

DOI:10.11918/201907024

α -生育酚脂质体的配方优化及其稳定性分析

徐伟丽¹, 朱元昊¹, 张玉琪¹, 唐寅朝¹, 韩晓军²

(1. 哈尔滨工业大学 化工与化学学院, 哈尔滨 150001; 2. 城市水资源与水环境国家重点实验室
(哈尔滨工业大学), 哈尔滨 150001)

摘要: 为保护 α -生育酚的活性并提高其稳定性,以蛋黄卵磷脂和胆固醇为壁材,吐温80作乳化剂,采用薄膜水化法制备 α -生育酚脂质体。以包封率、粒径及Zeta电位为考察指标,通过单因素试验分析磷脂与胆固醇的质量比、磷脂与 α -生育酚质量比及无水乙醇体积对脂质体质量的影响。在单因素实验的基础上,以包封率为响应值,采用响应面法优化 α -生育酚脂质体的配方,并探究各个因素对其稳定性的影响。结果表明, α -生育酚脂质体制备的最优工艺参数为:磷脂质量为280.00 mg,磷脂与胆固醇的质量比为6.22:1,磷脂与 α -生育酚的质量比为18.70:1,无水乙醇体积为14.65 mL。在此条件下脂质体包封率为 $87.39 \pm 1.12\%$,平均粒径为 181.30 ± 3.45 nm (PDI = 0.201 ± 0.013),Zeta电位值为 -38.90 ± 0.32 mV。通过电镜观察 α -生育酚脂质体为球形结构,大小均匀且有较好的分散性。稳定性分析显示脂质体在蔗糖浓度为0.5%及以下时可以很好地保持稳定,但pH、离子浓度、加热温度及时间、储藏温度及时间均显著影响其稳定性。结果表明脂质体可以很好的保持 α -生育酚的活性并提高其生物利用率,有效扩大产品的应用范围。

关键词: α -生育酚;脂质体;响应面分析;保留率;稳定性

中图分类号: TS218

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2020)12-0116-10

Optimization of formula for α -tocopherol liposomes and their stability analysis

XU Weili¹, ZHU Yuanhao¹, ZHANG Yuqi¹, TANG Yinzhao¹, HAN Xiaojun²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China;

2. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment (Harbin Institute of Technology), Harbin 150001, China)

Abstract: To protect the activity of α -tocopherol and improve its stability, α -tocopherol liposomes were prepared by using thin film hydration method with egg yolk lecithin and cholesterol as wall materials and Tween 80 as emulsifier. The effects of the mass ratio of phospholipids to cholesterol, the mass ratio of phospholipids to α -tocopherol, and the volume of absolute ethanol on the quality of liposomes were analyzed by single factor experiments with the entrapment efficiency, particle size, and Zeta potential as indexes. Based on the single factor experiments, response surface methodology was adopted to optimize the formula of α -tocopherol liposome with the entrapment efficiency of α -tocopherol as response value, and the influence of different factors on the stability of α -tocopherol liposomes was investigated. Results show that the optimum parameters for the preparation of α -tocopherol liposome were as follows: phospholipid, 280.00 mg; mass ratio of phospholipids to cholesterol, 6.22:1; mass ratio of phospholipids to α -tocopherol, 18.70:1; absolute ethanol, 14.65 mL. Under these conditions, the entrapment efficiency of α -tocopherol liposomes was $87.39 \pm 1.12\%$, the average particle size was 181.30 ± 3.45 nm (PDI = 0.201 ± 0.013), and the Zeta potential value was -38.90 ± 0.32 mV. The spherical structure of α -tocopherol liposomes, which has uniform size and good dispersion, was observed by electron microscope. Stability analysis results suggest that liposomes could be well stabilized at a sucrose concentration of 0.5% or less, but pH, ion concentration, heating temperature and time, as well as storage temperature and time all significantly affected the stability. The study indicates that liposomes can maintain the activity of α -tocopherol and improve its bioavailability to effectively expand the range of applications.

Keywords: α -tocopherol; liposomes; response surface analysis; conserving rate; stability

α -生育酚(α -tocopherol, α -TOC)是动物生长发

育过程中必需的脂溶性维生素^[1],具有很强的抗氧化性及抗癌、防衰老、增强免疫力等生理功能^[2],常作为营养强化剂及抗氧化剂应用于食品、医药及化妆品行业。然而, α -TOC水溶性差且易受光、氧、热等因素的干扰^[3],进入人体后吸收利用率低^[4],这使其在应用方面存在局限性。

收稿日期: 2019-07-03

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(31501481);国家重点研发计划(MB20170173)

作者简介: 徐伟丽(1977—),女,博士,副教授;
韩晓军(1975—),男,教授,博士生导师

通信作者: 韩晓军,hanxiaojun@hit.edu.cn

脂质体是磷脂双分子层定向排列成的一种小型囊泡,对人体无免疫原性,可以明显改善非水溶性营养素的溶解情况^[4]并提高其有效载量和生物利用率^[5-7],广泛应用于食品、化妆品和医药产业^[8-9]。但由于脂质体进入人体后极易被分解代谢,因此需要改变其膜材选用及制备工艺以提高其质量和应用价值。磷脂(Phosphatidylcholine, PC)是构成脂质体膜的常用材料,蛋黄卵磷脂与目前常用的大豆卵磷脂相比具有更好的稳定性^[10],且有研究表明,胆固醇(Cholesterol, CHOL)作为脂质体制备的附加剂可以有效提高脂质体稳定性和内部药物的生物利用率^[11]。因此本文以蛋黄卵磷脂和胆固醇为壁材,结合单因素实验与响应面分析法优化 α -TOC 脂质体制备工艺,并在此条件下研究糖浓度、盐浓度、离子浓度、pH、加热温度及时间、储藏温度及时间对脂质体稳定性的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

α -TOC:美国 Sigma 公司;蛋黄卵磷脂:国药集团化学试剂有限公司;胆固醇:北京索莱宝科技有限公司;无水乙醇、蔗糖、NaCl、HCl、NaOH(均为分析纯试剂):天津市天力化学试剂有限公司;吐温 80:天津市光复精细化工研究所;PBS 缓冲液:北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

BSA223S 电子分析天平:赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;UV-2100 紫外可见分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司;TGL-16G 台式高速离心机:上海安亭科技有限公司;HHS-11-4 电热恒温水浴锅:常州市人和仪器厂;BCD-221 冰箱:河南新飞电器集团有限公司;RE 52-05 真空旋转蒸发器:上海亚荣生化有限公司;pHS-3C 电子 pH 计:上海伟业仪器厂;QL-902 漩涡震荡仪:海门其林贝尔仪器制造有限公司;HZS-HA 恒温振荡器:哈尔滨东联电子技术开发有限公司;Zetasiter Nano ZS90 纳米粒度仪,Bohlin Gemini II 旋转流变仪:英国 Malvern 公司;79-3 恒温磁力搅拌器上海司乐仪器厂;S3400N 扫描电子显微镜:日立高新技术公司。

