

doi:10.3969/j.issn.0253-2417.2020.01.010

杜仲籽油脂质体的制备及其稳定性研究

陈亮^{1,2}, 詹桂萍², 鲁颖¹, 李加兴^{1,2}, 余佳², 麻成金^{1,2}, 姚茂君^{1,2*}

(1.吉首大学 林产化工工程湖南省重点实验室,湖南 张家界 427000;

2.吉首大学 食品科学研究所,湖南 吉首 416000)



CHEN Liang

摘 要:采用乙醇注入-超声波法制备杜仲籽油脂质体,在单因素的基础上,通过 Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验和响应面法优化制备条件,并对其稳定性进行考察。脂质体制备的最佳工艺条件为:大豆卵磷脂 240 mg,大豆卵磷脂与 β -谷甾醇质量比(X_1)为 3.1:1,大豆卵磷脂与杜仲籽油质量比(X_2)为 4:1,吐温-80 用量(X_3)为 20% (以大豆卵磷脂质量计),PBS 缓冲液 pH 值(X_4)为 6.9,超声波作用时间(X_5)为 13 min,超声波功率(X_6)为 180 W。在此优化工艺条件下,杜仲籽油脂质体包埋率达 75.26%,平均粒径为 137.4 nm,Zeta 电位为 -19.3 mV,多分散系数(PDI)为 0.219。在透射电镜下观察到杜仲籽油脂质体呈准球形且外观平滑完整,分布均匀,无明显塌陷和凝聚成团现象。稳定性试验结果发现,杜仲籽油脂质体稳定性受温度影响较大,4℃下各项指标稳定性均优于 25 和 40℃;在 4℃下储藏 15 天时,包埋率由 75.26% 下降到 61.45%,pH 值略微下降,平均粒径由 137.4 nm 上升到 160.9 nm,丙二醛(MDA)由 0.023 2 mg/g 上升到 0.033 1 mg/g。

关键词:杜仲籽油;脂质体;包埋率;响应面;稳定性

中图分类号:TQ35

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2020)01-0068-09

引文格式:陈亮,詹桂萍,鲁颖,等.杜仲籽油脂质体的制备及其稳定性研究[J].林产化学与工业,2020,40(1):68-76.

Preparation and Stability of *Eucommia ulmoides* Oliv. Seed Oil Liposomes

CHEN Liang^{1,2}, ZHAN Guiping², LU Ying¹, LI Jiaying^{1,2}, YU Ji², MA Chengjin^{1,2}, YAO Maojun^{1,2}

(1.Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China; 2.Institute of Food Science, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstract: *Eucommia ulmoides* Oliv. seed oil liposomes were prepared by a combined technology of ethanol injection and ultrasound, and the stability of liposomes was also evaluated. The optimized conditions and the encapsulation efficiency of *E. ulmoides* seed oil liposomes were investigated by Plackett-Burman design, the steepest ascent design and response surface methodology. The results showed that the optimal conditions selected were as follows: the mass ratio of phosphatidylcholine to sitosterol (X_1) 3.1:1, the mass ratio of phosphatidylcholine to *E. ulmoides* seed oil (X_2) 4:1, dosage of tween-80 (X_3) 20%, phosphate buffer solution pH value (X_4) 6.9, ultrasonic time (X_5) 13 min, ultrasonic power (X_6) 180 W. Under this condition, the actual encapsulation efficiency, average particle size, average potential and poly dispersity index (PDI) of *E. ulmoides* seed oil liposomes were 75.26%, 137.4 nm, -19.3 mV and 0.219, respectively. The particles showed irregular oval shape and smooth and complete morphology via the transmission electron microscopy observation. The stability experiments showed that *E. ulmoides* seed oil liposomes were significantly affected by the temperature, and the stability of all indexes at 4℃ was better than that at 25℃ and 40℃. When the *E. ulmoides* seed oil liposomes were stored at 4℃ for 15 days, the encapsulation efficiency decreased from 75.26% to 61.45%, the pH value decreased slightly, the average particle size increased from 137.4 nm to 160.9 nm, and malondialdehyde (MDA) increased from 0.023 2 mg/g to 0.033 1 mg/g.

Key word: *Eucommia ulmoides* seed oil; liposomes; encapsulation efficiency; response surface methodology; stability

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)又名思仙、思仲,传统以皮入药,在我国已有 2 000 多年的药用历

收稿日期:2019-07-11

基金项目:湖南省科技厅重点研发计划资助项目(2018NK2045)

