

# 中链脂肪酸脂质体的制备及其特性评价

刘成梅, 王瑞莲, 刘 伟, 万 婕, 刘玮琳

(南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047)

**摘 要:** 采用薄膜蒸发-超声法制备中链脂肪酸脂质体, 考察单因素制备工艺对包封率的影响以及所得脂质体的外观形态、粒径、Zeta 电位和稳定性。结果表明, 中链脂肪酸脂质体的最佳工艺条件为: 磷脂与胆固醇之比为 3:1, 中链脂肪酸与总脂材比为 1:10, 表面活性剂(吐温-80)与膜材之比为 3:10, 制备温度为 35℃。最佳工艺条件下产物包封率可达 82.9%, 平均粒径为 240.420.3nm, Zeta 电位为-52.273.2mV, 4℃下放置 90d 质量稳定。

**关键词:** 中链脂肪酸; 脂质体; 薄膜蒸发-超声法

## Preparation Process of Medium Chain Fatty Acid Liposome and Its Characteristic Evaluation

LIU Cheng-mei, WANG Rui-lian, LIU Wei, WAN Jie, LIU Wei-lin

(Key Laboratory of Food Science, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Liposomes were prepared by thin film evaporation and ultrasonic technique, and single factor test was adopted to study the effects of several factors in preparation on encapsulation efficiency. The shape, the particle size distribution, the Zeta potential and stability of medium chain fatty acid liposomes were investigated. The results indicated that the optimal preparation conditions of medium chain fatty acid liposome were as follows: the ratio of soybean phosphatidylcholine to cholesterol 3:1, the proportion of medium chain fatty acid and lipids in weight 1:10; the ratio of Tween-80 to total lipids 3:10 and the optimal temperature 35℃. In the optimal condition, the encapsulation efficiency could reach 82.9%, the mean particle size of liposome was 240.420.3 nm and the Zeta potential was -52.273.2 mV. The liposome was still stable after that stored for 90 days storage at 4℃.

**Key words** medium chain fatty acid liposome, thin film evaporation and ultrasonic technique

中图分类号 R944.1

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2007)10-0143-04

中链脂肪酸(MCFA)是以碳元素为 8 的辛酸(octanoic acid, C<sub>8:0</sub>)、碳元素为 10 的癸酸(decanoic acid, C<sub>10:0</sub>)定义的。与长链脂肪酸相比, 具有吸收速度快, 无积蓄, 几乎全部作为能量来消耗等特点<sup>[1]</sup>。可作为危症病人的能量来源。MCFA 可以节省蛋白, 具有保持肌肉而不增加脂肪组织的作用, 是运动员以及减肥者所想要的结果; 能提高鸡的采食量、提高产蛋率、增加蛋重、降低破壳率, 能抑制体脂肪的形成改善肉质, 抑制原虫引起的疾病, 尤其鸡球虫病的发生<sup>[1]</sup>; 可减少体脂和蛋白质的消耗能够降低仔猪的死亡率提高仔猪日增重<sup>[2]</sup>, 用以长途运输雏鸡饮水, 可起到供能的作用<sup>[3]</sup>。但是(MCFA)水溶性较差, 影响了其作用效果。

脂质体(liposome)又称为类脂小球或液晶微囊, 是一种定向药物载体, 属于靶向给药系统的一种药物新剂型<sup>[4]</sup>, 对亲脂性药物有良好的包封率, 脂质体作为一种

新型药物载体, 有利于增强药物的靶向性, 提高药物的生物利用度, 增加药物的稳定性, 降低药物的毒副作用, 达到药物控释缓释的目的。目前尚没有关于中链脂肪酸脂质体的报道, 将中链脂肪酸制成脂质体的形式解决了中链脂肪酸水溶性差的问题, 提高了中链脂肪酸的利用度, 提高它在肠道内的稳定性、靶向性、长效性<sup>[5]</sup>, 从而可进一步扩展其应用领域。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

6890N 气相色谱仪 Agilent 公司; NICOMP 380/ZLS 纳米粒度分析仪 美国 PSS 粒度分析仪公司; H-600 透射电镜 日立公司; 循环水式多用真空泵 郑州长城科公司; 超声波振荡仪 山东奥波公司。

