

番木瓜籽挥发油纳米结构脂质载体的制备及抗假丝酵母菌活性研究

姚凯^{1,2}, 马寅正^{1,3}, 易国辉¹, 王元晓^{1,2}, 周霞^{1,2}, 臧旭^{1,2}, 刘禹棋^{1,2},
汪桐^{1,2}, 何小稳^{1,4*}

1. 海南医学院科学实验中心, 海南海口 571199; 2. 海南医学院药学院, 海南海口 571199; 3. 海南医学院公共卫生与全健康国际学院, 海南海口 571199; 4. 海南省热带心血管病研究重点实验室, 海南海口 571199

摘要: 番木瓜 (*Carica papaya* Linn.) 属十字花目番木瓜科, 广泛分布于热带、亚热带地区。课题组前期研究发现, 番木瓜籽挥发油的主成分为异硫氰酸苜酯 (BITC), 含量高达 99%, 具有天然、无污染、纯度高特点, 且对多种假丝酵母菌均具有明显的抑制作用。但由于 BITC 水溶性差、易挥发、易降解等缺点, 限制了其应用。本研究采用熔融乳化超声法制备异硫氰酸苜酯纳米结构脂质载体 (BITC-NLC), 并进行形态、粒径及 Zeta 电位、包封率、载药量等方面的表征及其抗假丝酵母菌活性研究, 旨在提高 BITC 的稳定性和抑菌效果。在单因素试验基础上通过正交试验设计, 优化纳米结构脂质载体 (NLC) 的制备工艺和 BITC-NLC 的处方组成, 得到最佳制备工艺: 初乳搅拌 20 min, 超声分散 15 min (振幅 80%); 最佳处方组成: 单硬脂酸甘油酯 50 mg, 辛癸酸三甘油酯 50 mg, 聚醚 F188 400 mg, 大豆卵磷脂 400 mg, BITC 100 mg, 蒸馏水 20 mL。采用透射电子显微镜观察形态, 纳米粒度及 Zeta 电位测定仪测定粒径及 Zeta 电位, 高效液相色谱法测定包封率和载药量。最终制备得到的 BITC-NLC 呈类球形, 平均粒径为 79.13 nm, Zeta 电位为 -21.77 mV, 包封率为 91.52%。初步稳定性试验结果显示, BITC-NLC 在 25 °C 下贮存 30 d 的稳定性良好。采用微量稀释法测得制剂对供试白假丝酵母菌 (*Candida albicans*) 和热带假丝酵母菌 (*C. tropicalis*) 的最低抑菌浓度 (MIC) 为 8~32 µg/mL, 比原料药 BITC 的抑菌效果好, 且对耐药菌株也具有抑菌效果。综上, 本研究制备的番木瓜籽挥发油新剂型 BITC-NLC 粒径小, 稳定性好, 包封率高, 对假丝酵母菌抑制作用强, 为大量存在且多被丢弃的番木瓜籽的合理开发和综合应用提供依据。

关键词: 番木瓜籽; 挥发油; 异硫氰酸苜酯; 纳米结构脂质载体; 假丝酵母菌

中图分类号: R284; S59 文献标识码: A

Preparation of Nanostructured Lipid Carrier Loaded with *Carica papaya* Seeds Essential Oil and Its Anti-*Candida* Activity

YAO Kai^{1,2}, MA Yinzheng^{1,3}, YI Guohui¹, WANG Yuanxiao^{1,2}, ZHOU Xia^{1,2}, ZANG Xu^{1,2}, LIU Yuqi^{1,2},
WANG Tong^{1,2}, HE Xiaowen^{1,4*}

1. Public Research Center, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571199, China; 2. School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571199, China; 3. International School of Public Health and One Health, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571199, China; 4. Key Laboratory of Tropical Cardiovascular Diseases Research of Hainan Province, Haikou, Hainan 571199, China

Abstract: *Carica papaya* L. belongs to Caricaceae, Brassicales, which is widely distributed in tropical and subtropical

收稿日期 2022-06-07; 修回日期 2022-09-15

基金项目 海南省基础与应用基础研究计划 (自然科学领域) 高层次人才项目 (No. 2019RC219); 海南医学院大学生创新创业训练计划项目 (No. X202211810034); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (No. 202111810005)。

作者简介 姚凯 (1999—), 男, 本科生, 研究方向: 天然植物成分的研究与应用。*通信作者 (Corresponding author): 何小稳 (HE Xiaowen), E-mail: xiaowen_he@126.com。

areas. In our previous study, the major constituent of *C. papaya* seeds essential oil was benzyl isothiocyanate (BITC) with a content of up to 99%. It had many advantages such as natural, non-pollution, high purity and strong antifungal activity against *Candida* strain. However, the application of BITC in pharmaceuticals, food industry and other fields is limited due to its poor aqueous solubility, volatility and easily degradation. In this study, in order to increase the stability and anti-*Candida* efficacy of BITC, nanostructured lipid carrier loaded with benzyl isothiocyanate from *C. papaya* seeds (BITC-NLC) was prepared by the melting emulsification ultrasonic method. The physicochemical properties such as morphology, particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency, drug loading, etc. were evaluated and its anti-*Candida* activity was investigated. On the basis of single factor influence test, the orthogonal design was adopted to choose the preparation process of nanostructured lipid carrier (NLC) and formulation of BITC-NLC. The best preparation process was stirring for 20 minutes and ultrasonic dispersion for 15 minutes (amplitude 80%). The best prescription was composed of 50 mg monostearate, 50 mg octyl capric acid triglyceride, 400 mg poloxamer, 400 mg soybean lecithin, 100 mg BITC and 20 mL ultrapure water. The morphology was observed by a transmission electron microscope, the particle size and zeta potential were measured by Zetasizer Nano ZSE, and the encapsulation efficiency and drug loading were analyzed by high performance liquid chromatography. The final prepared BITC-NLC was quasi-spherical shapes and the average particle size, Zeta potential and encapsulation efficiency was 79.13 nm, -21.77 mV and 91.52%, respectively. The preliminary stability test results showed that BITC-NLC was stable for 30 d kept at 25 °C. The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined using the broth dilution method. MICs of the BITC-NLC against all the selected *Candida* strains were 8–32 µg/mL, which were better than BITC. In addition, it could inhibit *C. albicans* and *C. tropicalis* that are resistant to the most commonly used antifungal drug - fluconazole. The new prepared formulation BITC-NLC from papaya seeds essential oil in this study has small particle size, good physical stability, high encapsulation efficiency and better antifungal effect on *C. albicans* and *C. tropicalis*. The results may provide theoretical and experimental basis for the application of papaya seeds which are abundant and typically discarded and the development of natural antifungal drugs.

