

椰子油基胆盐脂质体的制备及工艺优化

Preparation and process optimization of coconut oil-based bile salt liposomes

时振振 白新鹏 岳宜静

SHI Zhen-zhen BAI Xin-peng YUE Yi-jing

(海南大学食品科学与工程学院, 海南 海口 570000)

(School of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou, Hainan 570000, China)

摘要:目的:提高椰子油的水溶性,扩展其在食品工业中的应用范围。方法:根据椰子油脂溶性的特点,以大豆卵磷脂—脱氧胆酸盐作为壁材,椰子油为芯材,利用薄膜分散法制备椰子油胆盐脂质体。考察了大豆卵磷脂/脱氧胆酸盐比、PBS/无水乙醇比、样脂比、超声时间、水化时间和水化温度等影响因素对包封率的影响,并优化了椰子油胆盐脂质体的制备工艺条件。结果:其最优制备工艺为大豆卵磷脂/脱氧胆酸盐比 2.53、样脂比 0.56、水化温度 64.7 °C,椰子油胆盐脂质体的包封率为 58.09%。结论:薄膜分散法制备椰子油胆盐脂质体包封率较好,可以提高椰子油的水溶性。

关键词:椰子油;胆盐;脂质体;包封率

Abstract: Objective: this study focuses on improving the water solubility of coconut oil and expand its application in food industry. **Methods:** According to the characteristics of the solubility of coconut oil, soybean lecithin - deoxycholate was used as shell material with coconut-oil core to establish coconut-oil bile salt liposomes by thin film dispersion method. Response surface optimization (RSM) was carried out according to the encapsulation rate, and the effects of several factors, including soybean lecithin/deoxycholate ratio, PBS/ anhydrous ethanol ratio, sample fat ratio, ultrasonic time, hydration time and hydration temperature, on the encapsulation rate were investigated. **Results:** The results showed that the optimal preparation conditions were soybean lecithin/deoxycholate salt ratio of 2.53, sample fat ratio of 0.56, hydration temperature of 64.7 °C, and the encapsulation efficiency of coconut oil bile salt liposomes was 58.09%. **Conclusion:** The encapsulation efficiency of coconut oil

bile salt liposomes made by thin film dispersion method is favorable, and can improve the water solubility of coconut oil.

Keywords: coconut oil; bile salts; Liposomes; the encapsulation rate

椰子油(Coconut Oil, CO)是源于椰子果肉经榨取和精炼得到的植物性油脂,富含中链脂肪酸(Medium Chain Fatty Acids, MCFAs)以及多种活性物质^[1], MCFAs 比例高达 80% 以上,主要为辛酸、癸酸以及月桂酸,月桂酸含量在原生态椰子油中高达 50%~53%,故椰子油又被称为月桂酸油^[2-4]。中链脂肪酸中的中链脂肪酸甘油三酯(Medium Chain Triglycerides, MCT)含量占 60%,能被人体快速消化吸收,迅速提供能量,且不会在人体内转化或堆积成脂肪^[5],具有促进新陈代谢、减少机体负荷、抗菌^[6]、抗氧化、降血脂和胆固醇等多种生理功能^[1,7],对人体的生理健康发展和维持具有积极效应^[8]。椰子油的熔点约为 24~26 °C^[8]。椰子油低熔点和不溶于水的性质限制了其在食品工业的应用范围。

脂质体(liposome, LPs)是 1965 年英国科学家 Bangham 在用电镜观察分散在水中的磷脂时发现的。其结构是由尾对尾的磷脂双分子层形成外围结构,内部为水相,磷脂分子层之间为油相^[9],其理想化结构见图 1。相较于纳米乳液和微胶囊而言,脂质体的优势是形成了一个同时运载着油和水的体系。将性质不稳定的物质包埋在脂质体中,可更长时间保持物质原有活性,并且由于脂质体颗粒大小属于纳米级别,因此被脂质体包埋的物质更容易被人体吸收利用^[10-13]。胆盐脂质体是在脂质体膜中加入胆盐如胆酸钠或去氧胆酸盐而形成的,它不同于普通脂质体,由于胆盐的加入赋予了脂质体高度的变形性,可携带药物透过比自身尺寸小数十倍的孔隙,最初被应用于促进透皮给药^[14-17]。

