

姜黄挥发油脂质体制备及其抗黄曲霉菌评价研究

胡一晨 孔维军 杨美华

(中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京, 100193)

摘要 目的:研究及评价姜黄挥发油的纳米脂质体系,以用于抑制黄曲霉菌生长及产毒,为纳米抗菌剂研究和开发奠定基础。方法:以安全性好的卵磷脂、胆固醇为膜材,采用乙醇注入结合超声乳化法,采用单因素考察与正交设计结合的方法优选姜黄挥发油脂质体制备工艺,并对所得脂质体进行理化表征和抗黄曲霉菌作用的评价。结果:采用卵磷脂与胆固醇比例 10:1,加药量与脂质比例 1:5,乙醇滴加速度 1 mL/min,超声 5 min,制备所得姜黄挥发油脂质体包封率、粒径分布、稳定性均较好。采用 2 mL 脂质体/25 mL 培养基浓度,与黄曲霉菌共培养 10 d,可完全抑制霉菌生长和黄曲霉毒素的产生。结论:将姜黄挥发油制备成纳米脂质体,既增加其体系稳定性和均一性,又保证了其抗黄曲霉菌性效,具有极大开发前景。

关键词 姜黄挥发油;纳米;脂质体;黄曲霉菌;黄曲霉毒素

Preparation of Turmeric Essential Oil Liposome and Research on Its Anti-*Aspergillus flavus* Efficacy

Hu Yichen, Kong Weijun, Yang Meihua

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract Objective: To develop the nano-liposomal system of turmeric essential oil for inhibiting *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin generation. **Methods:** The stabilized and bio-safe liposomes loading turmeric essential oil were prepared by the ethanol injection-ultrasonic emulsification method with lecithin and cholesterol as excipients. Based on the combination of single factor screening and orthogonal design, liposomes were obtained by means of the optimized technology. Subsequently, following with the physicochemical characterization, the anti-*Aspergillus flavus* activity of liposomes were evaluated. **Results:** With the ratio of lecithin and cholesterol (10:1, weight ratio), ratio of feeding drug and excipient (1:5, weight ratio), 1 mL/min of the ethyl alcohol adding speed and along with ultrasonic emulsification for 5 min, liposomes were prepared, exhibiting high encapsulation efficiency, suitable size distribution, and good storage stability. Particularly, after incubation with 2 mL essential oil liposome per 25 mL culture medium for 10d, almost 100% of *Aspergillus flavus* growth could be suppressed, without aflatoxin production. **Conclusion:** The preparation of turmeric essential oil based on nano-system not only increases the stability and homogeneity of the system but guarantees the efficacy of anti-*Aspergillus flavus*.

Key Words Turmeric essential oil; Nanoparticles; Liposome; *Aspergillus flavus*; Aflatoxin

中图分类号:R283.6;R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.08.007

黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)是一类广泛存在的真菌,其次级代谢产物黄曲霉毒素具有致畸、致癌、致突变性。食物及农作物中黄曲霉毒素的污染相当广泛,包括谷物、坚果、籽类、牛乳等,尤以玉米、花生被污染的程度最严重^[1-2],近年来发现中药材也易受黄曲霉菌污染^[3-5]。黄曲霉菌污染严重影响食物及药物安全性,因此,寻找和开发各种抗霉菌及黄曲霉毒素合成抑制剂尤为重要。部分抗生素类药物及化学杀菌剂虽然具有较强的抗黄曲霉作用,但其长期使用容易引起人和家畜的累积性毒性反应,使用范围有限^[6]。近年来研究证明,姜黄、丁香、肉桂等多种植物挥发油可通过改变真菌细胞壁和膜结构、影

响真菌细胞核酸和蛋白质合成、影响真菌细胞内能量代谢及产毒基因表达等途径,从而有效抑制黄曲霉毒素合成作用,且安全性较好,耐药性小^[7-8]。但挥发油具有溶解度差、易挥发、不稳定等特点,实际应用时需加入大量乳化剂以形成混悬液,其稳定性、均一性均较差,如何得到质量稳定的挥发油制剂是其推广应用的重要技术难题。尽管 β -环糊精包合挥发油技术已得到了广泛的发展,但 β -环糊精包合技术工序烦琐、包合率及挥发油利用率低、有机溶剂残留等问题使得其仍停留在初级研究阶段^[3]。