Keywords: papaya seeds; essential oil; benzyl isothiocyanate; nanostructured lipid carrier; *Candida*

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.07.019

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 属十字花目番木瓜科, 广泛栽培于热带、亚热带地区, 在中国主要分布在海南、广东、广西、福建、台湾等地, 海南岛产量丰富, 其果实药食两用, 具有抗肿瘤、抗菌、抗氧化等多种生物活性^[1-2]。番木瓜籽是果实加工的副产物, 研究番木瓜籽成分及活性对其合理开发利用具有重要意义^[1-6]。课题组前期研究发现, 番木瓜籽挥发油的主成分为异硫氰酸苄酯 (benzyl isothiocyanate, BITC), 含量高达 99%, 具有天然、无污染、纯度高等特点, 且对多种假丝酵母菌 (包括耐药菌) 均具有明显的抑制作用^[7-8]。近年来, 以假丝酵母菌为代表的侵袭性真菌感染呈逐年上升趋势, 尤其是对免疫功能低下的患者, 其发病率和死亡率高, 而假丝酵母菌对常用抗真菌药物的耐药性日益提升, 成为临床治疗失败的重要原因^[9-10]。白假丝酵母菌 (*Candida albicans*, *Ca*) 是引起假丝酵母菌感染的主要种群, 但在热带及亚热带地区, 热带假丝酵母菌 (*C. tropicalis*, *Ct*) 已成为仅次于白假丝酵母菌的第二大假丝酵母菌^[11], 因此加快新型抗真菌药物的研制和开发具有重要意义^[12-14]。但由于 BITC 难溶于水、易

挥发、不稳定, 限制了其在医药、食品等各领域的应用。纳米结构脂质载体 (nanostructured lipid carriers, NLC) 作为一种新型的纳米制剂, 是以固态混合脂质材料为载体, 可保护挥发油免受外界环境的影响, 形成的纳米制剂粒径直径在 10~1000 nm 范围的药物传送系统, 可增加其稳定性、避免降解或泄露, 具有良好的缓控释作用及靶向性, 且可提高其抗菌活性^[15-18]。

本研究拟采用熔融乳化超声分散法制备番木瓜籽提取物异硫氰酸苄酯-纳米结构脂质载体 (BITC-NLC), 先通过单因素试验考察确定影响制剂制备工艺和处方组成的主要因素, 再采用正交试验方法进行优化, 从而制备得到 BITC-NLC, 以解决 BITC 在贮藏过程中对光、热、氧的不稳定性以及易挥发、低水溶性等缺点, 从形态、粒径及分布、Zeta 电位、包封率、载药量等方面对制剂进行初步表征和评价, 并研究比较 BITC-NLC 与 BITC 对假丝酵母菌 *Ca* 和 *Ct* 抗菌活性的差异, 探讨 BITC-NLC 的应用前景, 制备得到的天然抗真菌新剂型, 为番木瓜籽的合理开发和综合应用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

番木瓜籽挥发油：原材料采自海南，经海南医学院生药学杨卫丽教授鉴定，经本课题组提取得到浅黄色挥发油，经 GC-MS 检测 BITC 含量为 99.4%，4 ℃ 下密封保存。

试剂：单硬脂酸甘油酯（国药集团化学试剂有限公司）；辛癸酸甘油酯（上海麦克林生化科技有限公司，含量 $\geq 98.0\%$ ）；大豆卵磷脂（上海罗恩化学技术有限公司）；异硫氰酸苄酯（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，含量 $> 98.0\%$ ）；聚醚 F188（上海罗恩化学技术有限公司）；司班 80（天津市永大化学试剂有限公司）；吐温 80（天津市大茂化学试剂厂，分析纯）；乙腈（色谱纯，默克）；10 kDa 超滤离心管（密理博中国有限公司）；二甲基亚砜（DMSO，赛默飞世尔中国有限公司）；氟康唑（上海源叶生物科技有限公司，编号：YY10480-1g，含量 $\geq 99\%$ ）；RPMI 1640（Gibco）、SDA 培养基（广东环凯微生物科技有限公司）。实验所用水均为超纯水。

供试菌株：质控菌株 *Ca* ATCC 10231（广州环凯微生物科技有限公司），临床分离菌株有 *Ca* 53、*Ca* 27、*Ct* 68、*Ct* 112、*Ct* 56，经 ITS 基因序列测定确定。

仪器与设备：Zetasizer Nano ZSE 纳米粒度及电位仪（英国马尔文仪器有限公司）；HT-7800 透射电子显微镜（日本日立）；安捷伦 1260 液相色谱仪（美国安捷伦仪器有限公司）；JY92-IIDN 超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；RODI-160B1 超纯水仪（厦门锐思捷水纯化技术有限公司）；DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限公司）；Centrifuge 5430 台式离心机（德国艾本德）；Synergy HTX 多功能酶标仪（美国伯腾仪器有限公司）。

1.2 方 法

1.2.1 BITC-NLC 的制备 采用熔融乳化超声法制备 BITC-NLC。分别称取 50.0 mg 辛癸酸甘油酯，50.0 mg 单硬脂酸甘油酯和 100.0 mg BITC，70 ℃ 加热溶解作为油相，分别称取 400.0 mg 大豆卵磷脂和 400.0 mg 聚醚 F188，用 20 mL 水于 70 ℃ 溶解作为水相，在恒温磁力搅拌（800 r/min）下将水相缓慢滴入油相中，并持续搅拌 20 min 形成初乳。将初乳用探头超声（超声振幅 80%，开 5 s，

停 5 s）15 min 后，冰水浴冷却固化 2 min，过 0.22 μm 微孔滤膜即得 BITC-NLC。

1.2.2 BITC 含量测定 建立高效液相色谱法（high performance liquid chromatography, HPLC）测定 BITC-NLC 中的 BITC 含量。

（1）溶液配制。精密量取 BITC-NLC 50 μL 于 10 mL 容量瓶中加 7 mL 乙腈，涡旋 30 s 破乳，再加水定容至 10 mL，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得样品溶液。精密称取 BITC 约 10 mg 置于 100 mL 量瓶中，加乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，配制成 BITC 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品储备液。

（2）HPLC 条件。色谱柱 Aglient C_{18} 柱（250 mm \times 4.6 mm, 5 μm ），柱温 30 ℃；流动相乙腈：水（70：30, *V/V*）；流速 1.0 mL/min；检测波长 245 nm；进样量 10 μL 。

