

薄膜-探头式超声法和注乙醇-DHPM法制备的鱼油脂质体的理化性质研究

涂宗财^{1,2}, 马 达¹, 王 辉¹, 张 露¹, 沙小梅¹

(1.南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047;

2.江西师范大学功能有机小分子教育部重点实验室, 江西南昌 330022)

摘要:通过比较优化后的薄膜-探头式超声法(脂质体 I)和注乙醇-DHPM法(脂质体 II)制备的鱼油脂质体的理化性质及稳定性,初步评价两种方法的优点与缺点。分别测定脂质体 I 和脂质体 II 的包封率、载量、粒径分布、Zeta 电位以及形态观察和 4、25℃条件下贮藏 pH 变化、贮藏粒径变化。结果显示脂质体 II 相比脂质体 I 的平均粒径、多分散指数(PDI)、Zeta 电位小,TEM、AFM 显示脂质体 II 比脂质体 I 的颗粒完整性更好。4℃和 25℃条件下分别贮存 35d 的对比结果表明脂质体 II 相比于脂质体 I 在储存过程中的 pH、平均粒径变化小,贮藏稳定性更好。

关键词:鱼油,薄膜-探头式超声,注乙醇-DHPM,纳米脂质体

Physicochemical properties of fish oil nanoliposomes made by thin-film rehydration-ultrasonic and ethanol injection-DHPM

TU Zong-cai^{1,2}, MA Da¹, WANG Hui¹, ZHANG Lu¹, SHAO Xiao-mei¹

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2.Key Laboratory of Functional Small Organic Molecule, Ministry of Education, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

Abstract: The merits and disadvantages of thin-film rehydration-ultrasonic method and ethanol injection-DHPM were evaluated by comparing the physicochemical properties of fish oil (FO) nano liposomes prepared under individual optimum conditions. (liposome I and liposome II, respectively) The polydisperse index, particle size, zeta potential, transmission electron microscopy and pH of liposomes was detected. Result: Nanoliposomes II exhibited small average particle, PDI and zeta potential size, than nano liposomes I. TEM and AFM analysis revealed that the particle integrity of liposome II was better than liposomes I. Conclusion: Compared with nanoliposomes I, nanoliposomes II exhibits greater characteristics, and ethanol injection-DHPM could be a potent technique for the preparation of nanoliposomes.

Key words: fish oil; thin-film rehydration-ultrasonic method; ethanol injection-DHPM method; nanoliposomes

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)14-0127-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.14.017

鱼油中富含二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)^[1]。研究表明:这两种多不饱和脂肪酸,不但可以有效的防治心血管疾病^[2]、缺油症、炎症、癌症、而且能够调节血脂^[3]、增强免疫力、健脑益智^[4]以及保护视网膜^[5]等,但DHA和EPA为多烯脂肪酸决定了它极易被氧化变质,而且产生难闻的氧化味和对人体健康有害的氧化产物。为了克服鱼油的这些缺点,充分利用优质的鱼油资源,可将鱼油继续深加工制备成鱼油纳米脂质体,提高抗氧化性,部分掩盖其鱼腥味^[6]。

脂质体(Liposome)或称类脂小球、液晶微囊,是

将药物包封于类脂质双分子层形成的薄膜间隙,所制成的超微型球状载体制剂,常用的制备方法有薄膜法、超声法、挤压法、French压力法、冷冻干燥法、乙醇注入法、乙醚注入法、逆向蒸发法、钙融合法^[7-8]。本实验室运用改进的注乙醇-DHPM(动态高压微射流)法^[9]制备的鱼油纳米脂质体其各项性质均较好,为了对本实验室制备的脂质体进行科学的评价,将自制脂质体同传统的优化后薄膜-探头式超声法^[10-11]进行比较,以便为鱼油纳米脂质体的制备提供更好的思路。本实验运用薄膜-探头式超声法和注乙醇-DHPM法分别制脂质体 I 和脂质体 II,并对两种