作者简介:陈亮(1994—),男,浙江杭州人,硕士生,主要从事天然生物与功能性食品的开发与利用;E-mail: 936785438@qq.com

*通讯作者:姚茂君,教授,硕士生导师,研究领域为天然生物与功能性食品的开发与利用;E-mail: yaomaajun@126.com。

史^[1]。近年来,研究发现杜仲的叶、枝条、果实、雄花与皮含有相似的活性成分,均可入药^[2]。此外,杜仲翅果中富含油脂^[3],其 α -亚麻酸高达61.04%^[4],不仅能增强免疫力、抗炎、抗癌,而且还具有降低血压、调节血脂、抗抑郁、预防心脑血管疾病和延缓衰老等功效^[5-6]。由原卫生部和国家卫生计生委发布的2009年12号公告中,批准杜仲籽油为新食品原料,故其可作为药食兼用油。然而杜仲籽油易氧化“酸败”,生成过氧化脂质,限制了其在食品工业上的应用。脂质体是脂类分子在低剪切力作用下与水混合形成的一种球状囊泡^[7]。作为一种纳米运输载体,脂质体不仅可以克服疏水性物质水溶性差及生物不稳定性的缺点,从而增强其稳定性、防止氧化分解,而且还可以提高水溶性,促进活性物质的吸收^[8]。制备脂质体的传统方法包括薄膜水化法^[9]、逆向蒸发法^[10]、乙醚注入法^[11]和复乳法^[12]等,尽管这些方法制备的脂质体包埋率高,但存在有机溶剂残留、耗时长、产品粒径大和稳定性不佳等缺点。乙醇注入-超声波法是将磷脂等脂质膜材和脂溶性活性物质一起溶于无水乙醇中,用注射器加压将溶液快速注入到水相中,减压旋转蒸发除去乙醇,再经超声波处理形成脂质体的方法,操作简单、耗时少且无毒副作用。鉴于此,本研究采用乙醇注入-超声波法制备杜仲籽油脂质体,以包埋率为指标对制备工艺进行优化,并考察杜仲籽油脂质体的稳定性,以期提高杜仲籽油的氧化稳定性及储藏时间,为杜仲籽油在功能性食品中的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 原料、试剂及仪器

杜仲籽油,由湘西自治州和益生物科技有限公司提供。大豆卵磷脂(纯度 $\geq 97\%$)、 β -谷甾醇,上海瑞永生物科技有限公司;吐温-80,成都金山化学试剂有限公司;硫代巴比妥酸,国药集团化学试剂有限公司;无水乙醇、甲醇、石油醚(沸程60~90℃),均为国产分析纯。

JY-II DN型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物公司;UV-2450紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;Talos F200x场发射透射电子显微镜,赛默飞世尔公司;Nano-ZS90激光粒度分析仪,英国马尔文公司;TDL-40B低速离心机,上海安亭科学仪器厂;ZDJ-4A型自动电位滴定仪,上海仪电科学仪器公司。

1.2 杜仲籽油脂质体制备工艺优化

1.2.1 单因素试验 采用乙醇注入-超声波法制备杜仲籽油脂质体。准确称取大豆卵磷脂240 mg,与一定比例的 β -谷甾醇、杜仲籽油和吐温-80于无水乙醇中混合,在水浴振荡器中振荡,待其充分溶解后,用无菌注射器将脂质溶液注入到磷酸盐(PBS)缓冲液中。然后将样品溶液重新转移到圆底烧瓶中,水浴真空旋转蒸发除去乙醇,将所得乳液进行超声波处理,直至形成均匀脂质体乳液。

分别考察大豆卵磷脂与 β -谷甾醇质量比(2:1~10:1)、大豆卵磷脂与杜仲籽油质量比(2:1~6:1)、吐温-80用量(10%~30%,以大豆卵磷脂质量计)、PBS缓冲液pH值(6.0~8.0)、超声波作用时间(5~25 min)、超声波功率(60~300 W)等对杜仲籽油脂质体包埋率的影响。

1.2.2 Plackett-Burman 试验 在单因素试验的基础上,采用Plackett-Burman试验设计方法,考察上述6个因素($n=12$)对杜仲籽油脂质体包埋率的影响,并筛选出显著影响因素。

1.2.3 最陡爬坡试验 通过Plackett-Burman试验得到的一次拟合方程,设计各显著因素的爬坡方向和步长,确定各显著因素的最佳中心点。

1.2.4 响应面试验设计及分析 采用Box-Behnken试验设计,优化上述对包埋率影响显著的因素,通过二次多项式回归拟合,结合方差分析及各因素交互作用,确定杜仲籽油脂质体制备最佳工艺条件。

1.2.5 数据处理 使用Design-Expert8.0.6软件对数据进行描述和多元回归分析。

1.3 杜仲籽油脂质体包埋率的测定

1.3.1 标准曲线的绘制 将杜仲籽油、大豆卵磷脂、 β -谷甾醇分别溶解于石油醚中,以石油醚为空白对照,在200~400 nm波长范围内扫描,获得最大吸收波长为302 nm。配置质量浓度梯度为1.0、2.0、3.0、4.0和5.0 g/L的杜仲籽油石油醚溶液,在302 nm处测定不同浓度杜仲籽油石油醚溶液的吸光度。以质量浓度为横坐标(x),吸光度值为纵坐标(y),得标准曲线方程为 $y=0.1048x-0.0034$, $R^2=0.9931$ 。

1.3.2 包埋率的测定 参照文献^[13]方法并稍做修改测定杜仲籽油脂质体包埋率。取 10 mL 脂质体于烧杯中,加入 10 mL 石油醚,混合均匀,4 000 r/min 离心 15 min,取上层石油醚液置于 25 mL 容量瓶,重复萃取 2 次后,合并石油醚液,并用石油醚定容至刻度,以石油醚为空白对照,在 302 nm 处测定样品吸光度(A_0)。选用 10% Triton X-100 甲醇溶液为破乳剂,超声波破乳(功率 96 W,10 min),同法测定上述萃取后的脂质体溶液的吸光度(A_1)。将 A_0 和 A_1 分别代入标准曲线方程,计算出游离杜仲籽油质量浓度(C_0)和被包埋的杜仲籽油质量浓度(C_1),并计算包埋率(η): $\eta = C_1 / (C_0 + C_1) \times 100\%$ 。

1.4 杜仲籽油脂质体的形态与性能分析

1.4.1 微观形态观察 采用负染色法^[14]观察脂质体的表面形态。用 PBS 缓冲液将样品稀释 10 倍,用铜网沾取少量脂质体悬浮液,在铜网上停留 2 min,然后将铜网浸入 2% 磷钨酸 2 min,并用滤纸吸干,在透射电镜下观察杜仲籽油脂质体的微观形态。