近年来,纳米技术应用于农业服务已成为一个新兴研究领域和应用产业,纳米农药大大降低用药

基金项目:十二五国家科技重大专项重大新药创制“中药质量安全检测和风险控制技术平台”(编号:2014ZX09304307-002)

作者简介:胡一晨,女,博士,主要从事中药质量控制研究,Tel:(010)57833265,E-mail:huyichen0323@126.com

通信作者:杨美华(1964—),Tel:(010)57833277,E-mail:yangmeihua15@hotmail.com

量,提高药效,真正体现了使用剂量低、防病虫害谱广、对人畜低毒、残留少、对环境污染小等诸多优点^[9-10],但目前还鲜有将植物源真菌药物制备成纳米制剂的研究。姜黄挥发油来源于植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的水蒸馏提取产物,课题组前期研究发现其主要含姜黄酮类成分^[11],且具有良好的抑制黄曲霉菌生长的作用^[12]。针对其溶解性、稳定性等不足,本研究采用具有良好生物相容性和安全性的脂质材料^[13]与姜黄挥发油进行有效组装成为纳米级脂质体溶液,从而有利于开发以姜黄挥发油为原料的“高效绿色”抗真菌制剂。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 实验仪器 电子天平(德国赛多利斯公司);旋转蒸发仪(德国 BOSCH 公司);探头式超声波细胞破碎仪(美国 Qsonica sonicator q125);NB-302 水浴搅拌器(韩国 N-Biotek);恒流蠕动泵(美国 Thermo Scientific FH100);马尔文动态光散射仪(马尔文仪器有限公司);Waters ACQUITY H-Class 超高效液相色谱仪配荧光检测器(美国 Waters 公司);KQ-500 超声仪(昆山市超声仪器有限公司);恒温霉菌培养箱(上海一恒科学仪器公司);PGG-01D 型干式氮吹仪(天津艾维欧科技发展有限公司);高压灭菌锅(上海博讯实业有限公司)。

1.1.2 实验材料 蛋黄卵磷脂,胆固醇(SIGMA-ALDRICH,中国);1.5 μm 玻璃纤维滤纸(美国 VICAM 公司);黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂ 和 B₁ 混合标准品溶液(新加坡 Pribolab 公司);AflaTest-PTM 免疫亲和柱(美国 VICAM 公司)。黄曲霉菌冻干粉(*Aspergillus flavus*, CGMCC 3.4410)购自于中国普通微生物菌种保藏管理中心。察氏培养基(Salt Czapek Dox Agar, SCDA)、马铃薯琼脂培养基(Potato Dextrose Agar, PDA)和酵母膏(Yeast Extract)购买于北京奥博星生物技术有限公司;姜黄挥发油(自制);其他试剂为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 姜黄挥发油脂质体制备 脂质体以卵磷脂、胆固醇为膜材,但制备方法较多,常用的包括薄膜分散法、逆向蒸发法、复乳法、注入法、冷冻干燥法、熔融法等^[14]。故首先以空白脂质体物理稳定性参数 KE 和脂质体粒径分布为指标,对制备方法进行考察和优选。预实验结果表明,不同方法的 KE 值分别是:复乳法>薄膜分散法>逆向蒸发法>乙醇注入法;粒径分布分别是:薄膜分散法>复乳法>逆向蒸

发法>乙醇注入法;因此选择乙醇注入法来制备姜黄挥发油脂质体。为了增加脂质体载药体系的均一性,在乙醇注入法基础上结合超声乳化,以得到包封率较高,稳定性较好的脂质体。

1.2.1.1 工艺参数单因素考察 根据乙醇注入结合超声乳化法的制备工艺,对其中卵磷脂和胆固醇比例(10:1,5:1,1:1)、药脂比例(1:10,1:5,1:2)、水浴温度(50℃、60℃、70℃)、搅拌速度(30r/min、60 r/min、120 r/min)、乙醇注入速度(0.5 mL/min、1 mL/min、2 mL/min)、超声乳化时间(2 min、5 min、10 min)等因素和不同水平进行考察,以包封率和粒径分布作为其评价指标。

1.2.1.2 工艺参数正交设计优选 精密称取一定量的磷脂和胆固醇,加入无水乙醇使溶解,置于 60℃ 水浴的水相中,搅拌 5 min;另量取姜黄挥发油适量加入乙醇溶解,采用蠕动泵以适宜速度恒流滴入以上水相中,冰浴超声乳化一段时间后,继续搅拌 30 min,0.45 μm 滤膜滤过,即得姜黄挥发油脂质体。