收稿日期: 2013-11-11

作者简介:涂宗财(1965-),男,博士,教授,研究方向:食物资源开发与高效利用。

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2012CB126314);江西省重大科技创新研究项目(20124ACB00600)。

脂质体的包封率和载量、平均粒径及分布情况、Zeta 电位、微观形态和贮存稳定性进行评价,为鱼油纳米脂质体的开发与应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鱼油(EPA+DHA>30%) 南京森海生物油脂厂;大豆卵磷脂($\geq 90\%$) 德国Lipiod公司;胆固醇(A.R) 上海蓝季科技发展有限公司;其他试剂 均为分析纯,北京索莱宝生物科技有限公司。

Microfluidizer Processor M-110EH微射流仪 美国Microfluidics公司;NICOMP380/ZLS纳米粒度分析仪 美国PSS粒度分析仪公司;H-600透射电镜、U-2910紫外分光光度计 日本日立公司;JY98-IIIN超声波细胞破碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司;AJ-III原子力显微镜 上海爱建纳米科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鱼油纳米脂质体的制备 薄膜—探头式超声法制备鱼油纳米脂质体:参考文献[10-11]的基础上有所修改,将大豆磷脂(20mg/mL):鱼油胆固醇:吐温-80按质量比10:1:2加入无水乙醇中,在40℃下搅拌混匀,并超声(300W)处理90s,将乙醇旋转蒸发完,在烧瓶壁形成一层薄膜,随后用磷酸盐缓冲液(PBS)(pH=7.2)冲洗薄膜得到粗脂质体,将粗脂质体经过超声处理,即得到鱼油纳米脂质体。

注乙醇—DHPM法制备鱼油纳米脂质体^[9]。

1.2.2 包封率(EE)和载量(DL) 用标准曲线法绘制鱼油石油醚溶液的线性回归方程为 $A=1.197X+0.0319$, $R^2=0.9974$ 。并在274nm处测其包封率和载量^[12]。

1.2.3 粒径分布和Zeta电位^[13] 分别取两种方法在最佳条件下制备的脂质体,加入蒸馏水稀释到合适浓度,用Nicom380/ZLS纳米激光粒度分析仪测定粒径大小和粒度分布,光源波长360nm,散射角90°,样品平行测三次。然后在Zeta Potential模式下测定Zeta电位,光源波长635nm,电场10V/cm,电流0.2mA。

1.2.4 形态考察及稳定性评价

1.2.4.1 透射电镜(Transmission electron micrograph, TEM)、原子力显微镜(AFM)观察 运用负染色法对脂质体进行透射电镜观察,在放大倍率60000×下观察,工作电压为75kV的透射电镜下观察鱼油纳米脂质体的形态。AFM观察用洁净云母片快速刮层使样品形成吸附膜;放置于空气中自然干燥,取适量的去离子水洗脱未吸附的杂质和样品,重复两次,待样品自然干燥后待测^[14-15]。

1.2.4.2 稳定性评价 将脂质体 I 和脂质体 II 分装于小瓶中,分别在冷藏(4℃)、常温(25℃)条件下避光

贮存,分别于0、7、14、21、28、35d取样,按以下指标对稳定性进行评价^[16-17]。

a:外观的变化:评价标准为:-:溶液均一、无絮凝和沉淀;-+:混悬液有少量絮凝和沉淀;+:混悬液呈微黄色有少量絮凝和沉淀;++:混悬液呈微黄色、有大量絮凝和沉淀。

b:pH的变化:用精密pH计分别测定两种脂质体不同贮存天数后的pH。

2 结果与分析

2.1 两种脂质体的理化性质比较

比较采用薄膜—探头式超声法制备鱼油纳米脂质体 I 和注乙醇—DHPM法制备鱼油纳米脂质体 II 的各项理化性质。表1是测得脂质体 I 和脂质体 II 的理化性质,脂质体 II 相比于 I 脂质体的EE、DL都明显增大,但平均粒径和分散指数(PDI)减小,说明DHPM的高压作用比探头式超声的空穴和风化作用对脂质体颗粒的作用更明显,可以明显的降低脂质体的粒径,同时增大比表面积,使得包封率得到了一定的提升^[18]。脂质体 II 相对于脂质体 I 有更小的Zeta 电位,磷脂双分子层聚集在一起时受到更小的静电力,能够更好的形成稳定均一的脂质体体系。

