活性的影响统计图;

[0037] 图6为不同浓度的栀子黄色素对RAW264.7细胞细胞因子分泌量影响统计图;其中a为NO的分泌量,b为TNF- α 的分泌量,c为IL-10的分泌量。

具体实施方式

[0038] 为更好地说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合具体实施例对本发明作进一步说明。本领域技术人员应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0039] 实施例中所用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0040] 下述RAW264.7细胞购自中科院上海生命科学研究院细胞库;DMEM高糖培养基购自赛默飞世尔科技公司(Gibco,澳大利亚);胎牛血清购自赛默飞世尔科技公司(Gibco,澳大利亚);TNF- α 和IL-10酶联免疫分析试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司;NO检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

[0041] 阿拉伯胶(GA)和麦芽糊精(MD)均为市售;乳清蛋白(WP)、大豆分离蛋白(SPI)、聚甘油蓖麻醇酸酯(PGPR)购自源叶生物科技有限公司。

[0042] 所述栀子黄色素的制备方法,包括以下步骤:

[0043] (1)将栀子干粉与质量浓度47.78%乙醇溶液混合(液固比为18.08mL/g),采用真空封口机密封在聚乙烯袋中;将装有栀子溶液的聚乙烯袋于超高压设备中100Mpa压力下提取114.95s,得栀子黄色素粗提液;

[0044] (2)将栀子黄色素粗提液与石油醚等比例混合装入分液漏斗中萃取3次,弃去石油醚层,收集下层含栀子黄色素的溶液,采用旋转蒸发器于40℃减压浓缩除去残余的石油醚和乙醇,得浓缩液;

[0045] (3)将浓缩液采用500mL的超纯水进行洗脱,再用20%乙醇溶液以2.5mL/min的流速洗脱,每20mL收集1管;再用80%乙醇溶液以3mL/min的流速洗脱栀子黄色素,每6mL收集1管,收集80%乙醇洗脱液,在40℃下减压浓缩除去乙醇;采用透析袋(300D)透析3天,然后于冷冻干燥机中冻干,得栀子黄色素粉末,-20℃贮藏备用。所述洗脱在装有X-5大孔吸附树脂的玻璃柱中进行。

[0046] 本发明所采用的仪器和设备如下:

设备名称	生产厂家
DIAX 600 均质机	上海奥法美嘉公司
高压均质机	德国 ATS 工程有限公司
B4-1A 磁力搅拌器	上海司乐仪器有限公司
ADL311 喷雾干燥机	日本 YAMATO
VEGA-3-SBH 扫描电子显微镜	TESCAN, Czech
Vertex 70 傅里叶变换红外光谱仪	美国 Nicolet 公司
[0047] Synergy H1 BioTek 多功能酶标仪	美国伯腾仪器有限公司
CR22GIII 高速冷冻离心机	日本日立公司
Nikon ECLIPSE Ts2-FL/Ts2 显微镜	赛默飞世尔科技公司
CO2 培养箱	赛默飞世尔科技公司
超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
BMJ0826 微型离心机	BMJ 北京医学科技有限公司
DF-101S 集热式恒温磁力搅拌器	广东粤华医疗器械有限公司

[0048] 实施例1

[0049] 一种栀子黄色素微胶囊的制备方法,包括以下步骤:

[0050] (1) 将乳清蛋白在0.1M的磷酸盐缓冲溶液(乳清蛋白的质量浓度为10%)溶解,并置于磁力搅拌器中以250rpm的转速搅拌2h,然后将所获得的溶液于4℃储存过夜,完全水合,得乳清蛋白溶液;

[0051] (2) 将60mL玉米油、30mL栀子黄色素水溶液(栀子黄色素4g)和10mLPGPR混合,使用均质机以10000rpm的转速均质2min,得芯材混合物;将300mL乳清蛋白溶液加入到已均质的混合物中,使用均质机以10000rpm的转速均质2min,再将其置于高压均质机中以200Mpa的压力均质3次,得WP-0双层乳液;

[0052] (3) 采用喷雾干燥机对所得乳液喷雾干燥,入口和出口空气温度分别为170℃和80℃,泵速为1.5mL/min;即得WP-0栀子黄色素微胶囊。

[0053] 实施例2

[0054] 一种栀子黄色素微胶囊的制备方法,包括以下步骤:

[0055] (1) 将麦芽糊精、乳清蛋白分别在0.1M的磷酸盐缓冲溶液(麦芽糊精、乳清蛋白的质量浓度为10%)溶解,并置于磁力搅拌器中以250rpm的转速搅拌2h,然后将所获得的溶液于4℃储存过夜,完全水合,得麦芽糊精溶液、乳清蛋白溶液;

[0056] (2) 将60mL玉米油、30mL栀子黄色素水溶液(栀子黄色素4g)和10mLPGPR混合,使用均质机以10000rpm的转速均质2min,得芯材混合物;将150mL乳清蛋白溶液和150mL麦芽糊精溶液加入到已均质的混合物中,使用均质机以10000rpm的转速均质2min,再将其置于高压均质机中以200Mpa的压力均质5次,得WP-MD-0双层乳液;

[0057] (3)采用喷雾干燥机对所得乳液喷雾干燥,入口和出口空气温度分别为170℃和80℃,泵速为1.5mL/min;即得WP-MD-0栀子黄色素微胶囊。

[0058] 实施例3

[0059] 一种栀子黄色素微胶囊的制备方法,包括以下步骤:

[0060] (1)将麦芽糊精、乳清蛋白分别在0.1M的磷酸盐缓冲溶液(麦芽糊精、乳清蛋白的质量浓度为10%)溶解,并置于磁力搅拌器中以250rpm的转速搅拌2h,然后将所获得的溶液于4℃储存过夜,完全水合,得麦芽糊精溶液、乳清蛋白溶液;