1.4.2 粒径测定 按优化工艺条件制备杜仲籽油脂质体悬浮液,稀释一定倍数后,在 25 ℃、散射角 90°条件下,采用激光粒度仪测定杜仲籽油脂质的粒径大小、多分散系数(PDI)及 Zeta 电位值。

1.4.3 稳定性分析 按优化工艺条件制备杜仲籽油脂质体悬浮液,分装于密封小瓶中,分别置于 4、25 和 40 ℃条件下避光保存 15 d,每隔 3 d 取样观察 1 次。根据平均粒径、包埋率、pH 值、丙二醛(MDA)含量等指标的变化情况,评价其储藏稳定性。其中以 MDA 含量表征杜仲籽油脂质体中磷脂的氧化程度,参照文献^[15]方法,采用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量。

2 结果与分析

2.1 杜仲籽油脂质体制备条件的优化

2.1.1 单因素试验结果分析 选择大豆卵磷脂与 β -谷甾醇质量比(X_1)、大豆卵磷脂与杜仲籽油质量比(X_2)、吐温-80 用量(X_3)、PBS 缓冲液 pH 值(X_4)、超声波作用时间(X_5)和超声波功率(X_6)为考察因素,探讨各因素对杜仲籽油脂质体包埋率的影响,结果见图 1。

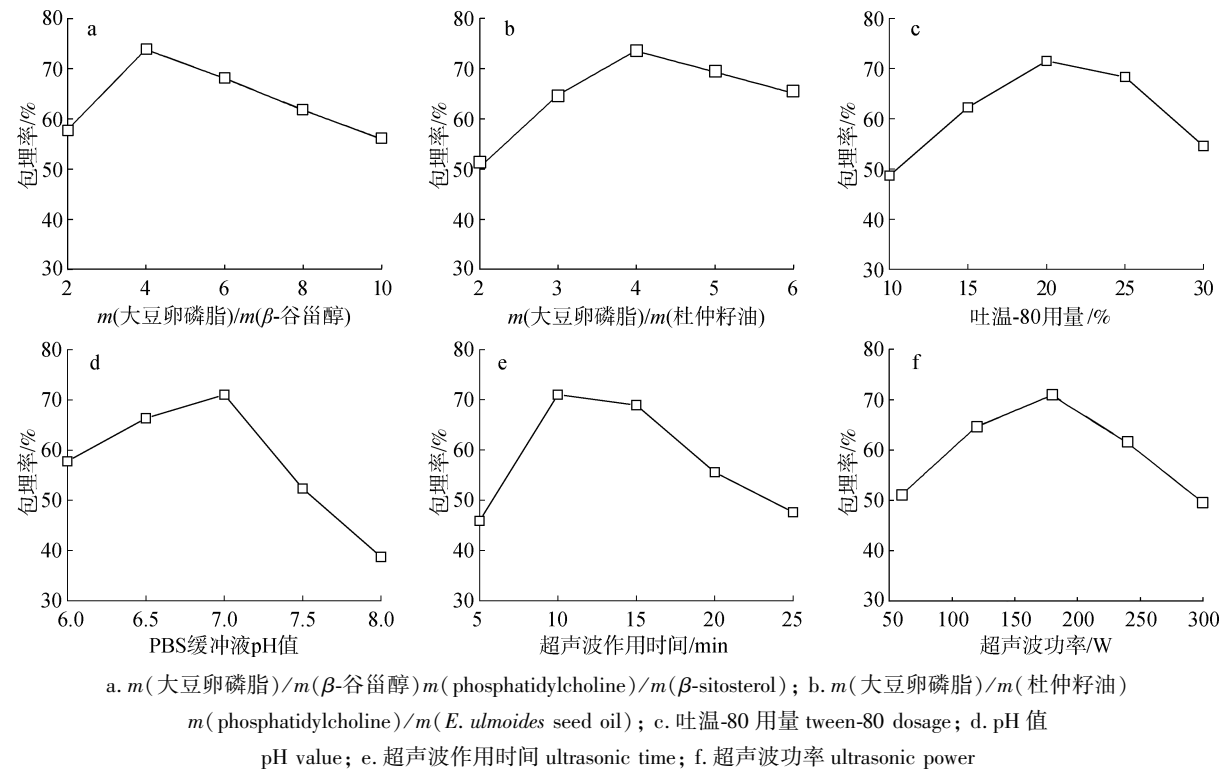


图 1 不同因素对杜仲籽油脂质体包埋率的影响

Fig. 1 Effects of different factors on the encapsulation efficiency of *E. ulmoides* seed oil liposomes

由图 1(a)可知, β -谷甾醇含量过高过低都会导致杜仲籽油脂质体包埋率下降,大豆卵磷脂与

β -谷甾醇最佳质量比为 2:1~6:1,考虑到 Plackett-Burman 试验设计因素的水平选取时,需尽量涵盖每个因素允许取值的最大空间,但不能选太大,所以选择大豆卵磷脂与 β -谷甾醇最佳质量比为 3:1~5:1。同理,由图 1(b)~图 1(f)可知,大豆卵磷脂与杜仲籽油的质量比、吐温-80 用量、PBS 缓冲液 pH 值、超声波作用时间、超声波功率分别在 3:1~5:1、15%~25%、6.8~7.2、6~14 min、160~240 W 区间内杜仲籽油脂质体包埋率达最高。

