

# VB<sub>2</sub> 脂质体的制备、表征及其稳定性

姚晓雪<sup>1</sup>, 徐凯<sup>1</sup>, 胡冰<sup>1</sup>, 姜发堂<sup>1</sup>, 张琨<sup>2</sup>, 姚晓琳<sup>1,2,\*</sup>

(1. 湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北武汉 430068;

2. 福格森(武汉)生物科技股份有限公司, 湖北武汉 430056)

**摘要:**为实现对 VB<sub>2</sub> 不良气味的掩蔽, 提高 VB<sub>2</sub> 的胃肠稳定性, 本实验优化了 VB<sub>2</sub> 脂质体的制备工艺, 分别探究了胆固醇与卵磷脂质量比( $r_{(C/P)}$ )、吐温 80 与卵磷脂质量比( $r_{(T/P)}$ )及 VB<sub>2</sub> 浓度对 VB<sub>2</sub> 脂质体品质的影响, 并对 VB<sub>2</sub> 脂质体不良气味的掩蔽效果及胃肠液中的稳定性进行了评价。结果表明, 当  $r_{(C/P)} = 1:8$ 、 $r_{(T/P)} = 3:5$ 、VB<sub>2</sub> 浓度为 1.0% 时, 所制备的 VB<sub>2</sub> 脂质体  $\zeta$ -电位为 -12.1 mV, 封装率为 94.67%, 微粒形态规整, 分散均匀, 可有效掩蔽 VB<sub>2</sub> 的不良气味, 且在体外模拟胃肠液中 VB<sub>2</sub> 呈缓慢释放, 具有较好的稳定性, 改善了 VB<sub>2</sub> 的生物利用度, 为含有 VB<sub>2</sub> 的配方食品设计提供了有利的理论支撑。

**关键词:** 维生素 B<sub>2</sub>, 脂质体, 封装率, 稳定性, 不良气味

## Preparation, Characterization and Stability of VB<sub>2</sub> Liposomes

YAO Xiao-xue<sup>1</sup>, XU Kai<sup>1</sup>, HU Bing<sup>1</sup>, JIANG Fa-tang<sup>1</sup>, ZHANG Kun<sup>2</sup>, YAO Xiao-lin<sup>1,2,\*</sup>

(1. School of Bioengineering and Food Science, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;

2. Ferguson (Wuhan) Biotechnologies Ltd., Wuhan 430056, China)

**Abstract:** In order to mask the bad odor and improve the digestive stability of VB<sub>2</sub>, the preparation process of VB<sub>2</sub> liposome was optimized. And the effect of the mass ratio of cholesterol to phosphatidylcholine ( $r_{(C/P)}$ ), Tween 80 to phosphatidylcholine ( $r_{(T/P)}$ ), as well as VB<sub>2</sub> concentration on the encapsulation efficiency were evaluated. The masking ability of bad odor and the digestive stability of liposome loaded with VB<sub>2</sub> were investigated. The results showed that liposomes prepared under the conditions of  $r_{(C/P)} = 1:8$ ,  $r_{(T/P)} = 3:5$ , VB<sub>2</sub> concentration 1.0% had uniform dispersion, complete structure high encapsulation efficiency of 94.67% and  $\zeta$ -potential of -12.1 mV. The bad odor of VB<sub>2</sub> could be effectively masked by liposome and VB<sub>2</sub> was slowly released in the simulated gastrointestinal juices *in vitro*, presenting a better stability and improve the bioavailability of VB<sub>2</sub>. The results could provide favorable theoretical support for the design of formulas food containing VB<sub>2</sub>.

**Key words:** VB<sub>2</sub>; liposome; encapsulation efficiency; stability; bad odor

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)07-0045-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.07.009

引文格式: 姚晓雪, 徐凯, 胡冰, 等. VB<sub>2</sub> 脂质体的制备、表征及其稳定性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(7): 45-50.

脂质体(Liposomes)是由磷脂双分子层组成的分子组装体, 具有类似生物膜的闭合囊泡结构, 可荷载亲水和疏水性成分, 亲水性成分可被包封于水相囊泡中, 疏水性成分可被截留于磷脂双分子层中<sup>[1-5]</sup>。脂质体具有良好的分散性、生物相容性及安全性, 可用于矿物质、维生素、抗氧化剂等功能成分的包载。在不利环境下脂质体可起到缓冲作用, 从而保护芯材免受外界环境的影响<sup>[6-9]</sup>。脂质体作为营养组分包载体系已引起食品领域的广泛关注, Cuomo 等<sup>[10]</sup>利用脂质体荷载姜黄素, 通过体外消化模型发现其可显著提高姜黄素的生物利用率。王坤<sup>[11]</sup>将脂质体包覆巯基化壳聚糖后形成的稳定化脂质体与  $\beta$ -甘油磷酸钠进行交联, 制备得到脂质体水凝胶, 结果表明

水凝胶的生物相容性随脂质体含量的增加而增强。

VB<sub>2</sub>(Vitamin B<sub>2</sub>)又称核黄素, 可促进生长发育和细胞的再生, 帮助人体预防和消除口腔内、唇、舌及皮肤的炎症, 是人和动物维持机体正常结构与功能的必需营养物质<sup>[12-14]</sup>。在光照及紫外照射下会产生日光臭味, 易受光、热、金属离子等因素影响, 使其应用受到了限制<sup>[15]</sup>。目前市场上 VB<sub>2</sub> 补充剂多为片剂, 不仅无法掩蔽 VB<sub>2</sub> 自身的异味, 且在人体胃肠道中易受消化液或食物中其他物质的破坏, 使其在人体内的生物利用率降低<sup>[16]</sup>。本文采用脂质体包载 VB<sub>2</sub>, 确定了 VB<sub>2</sub> 脂质体的制备参数, 并探究脂质体对 VB<sub>2</sub> 不良气味掩蔽的效果及其胃肠稳定性, 为 VB<sub>2</sub> 的应用提供理论依据。