[0061] (2)将4g栀子黄色素、100mL乳清蛋白溶液和300mL麦芽糊精溶液加入到已均质的混合物中,使用均质机以10000rpm的转速均质2min,再将其置于高压均质机中以200Mpa的压力均质3次,得WP-MD乳液;

[0062] (3)采用喷雾干燥机对所得乳液喷雾干燥,入口和出口空气温度分别为170℃和80℃,泵速为1.5mL/min;即得WP-MD栀子黄色素微胶囊。

[0063] 实施例4

[0064] 一种栀子黄色素微胶囊的制备方法,包括以下步骤:

[0065] (1)将麦芽糊精、大豆分离蛋白分别在0.1M的磷酸盐缓冲溶液(麦芽糊精、大豆分离蛋白的质量浓度为10%)溶解,并置于磁力搅拌器中以250rpm的转速搅拌2h,然后将所获得的溶液于4℃储存过夜,完全水合,得麦芽糊精溶液、大豆分离蛋白溶液;

[0066] (2)将4g栀子黄色素、100mL大豆分离蛋白溶液和300mL麦芽糊精溶液加入到已均质的混合物中,使用均质机以10000rpm的转速均质2min,再将其置于高压均质机中以200Mpa的压力均质5次,得SPI-MD乳液;

[0067] (3)采用喷雾干燥机对所得乳液喷雾干燥,入口和出口空气温度分别为170℃和80℃,泵速为1.5mL/min;即得SPI-MD栀子黄色素微胶囊。

[0068] 实施例5

[0069] 一种栀子黄色素微胶囊的制备方法,包括以下步骤:

[0070] (1)将麦芽糊精、阿拉伯胶分别在0.1M的磷酸盐缓冲溶液(麦芽糊精、阿拉伯胶的质量浓度为10%)溶解,并置于磁力搅拌器中以250rpm的转速搅拌2h,然后将所获得的溶液于4℃储存过夜,完全水合,得麦芽糊精溶液、阿拉伯胶溶液;

[0071] (2)将4g栀子黄色素、100mL阿拉伯胶溶液和300mL麦芽糊精溶液加入到已均质的混合物中,使用均质机以10000rpm的转速均质2min,再将其置于高压均质机中以200Mpa的压力均质5次,得GA-MD乳液;

[0072] (3)采用喷雾干燥机对所得乳液喷雾干燥,入口和出口空气温度分别为170℃和80℃,泵速为1.5mL/min;即得GA-MD栀子黄色素微胶囊。

[0073] 包埋率和载药量的测定

[0074] 栀子黄色素微胶囊中的总栀子黄色素含量的测定方法如下:称取实施例1-5的微胶囊粉末10mg,分别溶解于4mL乙醇:乙酸:水(50:8:42,v/v)的混合溶液中;将包含栀子黄色素微胶囊的混合样液涡旋混合30s,并使用高速离心机(6000g,5min)离心以破坏微胶囊壁,收集上清液并过0.22μm尼龙滤膜,进行高效液相色谱仪(HPLC)分析以确定总栀子黄色素含量。

[0075] 称取实施例1-5微胶囊粉末10mg,分别加入4mL乙醇:甲醇(1:1,v/v)混合溶液并涡

旋混合30s,然后将混合溶液以6000g离心5min,收集上清液以测定栀子黄色素微胶囊的表面栀子黄色素含量。包埋率(%)和载药量($\mu\text{g}/\text{mg}$)的计算公式如下:

[0076] 包埋率(%) = $(M_1 - M_2) / M_1 \times 100\%$; 载药量($\mu\text{g}/\text{mg}$) = $(M_1 - M_2) / W$ 。

[0077] 式中 M_1 为微胶囊总栀子黄色素的含量(μg); M_2 为微胶囊表面栀子黄色素的含量(μg); W 为微胶囊粉末的质量(mg)。

[0078] 水分含量的测定

[0079] 称取实施例1-5的微胶囊样品(0.5g)于105℃的热风烘箱中干燥至恒重,根据失重计算水分含量的变化。

[0080] 实施例1-5的栀子黄色素微胶囊的包埋率、载药量及水分含量如表1所示:

[0081] 表1实施例1-5的栀子黄色素微胶囊的包埋率、载药量及水分含量

	微胶囊	包埋率(%)	载药量($\mu\text{g}/\text{mg}$)	水分含量(%)
[0082]	WP-O	58.73	1.63	2.40
	WP-MD-O	70.99	1.59	1.92
	WP-MD	91.29	3.45	6.00
	SPI-MD	78.28	3.25	5.03
	GA-MD	83.16	3.32	8.16

[0083] 从表1可以看出,本发明栀子黄色素微胶囊的包埋率为58.73%~91.29%,载药量为1.59 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ~3.45 $\mu\text{g}/100\text{g}$,WP-MD具有最高的包埋率,这可能是因为麦芽糊精是一种高度支化的杂多聚合物,含有少量共价键连接到乳清蛋白上,起到较好的成膜剂作用。水分含量是微胶囊的一项关键指标,直接关系到粉末的干燥效率、粉末流动性、粘性和贮藏稳定性。一般来说,食品的水分含量为3-10%时,在保质期内具有较好的稳定性。因此,从表1可以得知,本发明所制备的微胶囊都具有合适的水分含量。可见,本发明所制得的微胶囊包埋性好、载药量高、水分含量低,具有很好的贮藏稳定性。

[0084] 采用扫描电子显微镜和傅立叶变换红外光谱仪来探究本发明的微胶囊中,栀子黄色素是否成功包埋。图1为实施例1-5的栀子黄色素微胶囊的扫描电子显微镜图,其中,a为实施例1的WP-O微胶囊;b为实施例2的WP-MD-O微胶囊;c为实施例3的WP-MD微胶囊;d为实施例4的SPI-MD微胶囊;e为实施例5的GA-MD微胶囊。从图1可以看出,实施例1-5的栀子黄色素微胶囊具有不同大小的球形结构,没有观察到明显的裂缝,初步证明栀子黄色素成功包埋进栀子黄色素中。