中链脂肪酸 进口分装 大豆磷脂(纯度>92%) 上

收稿日期: 2007-06-14

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划创新团队项目(IRT0540)

作者简介: 刘成梅(1963-), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品加工新技术与功能性食品。

海泰伟制药厂; 辛酸和癸酸标准品 Sigma 公司; 胆固醇 上海化学试剂站分装厂; 正己烷、二氯甲烷、氢氧化钾、甲醇、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等试剂均为分析纯。

## 1.2 方法

### 1.2.1 中链脂肪酸脂质体的制备

采用薄膜蒸发-超声法<sup>[6-7]</sup>制备中链脂肪酸脂质体。按照一定比例称取各成分(磷脂、胆固醇、中链脂肪酸)和适量表面活性剂于茄形烧瓶, 加入二氯甲烷, 于 35℃ 恒温水浴中旋转蒸发, 除去有机溶剂, 使磷脂等成膜材料在烧瓶壁上形成均匀的一类脂膜。然后往烧瓶中分别加入 pH 为 6.8 的 PBS 缓冲溶液, 继续在 35℃ 水浴下旋转, 然后在水浴中超声, 使得薄膜溶胀水合, 所得的乳白色混悬液用 0.8μm 微孔滤膜过滤, 制得中链脂肪酸脂质体悬浮液。

### 1.2.2 包封率的测定

#### 1.2.2.1 色谱条件

色谱柱 HP-innowax Polyethylene Glycol (30m×0.32mm×0.5μm); 载气为高纯氮气(纯度 99.999%), 流速 20ml/min, 氢气流速 40ml/min, 空气流速 450ml/min; 载气的柱内流速 1.4ml/min; 程序升温: 150℃ 保持 5min, 以 6℃/min 升温到 180℃ 保持 2min; 进样口温度 280℃; FID 检测器温度 280℃; 进样量 1.0μl。

#### 1.2.2.2 脂肪酸甲酯化

称取 0.02g 中链脂肪酸, 加入 10ml 正己烷, 摇动溶解, 加入 5ml 甲醇, 5ml 0.8mol/L 的氢氧化钾-甲醇溶液, 于 40℃ 水浴中放置 40min 进行甲酯化, 取出冷却加蒸馏水洗涤, 静置分层后取上清液用无水硫酸钠干燥待测。

取中链脂肪酸脂质体悬浮液 15ml 放入透析袋中, 以 pH6.8 的磷酸缓冲液 100ml 为外液透析 15h。精密吸取透析内液 10ml, 加甲醇定容到 100ml, 超声振荡 20min 破乳, 离心后取上清液, 按 1.2.2.2 的方法进行甲酯化, 做为脂质体中包封脂肪酸测定。取中链脂肪酸脂质体悬浮液 10ml, 加甲醇定容到 100ml, 超声振荡 20min 破乳, 离心后取上清液, 按 1.2.2.2 的方法进行甲酯化, 做脂质体中总脂肪酸测定。

#### 1.2.2.3 包封率

$$\text{包封率} = n/m \times 100\%$$

式中,  $m$  为脂质体中总中链脂肪酸的含量;  $n$  为包封的中链脂肪酸的含量。

#### 1.2.2.4 标准曲线的绘制

精密称取辛酸标准品, 用正己烷溶解配制成 0.15、0.3、0.6、1.2、2.4mg/ml 的标准品溶液, 称取癸酸标

准品, 用正己烷溶液配制成 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6mg/ml 的标准品溶液, 按 1.2.2.2 的方法甲酯化, 精密量取 1μl, 注入色谱仪, 记录色谱图, 测定峰面积。以脂肪酸浓度(mg/ml)对峰面积作标准曲线, 得回归方程, 辛酸  $y=314.62x+32.34$ ,  $R=0.9975$ ; 癸酸  $y=429.95x+20.688$ ,  $R=0.9985$ 。结果表明, 在 0.15~2.4mg/ml 范围内, 辛酸峰面积和样品浓度(辛酸的量)呈良好的线性关系; 在 0.1~1.6mg/ml 内, 癸酸峰面积和样品浓度(癸酸的量)呈良好的线性关系。