（3）系统适用性试验。取制备的空白制剂 NLC 和 BITC-NLC，按 1.2.2-（1）方法制备样品溶液和标准溶液，按 1.2.2-（2）方法进样检测并记录色谱图。

（4）线性关系考察。分别精密量取 1.2.2-（1）中制备的对照品储备溶液 3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 mL 于 5 mL 量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀作为系列标准溶液。按 1.2.2-（2）方法进样检测，以 BITC 峰面积（*A*）为纵坐标，浓度（*C*, $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）为横坐标，进行线性回归分析。

（5）计算最低定量限和检测限。取线性溶液最低点对照品溶液稀释，按 1.2.2-（2）方法进样检测，分别按照信噪比 *S/N*=10 及 *S/N*=3，计算 BITC 的最低定量限和检测限。

（6）重复性和稳定性试验。取制备的 BITC-NLC，按 1.2.2-（1）方法处理 6 份样品溶液，分别按 1.2.2-（2）方法进样检测，计算 BITC 含量的相对标准偏差（RSD）。取制备的 BITC-NLC，按 1.2.2-（1）方法处理样品溶液，于 0、2、4、8、12、24 h 进样检测，计算 BITC 含量的 RSD 值。

（7）加样回收率试验。制备含量相当于处方含量的 80%、100%、120% 的 BITC 对照品溶液，将其加入已知 BITC 含量的 NLC 样品溶液中，每个浓度 3 份，进样检测，计算得加样回收率及 RSD 值。

1.2.3 NLC 制备工艺的优化 采用熔融超声乳化法制备 NLC，预设处方后先摸索制备温度、

初乳形成的滴加速度等条件, 并采用单因素试验考察确定影响制备工艺的因素, 最终采用正交试验法优化 NLC 最佳制备工艺。

1.2.4 BITC-NLC 处方筛选 首先选择 BITC-NLC 处方中脂质及表面活性剂, 并采用单因素试验考察确定影响制备处方的因素, 最终采用正交试验优化 BITC-NLC 的最佳处方组成。

1.2.5 BITC-NLC 的形态观察 将制备的 BITC-NLC 用超纯水稀释后滴至铺有碳膜的铜网上, 静置 20 min, 用滤纸吸干混悬液, 用 2% 磷钨酸溶液 (pH 6.5) 负染 1 min, 风干后置于透射电子显微镜下观察 BITC-NLC 的形态并拍照。

1.2.6 BITC-NLC 的粒径分布及 Zeta 电位测定 将制备的 BITC-NLC 用超纯水稀释后, 采用纳米粒度及电位分析仪检测其粒径分布及 Zeta 电位, 平行测定 3 次, 取平均值。

1.2.7 BITC-NLC 包封率和载药量测定 精密量取 50 μL 制备的 BITC-NLC 于 10 mL 容量瓶中, 加 7 mL 乙腈, 涡旋 30 s 破乳, 再加水定容至 10 mL, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 按 1.2.2-(2) 方法进样检测, 并计算药物浓度及相应体积的质量, 平行测定 3 次; 精密吸取 1 mL 制备的 BITC-NLC 于超滤离心管中, 8000 r/min 离心 20 min 后, 在外管中精密量取 50 μL 游离药物溶液于 10 mL 容量瓶, 加 7 mL 乙腈再加水定容, 按 1.2.2-(2) 方法进样检测, 并计算游离药物浓度及相应体积的质量, 平行测定 3 次, 按以下公式计算包封率 (encapsulation efficiency, EE) 和载药量 (drug loading, DL):

$$EE = \frac{\text{系统中包封的药量}}{\text{总药量}} \times 100\%$$

$$DL = \frac{\text{系统中包封的药量}}{\text{总重量}} \times 100\%$$

1.2.8 BITC-NLC 稳定性考察 将 BITC-NLC 置于室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 下贮存 30 d, 在不同时间 (0、5、10、15、20、25、30 d) 观察其外观, 测定粒径、Zeta 电位及包封率, 评价其稳定性。

1.2.9 BITC-NLC 抗假丝酵母菌活性研究 采用微量稀释法 (M38-A2)^[19] 测定 BITC-NLC 和 BITC 对 *Ca* 和 *Ct* 的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 和最低杀菌浓度 (minimum fungicidal concentration, MFC)。将 *Ca* 和 *Ct* 接种、活化, 取无菌 96 孔平底微量培养板, 配制不同浓度的 BITC-NLC 和 BITC 溶液并加菌悬液后, 培养板置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 48 h, 观察结果。每次同时制备 1 个质控菌药敏板 (以 *Ca* ATCC 10231

为质控菌), 若质控菌药敏板中氟康唑 (fluconazole, FLZ) 的 MIC 值位于规定的范围, 即 0.25~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 则认为此次试验操作有效。判读 MIC 值方法: 与培养 48 h 的无药对照孔比较抑制率达到 50% 的最低药物浓度。设置 3 次重复, MIC 值取平均值。MFC 的测定以培养 72 h 后, 于清晰透明的微量试验孔和无药对照孔中各吸取 20 μL 菌悬液, 倾注在 SDA 平板上, 培养 48 h 后进行活菌计数, 小于 3 CFU 的最低药物浓度即 MFC。

1.3 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件进行正交试验设计, 并对结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 制剂含量分析方法的建立

2.1.1 系统适用性试验 由 BITC 标准溶液、BITC-NLC 和空白制剂 NLC 的 HPLC 色谱图 (图 1) 可知, 在设定的色谱条件下, BITC 出峰时间为 7.2 min, 与其他成分的分离良好, 空白样品无干扰。

2.1.2 线性试验 以 BITC 峰面积 (A) 为纵坐标, 浓度 (C , $\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标, 得回归方程: $A = 5.076 \times C + 0.052$ ($r = 0.9997$)。结果表明, BITC 在 2.0~64.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性关系良好。

2.1.3 最低定量限和检测限 按 $S/N=10$ 计, BITC 的最低定量限为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 按 $S/N=3$ 计, BITC 的最低检测限为 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.1.4 重复性和稳定性试验 重复性试验结果显示, BITC 含量的 RSD 值为 1.29%, 表明该方法重复性良好; 稳定性试验结果显示, BITC 含量的 RSD 值为 1.80%, 表明样品在 24 h 内稳定。