[0085] 实施例1-5的微胶囊的傅立叶变换红外光谱如图2所示,由图2a可知,栀子黄色素的特征谱带出现在3372 cm^{-1} ,2851-2919 cm^{-1} ,1700 cm^{-1} ,1453 cm^{-1} ,1372 cm^{-1} 和1063 cm^{-1} 。对于乳清蛋白的特征光谱,3300 cm^{-1} 处的特征峰对应酰胺A或N-H伸缩振动,2916 cm^{-1} 处的峰代表C-H伸缩振动,1636 cm^{-1} ,1541 cm^{-1} 和1238 cm^{-1} 分别对应于酰胺I带的C=O伸缩振动,酰胺II带的N-H弯曲以及酰胺III带的C-N伸缩振动。小于1200 cm^{-1} 的区域为C-N伸展和N-H弯曲所致。WP-O图谱类似于乳清蛋白和栀子黄色素图谱的叠加,但仍有一些吸收峰的位置发生了改变:3435 cm^{-1} ,1653 cm^{-1} 和1542 cm^{-1} 处酰胺I和II谱带的变化归因于栀子黄色素与乳清蛋白的C=O、C-N和N-H基团相结合以及乳清蛋白结构中氢键的变化。此外,在3009 cm^{-1} 处出现了一个新的吸收峰,表明栀子黄色素与乳清蛋白之间发生了相互作用。同时,栀子黄色素在

1700 cm^{-1} , 1372 cm^{-1} , 和1063 cm^{-1} 处的特征峰分别移至1746 cm^{-1} , 1378 cm^{-1} 和1083 cm^{-1} 处, 该数据表明栀子黄色素已成功加载到微胶囊中。

[0086] 图2b为WP-MD-0微胶囊壁材与芯材相互作用的红外光谱图。麦芽糊精的主要特征峰为3433 cm^{-1} 、2920 cm^{-1} 、1647 cm^{-1} 和1421 cm^{-1} , 1158 cm^{-1} 、1081 cm^{-1} 和1020 cm^{-1} 处的峰是由C-O拉伸和C-O-H弯曲所致。在小于1000 cm^{-1} 处的吸收峰是由吡喃环的骨架振动引起的。与WP-0微胶囊类似, WP-MD-0出现与栀子黄色素的振动带重叠的特殊谱带, 证实了栀子黄色素存在于微胶囊中。此外, 在WP-MD-0复合物中出现酰胺I带的移动, 该结果表明蛋白质与多糖之间发生了分子间的静电相互作用。WP-MD微胶囊的壁材与芯材分子作用(图2c)与WP-MD-0微胶囊相似。

[0087] 图2d和e展示了SPI-MD和GA-MD的微胶囊壁材和芯材的红外光谱图。大豆分离蛋白的特征谱带分别为: 3382 cm^{-1} , 2932 cm^{-1} , 1657 cm^{-1} , 1539 cm^{-1} , 1391 cm^{-1} , 1153 cm^{-1} , 1079 cm^{-1} 。阿拉伯胶的光谱在3452 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , 1614 cm^{-1} , 1427 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} , 771 cm^{-1} 。由SPI-MD的红外图谱可以看出, 与栀子黄色素相互作用后并不影响大豆分离蛋白的特征光谱, 由此说明栀子黄色素与蛋白质的络合作用发生在蛋白质的表面疏水结构域上。在GA-MD红外光谱中栀子黄色素的一些特征吸收峰的消失或变弱, 该结果表明栀子黄色素已被包埋成功。采用X射线衍射图分析进一步证实了本发明栀子黄色素微胶囊中, 栀子黄色素成功包埋。

[0088] 稳定性分析

[0089] 热稳定性

[0090] 通过记录加热后栀子黄色素在微胶囊中的保留率来研究栀子黄色素微胶囊的热稳定性。将实施例1-5的栀子黄色素微胶囊粉末(0.3g)和栀子黄色素粉末(0.02g)分散到20mL蒸馏水中, 涡旋混合2min。然后将获得的溶液均匀地分配到带有螺旋盖的棕色玻璃小瓶中, 置于已预热至给定温度(60 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$)的恒温水浴锅中10h。每个样品在冰水浴中冷却后, 将3倍体积的乙醇溶液加入到微胶囊溶液中以提取栀子黄色素, 然后将混合溶液以6000g离心5min, 收集上清液, 过0.22 μm 尼龙滤膜, 采用HPLC分析测定栀子黄色素的含量。栀子黄色素保留率的计算公式为: 保留率(%) = $A_2/A_1 \times 100\%$;

[0091] 式中 A_1 为初始栀子黄色素的含量; A_2 为经处理后栀子黄色素的含量。

[0092] 光照稳定性

[0093] 栀子黄色素微胶囊的光照稳定性通过将样品暴露于不同类型的光照(白光: 1x>300, 紫外光: 15W), 距离为50cm, 温度为25 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下进行。样品测定步骤同热稳定性测试。

[0094] pH稳定性

[0095] 在不同pH(3、7、11)下评估了栀子黄色素微胶囊的pH稳定性。不同pH溶液由1M盐酸和1M氢氧化钠配制而成。样品测定步骤同热稳定性测试。

[0096] 表2为栀子黄色素及实施例1-5的栀子黄色素微胶囊的稳定性测试结果。

[0097] 表2栀子黄色素及栀子黄色素微胶囊的稳定性测试结果

样品	热稳定性(保留率, %)		光照稳定性(保留率, %)		pH 稳定性(保留率, %)		
	60℃	80℃	白光	紫外	pH=3.0	pH=7.0	pH=11.0
WP-O	88.07	22.51	94.02	67.95	99.02	98.01	99.23
WP-MD-O	87.06	33.45	93.56	63.84	97.44	98.65	99.62
WP-MD	90.24	33.48	95.05	64.57	99.66	99.82	99.85
SPI-MD	85.97	42.95	91.88	72.12	97.49	99.64	99.31
GA-MD	89.91	47.62	88.25	51.01	99.57	97.50	99.76
栀子黄色素	81.89	15.97	88.31	10.52	97.31	98.74	90.59