收稿日期: 2018-07-16

作者简介: 姚晓雪(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品胶体, E-mail: 243487878@qq.com。

\* 通讯作者: 姚晓琳(1982-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品胶体功能化的应用研究, E-mail: yaoxiaolin1113@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31871812); 中国博士后科学基金(2017M612464)。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

大豆卵磷脂 美国 Sigma-Aldrich 公司;胆固醇 国药集团化学试剂有限公司;VB<sub>2</sub> 武汉盛世天元生物科技有限公司;吐温 80 (Tween 80) 国药集团化学试剂有限公司;磷钨酸混合物 上海麦克林生化科技有限公司;胃蛋白酶(酶比活力:1:3000) 上海麦克林生化科技有限公司;胰蛋白酶(酶比活力:1:4000) 上海源叶生物科技有限公司;超纯水 MILLIPORE-Q,美国 Merck Millipore 公司;其余常规试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

Zetasizer Nano-ZS 纳米粒度及电位分析仪 英国马尔文仪器有限公司;MODUL YOD-230 真空冷冻干燥机 美国 Thermo 公司;VCX 800 超声波细胞粉碎仪 美国 SONICS 公司;F-7000 荧光分光光度计 日本日立公司;DELTA 320pH 计 瑞士梅特勒-托利多公司;R-3 旋转蒸发仪 瑞士步琦有限公司;Tecnai G2 20 透射电子显微镜 荷兰 FEI 公司;FOX 4000 电子鼻 法国阿尔法莫斯仪器有限公司;Direct Q3 超纯水机 美国默克密理博(Merck Millipore)公司;HJ-8A 磁力搅拌器 武汉科尔仪器有限公司;KQ5200DE 数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 VB<sub>2</sub> 脂质体制备 VB<sub>2</sub> 脂质体的制备参考 Lasic<sup>[17]</sup> 的制备方法,并在其基础上进行改进。按一定比例精确称取卵磷脂、胆固醇,溶于 30 mL 无水乙醇中,按 3:1 (v/v) 加入一定浓度的 VB<sub>2</sub> 水溶液,混匀后置于冰水浴中利用超声波细胞粉碎仪超声(800 W,40%,超声 3 s,关 1 s)5 min 得到均一的乳液。将乳液于 35 ℃、0.1 MPa 的条件下减压旋蒸 40 min 除去有机溶剂,待瓶中形成凝胶状物后,继续旋转蒸发至凝胶塌陷。然后加入 40 mL pH7.0 的磷酸缓冲溶液和一定比例的 Tween 80 旋蒸 30 min,得到 VB<sub>2</sub> 脂质体混悬液,在温度为-47 ℃,真空度为 15 Pa 下冷冻干燥 36 h 后得到 VB<sub>2</sub> 脂质体冻干粉末。

#### 1.2.2 VB<sub>2</sub> 脂质体制备条件的确定

1.2.2.1 胆固醇与卵磷脂质量比( $r_{(C/P)}$ )的确定 根据 1.2.1 中方法制备 VB<sub>2</sub> 浓度为 0.8%,卵磷脂质量比  $r_{(T/P)}$  为 4:5, $r_{(C/P)}$  分别为 1:2、1:4、1:6、1:8、1:10 的 VB<sub>2</sub> 脂质体,对其粒径、 $\zeta$ -电位以及包封率进行测定(见 1.2.3、1.2.4),选择最适  $r_{(C/P)}$  值。

1.2.2.2 Tween 80 与( $r_{(T/P)}$ )的确定 根据 1.2.1 中方法制备 VB<sub>2</sub> 浓度为 0.8%, $r_{(C/P)}$  为 1.2.2.1 中检测到的最佳比例, $r_{(T/P)}$  分别为 1:5、2:5、3:5、4:5、5:5 的 VB<sub>2</sub> 脂质体,对其粒径、 $\zeta$ -电位以及包封率进行测定,选择最适  $r_{(T/P)}$  值。

1.2.2.3 VB<sub>2</sub> 浓度的确定 根据 1.2.1 中方法制备  $r_{(C/P)}$  及  $r_{(T/P)}$  为 1.2.2.1 与 1.2.2.2 中的最佳比例,VB<sub>2</sub> 浓度分别为 0.4%、0.8%、1.0%、1.5%、2.0% 的 VB<sub>2</sub> 脂质体,对其粒径、 $\zeta$ -电位以及包封率进行测定,选择最适 VB<sub>2</sub> 浓度。

1.2.3 VB<sub>2</sub> 脂质体粒径及  $\zeta$ -电位测定 采用纳米粒

度及电位分析仪测定 1.2.2 中优化的最佳工艺下制得的 VB<sub>2</sub> 脂质体混悬液粒径分布及  $\zeta$ -电位。测定前先将混悬液轻微振荡摇匀,样品测定时,温度 25 ℃,折光指数 1.33,分散相折光指数 1.47,吸光指数 0.01,He-Ne 激光光源输出功率 4 mW,检测角度 173°,检测波长 633 nm。