2.1.5 加样回收率试验 相当于处方含量 80%、100%、120% 的高、中、低 3 种浓度的平均加样回收率分别为 98.83%、100.34%、100.47%, RSD 值分别为 1.15%、1.63%、1.73%。

2.2 NLC 制备工艺的影响因素考察

采用熔融超声乳化法制备 NLC, 预设处方为 辛癸酸甘油酯 100 mg, 单硬脂酸甘油酯 100 mg, 大豆卵磷脂 200 mg, 聚醚 F188 400 mg, 20 mL 水进行制备工艺考察。

2.2.1 制备温度的选择 制备温度应在脂质熔点以上, 以保证药物和脂质在制备过程中保持熔融状态, 但温度过高药物易损失, 经试验观察, 确定温度为 70 $^{\circ}\text{C}$ 。

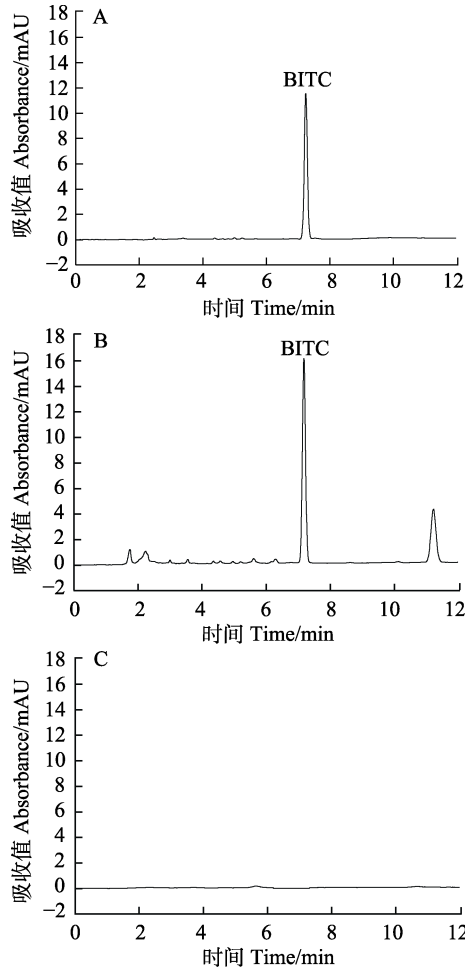


图 1 HPLC 色谱图
A: BITC 标准溶液; B: BITC-NLC; C: 空白 NLC。
A: BITC standard; B: BITC-NLC; C: Free NLC.

图 1 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms

2.2.2 初乳形成的滴加速度 在初乳形成过程中,滴加速度过快,脂质相和水相不能充分混合,难以得到均匀的分散液,经反复试验,最终确定 20 mL 水相滴加时间为 5 min。

2.2.3 制备工艺的正交试验 采用预设处方,制备温度在 70 °C,初乳滴加时间 5 min,选择超声时间、超声振幅、搅拌速率、搅拌时间 4 个因素进行单因素考察制备工艺,结果显示,搅拌速率对 NLC 的粒径及稳定性影响最小,因搅拌速度快时锥形瓶易倾倒,综合考虑粒径大小及操作等因素,搅拌速度定为 800 r/min,选择影响制备工艺的其他因素进行 L_93^3 的正交试验,其中 A 搅拌时间 (10、20、30 min)、B 超声振幅 (60%、80%、100%)、C 超声时间 (5、10、15 min),以平均粒径为实验指标进行统计分析,正交试验分析结果见表 1。由表 1 的方差结果可以看出,因素 C (超声时间)对制剂的粒径影响最显著,其次是

因素 B (超声振幅)、因素 A (搅拌时间),最优组合为 $A_3B_2C_3$,因搅拌时间对制剂的粒径影响无显著差异,且搅拌 20 min 和 30 min 时平均粒径基本相同,考虑到节省制备时间,最终选择搅拌时间为 20 min。因此最佳制备工艺为:初乳搅拌速率 800 r/min,搅拌时间 20 min,超声破碎振幅 80%,超声时间 15 min。按照最佳制备工艺平行制备 3 批 NLC,检测其平均粒径及分布,平均粒径为 (75.48 ± 0.68) nm, PDI 为 0.248 ± 0.012 。

表 1 制备工艺正交试验的方差分析
Tab. 1 ANOVA for experimental response of preparation proces in the L_93^3 matrix

编号 No.	因素 Factor			平均粒径 Average size/nm
	A	B	C	
1	3	3	1	90.54
2	1	2	3	80.03
3	3	1	3	87.39
4	1	3	2	85.66
5	2	3	3	76.65
6	3	2	2	81.12
7	2	2	1	91.67
8	2	1	2	91.15
9	1	1	1	101.83
偏差平方和	15.19	168.48	274.60	
自由度	2	2	2	
方差	7.60	84.24	137.30	
F	3.44	38.19	62.24	
临界值	$F_{0.05}=5.14, F_{0.01}=10.92$			
显著性		**	**	

注: **表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

2.3 BITC-NLC 处方筛选

2.3.1 脂质的选择 固态脂质是纳米制剂的重要组成部分,不仅能使纳米粒保持稳定,还可为其提供形态支撑,使其具有更好的缓释效果,而合适的液态脂质不仅能够提高制剂的载药量和包封率,还能使其更加稳定。通过查阅文献^[17-18],最终选择单硬脂酸甘油酯和辛癸酸甘油酯的固液混合脂质。

2.3.2 表面活性剂的选择 一般用亲水亲油平衡值 (hydrophilelipophile balance, HLB) 衡量表面活性剂分子的亲水和亲油程度。通常,HLB 值在 3~6 范围内适于 W/O 型乳液,在 8~18 范围内适于 O/W 型乳液,研究发现将高 HLB 值的表面活性剂和低 HLB 值的表面活性剂复合使用制备得

到的 NLC 效果最好。因此，本研究选用复合乳化剂（按 m/m 1 : 1 混合）大豆卵磷脂（HLB=10）与吐温 80（HLB=15）、大豆卵磷脂（HLB=10）与聚醚 F188（HLB=16）、司班 80（HLB=4.3）与吐温 80（HLB=15）、司班 80（HLB=4.3）与聚醚 F188（HLB=16）相比较，结果发现选用大豆卵磷脂（HLB=10）与聚醚 F188（HLB=16）作为混合乳化剂所制得的制剂为澄清透明溶液，其他为半透明或乳白色混悬液，因此选择大豆卵磷脂与聚醚 F188 作为混合乳化剂。