[0099] 从表2可以看出,在60℃和80℃条件下放置10小时,栀子黄色素的保留率分别为81.89%和15.97%,而本发明实施例1-5的微胶囊中的栀子黄色素均呈现较高的保留率。在80℃条件下,游离栀子黄色素与栀子黄色素微胶囊均呈现较大的损失,这可能是因为高温破坏了多糖和蛋白质的结构,导致栀子黄色素暴露。在60℃和80℃条件下,本发明实施例1-5的微胶囊中的栀子黄色素的保留率均高于栀子黄色素。表明,栀子黄色素的稳定性受温度的影响较大,栀子黄色素微胶囊提高了栀子黄色素的热稳定性。

[0100] 栀子黄色素在白光下具有较高的保留率为88.31%,栀子黄色素微胶囊提高了栀子黄色素的保留率。然而,在紫外光照射下,游离栀子黄色素的保留率仅为10.52%,这可能是因为紫外线导致西红花素共轭双键的降解和自由基的产生。而实施例1-5的栀子黄色素微胶囊在紫外照射下较稳定,保留率远高于游离的栀子黄色素,这可能是因为蛋白质和多糖的光吸收和微胶囊颗粒的散射共同降低了到达栀子黄色素的光强度,从而提高了栀子黄色素的光稳定性。显然,从表2可以得知,栀子黄色素微胶囊提高了栀子黄色素的紫外光照稳定性。

[0101] 从表2中pH稳定性测试结果可以看出,在pH3.0和pH7.0的条件下,栀子黄色素的保留率均达到95%以上,呈现较好的稳定性。在pH为11.0的条件下,游离栀子黄色素的保留率为90.59%,而微囊化栀子黄色素的保留率均在99%以上,说明本发明的栀子黄色素微胶囊提高了栀子黄色素的pH稳定性,尤其是在碱性条件下的稳定性。

[0102] 总之,本发明的栀子黄色素微胶囊在不同环境中均表现出较高的稳定性,这在一定程度上拓宽了栀子黄色素在食品工业中的应用范围。

[0103] 实施例6栀子黄色素对免疫活性的影响

[0104] 为了评价栀子黄色素对免疫活性的影响,考察不同浓度的栀子黄色素对巨噬细胞活性和吞噬能力的影响。

[0105] 1.实验方法

[0106] 1.1栀子黄色素对RAW264.7细胞增殖的影响

[0107] RAW264.7细胞用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基(含1%青、链霉素双抗)于37℃、5%CO₂培养箱中培养。将RAW264.7细胞密度调整为 2×10^5 个/mL,接种到96孔板中,每孔100μL,分别设置阴性对照组、阳性对照组和栀子黄色素实验组,每个组别设置6个复孔。阴性对照组仅加入细胞培养液即空白组,阳性对照组加入含10μg/mL脂多糖(LPS)的细胞培养

液, 栀子黄色素实验组分别加入含不同质量浓度的栀子黄色素细胞培养液 (7.81、15.6、31.2、62.5、125 $\mu\text{g/mL}$), 各组均与细胞共培养24h。培养结束后, 弃培养液, 更换为含10% CCK-8的细胞培养液100 μL , 于CO₂培养箱中孵育1h。酶标仪检测其在450nm处的吸光值。细胞存活率的计算公式为:

[0108] 细胞存活率(%) = $(OD_1 - OD_2) / (OD_3 - OD_2) \times 100\%$;

[0109] 式中OD₁为实验组对应的吸光值; OD₂为空白组 (即细胞培养液) 对应的吸光值; OD₃为阳性对照组对应的吸光值。

[0110] 1.2 栀子黄色素对RAW264.7细胞吞噬能力的影响

[0111] RAW264.7细胞的处理方法同1.1, 细胞培养结束后, 弃去细胞培养液, PBS洗1-2次, 各孔均加入100 μL 质量分数0.075%中性红溶液继续培养3h。弃掉中性红溶液, 用PBS洗2-3次, 每孔加入100 μL 细胞裂解液 (乙醇: 1M醋酸 = 1:1), 室温裂解10min后, 于540nm处测定吸光度。吞噬率的计算公式为:

[0112] 吞噬率(%) = $(OD_1 - OD_2) / (OD_3 - OD_2) \times 100\%$;

[0113] 式中OD₁为实验组对应的吸光值; OD₂为空白组 (即细胞培养液) 对应的吸光值; OD₃为阳性对照组对应的吸光值。

[0114] 1.3 栀子黄色素对RAW264.7细胞分泌细胞因子的影响

[0115] RAW264.7细胞的处理方法同1.1, 细胞培养结束后, 根据NO试剂盒说明进行测定, 每孔取50 μL 培养液至96孔板中, 分别依次加入Griess Reagent I和Griess Reagent II各50 μL , 混匀, 于540nm处测定吸光值。根据ELISA试剂盒说明测定细胞培养液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和细胞白介素-10 (IL-10) 的含量。