在单因素考察实验结果基础上,利用正交试验法考察卵磷脂和胆固醇比例(A),药脂比例(B),姜黄挥发油体积(C),冰浴超声时间(D)4 个主要因素,每个因素各取三个水平,按照正交实验表 L₉(3⁴),考察 4 个主要因素及其不同水平对姜黄挥发油制备的影响,并以包封率、粒径分布作为评价指标,筛选最佳处方。正交试验因素水平设计见表 1。

表 1 姜黄油脂质体处方筛选正交试验因素水平设计表

水平	A 卵磷脂:胆固醇 (mg: mg)	B 药脂比例 (mL: mg)	C 乙醇注入速度 (mL/min)	D 超声时间 (min)
1	10:1	1:10	0.5	2
2	5:1	1:5	1	5
3	1:1	1:2	2	10

1.2.2 姜黄挥发油脂质体性能评价 形态观察及粒径分布测定:取姜黄挥发油脂质体稀释到适宜浓度,用马尔文 Nano ZSP 粒径测定仪测定粒径;取适量姜黄挥发油脂质体递加于铜网上,用 0.3% 磷钨酸进行负染 30 s,置于透射电镜下,观察其结构。

Zeta 电位测定:取姜黄挥发油脂质体稀释到适宜浓度,用马尔文粒径测定仪测定 Zeta 电位。

稳定系数 KE 测定:取 2 mL 脂质体,3 000 r/min 离心 15 min 后,弃去上层澄清液体,摇匀下层液体,450 nm 可见光下测定浊度 A。另精密量取未离心的脂质体样品,同法操作,测定 A₀。K_E(%)=(A-A₀)/A×100%;K_E 值越小,代表体系稳定性越好。

脂质体 pH 测定:脂质体中卵磷脂分子酯键水

解时产生脂肪酸,氧化则会产生溶血卵磷脂和脂肪酸等,从而使得制剂在贮存过程中 pH 值下降。本文采用 pH 计测定空白脂质体和姜黄挥发油脂质体混悬液的 pH 值。

包封率测定:包封率(EE%)是评价脂质体质量的重要指标。根据参考文献,选择石油醚萃取结合 GC-MS 法,以芳香姜黄酮作为指标成分,测定姜黄挥发油脂质体包封率。

精密吸取姜黄挥发油脂质体 0.5 mL 置于容量瓶,加入甲醇定量至 10 mL,超声破乳,GC-MS 测定其中芳香姜黄酮含量 D_{total} ;另取相同体积含药脂质体,加入同体积石油醚萃取 2 次,弃掉上层石油醚,将下层脂质体加入甲醇定容并超声破乳,测定其中芳香姜黄酮含量 D_{load} ,计算包封率:包封率 EE% = $D_{load}/D_{total} \times 100\%$ 。

初步稳定性:脂质体中药物渗漏率是评价制剂贮藏期间良好稳定性的重要质量指标。渗漏率(%) = 包封率 E0% - 包封率 En%。其中“En%”代表第 n 个月的包封率。

取三批脂质体分别置于 4 °C 和 37 °C 中,放置 24h 后,测定其粒径、Zeta 电位、包封率、渗漏率等。

加速稳定性:取三批脂质体分别置于 4 °C、25 °C、40 °C 中,依次于第 0、7、14 天测定其粒径、Zeta 电位、包封率、渗漏率等。

同上,取姜黄挥发油脂质体置于光照箱中于 25 °C 保存,在 $4\ 500 \pm 500$ Lx 的光照照度下放置 14 d,同上定时取样考察其粒径、Zeta 电位、包封率、渗漏率等。

1.2.3 姜黄挥发油脂质体最低抑菌浓度的考察
在 9 cm 直径的无菌培养皿中,加入灭菌后的察氏培养基,每个培养皿中均含有总体积为 25 mL 的察氏培养基和不同体积姜黄挥发油脂质体(0.1 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL)的混悬液,冷却后即得含不同体积姜黄挥发油脂质体的平板培养基。其中不含姜黄挥发油脂质体的平板培养基为对照组,以空白脂质体制得的平板培养基为空白组。用微量移液器移取黄曲霉菌 *A. flavus* (CGMCC 3.4410) 孢子悬液 10 μ L 接种于平板培养基上,置于温度为 28 °C、湿度为 90% 的霉菌培养箱中培养 10 d。所有试验均重复 3 次。10 d 后测量黄曲霉菌的生长直径,来考察姜黄挥发油脂质体抑制黄曲霉菌生长的作用:

$$\text{生长抑制率} = [(dc - dt)/dc] \times 100\%$$

其中,dc 为控制组黄曲霉菌的直径,dt 为含有姜黄挥发油的测试组的黄曲霉菌的直径。能抑制培

养基内黄曲霉菌生长的最低药物浓度,即为最低抑菌浓度。

1.2.4 对黄曲霉菌分生孢子形成的抑制作用
同上,取已培养 10 d 的黄曲霉菌平板,加入 5 mL 含有 1% 吐温-20 的无菌水。取无菌接种环轻轻刮取平板表面的分生孢子,用无菌滴管吸取分生孢子悬液,加入 1% 吐温-20 定容至 10 mL。运用血球计数板法计数,计算分生孢子形成的抑制率:

$$\text{分生孢子形成的抑制率} = [(Nc - Nt)/Nc] \times 100\%$$

其中,Nc 为控制组黄曲霉菌的孢子数,Nt 为含有姜黄挥发油的测试组的黄曲霉菌的孢子数。

1.2.5 对黄曲霉毒素的抑制作用
采用 YES 培养基培养黄曲霉菌 *A. flavus* (CGMCC 3.4410),同上,在其中加入不同体积姜黄挥发油脂质体(0.1 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL),10 d 后,将培养皿中黄曲霉菌菌丝和培养基倒入锥形瓶中,加入 40 mL 的甲醇超声提取 5 min,滤过,取续滤液 10 mL。用 PBS 配置的 2% 的吐温-20 溶液稀释至 50 mL,混匀,玻璃纤维滤纸滤过。精密吸取续滤液 25 mL,过 AflaTest-PTM 免疫亲和柱,控制流速为 1 滴/s。随后用 10 mL 水以 1 滴/s 的流速清洗免疫亲和柱两遍,用 2 mL 甲醇洗脱黄曲霉毒素,氮气 50 °C 近干,用甲醇/水(50/50, v/v)定容至 1 mL,0.22 μ m 有机滤膜滤过,待测。姜黄挥发油对黄曲霉毒素的抑制率计算公式为 $(1 - X/Y) \times 100\%$ 。X 为含有姜黄挥发油的测试组的黄曲霉毒素的含量,Y 为对照组黄曲霉毒素的含量。

黄曲霉毒素采用 UPLC-FLD 测定^[15],色谱条件如下:色谱柱:Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m);流动相:甲醇-水(50/50, v/v);流速:0.2 mL/min;柱温:30 °C;进样体积:1 μ L。检测器为荧光检测器(FLD):激发波长为 360 nm,发射波长为 440 nm。UPLC-FLD 的分析时间为 6 min。

1.2.6 统计学分析
所有数据采用 SPSS 16.0 统计软件分析,各组数据以均数 $\pm$ 标准差表示,多组资料间比较采用单因素方差分析,LSD-t 法检验比较组间差异。以 $P < 0.05$ 为判断差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄挥发油脂质体的工艺优选

2.1.1 单因素考察
本实验采用单因素考察对该制备方法中几个相关因素进行筛选,确定其主要影响因素及水平范围,以便进行后期优化^[16]。以包封率和平均粒径作为考察指标,实验结果见图 1。