### 1.2.3 脂质体的显微形态观察

将脂质体稀释到一定倍数, 以 1% 磷钨酸染色, 置于铜网上, 自然凉干, 用 H-600 透射电镜观察脂质体外观形态。

### 1.2.4 脂质体的粒径分布和 Zeta 电位

取脂质体悬浮液, 用 NICOMP 380/ZLS 纳米粒度分析仪测定中链脂肪酸脂质体的粒径大小和粒径分布及 Zeta 电位。

### 1.2.5 脂质体的稳定性考察

将脂质体悬浮液在 4℃ 下储存 90d, 每隔 30d 测定一次脂质体的各指标。

## 2 结果与分析

### 2.1 制备工艺条件对包封率的影响

单因素试验考察磷脂与胆固醇质量比、中链脂肪酸与总脂材比、表面活性剂(吐温-80)与总脂材比、制备温度对包封率的影响。

#### 2.1.1 磷脂与胆固醇质量比的影响

保持中链脂肪酸浓度为 2mg/ml, 中链脂肪酸与总脂材比例 1:20, 表面活性剂与总脂材比例 3:10, 制备温度 35℃ 不变, 改变胆固醇的加入量。考察了胆固醇用量的变化对脂质体包封率的影响, 结果见图 1A。结果表明: 磷脂和胆固醇质量比为 4:1 时, 包封率较高, 胆固醇含量较多时, 它以高浓度渗入磷脂双层, 脂质体膜的刚性较强, 但磷脂含量太少, 可包封药物的空间小, 包封率小; 若胆固醇的含量较低, 膜的刚性不强, 制备和保存中药物容易泄露, 包封率低。

#### 2.1.2 中链脂肪酸与总脂材比的影响

保持中链脂肪酸浓度为 2mg/ml, 大豆磷脂与胆固醇的质量比为 4:1, 表面活性剂与总脂材比例 3:10, 制备温度 35℃ 不变, 改变总脂材的量, 使总脂材与中链脂肪酸之比分别为 5:1~25:1, 产物的包封率结果见图 1B。结果表明: 脂材较少时, 药物用量超过了脂质膜饱和限度, 包封率降低, 随着总脂材加入量的增大, 虽然包封率较高, 但脂质体的载药量(即单位重量的脂材所包封的脂肪酸)较小, 选择总脂材与中链脂肪酸质量比为 10:1。

### 2.1.3 表面活性剂(吐温-80)与总脂材比的影响

保持中链脂肪酸浓度为2mg/ml,大豆磷脂与胆固醇的质量比为4:1,总脂材与中链脂肪酸比为10:1,制备温度35℃不变,依次改变表面活性剂(吐温-80)与总脂材比为1:10~5:10,产物的包封率结果见图1C。结果表明:Tween-80与脂材的最佳比例为3:10,由于Tween-80具有疏水性长链,能插入脂质体膜,而亲水端伸展于脂质体的表面,使脂质膜变的疏松有利于中链脂肪酸的嵌入,但由于Tween-80本身的成膜性差,随着比例的增大,会破坏脂质体的稳定性,使包封率下降。

### 2.1.4 制备温度对包封率的影响

保持中链脂肪酸浓度为2mg/ml,大豆磷脂与胆固醇的质量比为4:1,总脂材与中链脂肪酸比为10:1,表面活性剂与总脂材比例3:10,考察了25、35、45、55、65℃五种制备温度对脂质体包封率的影响,结果见图1D。结果表明:35℃下脂质体包封率最高,由于温度过高时脂材的成膜速度过快,磷脂和胆固醇之间还没有形成致密结合,在加入PBS溶液溶胀时,脂材膜比较松散,得到的脂质体的包封率较小。在温度过低时,脂材的成膜速度又过慢,也达不到成膜的致密性,得到的脂质体的包封率较小。

## 2.2 正交试验结果

在单因素试验的基础上,考虑到因素交互效应对脂质体成膜以及质量的影响<sup>[8]</sup>,考察它们之间的相互作用对包封率的影响,进行正交试验设计,每个因素取三