2.2 脂质体的形态观察

2.2.1 脂质体的TEM图 图1是两种脂质体放大60000倍的透射电镜图,脂质体 I 和脂质体 II 都呈圆形或不规则椭圆形,且脂质体 II 更加圆滑,颗粒更加饱满,大小也相对均一,这与粒径和DPI的结果是一致的。

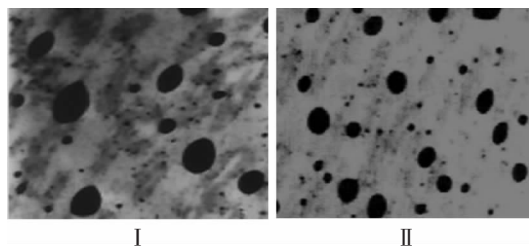


图1 I 和 II 的透射电镜图

Fig.1 TEM of nanoliposome I and II

2.2.2 脂质体的原子力显微镜图 图2是原子力显微镜在3μm范围内观察到的两种脂质体的形态,从图2(I B)中可以明显的看出脂质体 I 轮廓不太清晰分布也不均匀,这可能由于探头式超声设备作用于溶液产生局部热作用过强导致,相比脂质体 I 而言,脂质体 II 更加均一,完整性更好。

2.3 脂质体的稳定性考察结果

2.3.1 外观的变化 表2是贮存温度和时间对脂质体 I 和 II 外观的影响,从表2可以看出,在4℃条件下

表1 两种方法制备的鱼油纳米脂质体理化性质

Table 1 The characteristics and qualities of both fish oil nanoliposomes I and II were measured

项	EE(%)	DL(%)	平均粒径(nm)	PDI(Mw/Mn)	Zeta电位(mV)
脂质体 I	71.1±3.8	5.47±0.29	235±11.9	0.373±0.054	-22.94±0.10
脂质体 II	76.5±3.2	10.55±0.43	127.3±7.6	0.265±0.013	-20.40±0.41

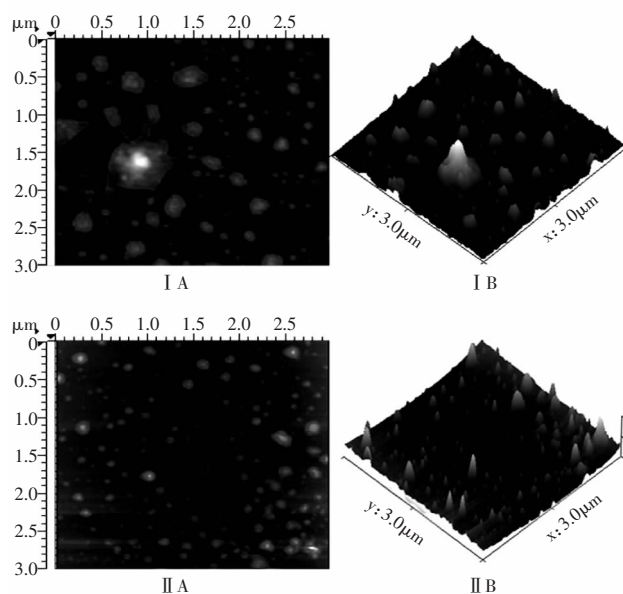


图2 脂质体 I 和 II 的AFM图

Fig.2 AFM image of nanoliposome I and II

贮存, 脂质体 I 在第28d开始出现絮凝, 脂质体 II 外观没有变化; 在25℃条件下贮存, 脂质体 I 在第7d开始出现沉淀, 而脂质体 II 在贮存第21d出现沉淀, 总体来说脂质体 II 相比于脂质体 I 更容易保存。