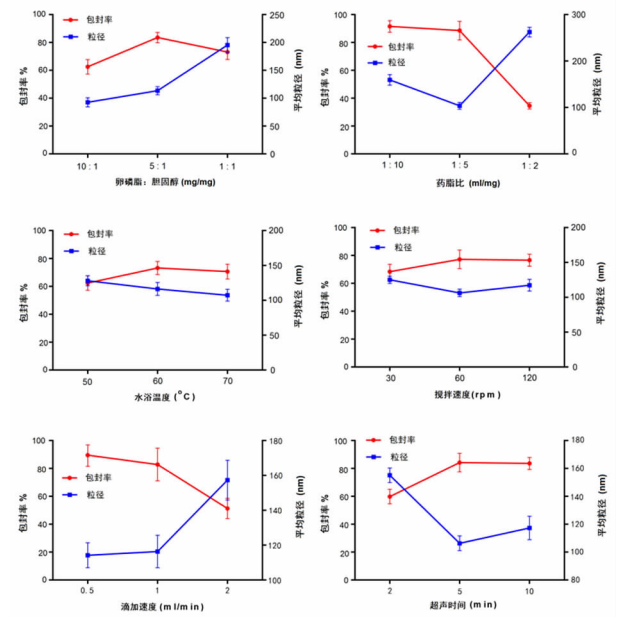


图1 姜黄挥发油脂质体制备单因素考察结果

由图1可知,在所考察的六个因素中,有四个因素对脂质体质量影响较大,而水浴温度和搅拌速度影响较小。其中卵磷脂与胆固醇比例越低,其粒径增大较多,表明随着胆固醇材料增加,药物包载能力减小,脂质体形成受影响较大,胆固醇材料过多,使脂质层流动性过强,从而导致脂质体粒径增大;药脂比例越大,包封率下降明显,表明随着脂质材料用量减少,包载药物能力下降;乙醇注入速度对包封率影响较大,药物随有机溶剂注入水相速度过快,药物来不及在含脂质的水相中均匀分散而进入脂质层包裹的内腔,挥发油游离于水相中,从而导致药物包载能力下降;超声乳化时间对纳米粒径影响较大,超声时间太短,纳米粒分散不够,易产生团聚,使其粒径过大。

表2 正交试验结果

序号	A	B	C	D	包封率 (%)	平均粒径 (nm)	加权结果
1	1	1	1	1	78.6	105.3	83.62
2	1	2	2	2	93.4	114.5	95.90
3	1	3	3	3	49.5	196.4	10.84
4	2	1	2	3	75.2	127.3	70.06
5	2	2	3	1	77.4	166.3	55.11
6	2	3	1	2	56.8	174.4	28.72
7	3	1	3	2	69.7	194.1	34.21
8	3	2	1	3	61.2	157.7	41.02
9	3	3	2	1	48.2	217.5	0
K1	190.369	187.902	153.377	138.745			
K2	153.900	192.046	165.963	158.831			
K3	75.240	39.560	100.169	121.933			
R	38.376	50.828	21.931	12.299			

2.1.2 正交实验考察 通过单因素考察实验,确定了卵磷脂与胆固醇比例、药脂比、乙醇注入速度、超声乳化时间四个影响因素的三个水平对脂质体质量影响较大,而对于影响较小的水浴搅拌温度和搅拌速度两个因素,则依次选择 60 ℃ 和 60 r/min 作为后期工艺考察条件。

本试验设定包封率和平均粒径两个指标对脂质体质量影响相当,采用 50:50 比例对两个指标进行加权评分,作为正交试验结果,结果分析见表 2 和表 3。

表3 方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	2308.011	2	1154.005	10.145	0.089
B	5030.486	2	2515.243	22.111	0.043 *
C	813.160	2	406.580	3.5743	0.218
D	227.500	2	113.750		

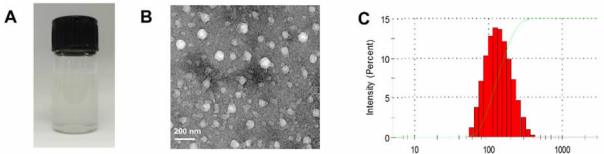
注: * $P < 0.05$, 具有统计学意义。

由表3可知,4个因素中仅有药脂比例具有统计学意义($P < 0.05$),其他三个因素根据 K 值大小评价不同水平对脂质体质量的影响,故选定最佳制备条件为: $A_1B_2C_2D_2$, 即卵磷脂与胆固醇比例为 10:1,加药量与脂质比例为 1:5,乙醇滴加速度为 1 mL/min,超声时间为 5 min。

按照优化的处方制备三批姜黄挥发油脂质体,其包封率为 85% ~ 92%,平均粒径为 100 nm ~ 120 nm。结果表明,采用正交实验所得优化工艺制备的姜黄挥发油脂质体具有良好的包封率和粒径分布。

2.2 姜黄挥发油脂质体理化表征及评价

2.2.1 形态学观察 姜黄挥发油脂质体呈均匀半透明的乳白色液体,泛乳光(图 2A)。采用透射电镜观察负染后脂质体纳米粒,可见姜黄油脂质体为较均一的圆形或椭圆形,形态分布较均一(图 2B)。