2.1.2 Plackett-Burman 试验设计筛选关键因素 在单因素试验的基础上,采用 Plackett-Burman 试验设计方法,考察了上述因素对杜仲籽油脂质体包埋率的影响,并筛选出显著影响因素,每个因素取最低(-1)和最高(1)两个水平。PB 试验设计方案及结果见表 1。

表 1 Plackett-Burman 试验设计及结果
Table 1 Plackett-Burman design matrix and corresponding results

序号 No.	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	包埋率/% encapsulation efficiency
1	5:1	3:1	25	7.2	6	240	69.92
2	5:1	5:1	15	7.2	14	240	68.97
3	3:1	3:1	15	6.8	6	160	65.72
4	3:1	5:1	25	7.2	6	160	67.79
5	5:1	5:1	15	6.8	6	240	68.13
6	3:1	5:1	15	6.8	14	160	66.44
7	5:1	5:1	25	6.8	6	160	69.48
8	5:1	3:1	25	7.2	14	160	67.55
9	5:1	3:1	15	6.8	14	160	67.24
10	3:1	3:1	25	6.8	14	240	61.62
11	3:1	5:1	25	6.8	14	240	64.59
12	3:1	3:1	15	7.2	6	240	65.35

根据表 1 试验设计结果,进行多元回归方程拟合和方差分析,得一次回归方程: $Y=0.3485+1.648\times 10^{-2}X_1+6.667\times 10^{-3}X_2-1.500\times 10^{-4}X_3+3.850\times 10^{-2}X_4-2.079\times 10^{-3}X_5-1.567\times 10^{-4}X_6$,对方程进行方差分析及显著性检验,结果见表 2。

表 2 Plackett-Burman 试验方差分析
Table 2 Analysis of variance for Plackett-Burman

方差来源 source	平方和 sum of square	自由度 df	均方 mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 significance
模型 model	5.607×10^{-3}	6	9.345×10^{-4}	11.52	0.0084	**
X_1	3.260×10^{-3}	1	3.260×10^{-3}	40.02	0.0014	**
X_2	5.333×10^{-4}	1	5.333×10^{-4}	6.58	0.0504	
X_3	6.750×10^{-6}	1	6.750×10^{-6}	0.083	0.7846	
X_4	7.115×10^{-4}	1	7.115×10^{-4}	8.77	0.0315	*
X_5	8.300×10^{-4}	1	8.300×10^{-4}	10.23	0.0240	*
X_6	2.651×10^{-4}	1	2.651×10^{-4}	3.27	0.1304	
残差 residual	4.055×10^{-4}	5	8.111×10^{-5}			
总误差 cor total	6.013×10^{-3}	11				

由表 2 可知,模型 P 值为 $0.0084<0.01$,说明回归方程关系极显著。模型的相关系数 $R^2=0.9326$,调整相关系数 $R^2_{Adj}=0.8516$,信噪比(SIN)为 10.516,说明该模型有较好的回归性,能解释 85.16% 响应值的变化,拟合度良好。PBS 缓冲液 pH 值(X_4)、超声波作用时间(X_5)对杜仲籽油脂质体包埋率影响显著($P<0.05$),大豆卵磷脂与 β -谷甾醇质量比(X_1)影响极显著($P<0.01$),其它因素影响均不显著。因此,在后续验证实验时将不显著因素取单因素试验最优水平,即大豆卵磷脂与杜仲籽油质量比为 4:1、吐温-80 用量为 20%、超声波功率为 180 W。

2.1.3 最陡爬坡试验确定最佳中心点 根据 Plackett-Burman 试验回归方程中 3 个显著因素(X_1 、 X_4 、 X_5)的变量关系确定爬坡方向和步长,其中 X_1 、 X_4 为正效应,应当取其高水平; X_5 为负效应,应当取其低水平。最陡爬坡试验设计及结果见表 3。由表 3 可知,杜仲籽油脂质体包埋率在第 2 组达到最高,说明第 2 组附近存在最优点。因此以 m (大豆卵磷脂)/ m (β -谷甾醇)3.5:1、PBS 缓冲液 pH 值 6.9、超声波作用时间 12 min 为响应面试验中心点,进行响应面优化。

2.1.4 响应面优化分析 结合单因素试验、PB 试验及最陡爬坡试验结果,采用 Box-Behnken 试验设计 3 因素 3 水平共 17 组试验,响应面试验设计及结果见表 4。

表 3 最陡爬坡试验设计及结果

Table 3 Steepest ascent design and results

序号 No.	X_1	X_4	X_5	包埋率/% encapsulation efficiency
1	3.0:1	6.8	14	61.72
2	3.5:1	6.9	12	71.81
3	4.0:1	7.0	10	68.31
4	4.5:1	7.1	8	64.32
5	5.0:1	7.2	6	61.01

表 4 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 4 Design and results of Box-Behnken experiment

序号 No.	X_1	X_4	X_5	包埋率/% encapsulation efficiency
1	3.0:1	6.9	14	73.43
2	3.5:1	7.0	10	68.59
3	3.5:1	7.0	14	68.03
4	3.5:1	6.9	12	73.80
5	4.0:1	6.9	10	69.43
6	4.0:1	7.0	12	67.01
7	3.5:1	6.9	12	73.99
8	3.0:1	6.9	10	72.16
9	4.0:1	6.9	14	68.76
10	4.0:1	6.8	12	70.39
11	3.0:1	6.8	12	71.86
12	3.5:1	6.9	12	73.58
13	3.0:1	7.0	12	72.42
14	3.5:1	6.8	14	71.14
15	3.5:1	6.9	12	74.17
16	3.5:1	6.9	12	73.50
17	3.5:1	7.0	10	69.19