吕方方等^[18]曾对羧甲基壳聚糖(CMCT)包裹椰子油脂质体的制备工艺进行了优化,但因素水平设计不够完

基金项目:海南省重点科技计划项目(编号:ZDYF2019021, SQ2021XDNY0122);海口市重点科技计划项目(编号:2020-020)

作者简介:时振振,女,海南大学在读硕士研究生。

通信作者:白新鹏(1963—),男,海南大学教授,博士。

E-mail: xinpeng2001@126.com

收稿日期:2021-06-03

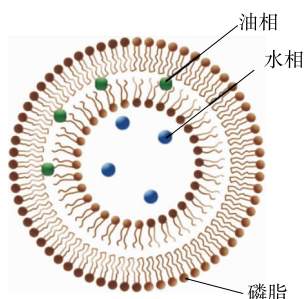


图 1 脂质体理想化结构示意图

Figure 1 Ideal structure of liposomes

善。研究拟利用脂质体结构特征,将椰子油包裹在中间的疏水尾部之间,其中也不乏由部分油脂被包埋进了内水相^[12],以提高椰子油的水溶性及生物利用率。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

初榨椰子油:海南大白康健医药股份有限公司;

脱氧胆酸盐(猪):65%,上海源叶生物科技有限公司;

大豆卵磷脂:食品级,河南万邦实业有限公司;

无水乙醇:分析纯,西陇科学股份有限公司;

石油醚(Ⅱ):分析纯,广州化学试剂厂;

1×PBS 缓冲液:pH 7.2~7.4,广州赛国生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

电子天平:EL204 型,梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司;

循环水式真空泵:SHZ-D 型,上海予华仪器设备有限公司;

高速冷冻离心机:GL-20G 型,上海安亭科学仪器厂;

高功率超声波破碎仪:KQ-800KDE 型,昆山市超声仪器有限公司;

旋转蒸发仪:EV400 型,北京莱伯泰科仪器股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 胆盐脂质体的制备 采用薄膜分散法制备椰子油胆盐脂质体。将磷脂与脱氧胆盐按一定比例(m 大豆卵磷脂: m 脱氧胆盐 分别为 2:1,3:1,4:1,5:1,6:1)加入茄形瓶中,再加入一定量无水乙醇和一定量的椰子油。将混合物超声分散一定时间后,于 55℃ 下旋蒸 30 min。再加入 25 mL 的磷酸缓冲盐溶液(PBS)后,在一定温度下水化一定时间后即得到椰子油脂质体。

1.2.2 包封率的测定

(1) 游离椰子油含量测定:采用萃取—离心法分离游离椰子油,分离后旋蒸除去有机溶液,再利用差量法得到游离油脂含量。具体操作:取 3 mL 椰子油脂质体于 15 mL 离心管中,再加入 3 mL 石油醚,摇晃离心管约

15 s 后进行离心(2 000 r/min,3 min),重复萃取 3 次。将茄形瓶称重得到空瓶重 M_1 ,称重后加入萃取液石油醚放入旋转蒸发仪旋转,蒸发除去萃取液石油醚后,待茄形瓶温度变为常温后再次称重得到瓶重 M_2 。空白对照为按同样方法制备脂质体,但不加入椰子油,首先称重得到空瓶重 M_3 ,再按同样方法先萃取后蒸发除去石油醚,得到蒸发石油醚后的瓶子质量 M_4 。按式(1)计算游离椰子油含量。

$$W_{\text{游}} = (M_2 - M_1) - (M_4 - M_3), \quad (1)$$

式中:

$W_{\text{游}}$ ——游离椰子油含量,g;

M_1 ——空瓶质量,g;