#### 1.2.4 VB<sub>2</sub> 脂质体包封率测定

1.2.4.1 标准曲线及 VB<sub>2</sub> 脂质体包封率计算 在室温下利用荧光分光光度计,分别测定浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0  $\mu\text{g/mL}$  的 VB<sub>2</sub> 标准溶液的荧光强度,绘制标准曲线。获得标曲为  $y = 18.473x + 3.663$  ( $R^2 = 0.9943$ , $x$ :VB<sub>2</sub> 浓度, $\mu\text{g/mL}$ , $y$ :荧光强度值)计算 VB<sub>2</sub> 脂质体中 VB<sub>2</sub> 的总质量及脂质体表面 VB<sub>2</sub> 质量,并按式(1)计算脂质体的包封率。

$$\text{包封率}(\%) = (P_2 - P_1) / P_2 \times 100 \quad \text{式(1)}$$

其中: $P_1$  表示脂质体表面 VB<sub>2</sub> 的质量; $P_2$  表示脂质体中 VB<sub>2</sub> 的总质量。

1.2.4.2 脂质体表面 VB<sub>2</sub> 质量测定 室温下准确称取 20~30 mg VB<sub>2</sub> 脂质体干样品加入 20 mL 无水乙醇中,100 r/min 下磁力搅拌 2 min 后进行过滤,收集滤液。将滤液于 30 ℃、0.085 MPa 真空度下进行减压蒸馏,直至无水乙醇完全挥发,瓶壁内侧形成一薄层脂质膜,向瓶中加入 6~7 mL 三氯甲烷洗下瓶中的脂质膜,得到混合溶液。然后向混合溶液中加入 15 mL 超纯水以萃取溶液中的 VB<sub>2</sub>,静置 1 h 后收集上层溶液(上层)溶液,并用超纯水定容至 50 mL。取 3 mL 溶液测定其荧光强度,根据标准曲线计算脂质体表面 VB<sub>2</sub> 质量。

1.2.4.3 脂质体中 VB<sub>2</sub> 总质量测定 室温下准确称取 20~30 mg VB<sub>2</sub> 脂质体干样,加入 6~7 mL 三氯甲烷,待样品溶解后加入 15 mL 超纯水萃取溶液中的 VB<sub>2</sub>,静置 1 h 然后收集上层溶液,萃取过程重复三次,合并每次萃取后得到的上层(水层)溶液,并用超纯水定容至 50 mL。取 3 mL 溶液测定其荧光强度,根据标准曲线计算脂质体中 VB<sub>2</sub> 质量。

1.2.5 VB<sub>2</sub> 脂质体微观形貌观察 将 1.2.2 中优化的最佳工艺下制得的 VB<sub>2</sub> 脂质体冻干粉利用蒸馏水制备 VB<sub>2</sub> 脂质体混悬液,在室温下用 pH7.0 的磷酸盐缓冲溶液将其浓度稀释至 0.02% (w/w),在数控超声波清洗装置中以 24 kHz 超声处理 10 min,促进样品分散,然后用移液枪吸取 20  $\mu\text{L}$  样品滴至铜网正面,室温下风干,随后用毛细吸管取 1% (w/w) 磷钨酸(水浴超声 1 h,32 kHz,0.22  $\mu\text{m}$  水相滤膜过滤)滴至样品表层,再次室温风干后,利用透射电子显微镜进行观察。

1.2.6 VB<sub>2</sub> 脂质体对 VB<sub>2</sub> 气味掩蔽能力测定 采用电子鼻评价脂质体对将 1.2.2 中优化的最佳工艺下制得的 VB<sub>2</sub> 脂质体不良气味的掩蔽效果检测。准确称取 1.00 g VB<sub>2</sub> 脂质体冻干粉于 20 mL 电子鼻专用顶空瓶中,同时分别以未荷载 VB<sub>2</sub> 脂质体冻干粉和 VB<sub>2</sub> 原料粉末作为对照组进行实验,采用聚四氟乙烯隔垫进行密封,置于自动进样装置上,加热箱温

度 40 ℃, 每个样品加热 2 min, 振荡速度 500 r/min。测定时以合成的干燥空气为载气, 流速 150 mL/min, 进样针温度 50 ℃, 注射体积 2.5 mL, 注射速度 2.5 mL/s, 获取时间 2 min, 延滞时间 5 min。每个样品在上述条件下重复分析 4 次。

1.2.7 VB<sub>2</sub> 脂质体胃肠稳定性实验 模拟胃液的配制: 于室温下准确取浓盐酸 14 mL, 氯化钠 4.00 g, 胃蛋白酶 6.40 g 加入 1800 mL 纯水中, 充分混合后, 调节溶液 pH 至 1.3 并定容至 2 L。模拟肠液的配制: 于室温下准确称量 13.06 g 磷酸二氢钾溶于 1 L 纯水中后, 再加入 12.70 mL 6 mol/L 氢氧化钠溶液, 20.00 g 胰蛋白酶和 5.00 g 胆盐, 充分溶解后调节溶液 pH 至 7.5 并定容至 2 L<sup>[18]</sup>。移取 2 mL 蒸馏水制备的 VB<sub>2</sub> 脂质体混悬液于透析袋中, 浸没于 100 mL 模拟胃肠液中, 在 37 ℃ 下以 100 r/min 转速搅拌, 分别在 1、2、3、4、5、10 h 测定 VB<sub>2</sub> 体外释放量。