[0116] 2. 实验结果

[0117] 本发明采用CCK-8法测定细胞存活率来评价栀子黄色素对RAW264.7细胞的增殖影响。如图3所示, 与空白对照组相比, LPS组细胞活性明显增强, 达136.64% ($p < 0.05$)。在栀子黄色素质量浓度为7.81-125 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 细胞活性呈现下降趋势, 当栀子黄色素质量浓度为7.81 $\mu\text{g/mL}$, 细胞活性可达135.58%; 而当栀子黄色素质量浓度为125 $\mu\text{g/mL}$, 细胞活性为106.75%, 这可能是因为渗透压的作用。栀子黄色素在低质量浓度时为RAW264.7细胞提供营养, 但随着栀子黄色素质量浓度的增加, 渗透压也随之升高, 对细胞产生一定的损伤作用。但与空白对照组相比, 栀子黄色素促进了RAW264.7细胞的增殖。

[0118] 采用显微镜观察LPS和栀子黄色素对巨噬细胞形态的影响。结果如图4所示, 空白对照组的细胞体积较小, 大部分呈圆形, 而LPS和不同浓度的栀子黄色素处理组细胞体积明显增大, 形态由圆形变为长梭形, 部分细胞出现伪足。表明栀子黄色素可以刺激RAW264.7细胞从正常状态转变为激活状态, 从而促进RAW264.7细胞的增殖。

[0119] 本发明采用中性红吞噬实验分析栀子黄色素对RAW264.7细胞吞噬能力的影响。如图5所示, 与空白对照组相比, 栀子黄色素在质量浓度为7.86和15.6 $\mu\text{g/mL}$ 时, 吞噬指数分别显著提高到119.89%和105.37% ($p < 0.05$)。表明栀子黄色素可以提高RAW264.7细胞的吞噬能力, 从而抵抗外来物的入侵, 提高机体的免疫能力。

[0120] 活化的巨噬细胞可以产生多种细胞因子 (NO、TNF- α 、IL-10) 来调节细胞和体液免疫反应, 本发明通过试剂盒探究了栀子黄色素对RAW264.7细胞分泌NO、TNF- α 、IL-10的影响。

[0121] 图6a显示,与空白对照组相比,LPS处理后NO浓度显著升高($p<0.05$)。当栀子黄色素质量浓度为7.81-62.5 $\mu\text{g/mL}$,NO分泌量显著下降($p<0.05$)。然而,当栀子黄色素质量浓度为125 $\mu\text{g/mL}$,NO分泌量明显上升($p<0.05$)。NO是一种由L-精氨酸经NO合酶合成的气态分子,可介导免疫、炎症等多种生理病理过程;但是,NO的过量产生具有细胞毒性,并可能诱导巨噬细胞凋亡。因此,RAW264.7细胞的细胞活性和吞噬指数随栀子黄色素质量浓度的上升而呈现下降趋势的原因可能是NO的过度积累。

[0122] 细胞因子是一类小分子可溶性蛋白质,具有调节免疫系统、细胞生长和修复受损组织的功能。在非炎症性巨噬细胞模型中,细胞因子的分泌水平可以作为评价免疫激活和调节能力的指标。如图6b和c所示,与空白对照组相比,LPS组中的TNF- α 和IL-10的分泌量显著增加($p<0.05$),栀子黄色素质量浓度为7.81 $\mu\text{g/mL}$ 时,栀子黄色素能显著促进TNF- α 和IL-10的分泌($p<0.05$)。此时,TNF- α 的分泌量为83.75pg/mL,IL-10的分泌量为32.48pg/mL。但随着栀子黄色素质量浓度的进一步增加,对TNF- α 分泌量的促进作用不明显,对IL-10表现出抑制作用,该结果与吞噬指数测定结果一致。综上可知,栀子黄色素能够促进RAW264.7细胞中TNF- α 和IL-10的分泌量增加,但其刺激作用远弱于LPS组,表明栀子黄色素可以激活RAW264.7细胞的免疫功能,同时能够避免过度刺激细胞,保持免疫平衡。

[0123] 因此,本发明通过探究得知栀子黄色素能够促进巨噬细胞增殖以及增强巨噬细胞吞噬活性,栀子黄色素及栀子黄色素微胶囊可用于制备调节免疫活性的药物或保健食品。