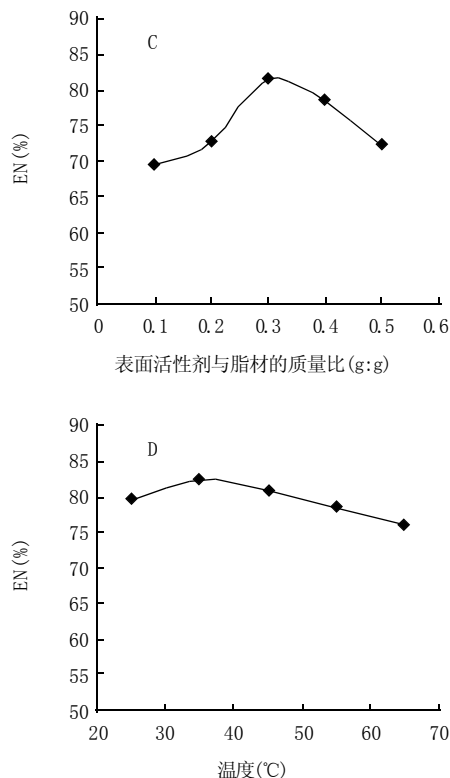


图1 磷脂和胆固醇的质量比(A)、脂材和中链脂肪酸的质量比(B)、表面活性剂与脂材的质量比(C)、不同温度(D)对包封率的影响

Fig.1 Effects of ratio of soybean phosphatidylcholine to cholesterol(A), proportion of medium chain fatty acid and lipids in weight(B), ratio of Tween-80 to total lipids(C) to temperature (D) on encapsulation efficiency

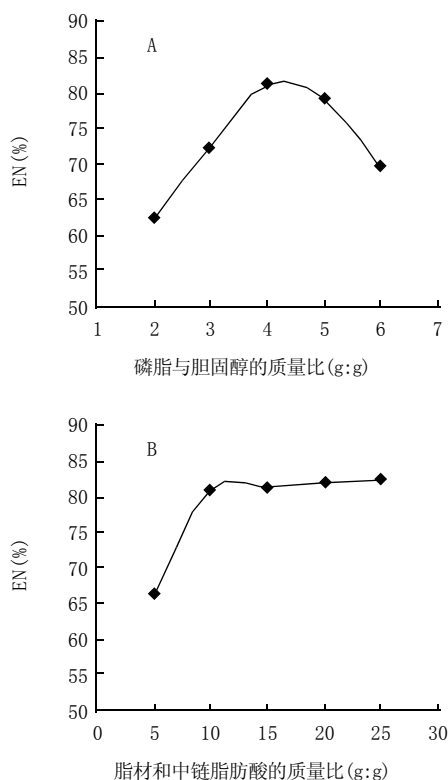


图2 脂质体中总的脂肪酸的色谱图

Fig.2 GC chromatogram of total fatty acid of liposome

个水平,按 $L_9(3^4)$ 安排正交试验。以中链脂肪酸脂质体的包封率为评价指标,得出最佳处方工艺为药脂比为1:10,磷脂与胆固醇质量比为3:1,表面活性剂与总脂材之比3:10,最佳温度为35℃;影响因素药脂比>磷脂胆固醇比>表面活性剂与总脂材之比>成膜温度。

### 2.3 最佳工艺条件下的包封率

按1.2.2.1的色谱条件,测得最佳处方下总的脂肪酸和被包封的脂肪酸谱图(见图2和图3)。将谱图测得的峰面积代入1.2.2.4的回归方程分别计算出10ml脂质体中总的脂肪酸和被包封的脂肪酸的量分别为16.69mg

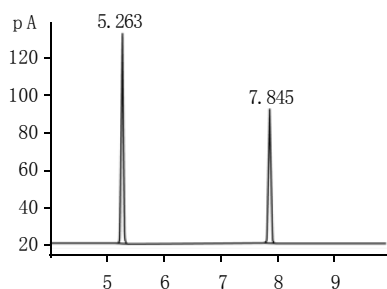


图3 脂质体中包封的脂肪酸的色谱图

Fig.3 GC chromatogram of fatty acid enveloped by liposome

和 13.84mg, 按 1.2.2.3 求得最佳工艺条件下制备的中链脂肪酸脂质体的包封率为 82.9%。

#### 2.4 脂质体的透射电镜观察结果

在 20000 倍的透射电镜下观察脂质体的外观形态, 可以看到分布均匀, 外观为圆形或椭圆形的脂质体 (见图 4)。

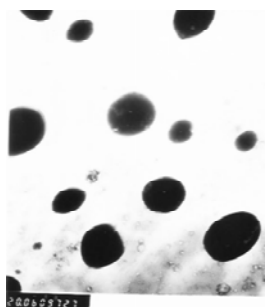


图4 脂质体的透射电镜照片(×20000)