### 1.3 数据处理

采用 SPSSV 21.0 软件进行显著性分析, 所得数据为三次重复 (n = 3), 数据采用 M ± SD 表示, 两组数据间显著性差异表示为 p < 0.05, 采用 Excel 2.0 进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 VB<sub>2</sub> 脂质体制备条件的确定

2.1.1 不同 r<sub>(C/P)</sub> 对 VB<sub>2</sub> 脂质体的影响 在磷脂双分子层中, 胆固醇如“缓冲剂”一般起着调节膜结构“流动性”的作用, 胆固醇的羟基可与磷脂分子的羟基通过氢键结合形成复合物, 使磷脂分子间结合更为紧密, 增加脂质体的稳定性<sup>[5]</sup>。由图 1 可知, VB<sub>2</sub> 脂质体粒径均为单峰分布, 当 r<sub>(C/P)</sub> 为 1:10、1:8、1:4 和 1:2 时, VB<sub>2</sub> 脂质体粒径分布范围较窄, 呈现出良好的分散性和稳定性。

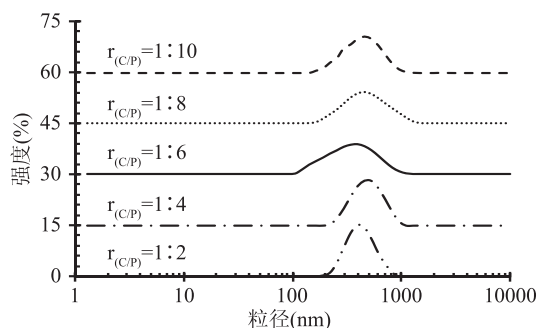


图 1 不同 r<sub>(C/P)</sub> 对 VB<sub>2</sub> 脂质体粒径分布的影响

Fig.1 The particle size distribution of liposomes loaded with VB<sub>2</sub> in different r<sub>(C/P)</sub>

由表 1 可知, 在 r<sub>(C/P)</sub> 为 1:6、1:8、1:10 条件下制得的 VB<sub>2</sub> 脂质体包封率较高且无显著差异 (p > 0.05), 其中 r<sub>(C/P)</sub> 为 1:8 时, VB<sub>2</sub> 脂质体的 ζ-电位最大, 为 -19.4 mV。有研究表明, 微粒所携带的电荷量多, 可提供斥力防止微粒间发生聚集<sup>[17]</sup>。当 r<sub>(C/P)</sub> 为 1:8 时, VB<sub>2</sub> 脂质体带有较强负电, 粒子之间存在一定静电排斥力, 脂质体微粒可均匀分散于体系中, 保持体系的稳定。通过综合考虑 VB<sub>2</sub> 脂质体粒径、电位及包封率, 选择 r<sub>(C/P)</sub> 为 1:8 进行下一步实验。

表 1 不同 r<sub>(C/P)</sub> VB<sub>2</sub> 脂质体的 ζ-电位及包封率

Table 1 ζ-potential and entrapment efficiency of liposomes VB<sub>2</sub> in different r<sub>(C/P)</sub>

r <sub>(C/P)</sub>	ζ-电位 (mV)	包封率 (%)
1:10	-12.1 ± 1.6 <sup>a</sup>	86.24 ± 2.23 <sup>b</sup>
1:8	-19.4 ± 1.2 <sup>b</sup>	84.83 ± 2.64 <sup>b</sup>
1:6	-9.8 ± 2.2 <sup>a</sup>	83.97 ± 2.83 <sup>b</sup>
1:4	-11.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	75.24 ± 2.73 <sup>a</sup>
1:2	-12.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	82.42 ± 2.92 <sup>b</sup>

注: 数值表示为平均值 ± 标准差 (n = 3), 不同字母者表示每列数据差异显著 (p < 0.05), 表 2~表 3 同。

2.1.2 不同 r<sub>(T/P)</sub> 对 VB<sub>2</sub> 脂质体的影响 Tween 80 作为非离子型表面活性剂, 加入脂质体中可增加脂质体的稳定性。由图 2 知, 与 r<sub>(T/P)</sub> 为 2:5 相比, r<sub>(T/P)</sub> 为 3:5 和 4:5 时, VB<sub>2</sub> 脂质体粒径分布范围较窄, 且呈单峰分布, 有利于维持纳米脂质体悬浮液体系的稳定性<sup>[19]</sup>。存在于脂质体双分子层中 Tween 80 的聚氧乙烯基可从脂质双层中伸出, 致密覆盖在双层表面, 在脂质体外表面形成有一定厚度的亲水相, 促进脂质体曲率的增加, 因而得到粒径较小的脂质体, 但当 Tween 80 浓度较小时, 部分 VB<sub>2</sub> 脂质体中 Tween 80 含量较少, 从而导致体系中脂质体粒径不均<sup>[20]</sup>。

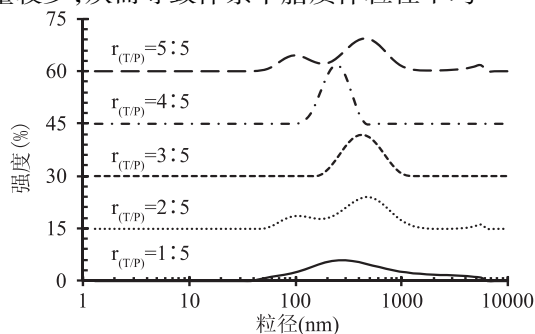


图 2 不同 r<sub>(T/P)</sub> 对 VB<sub>2</sub> 脂质体粒径分布的影响

Fig.2 The particle size distribution of liposomes loaded with VB<sub>2</sub> in different r<sub>(T/P)</sub>