(A) 制剂外观; (B) 透射电镜图; (C) DLS 粒径分布图

图2 姜黄挥发油脂质体理化表征

注: (A) 制剂外观; (B) 透射电镜图; (C) DLS 粒径分布图

2.2.2 粒径分布、Zeta 电位及 pH 值 质量良好的脂质体应粒径较小,分布窄,从而有利于制剂稳定。同时,Zeta 电位是脂质体与水相接触时在其表面形成的扩散双电层,Zeta 电位越小,说明粒子间斥力越弱,粒子间聚集和融合的机率增加,从而产生团聚。

因此,Zeta 电位绝对值越大,纳米粒溶液越稳定。

取制得的空白脂质体及姜黄挥发油脂质体用磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释至 1 mg/mL,用激光粒度分析仪测定其粒径大小及分布,并测定 Zeta 电位,检测温度 25 ℃。结果见表 4。

表 4 姜黄挥发油脂质体粒径及 Zeta 电位结果				
样品	粒径(nm)	PDI	Zeta 电位(mV)	pH
空白脂质体	84.3 ± 5.6	0.15 ± 0.04	-35.1 ± 4.7	6.87 ± 0.15
姜黄挥发油脂质体	116.5 ± 10.2	0.11 ± 0.02	-32.6 ± 5.2	7.02 ± 0.18

由测定结果可见,姜黄挥发油包载于脂质体后,脂质体粒径有所增加,但是仍较小,其 DLS 测定图谱见图 2C;其聚合物分散系数(Polymey Disperse Index,PDI)值均小于 0.2,说明其分布较窄;姜黄油脂质体平均 Zeta 电位为-32.6 mV,说明其稳定性较好。此外,空白脂质体和姜黄挥发油脂质体的平均 pH 值分别为 6.87 和 7.02,接近中性。

2.2.3 姜黄油脂质体稳定性考察 通过初步稳定性和加速稳定性试验,考察姜黄挥发油脂质体的贮存稳定性。结果发现,在 14 d 内温度和光照对姜黄油脂质体质量影响不大,制剂未发生分层,且粒径增大范围很小,药物泄漏率较小。但由于脂质体中脂质材料在高温下易氧化,故仍建议其制剂低温避光保存。

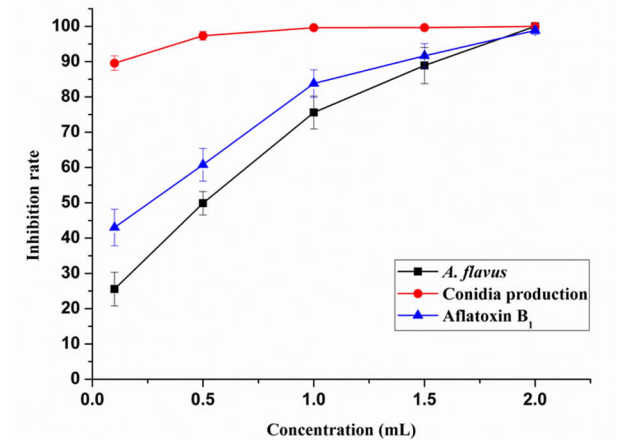


图 3 不同浓度的姜黄挥发油脂质体对黄曲霉菌 *A. flavus* (CGMCC 3.4410) 的生长直径、孢子产量和黄曲霉毒素的产量的影响

2.3 姜黄挥发油脂质体“抗菌抑毒”作用 不同体积姜黄挥发油脂质体对黄曲霉生长及产毒性能的影响呈浓度依赖性(图 3)。0.1 mL/25 mL 培养基浓度的姜黄挥发油脂质体即可产生约生长抑制率 25%,孢子产量抑制率 89% 和黄曲霉毒素 B₁ 抑制率 43%,该抑制作用随脂质体浓度依次增大。由图 3 可知,2.0 mL/25 mL 培养基为姜黄挥发油脂质体抑

制黄曲霉菌 *A. flavus* 的最小抑菌浓度。

图 4 所示为姜黄挥发油脂质体抑制黄曲霉菌在察氏培养基中和 YES 液体培养基中生长的培养图。由此图可知,控制组的黄曲霉菌和空白组的黄曲霉菌生长状态基本一致,可见空白脂质体对黄曲霉菌的生长影响不大。随着姜黄挥发油脂质体的浓度的增加,黄曲霉菌的生长得到很好的抑制,且与剂量呈正相关。当姜黄挥发油脂质体的加入量达到 2.0 mL,黄曲霉菌的生长被完全抑制。