M_2 ——蒸发除去萃取液石油醚后瓶质量,g;

M_3 ——对照组空瓶质量,g;

M_4 ——对照组蒸发石油醚后的瓶子质量,g。

(2) 总椰子油含量测定:取 3 mL 椰子油脂质体于 15 mL 离心管中,加入 3 mL 破乳剂。混合均匀后放入超声清洗机中超声粉碎 10 min 进行破乳,破乳后加入 3 mL 石油醚,摇晃离心管约 15 s 后进行离心(8 000 r/min,3 min),共重复萃取 3 次。将茄形瓶称重得到空瓶重 M_5 ,称重后加入萃取液放入旋转蒸发仪旋转,蒸发除去石油醚后,待茄形瓶温度变为常温后再次称重得到瓶重 M_6 。空白对照为按同样方法制备脂质体,但不加入椰子油,再按试验测定法测定。首先空白对照组含量得到空白对照组空瓶质量 M_7 ,再按同样方法先萃取后蒸发除去石油醚,得到蒸发石油醚后的瓶子质量 M_8 。按式(2)计算总椰子油含量。

$$W_{\text{总}} = (M_6 - M_5) - (M_8 - M_7), \quad (2)$$

式中:

$W_{\text{总}}$ ——总椰子油含量,g;

M_5 ——空瓶质量,g;

M_6 ——蒸发除去萃取液石油醚后瓶质量,g;

M_7 ——对照组空瓶质量,g;

M_8 ——对照组蒸发石油醚后的瓶子质量,g。

(3) 椰子油包封率的计算:

$$E = [(W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}}] \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

E ——椰子油包封率,%;

$W_{\text{游}}$ ——游离椰子油含量,g;

$W_{\text{总}}$ ——总油量,g。

1.2.3 单因素试验设计

(1) m 大豆卵磷脂: m 脱氧胆盐 对包封率的影响:控制其他变量分别为磷酸缓冲盐溶液 25 mL、无水乙醇 5 mL、椰子油 1 mL、超声分散时间 10 min、水化温度 55℃、水化时间 30 min,考察 m 大豆卵磷脂: m 脱氧胆盐(2:1,3:1,4:1,5:1,6:1)对包封率的影响。

(2) V 磷酸缓冲盐溶液: V 无水乙醇 对包封率的影响。控制其他变量分别为大豆卵磷脂与胆盐比列 4:1,椰子油

1 mL、超声分散时间 10 min、水化温度 55 ℃、水化时间 30 min,考察 $V_{\text{磷酸缓冲盐溶液}}:V_{\text{无水乙醇}}$ (5:5,5:4,5:3,5:2,5:1)对包封率的影响。

(3) 超声时间对包封率的影响:控制其他变量分别为磷酸缓冲盐溶液 25 mL、大豆卵磷脂与胆盐比列 4:1、无水乙醇 5 mL、椰子油 1 mL、水化温度 55 ℃、水化时间 30 min,考察超声分散时间(10,15,20,25,30 min)对包封率的影响。

(4) 水化温度对包封率的影响:控制其他变量分别为磷酸缓冲盐溶液 25 mL、大豆卵磷脂与胆盐比列 4:1、无水乙醇 5 mL、超声分散时间 15 min、椰子油 1 mL、水化时间 30 min,考察水化温度(45,50,55,60,65,70 ℃)对包封率的影响。

(5) $m_{\text{大豆卵磷脂}}:m_{\text{椰子油}}$ 对包封率的影响:控制其他变量分别为磷酸缓冲盐溶液 25 mL、大豆卵磷脂与椰子油比列 4:1、无水乙醇 5 mL、超声分散时间 15 min、水化时间 30 min,考察 $m_{\text{大豆卵磷脂}}:m_{\text{椰子油}}$ (0.50,0.75,1.00,1.25,1.50)对包封率的影响。