如表 2 所示, 不同 r<sub>(T/P)</sub> 下 VB<sub>2</sub> 脂质体所带负电荷随 Tween 80 浓度增加而减小, 研究表明, 脂质体的 ζ-电位受脂质类型、芯材等影响, 电荷变化表明芯材进入磷脂双分子层中, 而电位的下降可能是由于表面活性剂的加入改变了粒子的剪切平面所导致的<sup>[21-23]</sup>。

表 2 不同 r<sub>(T/P)</sub> 下 VB<sub>2</sub> 脂质体的 ζ-电位及包封率

Table 2 ζ-potential and entrapment efficiency of liposomes VB<sub>2</sub> in different r<sub>(T/P)</sub>

r <sub>C/P</sub>	ζ-电位 (mV)	包封率 (%)
1:5	-16.7 ± 0.1 <sup>c</sup>	86.57 ± 0.21 <sup>c</sup>
2:5	-15.3 ± 0.1 <sup>d</sup>	90.94 ± 0.28 <sup>d</sup>
3:5	-14.2 ± 0.2 <sup>c</sup>	92.01 ± 0.30 <sup>c</sup>
4:5	-13.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	85.50 ± 0.33 <sup>b</sup>
5:5	-12.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	81.69 ± 0.25 <sup>a</sup>

表 2 可知, VB<sub>2</sub> 脂质体包封率随 Tween 80 含量的增加呈现出增大的趋势, 但当 Tween 80 添加比例

超过 3:5 时,脂质体的包封率下降。可能是脂质体中存在的亲脂性基团引起脂质体表面“稠化效应”的增强,使膜的有效厚度增加,为 VB<sub>2</sub> 提供了良好的存在空间,从而保持较高包封率,但当 Tween 80 浓度超出一定范围后,过量的 Tween 80 造成脂质膜双分子层结构的破坏,导致包封的 VB<sub>2</sub> 泄漏,降低了包封率<sup>[18]</sup>。因此为保证 VB<sub>2</sub> 脂质体体系的稳定性及脂质体双分子层结构的完整性,选择  $r_{(T/P)}$  为 3:5 进行下一步实验。

**2.1.3 不同 VB<sub>2</sub> 浓度对 VB<sub>2</sub> 脂质体的影响** 由图 3 可知,VB<sub>2</sub> 浓度为 1.0%、0.8% 时制得的 VB<sub>2</sub> 脂质体粒径分布为单峰分布,脂质体在体系中分散均一。而当 VB<sub>2</sub> 浓度为 0.4%、1.5%、2% 时,脂质体的粒径分布为双峰分布,可能是由于当 VB<sub>2</sub> 浓度为 0.4% 时,体系中 VB<sub>2</sub> 浓度较低,导致体系中形成的部分脂质体未荷载 VB<sub>2</sub>,体系中存在已荷载 VB<sub>2</sub> 和未荷载 VB<sub>2</sub> 两种脂质体;当 VB<sub>2</sub> 浓度为 1.5% 和 2% 时,体系中 VB<sub>2</sub> 含量过高,壁材/芯材比减小,壁材所产生的物理阻隔或屏障作用减小,部分 VB<sub>2</sub> 脂质体中包载的 VB<sub>2</sub> 易泄露到脂质体表面,导致脂质体颗粒大小不均<sup>[24]</sup>。

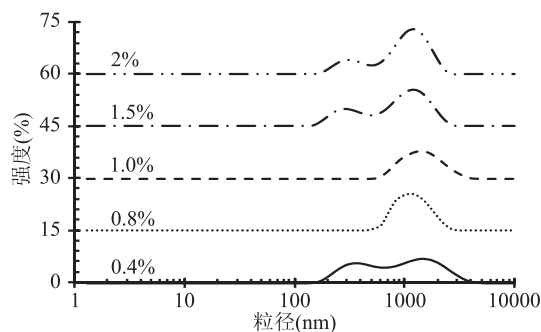


图 3 不同 VB<sub>2</sub> 浓度对 VB<sub>2</sub> 脂质体粒径分布影响

Fig.3 The particle size distribution of liposomes loaded with VB<sub>2</sub> in different concentration of VB<sub>2</sub>

如表 3 所示,不同 VB<sub>2</sub> 浓度下脂质体电位无显著差异 ( $p > 0.05$ ),而包封率随 VB<sub>2</sub> 浓度增加而增加,可能是由于体系中芯材浓度增大,使得脂质体囊泡对目标物捕捉更加容易,因而包封率增大<sup>[18]</sup>。VB<sub>2</sub> 浓度 1.0% 时,所制备的 VB<sub>2</sub> 脂质体在体系中分散均匀,具有良好的稳定性较高的包封率,其  $\zeta$ -电位为  $-12.1$  mV,包封率为 94.67%。

表 3 不同 VB<sub>2</sub> 浓度下 VB<sub>2</sub> 脂质体的  $\zeta$ -电位及包封率

Table 3  $\zeta$ -potential and entrapment efficiency of liposomes VB<sub>2</sub> in different concentration of VB<sub>2</sub>