表2 贮存温度和时间对脂质体 I 和 II 外观的影响

Table 2 The effect of storage temperature and time on the appearance of liposomes I and II

处理		天数(d)					
		0	7	14	21	28	35
脂质体 I 外观	4℃	-	-	-	-	-+	-+
	25℃	-	-+	-+	+	++	++
脂质体 II 外观	4℃	-	-	-	-	-	-
	25℃	-	-	-	-+	-+	-+

注:-: 溶液均一、无絮凝和沉淀; -+: 混悬液有少量絮凝和沉淀; +: 混悬液呈微黄色有少量絮凝和沉淀; ++: 混悬液呈微黄色、有大量絮凝和沉淀。

2.3.2 pH的变化 图3是贮存温度和时间对脂质体 I 和 II pH的影响, 由图3可以看出, 4℃贮存条件下脂

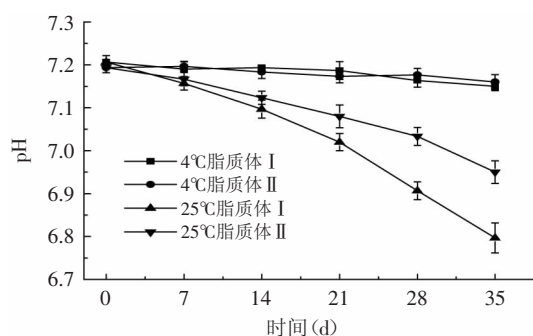


图3 贮存温度和时间对脂质体 I 和 II pH的影响

Fig.3 The effect of storage temperature and time on the pH of nanoliposomes I and II

质体 I 和 II 的pH变化小, 基本都在 7.2 ± 0.05 范围内, 25℃时随着贮存时间的延长pH显著降低, 且脂质体 I 下降明显快于脂质体 II。由于超声会产生瞬间高温可能破坏了磷脂的结构, 使其稳定性下降, 温度从4℃上升到25℃会使磷脂发生氧化产生溶血卵磷脂和游离脂肪酸等, 生成的这些产物不仅会使体系pH降低, 还会加速脂质体的氧化和水解^[19]。脂质体 II 贮藏稳定性也要明显好于脂质体 I。

2.3.3 粒径的变化 图4是贮存温度和时间对脂质体 I 和 II 粒径的影响, 由图4可以看出, 4℃贮存35d可以看出两种脂质体的平均粒径均增大, 脂质体 II 平均粒径由 (127.3 ± 7.6) nm增至 (163.7 ± 8.2) nm, 脂质体 I 由 (235 ± 11.9) nm增大 (352.5 ± 14.8) nm; 25℃贮存35d, 两种脂质体平均粒径也均在增大, 且脂质体 I 的粒径提高了4倍为 (875.1 ± 22.5) nm, 已经丧失了纳米脂质体的特性^[20]; 脂质体 II 平均粒径由 (127.3 ± 7.6) nm增大到 (285.9 ± 8.9) nm。综上所述, 脂质体无论是贮存在4℃条件下还是25℃, 脂质体 II 相比脂质体 I 有更好的贮藏稳定性。