1.3 方 法

1.3.1 α -TOC 脂质体的制备

通过薄膜水化法制备脂质体^[12]。将 100 mg 蛋黄卵磷脂、20 mg 胆固醇、10 mg α -TOC、100 mg 吐温 80 溶于 5 mL 无水乙醇中,55 °C 水浴搅拌 15 min 后 50 °C 减压蒸发 1 h。加入 pH = 7.4 的磷酸缓冲液

20 mL,40 °C 旋转蒸发 1 h。将样品 4 °C 超声 2 min 并过 0.45 μ m 滤膜,静置后得到 α -TOC 常规脂质体混悬液,4 °C 避光保存。

1.3.2 单因素实验

固定其他条件,按上述制备方法分别改变 PC 与 CHOL 的质量比、PC 与 α -TOC 的质量比、无水乙醇(EA)的体积制备脂质体进行单因素实验。室温静置 2 h 后观察脂质体混悬液的状态,4 °C 避光 24 h 后以包封率、粒径大小及分布、Zeta 电位为指标考察 PC、 α -TOC、CHOL 的质量比及无水乙醇体积对脂质体质量的影响。

1.3.3 响应面实验设计

在单因素实验的基础上,以 α -TOC 脂质体的包封率为响应值,采用三因素三水平的响应面实验设计进一步优化配方。各因素及水平实验设计见表 1。

表 1 因素与水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	EA 体积/mL	PC: CHOL/(w·w ⁻¹)	PC: α -TOC/(w·w ⁻¹)
-1	10	5:1	15:1
0	15	6:1	20:1
1	20	7:1	25:1

1.3.4 α -TOC 脂质体表 征及稳定性分析

1.3.4.1 形态学及结构观察

将冻干后的脂质体喷金,在 S3400N 扫描电镜下(加速电压为 104 kV)观测其外部形态。

1.3.4.2 α -TOC 标准曲线的绘制

精确称取 α -TOC 100 mg 溶于正己烷,并于 100 mL 容量瓶中定容以配制 1 mg/mL 的标准溶液。分别吸取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 g 标准溶液于 10 mL 容量瓶中定容。以正己烷作空白对照,于 290 nm 处测定吸光度。以 α -TOC 浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,所得回归方程为 $y = 0.003 6x + 0.028 7$, $R^2 = 0.997 7$ 。

1.3.4.3 α -TOC 包封率的测定

通过有机溶剂萃取法测定脂质体包封率。取 0.4 g α -TOC 脂质体混悬液于 15 mL 离心管中,加入 4 g 正己烷(0.685 mg/mL),涡旋 2 min 后机械震荡 10 min,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液测定吸光度。实验重复 3 次。将吸光度值代入 α -TOC 标准曲线计算其含量,按下式计算脂质体包封率。

$$\text{包封率} = (C_a - C_b) / C_a \times 100\%$$

式中: C_a 为样品中 α -TOC 总体积分数, μ g/mL; C_b 为正己烷中游离 α -TOC 的体积分数, μ g/mL。

1.3.4.4 Zeta 电位和粒径的测定

取 4 ℃ 避光储藏 24 h 的 α -TOC 脂质体 0.1 g, 用蒸馏水稀释到 1% (w/w). 用 Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度仪室温测定稀释脂质体的粒径和电位.

1.3.4.5 α -TOC 保留率 (conserving rate) 测定

保留率是指处理前后脂质体含 α -TOC 量的比值. 测定方法同 α -TOC 包封率 (entrapment efficiency) 的测定, 具体计算公式如下:

$$\text{保留率} = C_r / C_0 \times 100\%$$

式中: C_0 为初始状态下脂质体中 α -TOC 体积分数, $\mu\text{g}/\text{mL}$; C_r 为经实验条件处理后脂质体中 α -TOC 体积分数, $\mu\text{g}/\text{mL}$.

1.4 数据处理与分析

结果表示为 3 次独立实验结果的平均值 \pm SD, 采用 Microsoft Excel 2016 软件进行数据统计分析, 采用 Design Expert 8.0 软件进行响应面的方差分

析, 采用 LSD-T 检验进行显著性分析, $P < 0.05$ 为显著水平.

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 PC 与 CHOL 的质量比对脂质体性质的影响

脂质体的壁材主要是 PC 和 CHOL, 二者的比例显著影响脂质体性质. 固定 PC 与 α -TOC 的质量比为 10:1, 改变 PC 与 CHOL 的质量比制备脂质体并测定其性质, 结果如图 1 所示. 结果表明, 在质量比为 2:1 时溶液浑浊, 颜色暗沉, 出现轻微絮凝. 其他比例脂质体混悬液均呈乳白色且均一稳定, 粒径大小及分布比较均匀. 在 PC 与 CHOL 质量比为 3:1 ~ 6:1 时, 包封率随 CHOL 加入量的增加而上升, 在质量比为 6:1 时达到最高 ($84.20 \pm 1.42\%$).

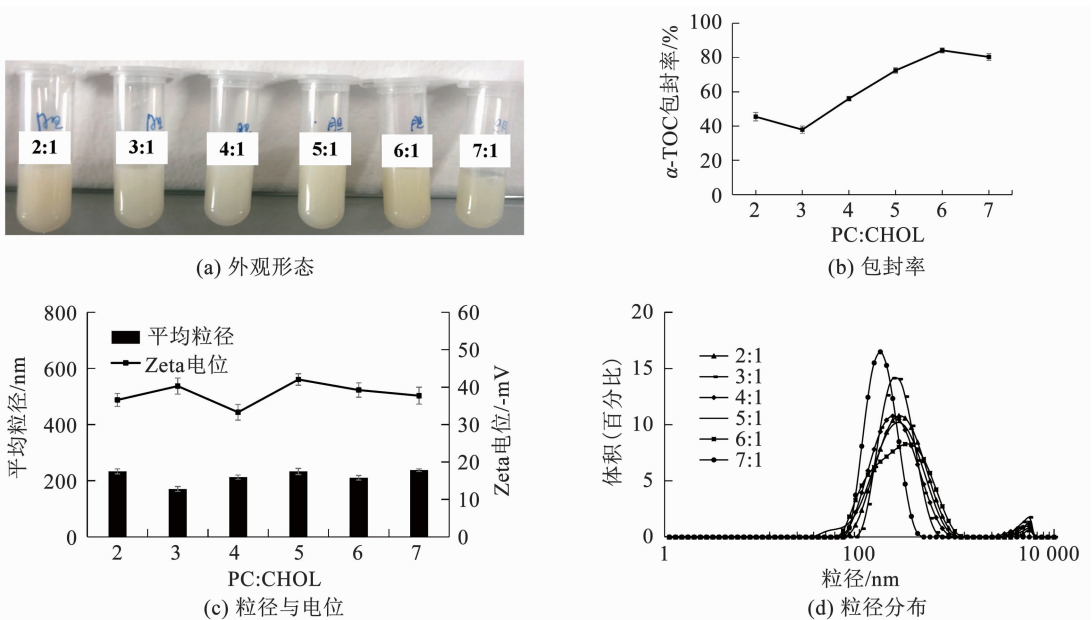


图 1 不同配比 CHOL 的脂质体性质比较

Fig. 1 Comparison of liposome properties of different lecithin/cholesterol ratio

2.1.2 PC 与 α -TOC 质量比对脂质体性质的影响

固定 PC 与 CHOL 的质量比为 6:1, 改变 PC 和 α -TOC 的质量比制备脂质体并测定其性质, 结果如图 2 所示. 各组脂质体混悬液静置 2 h 后均未发生絮凝或分层, 其中当 PC 与 α -TOC 质量比为 20:1 时脂质体呈乳白色, 乳光现象最明显, 包封率最高 ($85.1 \pm 1.48\%$).