[0124] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

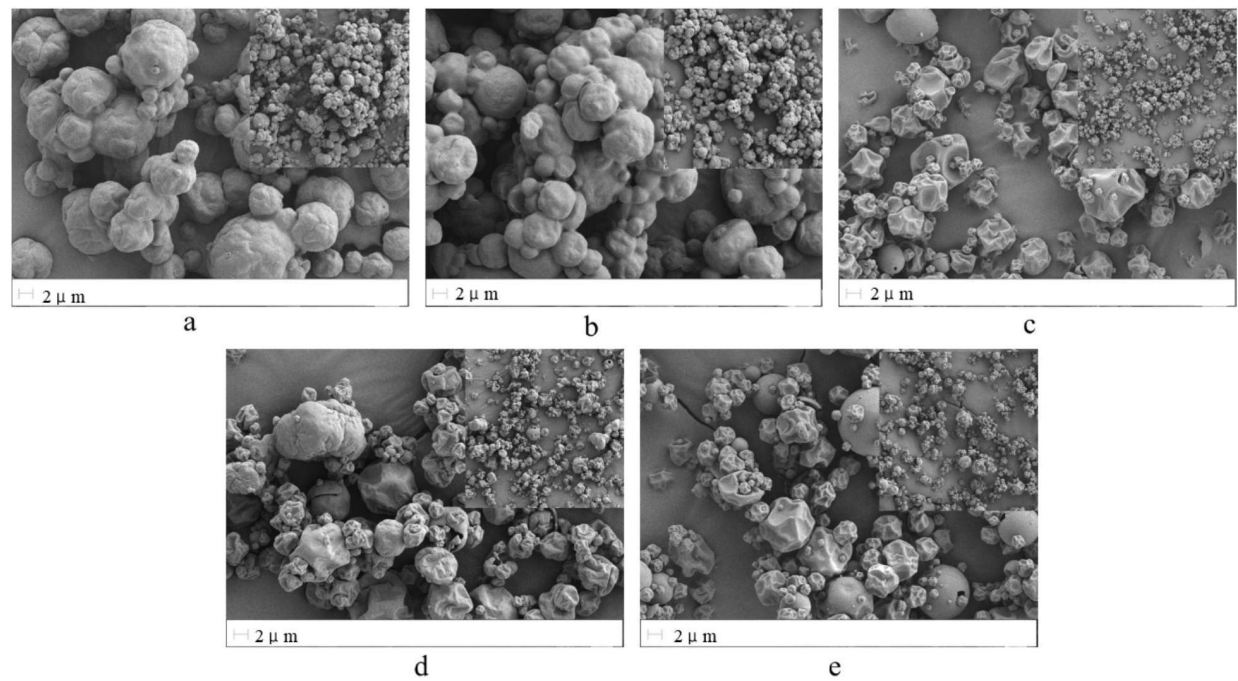


图1

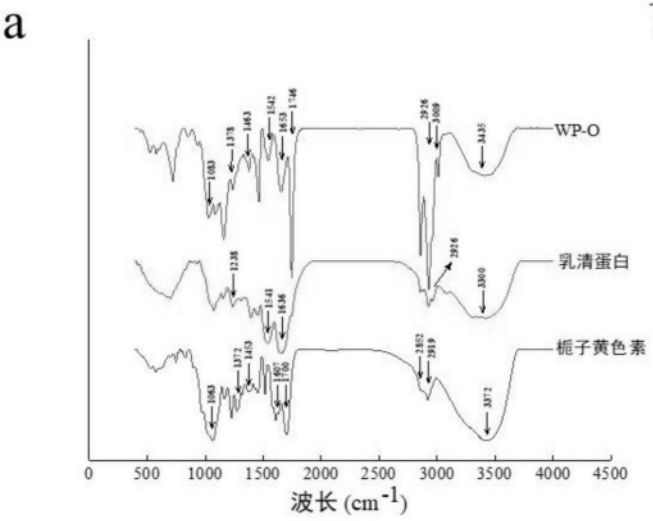


图2a

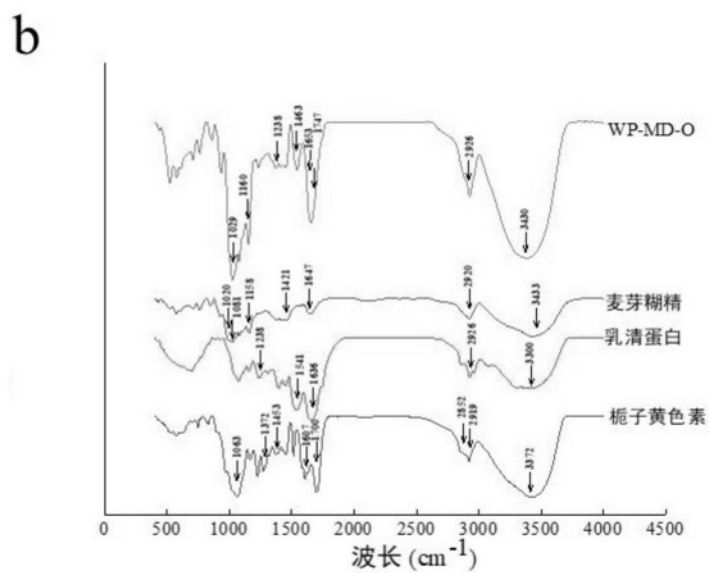