2.3.3 处方组成的正交试验 按照 2.2.3 优化得到的最佳制备工艺，选择脂质总量、固液脂质（单硬脂酸甘油酯和辛癸酸甘油酯）比例、复合乳化剂总量、复合乳化剂（大豆卵磷脂与聚醚 F188）的比例、挥发油用量共 5 个因素进行单因素试验，结果显示，固液脂质比例对制剂的平均粒径、Zeta 电位、包封率等影响均较小，因此以固液比例 1 : 1 (m/m)，选择其他 4 个影响处方工艺的因素进行 L_93^4 的正交试验，以平均粒径、Zeta 电位、包封率为实验指标进行统计分析，表 2 为正交因素水平，表 3 为正交试验及试验结果，表 4 为正交试验分析结果。

由表 4 的方差结果可以看出，4 个因素对 3 个实验指标中平均粒径的影响均为极显著，影响程度顺序为 $A>C>D>B$ ，因素 C、D、A 对 Zeta 电位的影响均为极显著，因素 B 对 Zeta 电位则无显著差异，其影响程度顺序为 $C>D>A>B$ ，因素 A、B、D 对包封率的影响均为极显著，因素 C 对其影响显著，影响程度顺序为 $A>B>D>C$ 。因素 A（脂质总量）对平均粒径和包封率的影响均最大，且均为极显著差异，对平均粒径的影响虽为极显著但相比其他 2 个实验指标影响较小，脂质总量越小，平均粒径越小，但包封率越小，而脂质总量增大对 Zeta 电位的影响是先增大后减小，综合考虑粒径和包封率，脂质总量选择 A_2 ；其次因素 B（复合乳化剂总量）对平均粒径和包封率影响均较大，且复合乳化剂总量越大，粒径越小，包封率越大，因此选择 B_3 ；因素 C（大豆卵磷脂与聚醚 F188 的比例）对平均粒径和 Zeta 电位影响大且为极显著差异，对包封率影响显著，综合考虑选择 C_1 ；因素 D（挥发油用量）对 3 个实验指标影响均较大，因此综合考虑选择 D_2 。最终的处方为：固液混合脂质单硬脂酸甘油酯 50.0 mg 和辛癸酸甘油酯 50.0 mg，大豆卵磷脂 400.0 mg，聚

表 2 处方工艺的正交因素水平
Tab. 2 Factors and levels of orthogonal design of formulation

水平 Level	因素 Factor			
	A 脂质总量 Lipid amount/%	B 复合乳化剂总量 Emulsifier amount/%	C 大豆卵磷脂与聚醚 F188 的比例 Ratio of lecithin to polyether F188	D 挥发油用量 Volatile oil amount/%
1	0.25	2.0	1 : 1	0.25
2	0.50	3.0	1 : 2	0.50
3	1.00	4.0	1 : 3	1.00

表 3 处方工艺正交试验及试验结果
Tab. 3 Orthogonal experiment and results of formulation

编号 No.	因素 Factor				结果 Result		
	A	B	C	D	平均粒径 Average size/nm	Zeta 电位 Zeta potential/mV	包封率 EE/%
1	3	2	3	1	90.59	-14.80	90.02
2	3	3	1	2	92.00	-22.50	99.74
3	2	1	3	2	76.29	-21.40	81.38
4	2	3	2	1	74.84	-19.00	87.63
5	2	2	1	3	100.16	-23.60	93.89
6	1	3	3	3	66.31	-15.00	88.25
7	1	1	1	1	74.43	-21.80	76.65
8	3	1	2	3	100.16	-17.50	90.87
9	1	2	2	2	71.63	-21.40	81.79

表 4 处方工艺正交试验的方差分析
Tab. 4 ANOVA for experimental response of formulation in L_93^4 matrix

指标 Index	因素 Factor	偏差平方和 SS	自由度 df	方差 MS	F	临界值 Critical value	显著性 Signification
粒径/nm	A	2486.40	2	1243.20	144.95	$F_{0.05}=3.55$, $F_{0.01}=6.01$	**
	B	433.19	2	216.59	25.25		**
	C	565.10	2	282.55	32.94		**
	D	476.93	2	238.46	27.80		**
Zeta 电位/mV	A	43.27	2	21.62	6.72		**
	B	9.84	2	4.92	1.53		
	C	141.45	2	70.70	21.97		**
	D	59.64	2	29.83	9.27		**
包封率/%	A	576.23	2	288.11	36.90		**
	B	364.98	2	182.49	23.37		**
	C	71.15	2	35.57	4.56		*
	D	175.40	2	87.70	11.23		**

注：*表示差异显著 ($P<0.05$)；**表示差异极显著 ($P<0.01$)。
Note: * indicates significant difference ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

醚 F188 400.0 mg, 挥发油 100.0 mg, 水 20.0 mL。

2.4 BITC-NLC 的形态表征

在透射电子显微镜下观察 BITC-NLC 的形态 (图 2), 由图 2 可知纳米粒呈类球形, 分布均匀, 无明显颗粒聚集现象。

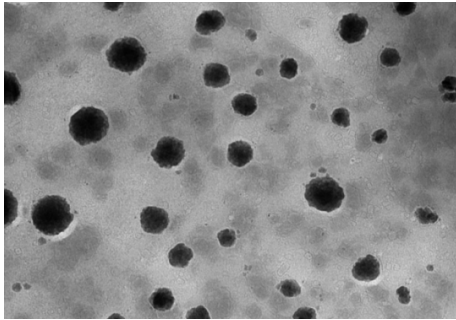


图 2 BITC-NLC 的透射电子显微镜图 (200 nm)

Fig. 2 Transmission electron micrographs of BITC-NLC (200 nm)

2.5 BITC-NLC 的粒径分布及 Zeta 电位

按照最佳处方和工艺平行制备 3 批 BITC-NLC, 检测其粒径分布 (图 3) 及 Zeta 电位 (图 4), BITC-NLC 粒度呈正态分布, 纳米粒径为 (79.13 ± 1.41) nm, PDI 为 0.248 ± 0.011 , 粒度大小均匀一致, Zeta 电位为 (-21.77 ± 1.16) mV, 说明该方法制备得到的 BITC-NLC 粒度分布均匀, 重现性好, 体系较稳定。