2.1.3 无水乙醇体积对脂质体性质的影响

固定 PC 与 CHOL 质量比为 6:1, PC 与 α -TOC 质量比为 20:1, 改变无水乙醇 (EA) 体积制备脂质体并测定其性质, 结果如图 3 所示. 新鲜制备的各组

脂质体混悬液均呈乳白色, 乳光现象明显且无絮凝. 放置 2 h 后, 无水乙醇添加量为 2.5 mL 的脂质体明显分层且包封率最低 ($42.40 \pm 1.96\%$), 当添加量为 15 mL 时包封率 ($85.20 \pm 1.45\%$) 最高, Zeta 电位绝对值 ($39.10 \pm 1.11 \text{ mV}$) 较高, 平均粒径在 200 nm 左右 ($\text{PDI} = 0.203 \pm 0.014$).

2.2 响应面分析实验结果及脂质体表征

2.2.1 响应面法优化 α -TOC 脂质体制备工艺

根据单因素实验结果, 以 α -TOC 脂质体的包封率为响应值进行三因素三水平响应面分析实验, 实验结果见表 2.

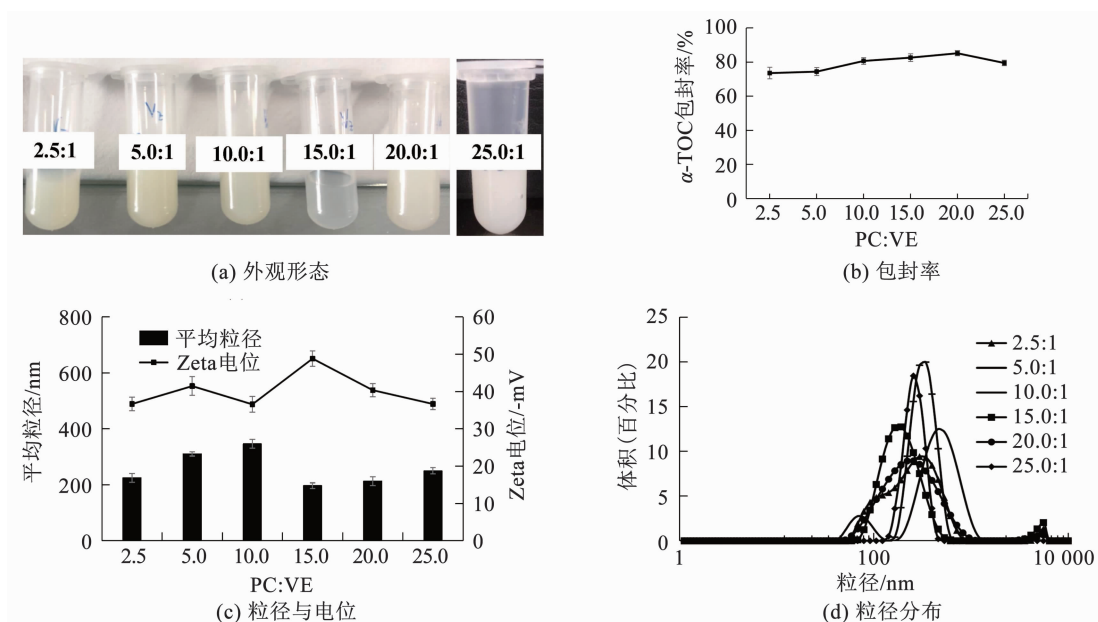


图 2 不同配比 α -TOC 的脂质体性质比较

Fig. 2 Comparison of liposome properties of different lecithin/ α -tocopherol ratio

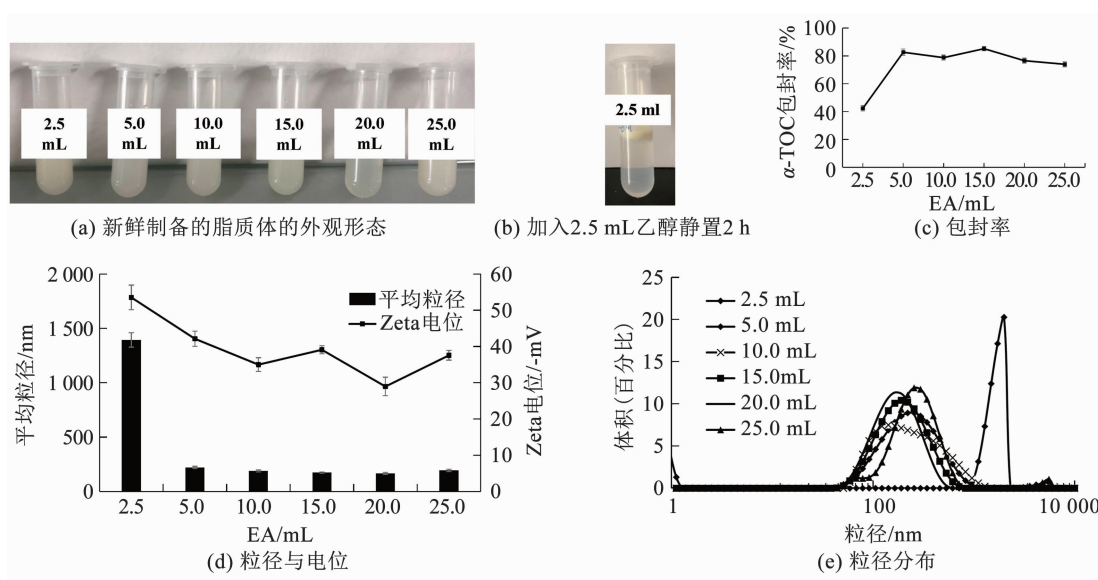


图 3 不同体积无水乙醇的脂质体性质比较

Fig. 3 Comparison of liposome properties of different volumes of absolute ethanol

对上述实验结果进行回归拟合分析, 建立数学模型, 得到以包封率 Y 为因变量, X_1 、 X_2 、 X_3 为自变量的二次多项回归方程, 得到的回归方程为

$$Y = 86.25 - 0.44X_1 + 0.95X_2 - 0.76X_3 + 0.34X_1X_2 + 0.59X_1X_3 - 0.05X_2X_3 - 2.92X_1^2 - 2.1X_2^2 - 1.54X_3^2.$$

对得到的回归方程的回归项分别进行方差分析以判断每个因素对维生素 E-脂质体的显著性强弱, 结果见表 3.