(6) 水化时间对包封率的影响:控制其他变量分别为磷酸缓冲盐溶液 25 mL、大豆卵磷脂与胆盐比列 1:4、无水乙醇 5 mL、椰子油 1 mL、超声分散时间 15 min,考察水化时间(10,20,30,40,50 min)对包封率的影响。

1.2.4 响应面试验设计 在单因素试验基础上,发现 $m_{\text{大豆卵磷脂}}:m_{\text{脱氧胆酸盐}}、m_{\text{大豆卵磷脂}}:m_{\text{椰子油}}$ 和水化温度三因素对脂质体包封率影响较大,而 $V_{\text{磷酸缓冲盐溶液}}:V_{\text{无水乙醇}}$ 、超声时间和水化时间影响相对较小,因此选取影响较大的进行响应面试验。利用三因素三水平 Box-Behnken 设计,以椰子油胆盐脂质体包封率为响应值,优化椰子油胆盐脂质体的制备工艺条件^[19]。

1.3 数据处理

试验数据均为 3 次平行试验,测试结果以均值±标准差表示,采用 SPASS 17.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 回归方程的建立及模型方差分析

响应面试验因素水平及编码如表 1 所示,试验方案及结果见表 2。

采用 Design-Expert 8.0 软件对表 2 数据进行拟合得出二次多项回归方程为:

$$Y = -0.021\ 735 + 0.561\ 41A - 6.471\ 10 \times 10^{-3} B - 0.418\ 59C - 9.091\ 00 \times 10^{-3} AB + 0.381\ 82AC - 0.025\ 452BC - 0.060\ 613A^2 + 4.844\ 80 \times 10^{-4} B^2 + 0.242\ 59C^2。$$
 (4)

由表 3 可知:模型的 $P = 0.003\ 5 < 0.01$,表明试验所采用的二次模型是极显著的,在统计学上具有统计学意义。失拟项 P 值为 $0.612\ 2 > 0.05$,对模型是有利的,无失拟因素存在。因此可用该回归方程代替试验真实点对试

表 1 响应面面试验因素与水平设计
Table 1 Design of factors and levels in the response surface

水平	A $m_{\text{大豆卵磷脂}}:m_{\text{脱氧胆酸盐}}$	B 水化温度/℃	C $m_{\text{大豆卵磷脂}}:m_{\text{椰子油}}$
-1	2:1	55	0.50
0	3:1	60	0.75
1	4:1	65	1.00

验结果进行分析。模型的确定系数为 $R^2 = 0.925\ 0$,模型的调整确定系数为 $R_{\text{Adj}}^2 = 0.828\ 5$,说明该模型与实际试验拟合较好。

一次项 A、C 的 P 值 < 0.01 ,说明因素 A、C 对包封率影响极显著。交互项 AC 的 P 值 $= 0.005\ 2 < 0.01$,说明因素 AC 对包封率影响极显著。二次项 A^2 的 $P < 0.05$,表明其对脂质体包封率影响显著。根据 F 值可以看出影响脂质体包封率的主次因素为 $m_{\text{大豆卵磷脂}}:m_{\text{椰子油}}$ (C) $> m_{\text{大豆卵磷脂}}:m_{\text{脱氧胆酸盐}}$ (A) $>$ 水化温度(B)。各个交互因子的响应曲面及其等高线见图 2。

2.2 响应面图分析

由图 2 可知, $m_{\text{大豆卵磷脂}}:m_{\text{脱氧胆酸盐}}$ 和 $m_{\text{大豆卵磷脂}}:m_{\text{椰子油}}$ 交互作用的等高线呈椭圆形,分布密集,说明交互作用显著,响应曲面的走势相对其他交互作用更为陡峭,说明对响应值的影响更为显著。当 $m_{\text{大豆卵磷脂}}:m_{\text{椰子油}}$ 或 $m_{\text{大豆卵磷脂}}:m_{\text{脱氧胆酸盐}}$ 固定时,椰子油胆盐脂质体的包封率随着 $m_{\text{大豆卵磷脂}}:m_{\text{椰子油}}$ 的增加而明显降低,当 $m_{\text{大豆卵磷脂}}:m_{\text{椰子油}}$ 一定时,椰子油胆盐脂质体包封率随 $m_{\text{大豆卵磷脂}}:m_{\text{脱氧胆酸盐}}$ 与水化温度变化相对较小。水化温度固定时的曲面和超声时间固定时的相比更为陡峭,说明水化温度