VB <sub>2</sub> 浓度 (%)	$\zeta$ -电位 (mV)	包封率 (%)
0.4	$-13.3 \pm 0.7^a$	$85.23 \pm 1.29^a$
0.8	$-13.3 \pm 0.7^a$	$92.01 \pm 0.38^b$
1.0	$-12.1 \pm 0.5^a$	$94.67 \pm 0.80^c$
1.5	$-13.5 \pm 0.4^a$	$96.96 \pm 0.36^d$
2.0	$-13.6 \pm 0.5^a$	$96.06 \pm 0.42^d$

## 2.2 VB<sub>2</sub> 脂质体形貌

如图 4 可知,荷载 1.0% VB<sub>2</sub> 的脂质体大小均

一,呈规则球形结构且分散均匀,其粒径较大约为 300~500 nm,而荷载 2.0% VB<sub>2</sub> 的脂质体粒径较小,呈现不规则状并有聚集趋势,可能是由于 2.0% VB<sub>2</sub> 浓度过高,体系中过量的 VB<sub>2</sub> 不能被脂质体水相囊泡截留,且其壁材/芯材比较 1% VB<sub>2</sub> 浓度下的壁材/芯材比小,导致其壁材的物理阻隔作用减小,使脂质体内部的部分 VB<sub>2</sub> 泄漏。

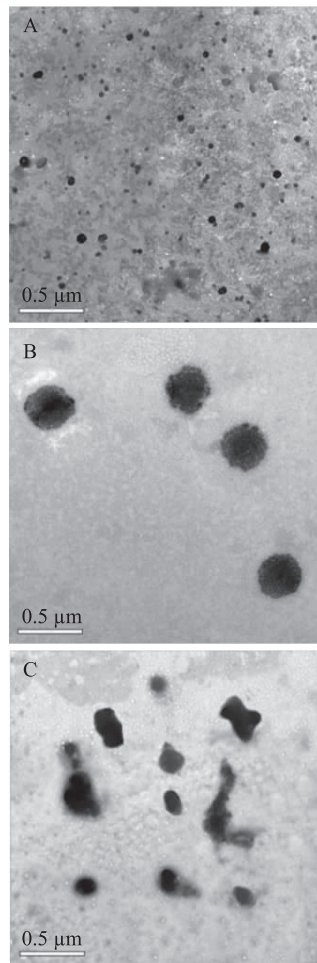


图 4 不同 VB<sub>2</sub> 浓度的脂质体的 TEM 图(7000 ×)

Fig.4 TEM observation of liposomes in different concentrations of VB<sub>2</sub> (7000 ×)

注:A:0% ;B:1.0% ;C:2.0% 。

## 2.3 VB<sub>2</sub> 脂质体的气味分析

如图 5,利用电子鼻对获得的 VB<sub>2</sub> 脂质体样品的信号数据进行主成分分析,建立前 2 个主成分的二维判别图。由图 5A 可知,VB<sub>2</sub> 脂质体平行检测的数据可构成独立组群,表明电子鼻分析检测重现性好。经主成分分析,发现 VB<sub>2</sub> 脂质体的主成分 PC1 和 PC2 的累积方差贡献率为 96.70%,大于 85%,说明 PC1 和 PC2 包含信息量大,能够反映 VB<sub>2</sub> 脂质体的整体信息<sup>[25-26]</sup>。区分指数 (discrimination index, DI) 为电子鼻软件提供样品区分程度的表征值,该值与区分效果呈线性相关,最大值为 100,本实验中 DI 值为 91,表明区分有效<sup>[27]</sup>。图 5A 中 VB<sub>2</sub> 脂质体和 VB<sub>2</sub> 原料分布区域较远,说明 VB<sub>2</sub> 脂质体与 VB<sub>2</sub> 原料在气味上差别明显,即 VB<sub>2</sub> 脂质体可成功掩蔽 VB<sub>2</sub> 的

不良气味。

图 5B 清晰显示出 VB<sub>2</sub> 脂质体对 18 个传感器的反应信号强度具有不同的响应。其中 VB<sub>2</sub> 脂质体与 VB<sub>2</sub> 原料存在明显差异,7 种传感器(T40/2、P30/2、P40/2、P30/1、PA/2、T70/2、T30/1)响应值的差异明显,表明脂质体成功掩盖了原料 VB<sub>2</sub> 不良气味<sup>[28]</sup>。通过建立样品指纹图,可对 VB<sub>2</sub> 的不良气味掩蔽提供理论依据,为设计含 VB<sub>2</sub> 的食品配方提供了新思路。

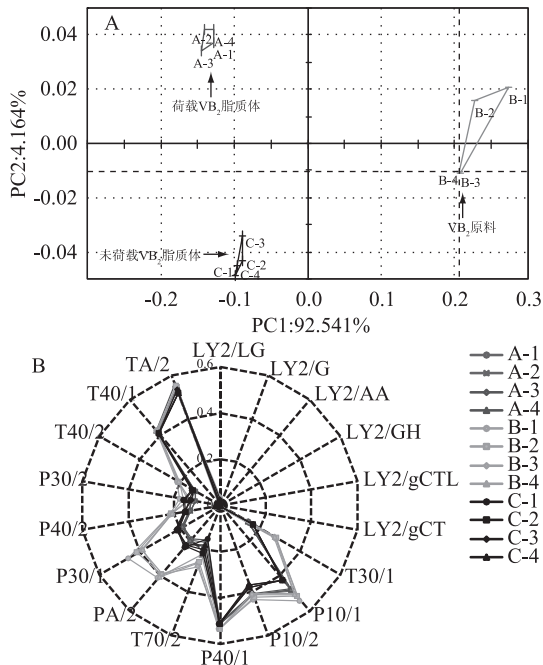


图 5 VB<sub>2</sub> 脂质体电子鼻气味分析

Fig.5 Analyse of liposomes loaded with VB<sub>2</sub> by E-nose

注:A:VB<sub>2</sub> 脂质体主成分分析;