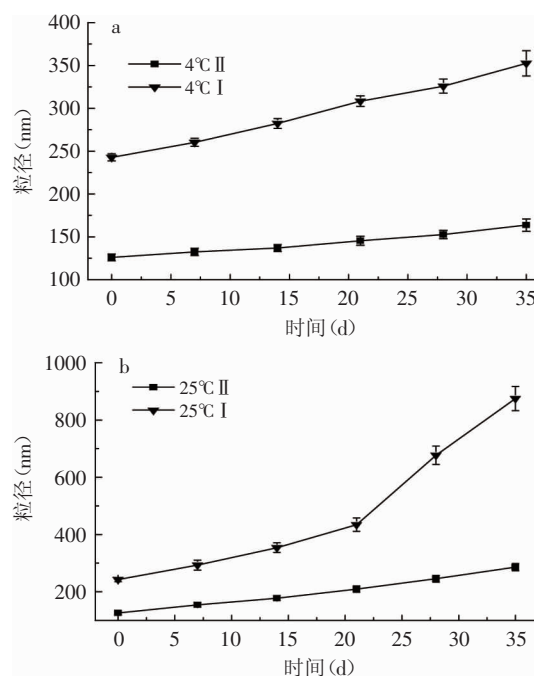


图4 贮存温度和时间对脂质体 I 和 II 粒径的影响

Fig.4 The effect of storage temperature and time on the particle size of nanoliposomes I and II

3 结论

本文比较了薄膜分散—超声法和乙醇注入—DHPM法制备的两种鱼油脂质体的理化性质: 脂质体 II 比脂质体 I 的包封率更高, 平均粒径、PDI、Zeta电位小, 说明其颗粒聚集在一起时受到分子间作用力更小, 更容易聚集形成纳米脂质体。TEM、AFM显示脂质体 II 比脂质体 I 的颗粒更圆滑、更均匀饱满、完整性更好。4℃和25℃条件下贮存35d的对比表明, 贮存过程中脂质体 II 比脂质体 I 的pH、平均粒径变化小, 贮藏稳定性更好。

参考文献

- [1] Wu J H, Cahill L E, Mozaffarian D. Effect of fish oil on circulating adiponectin: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013, 98(6): 2451-2459.
- [2] Dyerberg J, Bang H O, Stoffersen E, et al. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis[J]. The Lancet, 1978, 312(8081): 117-119.
- [3] 张静姝. 深海鱼油辅助改善记忆功能的研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2011.
- [4] 刘伟民, 马海乐, 李国文. 鱼油生理活性物质EPA和DHA分离进展[J]. 食品科学, 2002, 23(10): 125-127.
- [5] 郑美瑜, 李国文. 超临界CO₂萃取鱼油中EPA, DHA的研究进展[J]. 江苏大学学报: 自然科学版, 2002, 23(3): 37-40.
- [6] 黄丽燕, 韩磊, 刘青, 等. 枇杷叶总黄酮的提取及其脂质体的抗氧化活性[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2012, 33(1): 61-65.
- [7] 王琳. 脂质体制备方法的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2010, 42(5): F0002-F0004.
- [8] 刘晓谦, 王锦玉, 全燕, 等. 脂质体制备技术及其研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(14): 1084-1088.
- [9] 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.
- [10] Yang L, Yang W, Bi D, et al. A novel method to prepare highly encapsulated interferon- α -2b containing liposomes for intramuscular sustained release[J]. European Journal of

Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2006, 64(1): 9-15.

- [11] 刘红梅, 褚慧媛, 崔金霞, 等. 薄膜-超声分散法制备 β -榄香烯固体脂质纳米粒[J]. 中草药, 2008, 39(2): 193-195.
- [12] 刘伟, 刘伟琳, 刘成梅, 等. 高压微射流制备纳米中链脂肪酸脂质体的研究[J]. 高压物理学报, 2010, 24(4): 293-299.
- [13] 孙庆雪, 黄桂华, 邵伟. 褪黑素脂质体的制备及理化性质研究[J]. 山东大学学报: 医学版, 2010, 48(1): 159-163.
- [14] Ding B, Zhang X M, Hayat K, et al. Preparation, characterization and the stability of ferrous glycinate nanoliposomes[J]. Journal of Food Engineering, 2011, 102(2): 202-208.
- [15] 孙润广, 齐浩, 张静. 脂质体结构特性的原子力显微镜研究[J]. 物理学报, 2002, 51(6): 1203-1207.
- [16] 何泓良, 王卫国, 甘勇, 等. 喷雾冷冻干燥技术制备盐酸伊立替康脂质体冻干微粒及其理化性质考察[J]. 中国药房, 2010, 21(45): 4274-4278.
- [17] 张晶, 杨静, 吴基良, 等. 异甘草素脂质体的制备及稳定性考察[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(11): 1046-1048.
- [18] 邱瑞桂, 靳世英, 徐和, 等. 薄膜分散联合冻融法制备小菜蛾抗菌肽脂质体研究[J]. 环球中医药, 2012, 5(12): 904-907.
- [19] 郑会娟. 羧甲基壳聚糖包覆的中链脂肪酸纳米脂质体的制备及其性质研究[D]. 江西: 南昌大学, 2012.
- [20] Takahashi M, Inafuku K-I, Miyagi T, et al. Efficient preparation of liposomes encapsulating food materials using lecithins by a mechanochemical method[J]. Journal of Oleo Science, 2007, 56(1): 35-42.