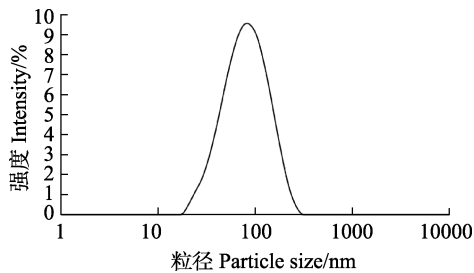


图 3 BITC-NLC 的粒径分布

Fig. 3 Particle size distribution of BITC-NLC

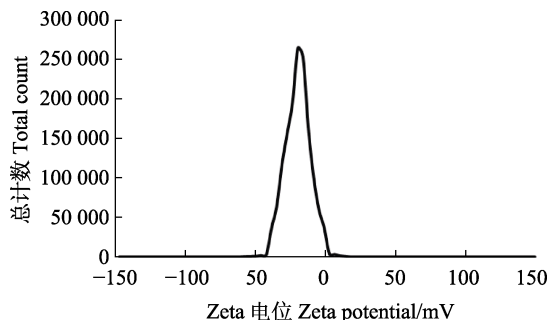


图 4 BITC-NLC 的 Zeta 电位分布

Fig. 4 Zeta potential distribution of BITC-NLC

2.6 BITC-NLC 的包封率和载药量

采用 HPLC 测定 3 批 BITC-NLC 的包封率为 $91.52\% \pm 0.60\%$, 符合药典标准 (不低于 80%)^[20], 载药量为 $9.15\% \pm 0.06\%$ 。

2.7 BITC-NLC 稳定性

将 BITC-NLC 置于室温 (25 °C) 下贮存 30 d, 在不同时间观察其外观, 结果发现 BITC-NLC 的外观在 30 d 时未发生明显变化, 粒径、Zeta 电位及包封率结果见表 5。BITC-NLC 的平均粒径稍有增大, 包封率虽有下降但在药典要求范围内, 说明该方法制备的制剂短期稳定性尚可。

表 5 BITC-NLC 的稳定性试验结果

Tab. 5 Stabilities results of BITC-NLC

时间 Time/d	平均粒径 Average size/nm	PDI	包封率 EE/%
0	79.13	0.248	91.52
5	79.18	0.253	91.19
10	79.05	0.254	90.93
15	80.37	0.259	89.87
20	81.12	0.258	87.93
25	83.56	0.261	86.11
30	83.62	0.264	83.20

2.8 BITC-NLC 抗假丝酵母菌活性

采用微量稀释法测定 BITC-NLC 和 BITC 对 6 株 *Ca* 和 *Ct* 的 MIC 和 MFC, 结果见表 6。其中 BITC-NLC 对供试菌株的 MIC 范围为 8.0~32.0 $\mu\text{g/mL}$, BITC 对供试菌株的 MIC 范围为 32.0~64.0 $\mu\text{g/mL}$, BITC-NLC 对供试菌株的 MIC 和 MFC 均低于 BITC, 这说明制备的新制剂 BITC-NLC 能增强 BITC 的抗假丝酵母菌的效果, 且其对耐药菌株 *Ca* 27 和 *Ct* 56 也具有抑制作用, 效果优于对照药物氟康唑 (FLZ)。

表 6 BITC-NLC 和 BITC 的抗假丝酵母菌活性

Tab. 6 Antifungal activity of BITC-NLC and BITC against *Candida* strains $\mu\text{g/mL}$

菌株 Strain	BITC-NLC		BITC		FLZ	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>Ca</i> ATCC 10231	8.0	16.0	32.0	64.0	0.1	32.0
<i>Ca</i> 53	8.0	16.0	32.0	64.0	0.1	32.0
<i>Ca</i> 27	16.0	32.0	64.0	128.0	>64.0	>64.0
<i>Ct</i> 68	16.0	32.0	64.0	256.0	0.3	>64.0
<i>Ct</i> 112	16.0	32.0	64.0	256.0	1.0	>64.0
<i>Ct</i> 56	32.0	64.0	64.0	256.0	>64.0	>64.0

3 讨论

近年来,以假丝酵母菌为代表的侵袭性真菌感染呈逐年上升趋势,尤其是对某些严重的免疫缺陷患者如艾滋病、中性白细胞减少等,以及恶性肿瘤患者、器官移植受者等,其发病率和死亡率高,给临床治疗带来很大困难。白假丝酵母菌(*Ca*)是引起假丝酵母菌感染的主要种群,但在热带及亚热带地区,热带假丝酵母菌(*Ct*)已成为仅次于*Ca*的第二大假丝酵母菌。目前,由于以氟康唑为代表的唑类抗真菌药物在临床上的广泛使用,使真菌耐药性大大增加,例如WU等^[11]研究了海南的211例头颈癌患者中假丝酵母菌的感染情况,其中*Ct*的感染率仅次于*Ca*,为22.6%,其中氟康唑耐药率高达14.3%。这种临床真菌的耐药性常常导致治疗失败,尤其是对免疫功能低下的患者容易导致深部真菌感染而成为患者死亡的主要原因之一^[9-10],因此,针对抗真菌药物的耐药性问题,目前的研究一方面要探讨抗真菌药物产生耐药性的机制,采用2种或多种药物联合应用来解决真菌耐药性的问题,另一方面是加快新型抗真菌药物的研制和开发^[12-14]。本课题组前期研究发现,番木瓜籽挥发油的主成分为异硫氰酸苜酯(BITC),含量高达99%,具有天然、无污染、纯度高等特点,且对多种假丝酵母菌均具有明显的抑制作用^[7-8]。但由于BITC水溶性差、易挥发、易降解等缺点,限制了其应用。

针对BITC的上述缺点,在以往研究中大多采用饱和水溶液法以环糊精为壁材对BITC进行包合,如LI等^[21]采用 β -环糊精对BITC进行包合,以增加其溶解度,提高热稳定性,减缓释放速率,从而达到延长其防腐抑菌的效果和目的,该课题组^[22]采用相同方法以 β -环糊精的衍生物羟丙基- β -环糊精为壁材对BITC进行包埋也达到了延长抑菌效果的作用。王家平^[23]也采用羟丙基- β -环糊精将BITC进行包合得到包封率达到78%的包合物后,再以羟丙甲纤维素为主的凝胶骨架材料将包合物进行压片制成胃悬浮片,该研究的主要目的是掩盖BITC的刺激气味,延长其半衰期,减少给药次数,提高癌症患者的顺应性。LIU等^[24]采用饱和水溶液法将3种异硫氰酸酯(包括BITC)与 γ -环糊精形成的包合物,其中BITC与 γ -环糊精形成的包合物延长了BITC对金黄色葡萄球菌的抗菌作用,经包合物处理的金黄色葡萄球菌的