Fig.4 Transmission electron photomicrograph of fatty acid liposome (×20000)

#### 2.5 脂质体的粒径及粒度分布

用 NICOMP 380/ZLS 纳米粒度分析仪测定最佳工艺条件下脂质体的平均粒径为 240.4nm, 粒度分布见图 5。从图 5 可以看出, 脂质体的粒径主要集中在 180~

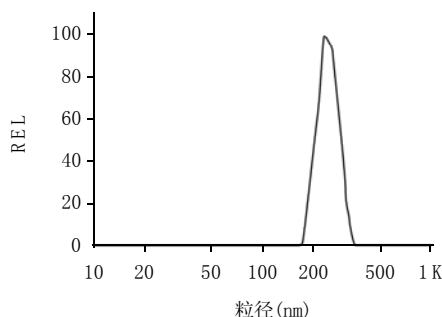


图5 中链脂肪酸脂质体的粒度分布图

Fig.5 Particle size distribution of fatty acid liposome

350nm, 说明制得的脂质体的粒度均匀, 粒径较小并且分布范围窄。

#### 2.6 脂质体的 Zeta 电位

用 NICOMP 380/ZLS 纳米粒度分析仪测定最佳处方脂质体的表面电荷, 测得最佳处方脂质体的 Zeta 电位为 -52.27mV, 说明脂质体比较稳定。

#### 2.7 中链脂肪酸脂质体的稳定性评价

将中链脂肪酸脂质体按 10ml 分装在玻璃瓶中, 在 4℃ 密封放置, 然后分别于 0、30、60、90d 观察其外观性状并检测包封率、平均粒径及 Zeta 电位等参数, 每次取样检测以考察样品的稳定性, 检测结果见表 1。

表1 中链脂肪酸脂质体稳定性考察结果

Table 1 Stability of medium chain fatty acid liposome

指标	时间(d)			
	0	30	60	90
色泽	乳白色	乳白色	乳白色	乳白色
包封率(%)	82.9	80.5	79.6	78.1
Zeta电位(mV)	-52.27	-51.32	-50.03	-52.96
粒径(nm)	240.4	258.2	264.7	267.6

由表 1 可以看出, 中链脂肪酸脂质体的各指标的变化很小, 说明脂质体的稳定性较好, 而且经过 90d 的储存, 包封率变化不大, 显示出薄膜分散-超声法制得的脂质体具有较好的稳定性。

### 3 结 论

本实验制备的中链脂肪酸脂质体包封率较高, 可以达到 82.9%, 平均粒径较小, 主要集中在 180~350nm, 且分布均匀, 脂质体稳定性较好, 说明薄膜蒸发-超声法制备中链脂肪酸脂质体可行。

#### 参考文献:

- [1] 中链脂肪酸对鸡的影响: 日本, 公开专利 平3-198748[P].
- [2] 朱成林, 孙家鹏. 中链脂肪酸对新生仔猪成活率和增重的作用[J]. 新疆畜牧业, 2000(增刊): 11-14.
- [3] 孙安权. 脂肪营养及在饲料中添加(下)[J]. 饲料广角, 2002(3): 20-21.
- [4] 陈鹰, 陈松. 磷脂类皮肤载体给药系统的研究进展[J]. 中国药房, 2003, 14(9): 564-566.
- [5] 徐辉壁. 纳米医药[M]. 北京: 清华大学出版社, 2004: 147-182.
- [6] VENKATESWARLU V, MANJUNATH K. Preparation, characterization and *in vitro* release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles [J]. Journal of Controlled Release, 2004, 95: 627-638.
- [7] 张耕, 易以木. 苦参素磷脂纳米粒的研制[J]. 中国医药学杂志, 2004, 24(9): 573-574.
- [8] 郭海燕, 莫林. 脂质体物理稳定性和包封率的影响因素[J]. 中国新药志, 2004, 13(6): 498.