模型项 $P = 0.0002 < 0.01$, 且失拟项 $P = 0.4109 > 0.05$, 表示建模成功. 方程决定系数 $R^2 = 0.9685$, 校正系数 $R^2_{Adj} = 0.928$ 且变异系数 =

0.75%, 表明该模型可靠程度高, 回归拟合性良好, 结果可信度高^[13]. 通过对方程中一次项系数绝对值的比较可知脂质体性质的影响因素按程度依次为: PC 与 CHOL 质量比 > PC 与 α -TOC 质量比 > 无水乙醇体积. 这是因为 PC 和 CHOL 都是构成脂质体膜的主要成分, 成膜质量决定了脂质体的包埋效果及其稳定性, 而无水乙醇的作用是溶解壁材并使之分散均匀, 所以对脂质体包封率的影响相对较小. 根据上述方程计算可得 α -TOC 脂质体制备的最佳工艺为: PC 与 CHOL 质量比为 6.22:1, PC 与 α -TOC 质量比为 18.7:1, 无水乙醇体积为 14.65 mL.

分别使影响脂质体包封率的两个因素在中心水平,由此得到等高线图和响应面立体分析图(如图4所示).结果表明,PC与 α -TOC质量比和无水乙醇

体积的交互作用显著,也进一步印证了表3的结果.这可能是因为 α -TOC易溶于有机溶剂,无水乙醇的用量决定了其溶解度的大小.

表 2 响应面分析实验结果

Tab.2 Experiment results of response surface analysis

试验号	X_1 无水乙醇体积/mL	X_2 PC:CHOL/(w·w ⁻¹)	X_3 PC: α -TOC/(w·w ⁻¹)	Y 包封率/%
1	1	0	1	79.85
2	-1	1	0	84.32
3	0	0	0	84.67
4	0	0	0	84.89
5	-1	-1	0	80.92
6	0	-1	-1	82.23
7	0	0	0	85.24
8	0	1	1	84.98
9	1	0	-1	79.69
10	1	-1	0	79.48
11	0	-1	1	81.31
12	0	0	0	84.98
13	-1	0	1	80.23
14	0	0	0	85.70
15	1	1	0	83.44
16	-1	0	-1	81.23
17	0	1	-1	85.78

表 3 回归模型方差分析

Tab.3 Analysis of variance in regression model

回归项	平方和	自由度	均方	F 值	$P(Pr > F)$	显著性
模型	84.202 830	9	9.355 870	23.924 820	0.000 2	* *
X_1 : EA	1.531 250	1	1.531 250	3.915 711	0.048 3	*
X_2 : PC: CHOL	7.220 000	1	7.220 000	18.462 980	0.003 6	* *
X_3 : PC: VE	4.620 800	1	4.620 800	11.816 310	0.010 9	*
$X_1 X_2$	0.462 400	1	0.462 400	1.182 449	0.312 9	-
$X_1 X_3$	1.416 100	1	1.416 100	3.621 250	0.048 8	*
$X_2 X_3$	1×10^{-5}	1	1×10^{-5}	0.000 256	0.987 7	-
X_1^2	33.590 740	1	33.590 74	85.898 200	<0.000 1	* *
X_2^2	18.648 090	1	18.648 09	47.686 870	0.000 2	* *
X_3^2	9.979 201	1	9.979 201	25.518 800	0.001 5	* *
残差	2.737 370	7	0.391 053			
失拟项	1.308 250	3	0.436 083	1.220 565	0.410 9	-
纯误差	1.429 120	4	0.357 280			
矫正总值	86.940 200	16				
$R^2 = 0.968 5$	$R^2_{Adj} = 0.928$			变异系数 0.75%		

注: * 差异显著($P < 0.05$); ** 差异极显著($P < 0.01$).

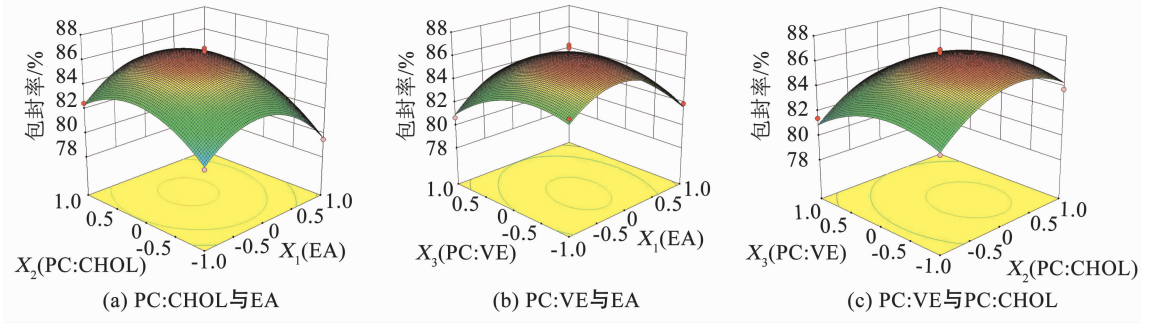


图 4 各因素交互作用对脂质体包埋率的影响

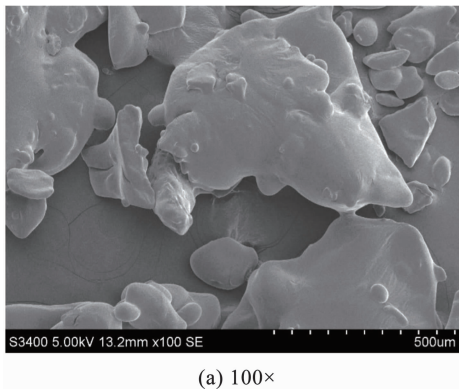
Fig. 4 Pairwise effects of different formula on entrapment efficiency of α -tocopherol liposomes

2.2.2 α -TOC 脂质体的表征

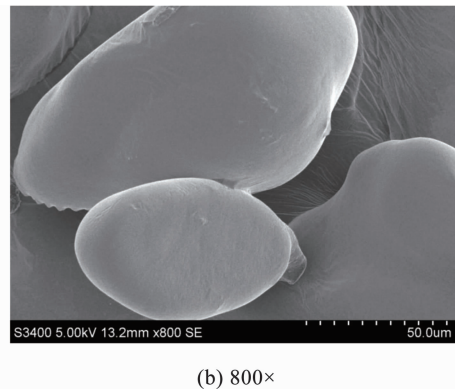
采用优化后的工艺制备 α -TOC 脂质体, 其粒径为 181.30 ± 3.45 nm ($PDI = 0.201 \pm 0.013$), Zeta 电位值为 -38.90 ± 0.32 mV, 包封率为 $87.39 \pm 1.12\%$. 脂质体混悬液呈乳白色, 有腥气味, 静置一段时间后无絮凝或分层, 流动性好, 乳光现象明显 (结果未显示).