根据表 4 试验结果,进行多元回归方程拟合和方差分析,得到自变量的二次多项回归方程: $Y = -128.6 + 1.617X_1 + 36.14X_4 + 0.3561X_5 - 0.1970X_1X_4 - 4.850 \times 10^{-3}X_1X_5 - 3.138 \times 10^{-2}X_4X_5 - 3.361 \times 10^{-2}X_1^2 - 2.548X_4^2 - 5.057 \times 10^{-3}X_5^2$ 。

响应面试验模型方差分析结果见表 5。由表 5 可知,回归模型极显著($P < 0.0001$)。模型 $R^2 = 0.9942$,表明实际值与预测值一致,模型调整相关系数 $R_{Adj}^2 = 0.9868$,表明该模型中响应值的变化 98.68% 由所选的自变量决定,进一步说明该模型能够准确预测出响应值与自变量之间的关系。 $P_{失拟项} = 0.5137 > 0.05$,不显著,表明模型误差较小,可用于预测实验结果。综上所述,该模型拟合程度良好,可用于杜仲籽油脂质体的制备工艺优化。

一次项 X_1 、 X_4 ,二次项 X_1^2 、 X_4^2 、 X_5^2 及交互项 X_1X_4 、 X_1X_5 、 X_4X_5 对杜仲籽油脂质体包埋率的影响极显著($P < 0.01$),一次项 X_5 对包埋率影响显著($P < 0.05$);根据 F 值可看出影响包埋率的主次因素为:大豆卵磷脂与 β -谷甾醇质量比(X_1) > PBS 缓冲液 pH 值(X_4) > 超声波作用时间(X_5)。

根据模型回归方程求得杜仲籽油脂质体制备的优化工艺条件为大豆卵磷脂与 β -谷甾醇比为 3.1:1, PBS 缓冲液 pH 值为 6.93,超声波作用时间为 12.52 min,在此条件下杜仲籽油脂质体的理论包埋率为 74.41%。

表 5 回归方程方差分析

Table 5 Analysis of variance of regression equal

方差来源 source	平方和 sum of square	自由度 df	均方 mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 significance
模型 model	8.975×10^{-3}	9	9.973×10^{-4}	133.76	<0.0001	**
X_1	2.549×10^{-3}	1	2.549×10^{-3}	341.88	<0.0001	**
X_4	5.330×10^{-4}	1	5.330×10^{-4}	71.49	<0.0001	**
X_5	4.950×10^{-5}	1	4.950×10^{-5}	6.64	0.0366	*
X_1X_4	3.881×10^{-4}	1	3.881×10^{-4}	52.05	0.0002	**
X_1X_5	9.409×10^{-5}	1	9.409×10^{-5}	12.62	0.0093	**
X_4X_5	1.575×10^{-4}	1	1.575×10^{-4}	21.12	0.0025	**
X_1^2	2.973×10^{-4}	1	2.973×10^{-4}	39.87	0.0004	**
X_4^2	2.733×10^{-3}	1	2.733×10^{-3}	366.57	<0.0001	**
X_5^2	1.723×10^{-3}	1	1.723×10^{-3}	231.06	<0.0001	**
残差 residual	5.219×10^{-5}	7	7.456×10^{-6}			
失拟项 lack of fit	2.108×10^{-5}	3	7.028×10^{-6}	0.90	0.5137	
纯误差 pure error	3.111×10^{-5}	4	7.777×10^{-6}			
总和 sum	9.028×10^{-3}	16				

为验证该响应面结果的可靠性,在此条件下进行 3 次验证实验。采用上述最佳工艺制备脂质体,考虑实际情况,取大豆卵磷脂 240 mg,设定大豆卵磷脂与 β -谷甾醇质量比为 3.1:1,大豆卵磷脂与杜仲籽油质量比为 4:1,吐温-80 占大豆卵磷脂质量分数为 20%,PBS 缓冲液 pH 值为 6.9,超声波作用时间13 min,超声波功率180 W,制备的杜仲籽油脂质体平均包埋率为 75.26%,与理论值的相对误差为1.129%,与刘玉珍等^[8]通过乙醇注入-超声波法制备的薏苡仁脂质体包埋率接近,说明该模型真实可靠。

2.2 杜仲籽油脂质体微观形态及粒径分布

按上述优化工艺条件制备杜仲籽油脂质体悬浮液样品于透射电镜下观察粒子微观形态,结果见图 2。由图 2 可知,杜仲籽油脂质体外观呈现准球形,平滑完整,无明显塌陷和凝聚成团的现象。经超声波处理后,杜仲籽油脂质体颗粒分布较为均匀,粒径小于 100 nm。

采用粒径分析仪测定杜仲籽油脂质体的粒径分布,结果见图 3。由图 3 可知,杜仲籽油脂质体的平均粒径为 137.4 nm,分布均匀,且呈正态分布。此外,经测定杜仲籽油脂质体的平均 Zeta 电位为 -19.3 mV, PDI 为 0.219,初步判断所制备的杜仲籽油脂质体稳定性良好。