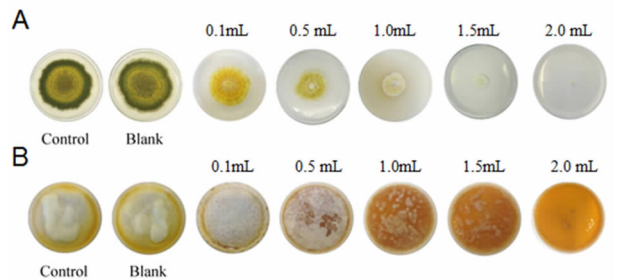


图 4 姜黄挥发油脂质体抑制黄曲霉菌在察氏培养基 (A) 和 YES 培养基 (B) 中生长的培养图

注:Control 为控制组,Blank 为空白组,从左至右依次为不同体积姜黄挥发油脂质体的处理组。

3 讨论

脂质体制备方法较多,其中薄膜分散法适用于脂溶性较强和水溶性药物,逆相蒸发法适用于包裹水溶性药物,这两种都会使用到减压干燥工艺,由于挥发油成分易挥发,在抽真空过程可能存在挥发性成分挥散,因此选择了稳定性更高的乙醇注入法制备,同时几种方法的稳定性系数结果,也表明乙醇注入法制备脂质体具有较好的物理稳定性。此外,超声乳化法有利于将大单室的脂质体转变为小单室脂质体,使纳米粒粒径更小,减小了脂质体纳米粒融合而造成的沉淀现象^[17]。

本实验采用乙醇注入-超声乳化法制备姜黄挥发油脂质体,通过单因素考察,运用正交实验以包封率及平均粒径为指标对工艺进行优化。实验结果表明,卵磷脂:胆固醇质量比值为 10:1,挥发油:脂质材料比为 1:5,制备水浴温度为 60 ℃,搅拌速度为 60 r/min,乙醇注入速度为 1.0 mL/min,超声乳化时间为 5 min 时,脂质体的包封率最高,平均包封率为 89.23 ± 2.86% 验证 3 批脂质体的包封率和平均粒径的结果表明制备工艺稳定。通过对脂质体的外观、透射电镜形态、平均粒径、pH 值、Zeta 电位、包封率等质量的考察,姜黄挥发油脂质体各项质量指标均达到制剂设计的要求。

本实验评价了姜黄挥发油脂质体的抗黄曲霉菌

的作用。实验结果表明,姜黄挥发油脂质体能有效抗黄曲霉菌,最小抑菌浓度为 2.0 mL/25 mL 培养基。脂质体的稳定性要优于姜黄挥发油加入增溶剂后的乳浊液,其两亲性的特性更有助于姜黄挥发油脂质体应用于实际中。

参考文献

- [1] 陈丽惠,洪超,蔡伟鹏. 市售食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 污染情况分析[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(8):1234-1236.
- [2] 周妍,闻胜,刘潇,等. 食品中化学污染物风险评估研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2014,5(6):1868-1875.
- [3] 杨美华. 药用植物及其产品中真菌及真菌毒素污染研究进展[J]. 贵州农业科学,2008,36(6):59-63.
- [4] 宋美芳,张忠廉,李学兰. 3 种云南主产中药材上污染真菌在贮藏过程中的变化[J]. 时珍国医国药,2015,26(4):955-957.
- [5] 宋美芳,陈娟,李学兰,等. 云南地区三七和草果上真菌污染的初步分析[J]. 中国中药杂志,2012,37(12):1734-1737.
- [6] Kano R KE, Tateishi A, Murayama SY, et al. Does farm fungicide use induce azole resistance in *Aspergillus fumigatus* [J]. Medical Mycology, 2015, 53(2):174-177.
- [7] 李红玲,高微微. 植物挥发油对黄曲霉毒素产生菌及其毒素合成的影响[J]. 中国食品卫生杂志,2012,24(6):590-595.
- [8] Flavio Dias Ferreira, Carlos Kemmelmeier, Carla Cristina Arrotéia, et al. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link [J]. Food Chemistry, 2013, 136(2):789-793.
- [9] 施峰,赵继会,郭腾,等. 中药挥发油纳米给药系统的研究进展

[J]. 中国药房,2013,24(15):1429-1430.