形态学观察 (如图 5 所示) 发现脂质体微粒基

本呈椭圆形, 且表面光滑. 以往研究显示以大豆卵磷脂为材料采用不同方法制备的维生素 E 脂质体的粒径及包埋率是不同的, 但薄膜水化法制备的维生素 E 脂质体的包封率最高^[14]. 赵丽萍^[15] 采用薄膜均质法根据最优配方制得的大豆卵磷脂维生素 E 脂质体包封率为 90.53%, 而采用聚乙二醇包覆维生素 E 的脂质体, 不仅包封率较高 (91.03%), 且脂质体的透皮性能增强, 生物利用率得以提高.



(a) 100×



(b) 800×

图 5 冻干样品的扫描电镜图

Fig. 5 Scanning electron micrograph of lyophilized α -tocopherol liposome

2.3 脂质体稳定性分析

2.3.1 糖稳定性

不同浓度的蔗糖对脂质体形态学、Zeta 电位、粒径及保留率的影响如图 6 所示. 5% 及以下浓度的蔗糖对脂质体溶液的表现形态无明显影响, 乳液澄清且颜色均一, 乳光作用明显且无沉淀产生, 脂质体平均粒径稳定在 186.20 ± 3.59 nm ~ 210.37 ± 16.05 nm 之间, Zeta 电位稳定在 -36.17 ± 2.97 mV ~ -38.47 ± 1.25 mV 之间, 保留率并未发生明显改变. 这可能是因为糖具有稳定磷脂双分子层的作用, 可以保持脂质体结构^[16].

2.3.2 盐稳定性

不同浓度的 NaCl 对脂质体性质的影响如图 7 所示. 脂质体在 250、300 mM 的 NaCl 浓度下颜色偏暗, 出现絮凝沉淀. 随着 NaCl 离子浓度的增大, 脂质体的 Zeta 电位绝对值和保留率明显下降, 平均粒径随之增大, 体系趋于不稳定^[17], 即 NaCl 会破坏负载 α -TOC 脂质体的稳定性. 这种现象出现的原因是带负电的蛋黄卵磷脂使得脂质体复合物本身带负电, Na^+ 离子被吸附到脂质体膜上使蛋黄卵磷脂带有的负电荷被中和. 此外, 高渗也会影响脂质体的稳定性.

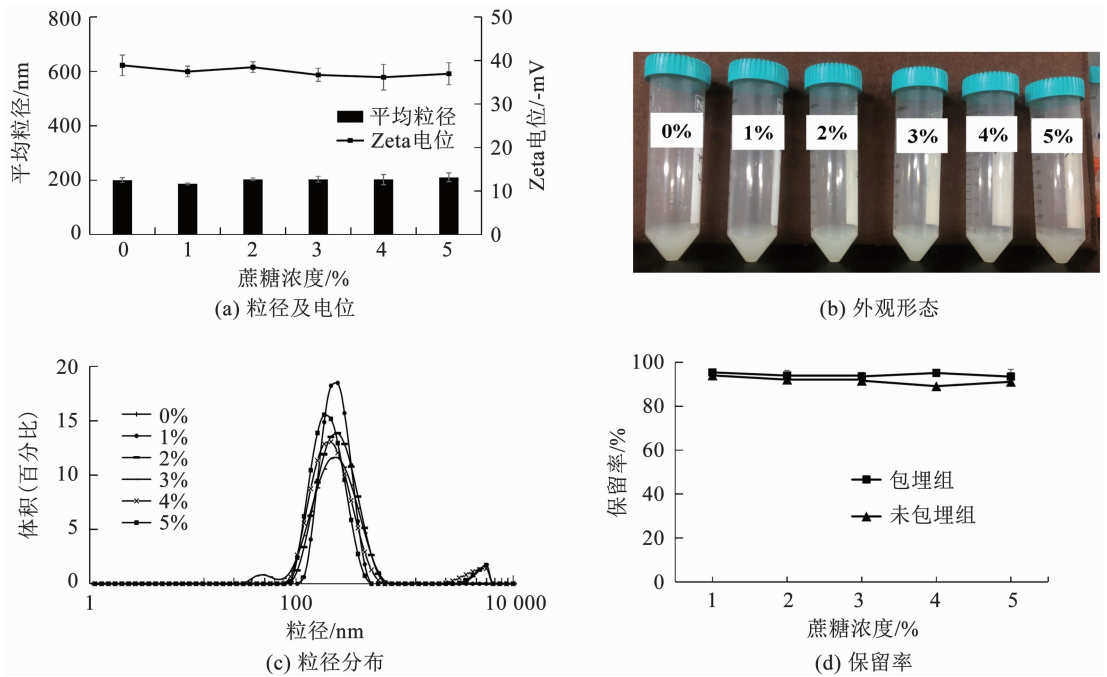


图 6 脂质体在不同糖浓度下的物理性质

Fig. 6 Properties of liposomes at different sucrose concentrations

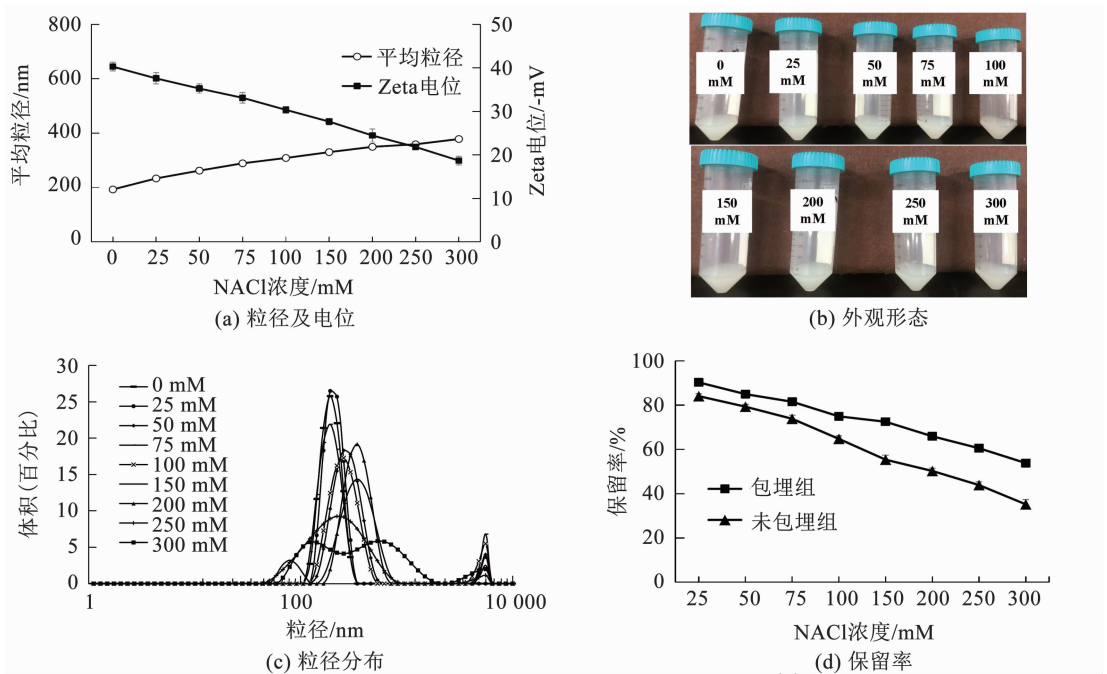


图 7 脂质体在不同 NaCl 浓度下的物理性质

Fig. 7 Properties of liposomes at different NaCl concentrations

2.3.3 pH 稳定性

不同 pH 对脂质体性质的影响如图 8 所示. 脂质体在 pH = 1.5 或 pH = 2.0 时溶液底部浑浊且出现絮凝沉淀,即在强酸环境中,过多的 H⁺ 中和了磷脂头部的负电荷^[19],体系趋于不稳定;在 pH 介于 3~8 的范围内,随着 pH 的升高,脂质体的 Zeta 电位绝对值和保留率呈增加趋势,在 pH = 7 时 Zeta 电位绝对值和保留率达最大(分别为 38.73 ± 0.57 mV 和 93.97 ± 1.33%),粒径最小(185.73 ± 4.82 nm),此