表 2 响应面试验方案及结果
Table 2 Response surface design and results

序号	A	B	C	包封率/%
1	-1	0	-1	58.182
2	-1	0	1	15.455
3	1	0	-1	30.909
4	1	0	1	26.364
5	0	-1	-1	45.455
6	0	-1	1	31.818
7	0	1	-1	54.545
8	0	1	1	28.182
9	-1	-1	0	32.118
10	1	-1	0	24.845
11	-1	1	0	49.091
12	1	1	0	23.636
13	0	0	0	30.000
14	0	0	0	33.636
15	0	0	0	40.909
16	0	0	0	40.913
17	0	0	0	40.905

表 3 方差分析

Table 3 Results of ANOVA of regression model coefficient

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.20	9	2.20E-02	9.59	0.003 5	* *
A	0.03	1	0.03	13.25	0.008 3	* *
B	5.63E-03	1	5.63E-03	2.48	0.159 7	
C	9.50E-02	1	9.50E-02	41.87	0.000 3	* *
AB	8.27E-03	1	8.27E-03	3.63	0.098 3	
AC	3.60E-02	1	3.60E-02	16.03	0.005 2	* *
BC	4.05E-03	1	4.05E-03	1.78	0.223 8	
A ²	1.50E-02	1	1.50E-02	6.80	0.035 0	*
B ²	6.18E-04	1	6.18E-04	0.27	0.618 3	
C ²	9.68E-04	1	9.68E-04	0.43	0.534 9	
残余项	1.60E-02	7	2.27E-03			
失拟项	5.34E-03	3	1.78E-03	0.67	0.612 2	
纯误差	1.10E-02	4	2.65E-03			
总和	0.21	16				

† * * 为影响极显著 ($P < 0.01$); * 为影响显著 ($P < 0.05$); $R^2 = 0.925\ 0$; $R^2_{\text{adj}} = 0.828\ 5$; $R^2_{\text{pred}} = 0.519\ 5$ 。