图2b

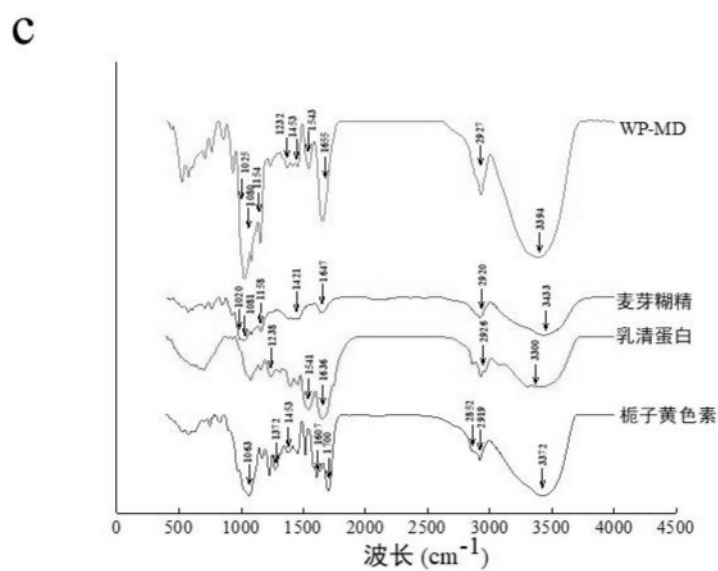


图2c

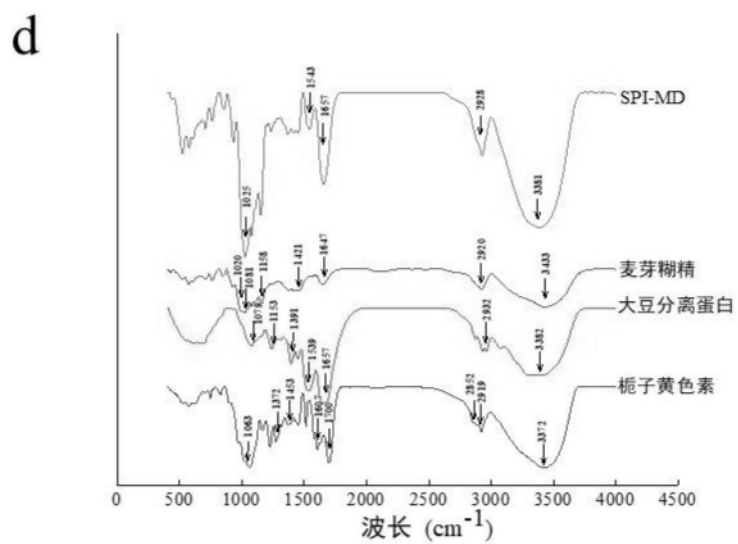


图2d

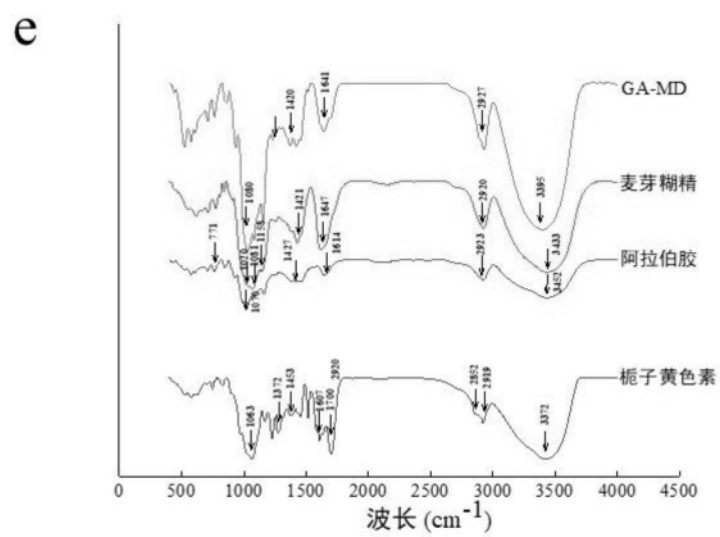


图2e