时脂质体体系的状态最为稳定;pH 调至 8 即偏碱性时,体系中的 OH⁻ 破坏了平衡,脂质体结构被破坏,Zeta 电位的绝对值和包埋率明显下降,平均粒径升高.结果显示脂质体溶液在强酸或偏碱的环境下不稳定,在中性环境下最稳定.

2.3.4 热稳定性

于 65 °C 恒温水浴处理不同时间对脂质体稳定性的影响,结果如图 9 所示.65 °C 恒温 45 min 后脂质体出现少许絮凝沉淀,Zeta 电位的绝对值达到最

小 (25.90 ± 1.44 mV), 平均粒径达到最大 (274.30 ± 6.15 nm), 粒径分布较为紊乱 ($PDI = 0.403 \pm 0.019$). 这是因为热处理使脂质体的双层膜膨胀导致脂质体粒径增大, 膜表面的负电荷密度相对下降, 脂质体 Zeta 电位的绝对值降低, 体系趋于不稳定, 而且脂质体在其临界温度以上长时间受热

时, 其膜上的磷脂分子运动明显增强, 可能会翻转、摆动等导致致密的双分子层趋向疏松无序, 脂质体膜变薄, 渗透性变强^[20]. α -TOC 的保留率随加热时间的延长而降低, 而相同加热时间下, 脂质体组的保留率均高于未包埋组, 这说明脂质体包覆可以有效防止内容物因为外界环境不稳定而发生泄漏.

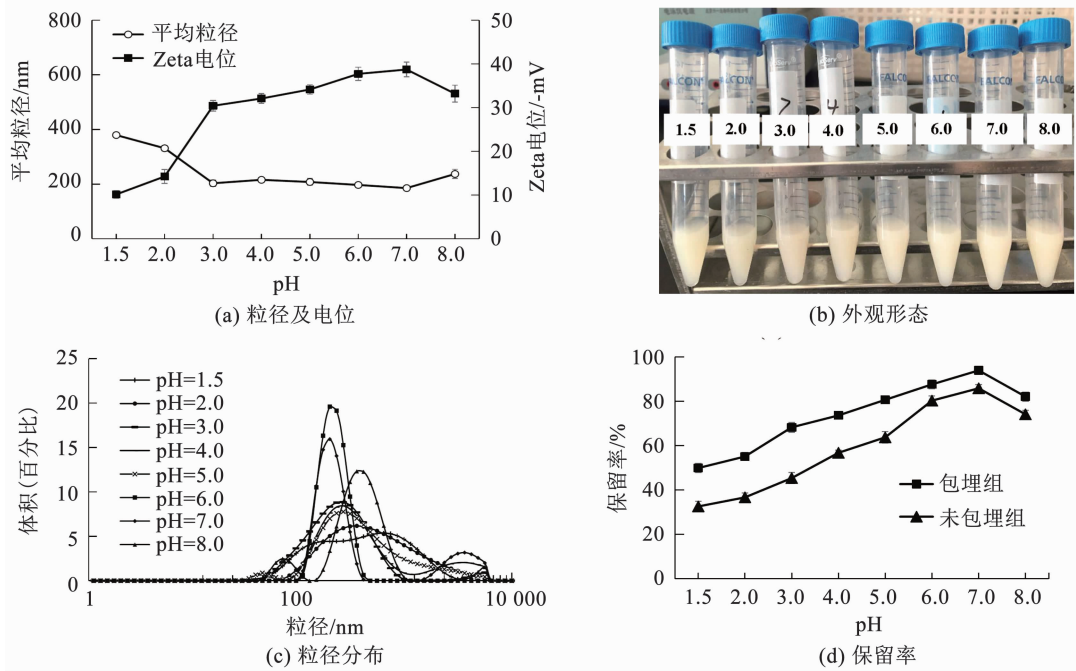


图 8 脂质体在不同 pH 下的物理性质

Fig. 8 Properties of liposomes at different pH

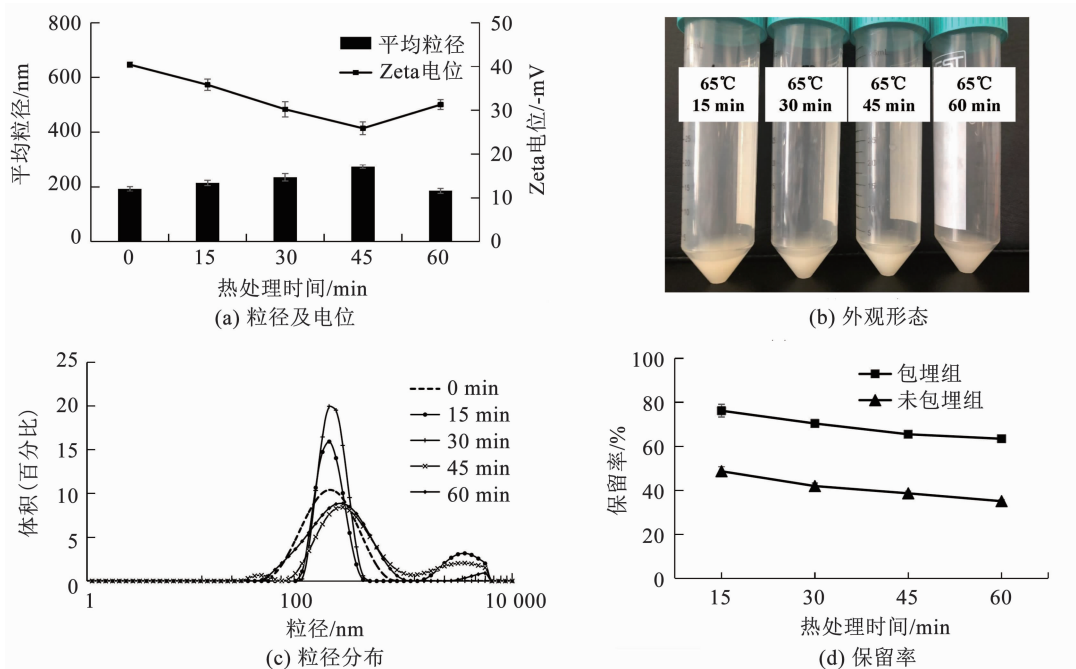


图 9 脂质体在不同加热时间下的物理性质

Fig. 9 Properties of liposomes at different heating times

2.3.5 温度稳定性

探究不同温度处理 15 min 对脂质体稳定性的

影响, 结果如图 10 所示. 随着处理温度的逐渐升高, 脂质体的平均粒径不断增大, 粒径分布趋于无序, 且

Zeta 电位的绝对值逐步减小,体系趋于不稳定.这是因为提高热处理温度会加速脂质体膜内磷脂的分子运动,增加微粒碰撞几率和分子聚集现象^[21].此外, α -TOC 的保留率随处理温度的升高明显下降,表明 α -TOC 在持续加热期间会发生泄漏,但相同处理条件下脂质体组的保留率明显高于未包埋组,这说明脂质体包覆可以有效保护高温引起的内容物的损失.