B:VB<sub>2</sub> 脂质体指纹图每组样品做 4 个平行。

## 2.4 VB<sub>2</sub> 脂质体模拟胃肠液体系下的稳定性

如图 6,在模拟胃液中,前 2 h 内 VB<sub>2</sub> 脂质体的释放率小于 7.0%,4 h VB<sub>2</sub> 释放率增加至 33.1%。可能由于在胃液低 pH 环境中,高浓度 H<sup>+</sup> 穿过脂质双分子层膜,导致双分子层膜的渗透性增加,脂质体失稳,被截留在脂质体水相的 VB<sub>2</sub> 更容易透过双分子膜<sup>[29]</sup>。在人工模拟肠液中,前 2 h 内 VB<sub>2</sub> 脂质体的释放率约为 10.3%,4 h VB<sub>2</sub> 的释放率增加至 49.2%。可能是由于模拟肠液环境中的胆盐会破坏脂质体的双分子层膜,促使 VB<sub>2</sub> 释放<sup>[18]</sup>。

## 3 结论

本文优化了 VB<sub>2</sub> 脂质体制备工艺,并对其在模拟胃肠液体系中的稳定性及对 VB<sub>2</sub> 不良气味的掩蔽进行评价。结果表明,当  $r_{(C/P)} = 1:8$ ,  $r_{(T/P)} = 3:5$ , VB<sub>2</sub> 浓度为 1.0% 时制备的 VB<sub>2</sub> 脂质体  $\zeta$ -电位为 -12.1 mV,封装率为 94.67%,微粒形态规整,分散均匀。经过脂质体封装能够实现 VB<sub>2</sub> 不良气味的掩蔽,且 VB<sub>2</sub> 在体外模拟胃肠液中呈缓慢释放。本研究基于食品结构化设计理论,构建了不稳定营养素 VB<sub>2</sub> 的递送

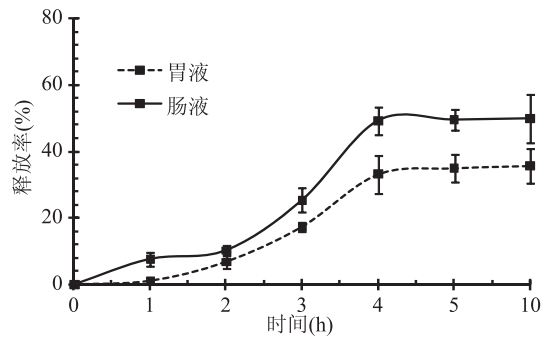


图 6 VB<sub>2</sub> 脂质体在模拟胃肠液体系下的释放率

Fig.6 Releaserate of liposomes loaded with VB<sub>2</sub> under simulated gastrointestinal fluid system

体系,改善了 VB<sub>2</sub> 的不良感官特性,为设计含 VB<sub>2</sub> 的食品配方提供一定的理论依据。

## 参考文献

- [1] Zhang N, Ping Q, Huang G, et al. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2006, 327: 153-159.
- [2] Lasic D D. Novel applications of liposomes [J]. Trends in Biotechnology, 1998, 16(7): 307-321.
- [3] Gómez-Hens A, Fernández-Romero J M. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2006, 25(2): 167-178.
- [4] Schwendener R A, Schott H. Liposome formulations of hydrophobic drugs [J]. Methods in Molecular Biology, 2010, 605: 129-138.
- [5] Kirby C, Clarke J, Gregoriadis G. Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability *in vivo* and *in vitro* [J]. Biochemical Journal, 1980, 186(2): 591-598.
- [6] Caracciolo G. Liposome-protein corona in a physiological environment; Challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines [J]. Nanomedicine Nanotechnology Biology & Medicine, 2015, 11(3): 543-557.
- [7] Wilson N, Shah N P. Microencapsulation of Vitamins [J]. Asean Food Journal, 2007, 14(1): 223-248.
- [8] Marín D, Alemán A, Sánchezfaure A, et al. Freeze-dried phosphatidylcholine liposomes encapsulating various antioxidant extracts from natural waste as functional ingredients in surimi gels [J]. Food Chemistry, 2017, 245: 525-535.
- [9] Meyenburg S, Lilie H, Panzner S, et al. Fibrin encapsulated liposomes as protein delivery system. Studies on the *in vitro* release behavior [J]. Journal of Controlled Release, 2000, 69(1): 159-168.
- [10] Cuomo F, Cofelice M, Venditti F, et al. In-vitro digestion of curcumin loaded chitosan-coated liposomes [J]. Colloids & Surfaces B Biointerfaces, 2018, 168: 29-34.
- [11] 王坤. 巯基化壳聚糖脂质体水凝胶的制备及其生物相容性研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2017.
- [12] 胡敏芳, 江明, 邱慧, 等. 维生素 B<sub>2</sub> 的 NMR 含量测定 [J]. 分析测试学报, 2013, 32(12): 1511-1514.
- [13] 刘佩莹. 几种药物联合治疗复发性口腔溃疡患者的疗效

及对炎性因子与疼痛程度的影响[J].医学综述,2016,22(17):3503-3507.