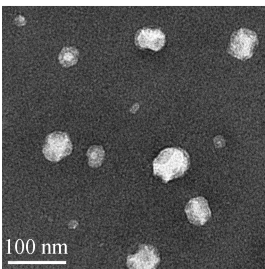


图 2 杜仲籽油脂质体透射电镜图

Fig.2 TEM micrographs of *E. ulmoides* seed oil liposome

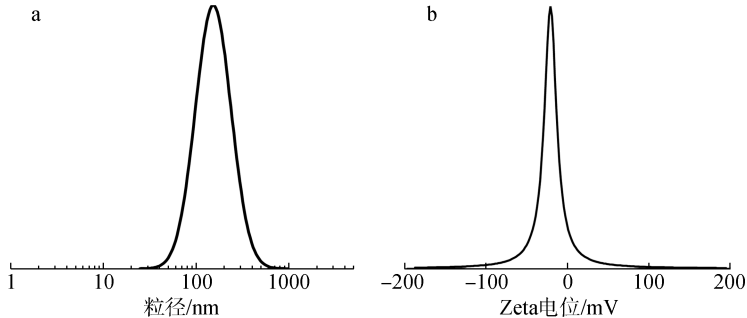


图 3 杜仲籽油脂质体的粒径分布(a)及 Zeta 电位图(b)

Fig.3 Diameter distribution(a) and Zeta potential(b) of *E. ulmoides* seed oil liposome

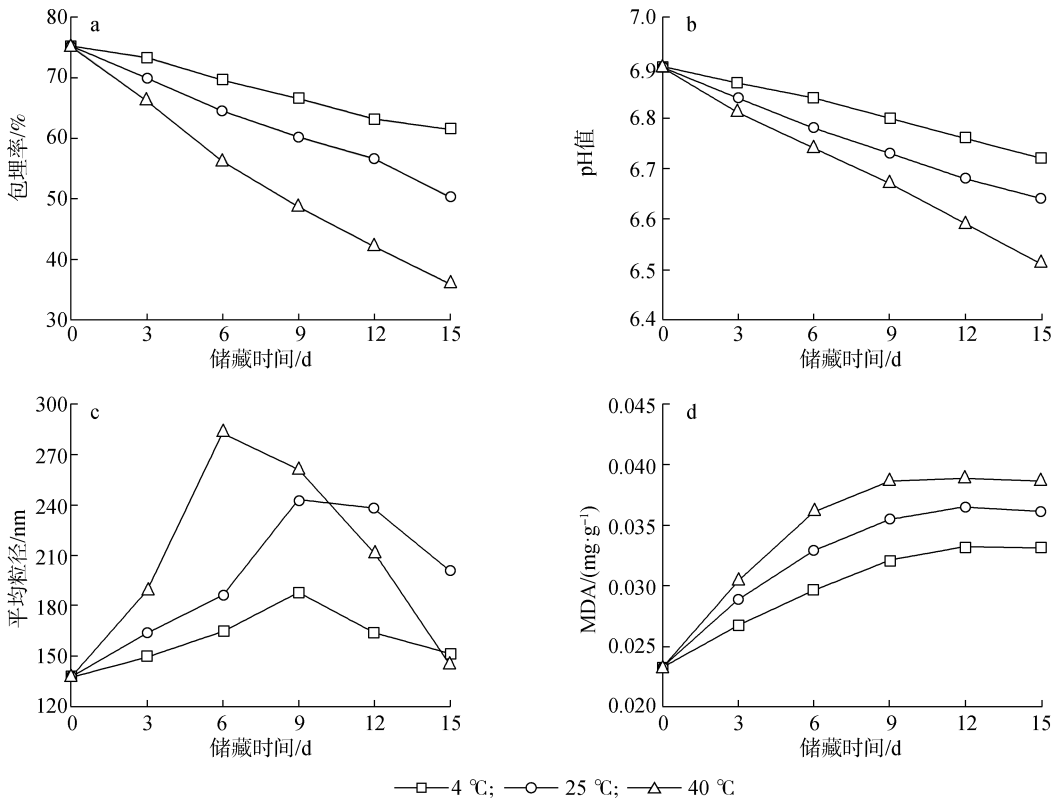
由上述分析可知,透射电镜与粒径分析仪测定的粒径结果稍有差异,这可能是因为粒径分析仪所测的杜仲籽油脂质体是液体状态,测的是水力学粒径,使得所测粒径较大;与此相反,透射电镜图是在样品脱水条件下测得的^[16]。此外,2 种测定方法的分析技术原理有所差异,激光粒度分析仪对颗粒粒径的计算基于颗粒的扩散特性,体系的黏度会对结果产生干扰^[17]。

2.3 杜仲籽油脂质体的稳定性分析

通过测定包埋率、平均粒径、pH 值和 MDA 含量,分析杜仲籽油纳米脂质体的储藏稳定性。在不同储藏温度下,杜仲籽油脂质体包埋率变化趋势如图 4(a)所示。由图可知,温度越高,杜仲籽油渗出越严重,包埋率越低;在 4 ℃ 条件下,储藏 15 d 时包埋率由 75.26% 下降到 61.45%,下降趋势相对于 25 和 40 ℃ 明显放缓。这可能是因为随着温度的升高,脂质体膜材的分子热运动加速,脂质双分子层的酰基侧链从有序排列到无序,导致脂膜由凝胶态转变为液晶态,膜的横切面增加,双分子层的厚度减小,膜流动性增加,导致包埋的杜仲籽油泄露^[18]。

由图 4(b)可知,在 4 ℃ 条件下,储藏 15 d 时杜仲籽油脂质体悬浮液 pH 值略微下降,而 25 和 40 ℃ 条件下储藏 15 d 时 pH 值下降明显。这是由于随着温度的升高,加重了磷脂的氧化程度,使其水解产生游离脂肪酸、溶血磷脂和甘油磷脂等^[19],这些产物的生成,导致杜仲籽油脂质体在储藏过程中 pH 值下降,并加速其进一步水解和氧化。