2.3.6 储藏稳定性

不同储藏温度及时间对脂质体稳定性的影响如

图 11 所示,在 25℃ 储藏的脂质体溶液底部于第 20 d 颜色暗沉,第 30 d 时出现少量沉淀,而 4℃ 储藏的乳液澄清均一,呈乳白色,乳光现象明显.随着储藏时间的延长,脂质体的粒径增大,Zeta 电位的绝对值下降,微粒间发生碰撞絮凝,粒径增大,分布趋于无序.保留率随储藏时间的延长呈降低趋势,即脂质体微粒随着储藏时间延长发生碰撞,从而导致内容物泄漏^[21].相较于 25℃ 下储存相同时间的脂质体,4℃ 存放脂质体的平均粒径更小,Zeta 电位的绝对值和

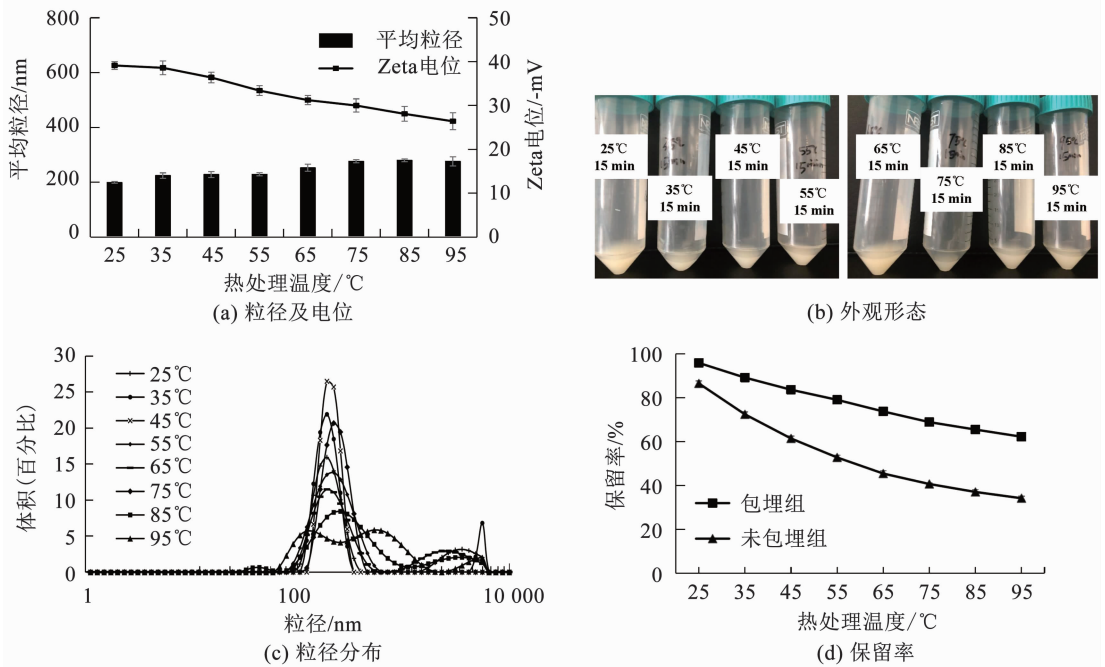


图 10 脂质体在不同温度下的物理性质

Fig. 10 Properties of liposomes at different temperatures

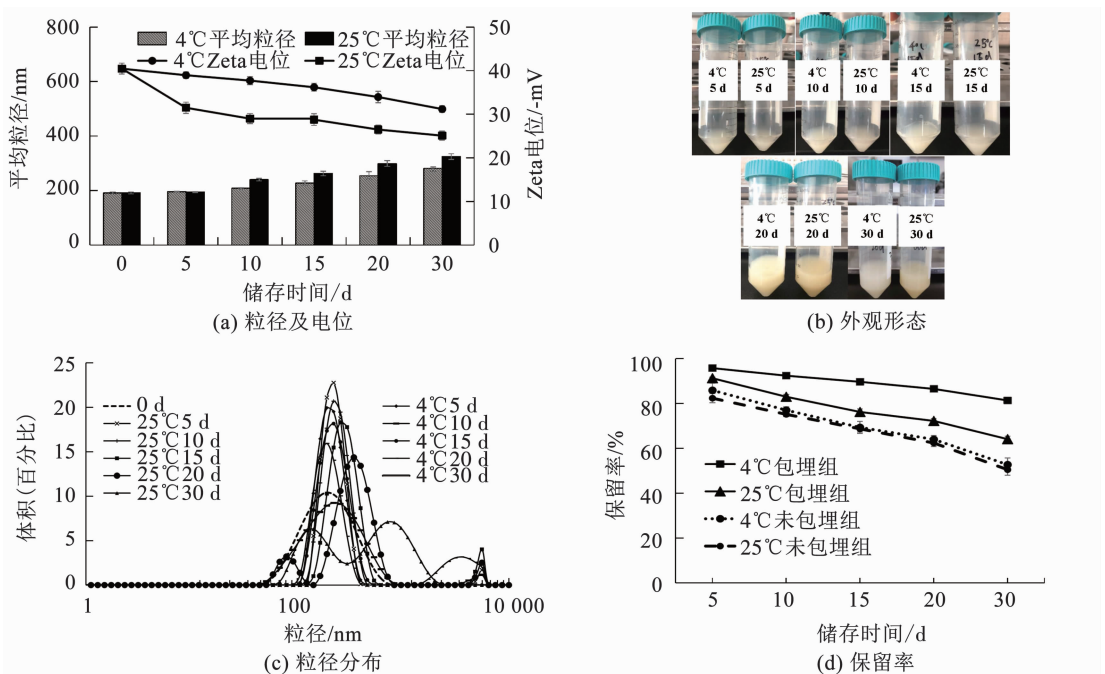


图 11 脂质体在不同储藏条件下的物理性质

Fig. 11 Properties of liposomes under different storage conditions

保留率更高, 4℃ 储存 30 d 后脂质体保留率可达 $81.36 \pm 1.25\%$, 说明 4℃ 储藏的脂质体更加稳定, 脂质体适宜冷藏。颜景全等^[14]发现采用壳聚糖-羧甲基壳聚糖包覆维生素 E 脂质体可有效提高维生素 E 脂质体的储存稳定性, 这为提高维生素 E-脂质体的稳定性提供了新的思路。