毒力基因的表达显著下调,并通过模型预测了该包合物在熟鸡胸肉中抑制金黄色葡萄球菌的情况。该课题组^[25]使用 α -环糊精并加入壳聚糖对BITC进行包合,延长了抗菌能力,增强了抗氧化活性,该包合物可作为食品包装材料特别是在牛肉保鲜方面具有开发应用的潜力。

以上采用环糊精对BITC包合的研究大多关注于BITC在食品抑菌包装材料方面的开发应用,其存在制备时间长(搅拌时间为3~7h),且使用有机溶剂乙醇,包封率低等问题。UPPAL等^[26]改进以上方法,采用超声波均质机超声900s制备 β -环糊精及羟丙基- β -环糊精的BITC包合物,大大缩短了制备时间,但仍需使用有机溶剂。田甜等^[27]以大豆分离蛋白-磷脂酰胆碱作为表面活性剂,以BITC与大豆油混合物作为油相,采用射流空化技术制备纳米乳液,目的为扩大BITC在食品行业抗菌中的应用。该方法得到的纳米乳的平均粒径为252nm,Zeta电位为-27.2mV,通过射流空化提高了乳液体系的冻融稳定性,但该方法对设备要求较高。

本研究采用融熔乳化超声法^[15]制备得到纳米制剂BITC-NLC,该方法具有操作步骤简单、制备时间短、不使用有机溶剂、对试验设备要求不高、实验重复性良好等优点。研究先确定了制备温度及初乳形成的滴加速度,选择超声时间、超声振幅、搅拌速率、搅拌时间4个因素进行单因素影响试验优化制备工艺,最终选择3个主要因素进行正交试验设计得到最佳制备工艺:制备温度70℃,初乳搅拌速率800r/min,搅拌时间20min,超声破碎振幅80%,超声时间15min。采用同样方法优化BITC-NLC的处方组成,首先对脂质及表面活性剂进行筛选,选择脂质总量、固液脂质(单硬脂酸甘油酯和辛酸甘油酯)比例、复合乳化剂总量、复合乳化剂(大豆卵磷脂与聚醚F188)的比例、挥发油用量5个因素进行单因素影响试验后,选择4个主要因素进行正交试验,最终处方组成为:辛酸甘油酯50.0mg,单硬脂酸甘油酯50.0mg,异硫氰酸苜酯100.0mg,大豆卵磷脂400.0mg,聚醚F188400.0mg,蒸馏水20.0mL。对该制剂从外观、形态、粒径、Zeta电位、包封率、载药量等方面进行表征和评价,该制剂形态呈类球形,分布均匀,粒径小,平均粒径为79.13nm,Zeta电位为-21.77mV,体系稳定,包封率高,为91.52%,30d短期稳定性良好。

本研究在制备得到新的制剂 BITC-NLC 后, 采用微量稀释法研究了 BITC-NLC 和 BITC 对假丝酵母菌中具代表性的 *Ca* 和 *Ct* 的抑制作用, 结果表明 BITC-NLC 的抗假丝酵母菌的活性强于 BITC, 这可能是因为新制剂 BITC-NLC 将 BITC 保护起来增强了稳定性, 且具有缓控释作用, 因此增强了 BITC 的抑菌效果。更重要的是 BITC-NLC 对 *Ca* 和 *Ct* 的耐药菌株也具有抑制作用, 且效果优于对照药物氟康唑 (FLZ)。这为日益严峻的假丝酵母菌对常用抗真菌药物的耐药问题提供了新的解决方案, 也为番木瓜籽的合理开发和综合应用提供了依据。

4 结论

本研究在单因素影响试验的基础上, 通过正交试验优化法采用熔融乳化超声分散法制备得到番木瓜籽挥发油纳米结构脂质载体, 具体制备流程和处方如下: 辛酸甘油酯 50.0 mg, 单硬脂酸甘油酯 50.0 mg, 异硫氰酸苄酯 100.0 mg, 在 70 °C 加热溶解作为油相, 大豆卵磷脂 400.0 mg 和聚醚 F188 400.0 mg 加水至 20.0 mL 于同温度下溶解作为水相, 在 800 r/min 搅拌下将水相缓慢滴入油相中, 并持续搅拌 20 min 形成初乳, 用探头超声(超声振幅 80%) 15 min 后冰水浴固化过滤即得。该制剂经表征和评价后, 粒径小, 稳定性好, 包封率高, 对假丝酵母菌尤其是耐药菌株的抑制作用强。本研究不仅得到了天然抗真菌的新剂型, 更为产量高且多被丢弃的番木瓜籽的合理开发和利用提供了依据。