- [10] 潘振中,崔博,崔海信,等. 农药纳米混悬剂及其制备方法探析[J]. 农药学报,2014,16(6):635-643.
- [11] Yichen Hu, Weijun Kong, Xihui Yang, et al. GC - MS combined with chemometric techniques for the quality control and original discrimination of *Curcuma longa* rhizome: Analysis of essential oils [J]. Journal of Separation Science, 2014, 37:404-411.
- [12] Yichen Hu, Jiaoyang Luo, Weijun Kong, et al. Uncovering the anti-fungal components from turmeric (*Curcuma longa* L.) essential oil as *Aspergillus flavus* fumigants by partial least squares [J]. RSC Advances, 2015, 5:41967-41976.
- [13] 刘让如. 乳香挥发油肝靶向脂质体的制备及药效学研究[D]. 长沙:中南大学,2007.
- [14] 曹宁宁,姜菲,刘金鹏. 脂质体的制备方法及其研究进展[J]. 天津理工学院学报,2003,19(1):30-34.
- [15] Yichen Hu, Weijun Kong, Jiaoyang Luo, et al. Dynamic variation of bioactive compounds and aflatoxins in contaminated *Radix Astragali* during extraction process [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015. doi:10.1002/jsfa.7257.
- [16] 郭海燕,莫穗林. 脂质体物理稳定性和包封率的影响因素[J]. 中国新药杂志,2004,13(6):498-501.
- [17] Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, et al. Essential oils loaded in nano-systems: a developing strategy for a successful therapeutic approach [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2014:651593.

(2015-06-29 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 1156 页)

- [56] 毛春芹,季琳,陆兔林,等. 中药材硫磺熏蒸后有害物质及其危害研究进展[J]. 中国中药杂志,2014,39(15):2801-2806.
- [57] Nand V, Maata M, Koshy K, et al. Water purification using moringa-leifera and other locally available seeds in Fiji for Heavy metal removal [J]. Int J Appl Sci Technol, 2012, 2(5):125-129.
- [58] 孟萌,陈涛,李进. 浅谈中药材中重金属的污染与防治[J]. 时珍国医国药,2009,20(5):1219-1220.
- [59] Kunle O F, Egharevba H O, Ahmadu P O. Standardization of herbal medicines-A review [J]. Int J Biodivers Conserv, 2012, 4(3):101-112.
- [60] 梁启超,李荣辉,刘爽. 降低中药中重金属含量方法的研究进展[J]. 微量元素与健康研究,2012,29(2):48-50.
- [61] Zhang H, Luo Y, Makino T, et al. The heavy metal partition in size-fractions of the fine particles in agricultural soils contaminated by waste water and smelter dust [J]. J Hazard Mater, 2013, 248:303-312.
- [62] Shi J, Abid A D, Kennedy I M, et al. To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution [J]. Environ Pollut, 2011, 159(5):1277-1282.

- [63] 王先良,王小利,徐顺清. 大孔螯合树脂可用于处理中药重金属污染[J]. 中成药,2005,27(12):1376-1379.
- [64] 王冬,关宏峰,刘晓秋. 中药中重金属和残留农药去除方法研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2009,26(2):152-156.
- [65] 梁成满,黄少烈,李琼. 超临界 CO₂ 配合萃取中药中重金属的研究进展[J]. 化工进展,2005,24(6):607-611.
- [66] 李琼,梁成满,吴婷. 超临界 CO₂ 萃取法去除橘红中重金属 Cu、As、Pb 的研究[J]. 中草药,2006,37(6):1005-1008.
- [67] 张楠楠,李巧遇,杨凌宇,等. 超临界 CO₂ 配合萃取技术去除中药中重金属研究进展[J]. 亚太传统医药,2011,7(1):147-149.
- [68] 文震,刘波,郑宗坤,等. 超临界 CO₂ 配合萃取巴戟天中的有害元素[J]. 化学工程,2009,37(7):1-3,8.
- [69] 党志,朱志鑫,文震,等. 超临界 CO₂ 配合萃取中药广霍香中的重金属[J]. 华南理工大学学报:自然科学版,2005,33(6):59-62.
- [70] 魏继新,张立国,倪力军. 两种螯合树脂用于板蓝根提取液脱重金属的比较[J]. 中药新药与临床药理,2007,18(2):139-141.
- [71] 郭石. 中药铜铅镉含量测定与无机离子树脂驱除技术研究[D]. 郑州:河南大学,2011.

(2015-06-29 收稿 责任编辑:洪志强)