(上接第126页)

汁液流失率比其他解冻方法的流失率大, 为3.89%。综合考虑, 微波解冻是一种较优良的适合于速冻温州蜜柑的解冻方法。而目前关于不同解冻方法对其他速冻水果影响的研究还很少, 有待进行更全面更深入的研究, 以促进速冻水果行业的发展。

参考文献

- [1] 单杨. 我国柑橘工业现状及发展趋势[J]. 农业工程技术-农产品加工业, 2014(4): 13-17.
- [2] Wang Jie, Li Lite, Dan Yang. The correlation between freezing point and soluble solids of fruits[J]. Journal of Food Engineering, 2003, 60(4): 481-484.
- [3] Carolina D, Galetto, Roxana A. Freezing of strawberries by immersion in CaCl₂ solutions[J]. Food Chemistry, 2010, 123: 243-248.
- [4] W L Kerr, C J Clark, M J McCarthy. Freezing effects in fruit tissue of kiwifruit observed by magnetic resonance imaging[J]. Scientia Horticulturae, 1997, 69: 169-179.
- [5] Min Zhang, Zhen-Hua Duan, Jian-Feng Zhang. Effects of freezing conditions on quality of areca fruits[J]. Journal of Food Engineering, 2004, 61: 393-397.
- [6] Holzwarth M, Korhummel S, Carle R. Evaluation of the effects of different freezing and thawing methods on color, polyphenol

and ascorbic acid retention in strawberries[J]. Food Research International, 2012, 48: 241-248.

- [7] D M Modise. Does freezing and thawing affect the volatile profile of strawberry fruit?[J]. Postharvest Biology and Technology, 2008, 50: 25-30.
- [8] Oszmianański, J Wojdyło, A Kolniak. Effect of L-ascorbic acid, sugar, pectin and freeze-thaw treatment on polyphenol content of frozen strawberries[J]. Food Science and Technology, 2009, 42: 581-586.
- [9] 隋继学. 速冻食品加工技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [10] 尤瑜敏. 冷冻食品的解冻技术[J]. 食品科学, 2001, 22(8): 87-90.
- [11] 邓永燕. 速冻橘瓣罐头生产工艺与品质改进研究[D]. 长沙: 中南大学, 2010.
- [12] 王华, 刘俊轩, 马亚琴, 等. 哈姆林橙汁在贮藏过程中的理化指标及色泽变化[J]. 食品科学, 2012, 33(24): 321-324.
- [13] 田学琴, 郭丽琼, 焦晓磊, 等. 基于电子鼻分析夏橙汁在贮藏过程中香气变化的研究[J]. 食品工业科技, 2013(11): 298-302.
- [14] 焦凌霄, 高愿军. 温度对猕猴桃V_C降解途径和降解速度影响的研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(12): 2847-2850.
- [15] 侯晓荣, 米红波, 茅林春. 解冻方式对中国对虾物理性质和化学性质的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(4): 243-247.