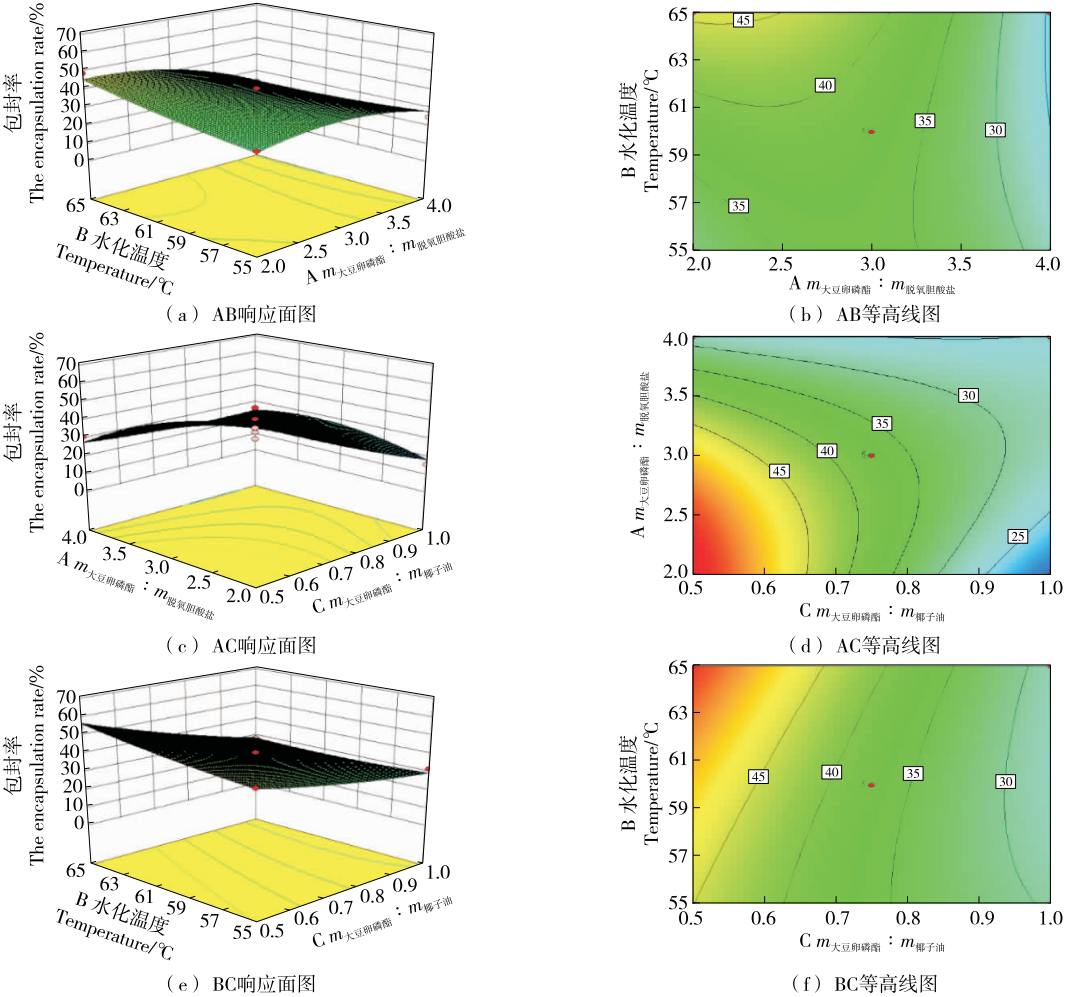


图 2 两因素交互作用对椰子油胆盐脂质体包封率影响的响应面图及等高线图

Figure 2 response surface and contour diagram of interaction of two factors on encapsulation efficiency of coconut oil bile salt liposome

对椰子油胆盐脂质体包封率的影响更大。

2.3 回归模型优化及验证

通过 Design-Expert 8.0 软件优化得出的制备椰子油胆盐脂质体最佳工艺条件为: $m_{\text{大豆卵磷脂}} : m_{\text{脱氧胆酸盐}} = 2.23$ 、 $m_{\text{大豆卵磷脂}} : m_{\text{椰子油}} = 0.56$ 、水化温度 64.7°C , 预测该模型下制备得到的椰子油胆盐脂质体的包封率为 59.22%。为了验证该响应面模型优化得到的工艺条件的可靠性, 在此工艺条件下进行 3 组平行验证实验, 实际测得椰子油胆盐脂质体包封率 58.09%, 与模型预测值椰子油胆盐脂质体的包封率相对误差为 1.91%, 说明实际验证值与响应面模型的预测值吻合良好。

3 结论

试验以卵磷脂和胆盐为壁材, 通过响应面法优化了椰子油胆盐脂质体的制备工艺, 其最优制备工艺为大豆卵磷脂与脱氧胆酸盐比例 2.53、样脂比 0.56、水化温度 64.70°C , 椰子油胆盐脂质体的包封率为 58.09%。试验中椰子油胆盐脂质体包封率的测定方法还有不足之处, 后续应进一步优化椰子油胆盐脂质体的包封率测定方法。