由图 4(c)可知,在 4 ℃ 下,随着储藏时间的延长,脂质体的粒径呈先增大后减小的趋势,到第 9 天时粒径由 137.4 nm 上升到 187.8 nm,在第 15 天时粒径下降到 160.9 nm。在 25 和 40 ℃ 下,脂质体的粒径也呈同样的趋势,且随着温度的升高,脂质体前期粒径增大更加明显。这是因为脂质体是热力学不稳定系统,在储藏过程中受体系温度影响较大,磷脂膜之间易发生融合、聚集等现象,导致粒径变大;此外,随着杜仲籽油的泄露与水解,游离脂肪酸的生成可以充当良好的融合剂的作用,促进脂质体融合^[20]。但随着时间的推移,脂质体膜可能会由于氧化而发生崩解,脂质体变成碎片,导致所测平均粒径变小^[21]。



a. 包埋率 encapsulation efficiency; b. pH 值 pH value; c. 平均粒径 particle size; d. MDA

图 4 不同储藏温度下杜仲籽油脂质体随时间的变化

Fig. 4 The change of *E. ulmoides* seed oil liposome with various times under different storage temperatures

由图 4(d)可知,丙二醛(MDA)含量在储藏期间呈现先上升后趋于平缓甚至略有下降趋势,且 4 ℃ 下脂质体的 MDA 含量低于 25 和 40 ℃ 下的测定值。4 ℃ 下储藏 15 d 时,丙二醛由 0.023 2 mg/g 上升到 0.033 1 mg/g。这是因为脂质体氧化过程通常是一个连锁式反应,丙二醛只是氧化反应的一个中间产物,在高温、低 pH 值、氧气等条件下会加速脂质体氧化水解^[22],此时,过氧化物分解速度低于生成速

度,导致所测MDA含量加速升高;但随着储藏过程中氧气的损耗,使脂质氧化水解速度下降,随着过氧化物含量的升高,其分解速度加快,导致MDA含量上升平缓甚至下降^[23]。

综上所述,杜仲籽油脂质体作为一个热不稳定体系,在4、25和40℃储藏15d时,发现4℃下各项指标稳定性均优于25和40℃,4℃下的杜仲籽油脂质体有较好的储藏稳定性。

3 结论

3.1 采用乙醇注入-超声波法制备杜仲籽油脂质体,以杜仲籽油脂质体包埋率为响应值,在单因素的基础上,通过Plackett-Burman试验、最陡爬坡试验和响应面试验得到杜仲籽油脂质体的最优制备工艺为:大豆卵磷脂240mg,大豆卵磷脂与 β -谷甾醇质量比为3.1:1,大豆卵磷脂与杜仲籽油质量比为4:1,吐温-80用量为20%,PBS缓冲液pH值为6.9,超声波作用时间13min,超声波功率180W。此时,杜仲籽油脂质体包埋率为75.26%。

3.2 在优化工艺条件下,杜仲籽油脂质体在透射电镜下呈准球形,外观平滑完整,平均粒径为137.4nm, PDI为0.219, Zeta电位为-19.3mV。在4、25和40℃储藏15d时,发现杜仲籽油脂质体在4℃下有较好的储藏稳定性,其各项指标稳定性均优于25和40℃。

参考文献:

- [1] 冯晗,周宏灏,欧阳冬生. 杜仲的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,2015,20(6):713-720.
FENG H, ZHOU H H, OUYANG D S. Chemical constituents and pharmacology of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2015, 20(6): 713-720.
- [2] 王娟娟,秦雪梅,高晓霞,等. 杜仲化学成分、药理活性和质量控制现状研究进展[J]. 中草药,2017,48(15):3228-3237.
WANG J J, QIN X M, GAO X X, et al. Research progress on chemical compounds, pharmacological action, and quality status of *Eucommia ulmoides* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(15): 3228-3237.
- [3] 刘玉兰,焦惠丽,张东东,等. 杜仲籽浸出取油条件及籽油与仁油品质比较研究[J]. 中国油脂,2016,41(11):6-11.
LIU Y L, JIAO H L, ZHANG D D, et al. Extraction conditions of *Eucommia* seed oil and quality comparison of *Eucommia* seed oil and *Eucommia* kernel oil [J]. China Oils and Fats, 2016, 41(11): 6-11.
- [4] 朱远坤,张振山,谢庆方,等. 精炼工艺对杜仲籽油品质的影响[J]. 中国油脂,2017,42(12):44-48.
ZHU Y K, ZHANG Z S, XIE Q F, et al. Influence of refining process on qualities of *Eucommia ulmoides* seed oil [J]. China Oils and Fats, 2017, 42(12): 44-48.
- [5] SANGIOVANNI J P, CHEW E Y. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina [J]. Progress in Retina and Eye Research, 2005, 24(1): 87-138.
- [6] 吴俏梅,杜冰,蔡允林,等. α -亚麻酸的生理功能及开发研究进展[J]. 食品工业科技,2016,37(10):386-390.
WU Q J, DU B, CAI Y L, et al. Research development of alpha-linolenic acid [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(10): 386-390.
- [7] TAMIIDI F, SHAHEDI M, VARSHOSAZ J, et al. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013, 19: 29-43.
- [8] 刘玉珍,熊华,蒋岩,等. 薏苡仁脂质体的制备及质量评价[J]. 食品科学,2009,30(16):193-197.
LIU Y Z, XIONG H, JIANG Y, et al. Preparation and quality evaluation of coix seed oil liposomes [J]. Food Science, 2009, 30(16): 193-197.
- [9] 张伟光,梁继宏,肖英慧,等. 大豆磷脂阿奇霉素脂质体的制备及渗漏率研究[J]. 食品工业科技,2009,30(2):99-101.
ZHANG W G, LIANG J H, XIAO Y H, et al. Preparation of soybean lecithin azithromycin liposome and study on its leakage [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(2): 99-101.
- [10] BOCHOT A, FATTAL E. Liposomes for intravitreal drug delivery: A state of the art [J]. Journal of Controlled Release, 2012, 161(2): 628-634.
- [11] 全东琴,苏德森,顾学裘. 药物载体空白脂质体前体的制备及性质的研究[J]. 沈阳药科大学学报,1999,16(3):160-163.
QUAN D Q, SU D S, GU X Q. Studies on the preparation and characteristics of empty proliposomes as a drug carrier [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 1999, 16(3): 160-163.
- [12] PATIL Y P, JADHAV S. Novel methods for liposome preparation [J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2014, 177(1): 8-18.
- [13] 郑景霞. β -胡萝卜素-薏苡仁油复合脂质体的制备及功能特性研究[D]. 南昌:南昌大学,2018.
ZHEN J X. Preparation and functional properties of β -carotene-coix seed oil composite liposome [D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.
- [14] 涂宗财,张朋,王辉,等. 鱼油纳米脂质体的制备及其性质测定[J]. 食品与发酵工业,2013,39(2):50-55.
TU Z C, ZHANG P, WANG H, et al. Preparation and characterization of fish oil nanoliposomes [J]. Food and Fermentation Industries, 2013,