参考文献

- [1] VIJ T, PRASHAR Y. A review on medicinal properties of *Carica papaya* Linn.[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2015, 5(1): 1-6.
- [2] 曾广琳, 施瑞城, 陈文学, 潘永贵, 魏静, 赵宏亮, 张伟敏. 不同干燥方法对番木瓜粉品质及抗氧化活性的影响[J]. 热带作物学报, 2018, 39(3): 581-587.
ZENG G L, SHI R C, CHEN W X, PAN Y G, WEI J, ZHAO H L, ZHANG W M. Effects of different drying methods on quality and antioxidant activity of papaya powder[J]. Journal of Tropical Crops, 2018, 39(3): 581-587. (in Chinese)
- [3] ÁVILA S, KUGO M, HORNUNG P S, APEA-BAH F B, SONGOK E M, BETA T. *Carica papaya* seed enhances phytochemicals and functional properties in cornmeal porridges[J]. Food Chemistry, 2020, 323: 126808.
- [4] AGADA R, THAGRARIKI D, LYDIA D E, KHUSRO A, ALKAHTANI J, SHAQHA M M A, ALWAHIBI M S, ELSHIKH M S. Antioxidant and anti-diabetic activities of bioactive fractions of *Carica papaya* seeds extract[J]. Journal of King Saud University Science, 2021, 33(2): 101342.
- [5] 朱明月. 番木瓜种子提取物异硫氰酸苄酯对肝癌细胞恶性行为的影响及其作用机制[D]. 海口: 海南大学, 2015.
ZHU M Y. Effect of benzyl isothiocyanate extract from papaya seed on the malignant behavior of hepatocellular carcinoma cells and its mechanism[D]. Haikou: Hainan University, 2015. (in Chinese)
- [6] GHAFARILALEH V, FISHE D, HENKEL R. *Carica papaya* seed extract slows human sperm[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2019, 241: 111972.
- [7] 应泽茜, 周丽娟, 赵诗景, 王林泉, 吴亚娟, 何小稳. 海南产番木瓜籽挥发油的稳定性及抗假丝酵母菌活性的研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(6): 1323-1325.
YING Z X, ZHOU L J, ZHAO S J, WANG L X, WU Y J, HE X W. Study on stability and anti-*Candida* activity of volatile oil of papaya seed from Hainan[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2017, 28(6): 1323-1325. (in Chinese)
- [8] 易国辉, 张菁芸, 姚孟霞, 陈锦萍, 何小稳. 番木瓜籽提取物对白色念珠菌及菌丝特异性基因表达的研究[J]. 海南医学, 2019, 30(1):19-21.
YI G H, ZHANG J Y, YAO M X, CHEN J P, HE X W. Study on specific gene expression of *Candida albicans* and mycelia in papaya seed extract[J]. Hainan Medical Journal, 2019, 30(1):19-21. (in Chinese)
- [9] LI M C, TANG H J, WU C J, WANG S W, CHEN Y C. Species identification and antifungal susceptibility of uncommon blood yeast isolates[J]. Journal of Microbiology Immunology and Infection, 2022, 55: 130-137.
- [10] DAHIYA S, SHARMA N, PUNIA A, CHOUDHARY P, GULIA P, PARMAR V S, CHHILLAR A K. Antimycotic drugs and their mechanisms of resistance to *Candida* species[J]. Current Drug Targets, 2022, 23(2): 116-125.
- [11] WU J Y, GAN C W, LI J Y, LIU Y W, CHEN Z Y, ZHANG Y X, YI G H, SUI J L, XU J P. Species diversity and antifungal susceptibilities of oral yeasts from patients with head and neck cancer[J]. Infection and Drug Resistance, 2021, 14: 2279-2288.
- [12] PRISTOV K E, GHANNOUM M A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2019, 25(7): 792-798.
- [13] MUSHI M F, BADER O, TAVERNE-GHADWAL L, BII C, UWE G, MSHANA S E. Oral candidiasis among African

- human immunodeficiency virus-infected individuals: 10 years of systematic review and meta-analysis from Sub-Saharan Africa[J]. *Journal of Oral Microbiology*, 2017, 9(1): 1317579.
- [14] 周杰, 刘璐, 邱盛敏, 杨熙贤, 胡一晨. 不同产地花椒精油的化学成分分析及花椒精油固体制剂的抗真菌作用考察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(2): 153-160.
ZHOU J, LIU L, QIU S M, YANG X X, HU Y C. Analysis of chemical constituents of essential oil of prickly ash from different producing areas and study of antifungal activity of solid preparation of prickly ash essential oil[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Formulae*, 2021, 27(2): 153-160. (in Chinese)
- [15] 朱子昊, 卢晓明. 纳米结构脂质载体的制备、表征及其在食品领域的研究进展[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(12): 311-322.
ZHU Z H, LU X M. Preparation, characterization and research progress of nanostructured lipid carrier in food field[J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2021, 21(12): 311-322. (in Chinese)
- [16] 高彩芳, 夏加璇, 朱颖, 任宏伟, 洪超, 陆伟根, 王建新. 纳米技术在改善中药有效成分成药性中的应用[J]. *中草药*, 2018, 49(12): 2754-2762.
GAO C F, XIA J X, ZHU Y, REN H W, HONG C, LU W G, WANG J X. Application of nanotechnology in improving medicinal properties of effective components of Chinese medicine[J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2018, 49(12): 2754-2762. (in Chinese)
- [17] RANPISE N, KORABU S, GHODAKE V. Second generation lipid nanoparticles (NLC) as an oral drug carrier for delivery of lercanidipine hydrochloride[J]. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2014, 116(14): 81-87.
- [18] ZARDINI A A, MOHEBBI M, FARHOOSH R, BOLURIAN S. Production and characterization of nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles containing lycopene for food fortification[J]. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 2018, 55(1): 287-298.
- [19] Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts, 2nd Edition[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA 2009.
- [20] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 9014.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 2020 edition (IV)[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 9014. (in Chinese)
- [21] LI W Z, LIU X Y, YANG Q F, ZHANG N, DU Y D, ZHU H P. Preparation and characterization of inclusion complex of benzyl isothiocyanate extracted from papaya seed with β -cyclodextrin[J]. *Food Chemistry*, 2015, 184: 99-104.
- [22] 李文钊, 杜依登, 史宗义, 时瀛洲, 阮美娟, 朱华平. 异硫氰酸苄酯羟丙基- β -环糊精包埋物理化特性研究[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(12): 74-78.
LI W Z, DU Y D, SHI Z Y, SHI Y Z, RUAN M J, ZHU H P. Study on the properties of an inclusion complex of hydroxypropyl- β -cyclodextrin and benzyl isothiocyanates[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(12): 74-78. (in Chinese)
- [23] 王家平. 异硫氰酸苄基酯包合物胃漂浮片的制备[D]. 湛江: 广东医学院, 2016.
WANG J P. Preparation of stomach buoyant tablets containing benzyl isothiocyanate inclusions[D]. Zhanjiang: Guangdong Medical University, 2016. (in Chinese)
- [24] LIU J N, WU H Y, AO X Y, HAO H S, BI J R, HOU H M, ZHANG G L. Characterization of the inclusion complexes of isothiocyanates with γ -cyclodextrin for improvement of antibacterial activities against *Staphylococcus aureus*[J]. *Foods*, 2022, 11(1): 60.
- [25] WU H Y, AO X Y, LIU J N, ZHU J Y, BI J R, HOU H M, HAO H S, ZHANG G L. A bioactive chitosan-based film enriched with benzyl isothiocyanate / α -cyclodextrin inclusion complex and its application for beef preservation[J]. *Foods*, 2022, 11(7): 2687.
- [26] UPPAL S, KAUR K, KUMAR R, KAHOLON N K, SINGH R, MEHTA S K. Encompassment of benzyl isothiocyanate in cyclodextrin using ultrasonication methodology to enhance its stability for biological applications[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, 39: 25-33.
- [27] 田甜, 周艳, 高悦, 李杨, 王中江, 李良. 异硫氰酸苄酯纳米乳液射流空化制备与冻融稳定性研究[J]. *农业机械学报*, 2019, 50(10): 337-342, 351.
TIAN T, ZHOU Y, GAO Y, LI Y, WANG Z J, LI L. Investigation on freeze-thaw stability of bitc nanoemulsion and its preparation by jet-cavitation[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2019, 50(10): 337-342, 351. (in Chinese)