3 结 论

1) 采用薄膜水化法制备包埋 α -TOC 的脂质体的最优工艺参数为: PC 用量为 280.00 mg, PC 与 CHOL 的质量比例为 6.22:1, PC 与 α -TOC 的质量比为 18.7:1, 无水乙醇体积为 14.65 mL, 此时脂质体包封率为 $87.39 \pm 1.12\%$, 平均粒径为 181.30 ± 3.45 nm (PDI = 0.201 ± 0.013), Zeta 电位为 -38.90 ± 0.32 mV。脂质体微粒呈球状结构且分散均匀, 成膜现象明显。

2) 稳定性分析表明蔗糖浓度低于 5% 时对脂质体稳定性基本没有影响, 但偏酸或偏碱的环境、NaCl 浓度的升高、加热及储藏温度的升高、储存时间的延长均会破坏脂质体的稳定性, 脂质体在 4℃ 储存时具有较好的稳定性。

3) 脂质体中 α -TOC 的损失都明显少于未包埋组, 说明脂质体能够很好地保护 α -TOC 活性和稳定性, 有效提高其效用并扩大其应用范围。

参 考 文 献

[1] KHADANGI F, AZZI A. Vitamin E—The next 100 years [J]. *IUBMB Life*, 2019, 71(4): 411. DOI: 10.1002/iub.1990

[2] MUSTACICH D J, BRUNO R S, TRABER M G. Vitamin E [J]. *Vitamins & Hormones*, 2007, 76: 1. DOI: 10.1016/S0083-6729(07)76001-6

[3] GALLI F, AZZI A, BIRINGER M, et al. Vitamin E: Emerging aspects and new directions [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, 102: 16. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.017

[4] HUMBERSTONE A J, CHARMAN W N. Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997, 25(1): 103. DOI: 10.1016/S0169-409X(96)00494-2

[5] CHEN Zeming, LIU Fuyao, CHEN Yanke, et al. Targeted delivery of CRISPR/Cas9-mediated cancer gene therapy via liposome-templated hydrogel nanoparticles [J]. *Advanced Functional Materials*, 2017, 27(46): 1703036. DOI: 10.1002/adfm.201703036

[6] 朱怡卿, 王芳. 脂质体姜黄素联合索拉非尼对人肝癌 Huh7 细胞的抑制作用 [J]. *中国医学物理学杂志*, 2018, 35(11): 1324

ZHU Yiqing, WANG Fang. Inhibitory effects of liposome curcumin combined with sorafenib on human hepatocellular carcinoma Huh7 cells [J]. *Chinese Journal of Medical Physics*, 2018, 35(11): 1324. DOI: 10.3969/j.issn.1005-202X.2018.011.016

[7] TALEGAONKAR S, BHATTACHARYA A. Potential of lipid nanoparticles (SLNs and NLCs) in enhancing oral bioavailability of drugs with poor intestinal permeability [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2019, 20(3): 121. DOI: 10.1208/s12249-019-1337-8

[8] MAKWANA S, CHOUDHARY R, DOGRA N, et al. Nanoencapsulation and immobilization of cinnamaldehyde for developing antimicrobial food packaging material [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 57(2): 470. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.01.043

[9] MARSANASCO M, PIOTRKOWSKI B, CALABRÓ V, et al. Bioactive constituents in liposomes incorporated in orange juice as new functional food: thermal stability, rheological and organoleptic properties [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(12): 7828. DOI: 10.1007/s13197-015-1924-y

[10] GUNER S, OZTOP M H. Food grade liposome systems: Effect of solvent, homogenization types and storage conditions on oxidative and physical stability [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2017, 513: 468. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2016.11.022

[11] SUGA K, HAMASAKI A, CHINZAKA J, et al. Liposomes modified with cardiolipin can act as a platform to regulate the potential flux of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase [J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2016, 3: 8. DOI: 10.1016/j.meten.2015.11.002

[12] 党奇峰, 刘成圣, 颜景泉, 等. 维生素 E 脂质体的制备工艺筛选、优化及其性质研究 [J]. *食品与药品*, 2012, 14(2): 95

DANG Qifeng, LIU Chengsheng, YAN Jingquan, et al. Screening and optimization of preparation process of Vitamin E liposome and its characteristics [J]. *Food and Drug*, 2012, 14(3): 95

[13] NATH A, CHATTOPADHYAY P K. Optimization of oven toasting for improving crispness and other quality attributes of ready to eat potato-soy snack using response surface methodology [J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 80(4): 1282. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2006.09.023

[14] 颜景全. 壳聚糖-羧甲基壳聚糖包覆 VE 脂质体的制备及其性能评价 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009

YAN Jingquan. Study on preparation and property evaluation of chitosan/carboxymethyl chitosan coated Vitamin E liposomes [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009

[15] 赵丽萍. 聚乙二醇包覆维生素脂质体的制备、性质及体外释放研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2011

ZHAO Liping. PEG-coated liposomes: Preparation, characterizations and in vitro release evaluation of Vitamin E [D]. Nanchang: Nanchang University, 2011

[16] 颜栋美, 周青峰, 姚汝华. 海藻糖对载药脂质体保护作用的初步研究 [J]. *广西大学学报(自然科学版)*, 1998, 23(4): 393

YAN Dongmei, ZHOU Qingfeng, YAO Ruhua. Primary investigation on the protection effect of trehalose on drug carrying liposome [J]. *Journal of Guangxi University (Natural Science Edition)*, 1998, 23(4): 393

[17] THOMPSON A K, HINDMARSH J P, HAISMAN D, et al. Comparison of the structure and properties of liposomes prepared from milk fat globule membrane and soy phospholipids [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(10): 3704. DOI: 10.1021/jf052859b

[18] 童华, 姚松年. 不同电解质溶液对脂质体 Zeta 电势的影响 [J]. *物理化学学报*, 1998, 14(11): 1043

TONG Hua, YAO Songnian. Effect of different types of electrolyte on surface potential of liposome of PC and PC-cholesterol [J]. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 1998, 14(11): 1043. DOI: 10.3866/PKU.WHXBI9981116

[19] KOTY SKA J, FIGASZEWSKI Z A. Adsorption equilibria between liposome membrane formed of phosphatidylcholine and aqueous sodium chloride solution as a function of pH [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2005, 1720(1/2): 22. DOI: 10.1016/j.bbmem.2005.11.008

[20] 安学勤. 刺激响应脂质体及其在控制释药中的应用 [J]. *中国科学: 化学*, 2015, 45(4): 340

AN Xueqin. Stimuli-responsive liposome and drug release [J]. *Scientia Sinica (Chimica)*, 2015, 45(4): 340. DOI: 10.1360/N032014-00252

[21] KONO K, HAYASHI H, TAKAGISHI T. Temperature-sensitive liposomes: liposomes bearing poly (*N*-isopropylacrylamide) [J]. *Journal of Controlled Release*, 1994, 30(1): 69. DOI: 10.1016/0168-3659(94)90045-0