39(2):50-55.

[15] 夏书芹,许时婴. 辅酶 Q₁₀ 纳米脂质体稳定性的研究[J]. 食品与发酵工业,2006,32(2):28-32.

XIA S Q,XU S Y. Study on stability of coenzyme Q₁₀ nanoliposomes[J]. Food and Fermentation Industries,2006,32(2):28-32.

[16] 张淑彦. 光化学合成纳米凝胶及其应用研究[D]. 上海:华东师范大学,2008.

ZHANG S Y. Application of novel nanogel synthesized by photochemistry method in an emulsion-free aqueous solution[D]. Shanghai:East China Normal University,2008.

[17] 冷小京,柴智,任发政,等. 应用动态光散射和透射电镜研究热力学不相容条件下果胶与乳清蛋白混合体系的微观结构[J]. 光谱学与光谱分析,2010,30(8):2196-2200.

LENG X J,CHAI Z,REN F Z,et al. Study of microstructure of pectin and whey protein isolate mixtures under incompatible conditions using dynamic light scattering and transmission electron microscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis,2010,30(8):2196-2200.

[18] Sessa G,Weissmann G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes[J]. Journal of Lipid Research,1968,9(3):310-318.

[19] GRIT M,UNDERBERG W J M,CROMMELIN D J A. Hydrolysis of saturated soybean phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersion[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences,1993,82(4):362-366.

[20] 张斌. 不同磷脂膜材对脂质体稳定性的影响[D]. 郑州:河南工业大学,2016.

ZHANG B. Effect of membranes with different phospholipids on the stability of liposomes [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology,2016.

[21] 耿亚男. 磷脂氧化对脂质体性质的影响[D]. 无锡:江南大学,2013.

GENG Y N. The influence of phospholipid oxidation on the properties of liposome[D]. Wuxi:Jiangnan University,2013.

[22] 丁保森. 影响补铁剂脂质体脂质氧化的因素分析[J]. 中国食品添加剂,2015(1):50-54.

DING B M. Effect of inner-exterior factors on lipid oxidation of iron supplement liposomes[J]. China Food Additives,2015(1):50-54.

[23] 吕方方,陈华,宋菲,等. 羧甲基壳聚糖包裹椰子油脂脂质体制备的工艺优化[J]. 食品工业科技,2018,39(9):175-180.

LÜ F F,CHEN H,SONG F,et al. Optimization of preparation process of carboxymethyl chitosan coated coconut oil liposomes[J]. Science and Technology of Food Industry,2018,39(9):175-180.

计量标准器具 竭诚欢迎使用检定

松 香 色 度 标 准 块

本产品具有国内行业中质量检验的权威性
长期、周到的售后服务让客户无后顾之忧

松香色度标准装置(又名《松香颜色分级标准》玻璃比色块),是符合我国松香光学特性具有完整体系的松香颜色分级标准。1982 年荣获林业部科技成果二等奖。1987 年至今,被《脂松香》、《松香试验方法》国家标准所采用,并多次经国家质量监督检验检疫总局复查考核合格。

用有色光学玻璃制成的最高标准一套称为“中国松香色度标准装置”,计六个级别,每级一块,编号为 S20,保存在中国林业科学研究院林产化学工业研究所。本标准块为最高标准的复制品,分为壹等品和贰等品两种。壹等品适用于商检、质检、内外贸、工厂中心化验室和教学、科研等单位;贰等品适用于工厂车间化验室。根据检定规程,壹等品与最高标准的色差 $\Delta E_{ab}^* \leq 1.5$,贰等品与最高标准的色差 $\Delta E_{ab}^* \leq 2.0$ 。林产化学工业研究所为本标准块全国唯一的制造单位和归口检定单位。制造计量器具许可证证书编号为(苏)制 00000095 号。产品出厂两年内免检,以后按检定规程要求每两年采用双光束分光光度计复检一次。林产化学工业研究所将竭诚为您服务,欢迎来电来函订购,欢迎将标准块寄我所检定。

联系地址:210042 南京市锁金五村 16 号
中国林科院林产化学工业研究所
电 话:(025)85482449,85482448

联 系 人:谭卫红
传 真:(025)85482450