[14] Knyazev A V, Letyanina I A, Plesovskikh A S, et al. Thermodynamic properties of vitamin B<sub>2</sub> [J]. Journal of Chemical Thermodynamics, 2016, 100(1): 185-190.

[15] Bensasson R V, Land E J, Truscott T G. Flash Photolysis and Pulse Radiolysis[M]. New York: Pergamon Press, 1983.

[16] 李晓飞. 基于纳米豆粕的维生素 B<sub>2</sub> 与维生素 B<sub>6</sub> 共载体体系构建[D]. 南昌: 南昌大学, 2017.

[17] Lasic D D. Liposomes: From physics to applications [M]. Amsterdam: Elsevier, 1993: 575.

[18] 丁保森. 甘氨酸螯合铁及其纳米脂质体研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010.

[19] V.P. 托尔钦林, V. 魏西希. 脂质体: 原著第二版[M]. 邓意辉, 徐晖, 译. 北京: 化学工业出版社, 2007.

[20] Tasi L M, Liu D Z, Chen W Y. Microcalorimetric investigation of the interaction of polysorbate surfactants with unilamellar phosphatidylcholines liposomes [J]. Colloids & Surfaces A Physicochemical & Engineering Aspects, 2003, 213(1): 7-14.

[21] Mohan A, McClements D J, Udenigwe C C. Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes:

Influence of peptide molecular weight [J]. Food Chemistry, 2016, 213: 143-148.

[22] Mosquera M, Giménez B, Da S I, et al. Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen [J]. Food Chemistry, 2014, 156(2): 144-150.

[23] 范明辉. 红景天苷纳米脂质体的研制[D]. 无锡: 江南大学, 2008.

[24] 井乐刚, 赵新淮. 复合维生素脂质体的制备[J]. 中国农学通报, 2011, 27(4): 330-333.

[25] 李越华, 包建强, 周秋淑, 等. 基于电子鼻的鲫鱼肉新鲜度研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(19): 284-288.

[26] 乔宇, 潘思轶, 徐晓云, 等. 电子鼻检测不同品种和加工类型的柑橘汁[J]. 农业工程学报, 2011, 27(12): 364-368.

[27] 胡志全, 王海洋, 刘友明. 电子鼻识别大米挥发性物质的应用性研究[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(7): 93-98.

[28] 黎量, 杨诗龙, 刘玉杰, 等. 基于相关性分析的山楂炮制过程气味变化机制研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(17): 3283-3286.

[29] Montgomery J M, Alpers M P. Characterization of liposomes coated with S-layer proteins from lactobacilli [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2007, 1768(3): 393-400.

(上接第44页)

-mass spectrometry [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2013, 21(2): 190-197.

[3] Benjakul S, Visessanguan W, Thongkaew C, et al. Comparative study on physicochemical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage [J]. Food Research International, 2003, 36(8): 787-795.

[4] Chanarat S, Benjakul S. Effect of formaldehyde on protein cross-linking and gel forming ability of surimi from lizardfish induced by microbial transglutaminase [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(2): 704-711.

[5] 彭惠惠, 李吕木. 葡萄籽提取物作为肉制品保鲜剂的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2011(1): 128-132.

[6] 林亲录, 施兆鹏. 葡萄籽中的天然抗氧化剂及其保健功能[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(4): 75-78.

[7] 李超, 王乃馨, 陈尚龙, 等. 葡萄籽提取物对发酵鸭肉香肠储存稳定性的影响[J]. 食品工业, 2016(2): 117-120.

[8] 吴帅帅, 朱军莉, 沈鹏, 等. 真空包装结合甲醛抑制剂对鱿鱼丝贮藏品质的影响[J]. 中国食品学报, 2014(5): 148-156.

[9] Tyihák E, Albert L, Németh Z I, et al. Formaldehyde cycle and the natural formaldehyde generators and capturers [J]. Acta Biologica Hungarica, 1998, 49(2-4): 225.

[10] 李颖畅, 杨钟燕, 仪淑敏, 等. 蓝莓叶多酚和大蒜提取物对冷藏鱿鱼鱼丸品质的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38

(10): 331-336.

[11] Pattarvivat J, Morioka K, Shirosaki M, et al. Effect of washing condition on the removal of lipid from the fatty fish escolar (*Lepidocybium flavobrunneum*) Meat [J]. J Biol Sci, 2008, 8(1): 34-42.

[12] 余永名, 马兴胜, 仪淑敏, 等. 豆类淀粉对鲢鱼鱼糜凝胶特性的影响[J]. 现代食品科技, 2016, 32(1): 129-135.

[13] Ma X S, Yi S M, Yu Y M, et al. Changes in gel properties and water properties of *Nemipterus virgatus* surimi gel induced by high-pressure processing [J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 61(2): 377-384.

[14] 励建荣, 胡子豪, 蒋跃明. 鲜香菇中甲胺含量检测的样品前处理方法改进[J]. 农业工程学报, 2008, 24(10): 252-254.

[15] 贾佳, 朱军莉, 励建荣. 气相色谱-氢火焰离子检测器检测海产品中的二甲胺[J]. 食品科学, 2009, 30(6): 167-170.

[16] Prodpran T, Benjakul S, Phatcharat S. Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of film from fish myofibrillar protein [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, (12): 774-782.

[17] 励建荣, 俞其林, 胡子豪, 等. 茶多酚与甲醛反应特性研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8(2): 52-57.

[18] 唐华丽, 熊汉国, 王玮. 响应面法优化葡萄籽多酚提取工艺[J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 147-149, 163.