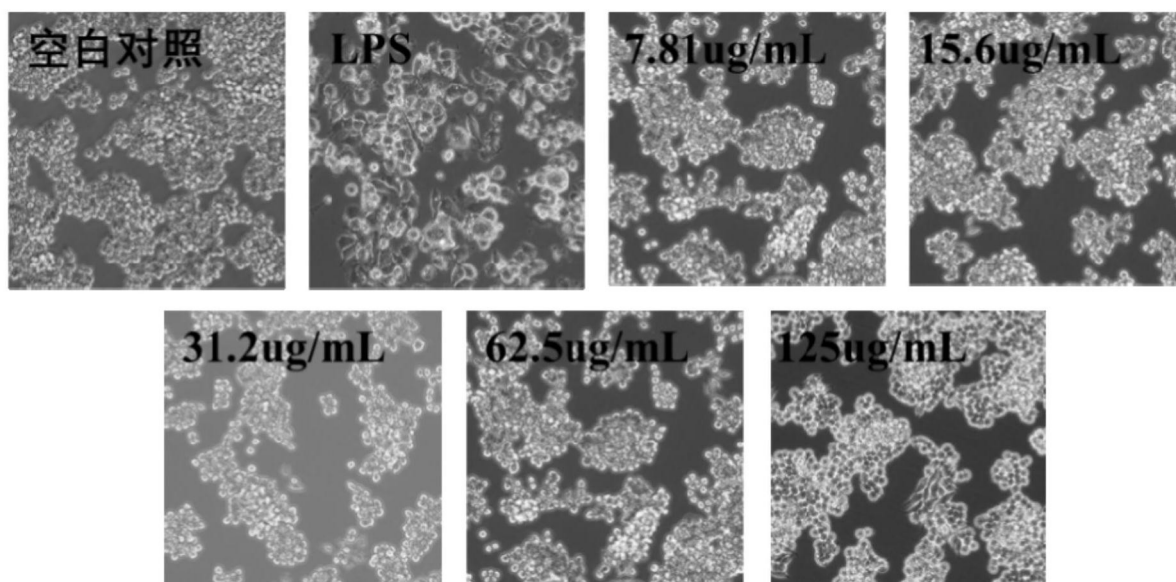


图3

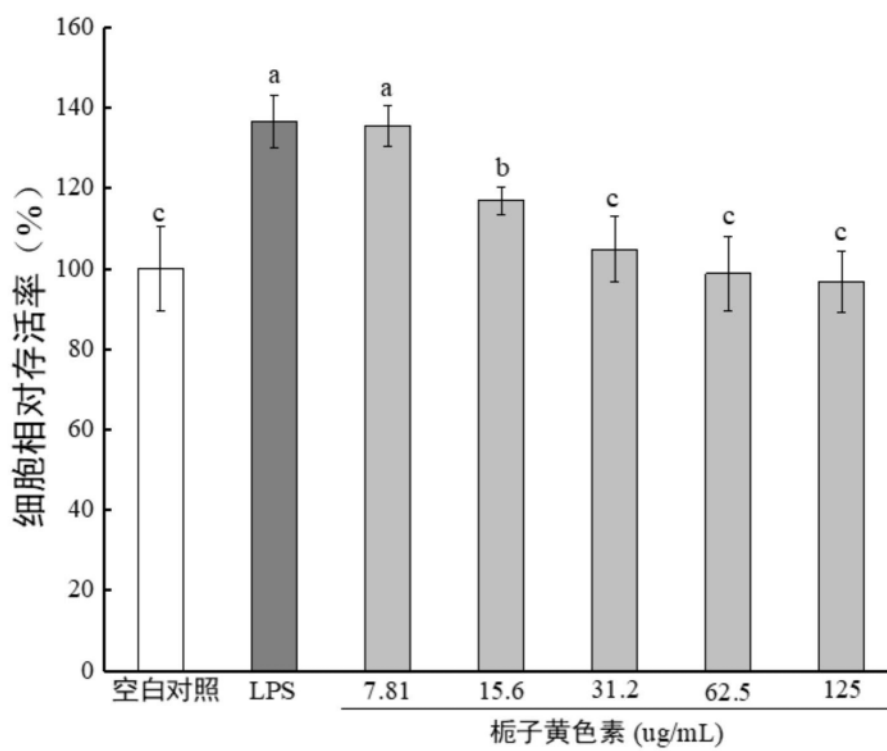


图4

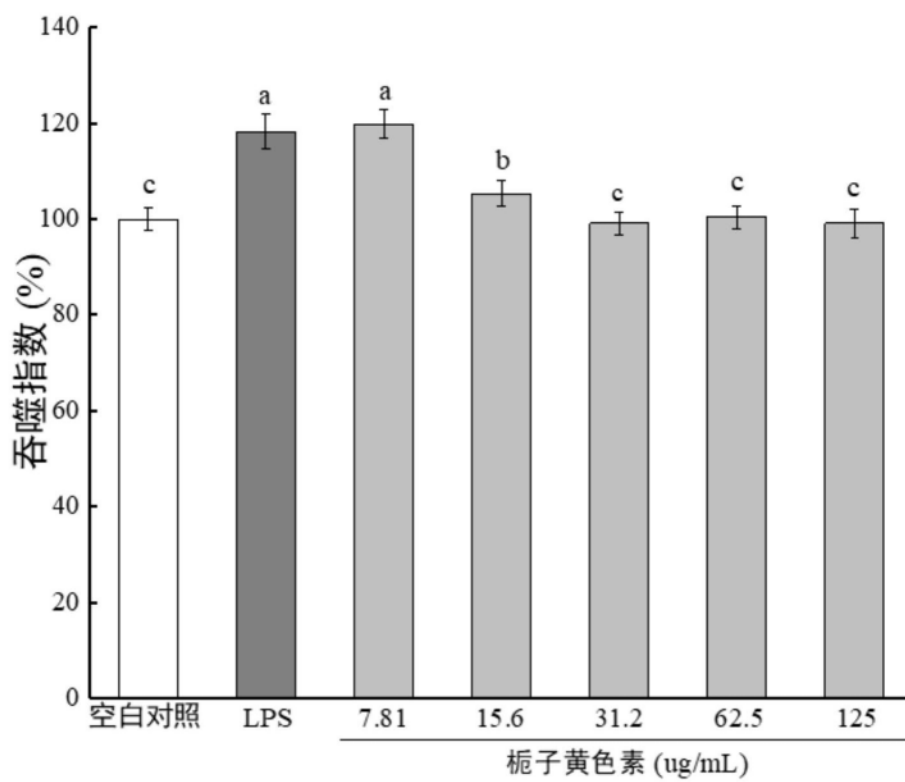


图5

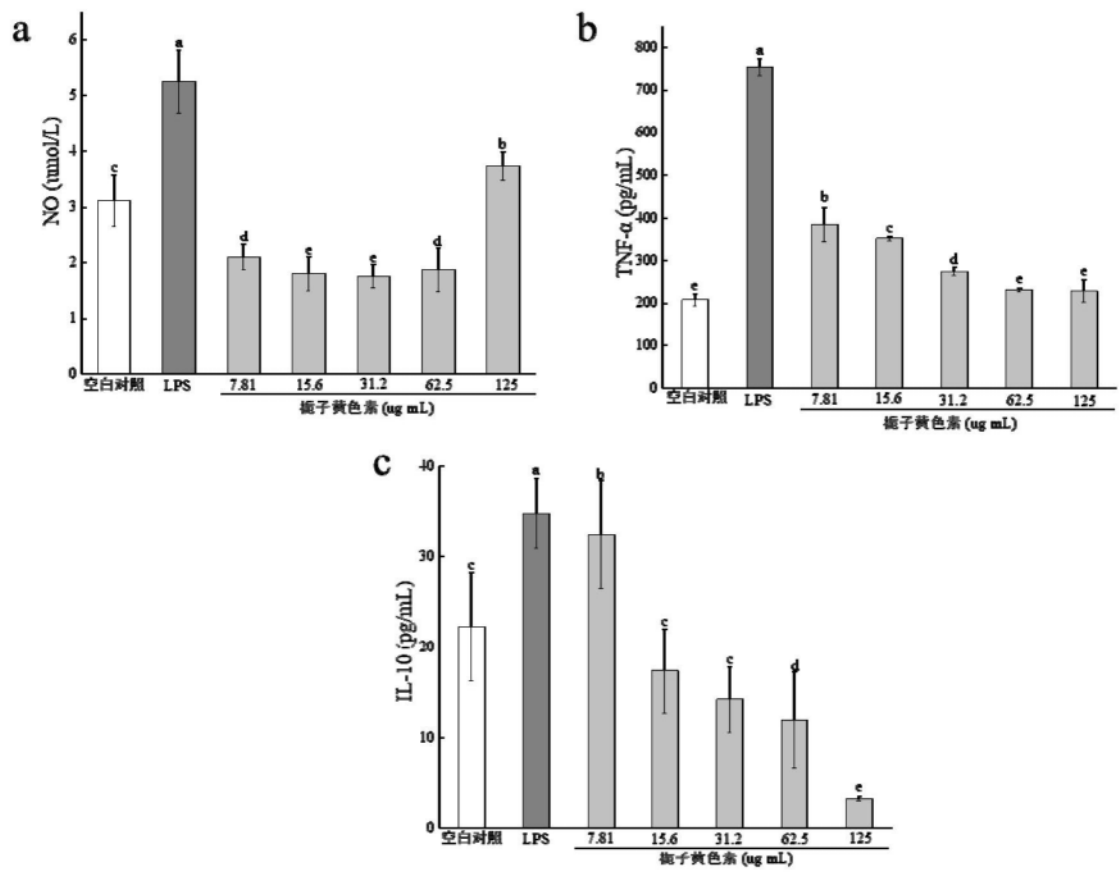


图6