参考文献

- [1] KAPILAN S. Variation of phenolic content in coconut oil extracted by two conventional methods[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2008, 43(4): 597-602.
- [2] CARDOSO Diuli A, MOREIRA Annie S B, OLIVEIRA Glaucia M, et al. A coconut extra virgin oil-rich diet increases hdl cholesterol and decreases waist circumference and body mass in coronary artery disease patients[J]. Nutricion Hospitalaria, 2015, 32(5): 457-465.
- [3] 杨嘉, 朱毅. 原生态椰子油的研究进展[C]// 海南省药学会. 海南省药学会二〇一〇年学术年会会议论文集. [出版地不详]: 海南省药学会, 2010: 5.
YANG J, ZHU Y. Research progress of original ecological coconut oil[C]// Hainan Pharmaceutical Association. Proceedings of the annual conference of Hainan Pharmaceutical Association in 2010. [S.L.]: Hainan Pharmaceutical Association, 2010: 5.
- [4] AGARWAL R K, BOSCO S D. Optimization of viscozyme-L assisted extraction of coconut milk and virgin coconut oil[J]. Dairy Food Res, 2014, 33(4): 276.
- [5] AHIANTE B O, AFUKWA J N, AJAYI O L. Effects of coconut oil on body weight and haemorrheology in rabbits[J]. Occup Health, 2010, 10(3): 217-222.
- [6] VAN W V, HIMAYA A, LOUISYLVESTRE, et al. Influence of medium-chain and long-chain cific, trlacylglycerols on the control of food intake in men[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1998, 68(2): 226-234.
- [7] NEVIN K G, RAJAMOHAN T. Virgin coconut oil supplemented diet increase the anti-oxidation status in rats[J]. Food Chemistry, 2006 (99): 260-266.
- [8] DIVINA D Bawalan, KETH R Chapman. Virgin coconut oil production manual for micro- and vilage scale processing [M]. Bangkok: FOD Regional Office for Asia and the Pacific, 2006: 10-45.
- [9] ZHU Y, LIANG J M, GAO C F, et al. Multifunctional ginsenoside Rg3-based liposomes for glioma targeting therapy[J]. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 2021, 330: 641-657.
- [10] 任翔. 积雪草苷修饰脂质体的制备及其大鼠体内药动学研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016: 9.
REN Xiang. Preparation and pharmacokinetic study of asiatica glycoside modified liposomes in rats [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2016: 9.
- [11] 李妍, 方芳, 曹珂珂, 等. 枸杞多糖脂质体制备工艺[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(5): 176-181.
LI Yan, FANG Fang, CAO Ke-ke, et al. Preparation technology of lycium barbarum polysaccharide liposome[J]. Food and Fermentation Industry, 2018, 44(5): 176-181.
- [12] 胡一晨, 孔维军, 杨美华. 姜黄挥发油脂质体制备及其抗黄曲霉菌评价研究[J]. 世界中医药, 2015, 10(8): 1 157-1 162.
HU Yi-chen, KONG Wei-jun, YANG Mei-hua. Preparation of volatile liposomes from curcuma and evaluation of its resistance to *Aspergillus flavus*[J]. World Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 10(8): 1 157-1 162.
- [13] DINGLINGGE C, LI Huang-juan, YUAN L, et al. Heparin modified photosensitizer-loaded liposomes for tumor treatment and alleviating metastasis in phototherapy[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 168: 526-536.
- [14] CEVC G, BLUME S A, GEBAUER D, et al. The skin: A pathway for systemic treatment with patches and lipidhased agent carriers[J]. Adv Drug Deliv Reu, 1996, 18(3): 349-378.
- [15] SIMDES S L, DELGADO T C, LOPES R M, et al. Developments in the rat adjuvant arthritis model and its use in therapeutic evaluation of novel noninvasive treatment by sOD in Transfersomes[J]. J Control Release, 2005, 103(2): 419-434.
- [16] CEVC G, BLUME S A. Transfersomes-mediated transepidermal delivery improves the regiospecificity and biological activity of corticosteroids in vivo[J]. J Control Release, 1997, 45(3): 211-226.
- [17] CEVC G, SCHATZLEIN A, BLUME G. Transdermal drug carriers: Basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides[J]. Control Release, 1995, 36(1/2): 3-16.
- [18] 吕方方, 陈华, 宋菲, 等. 羧甲基壳聚糖包裹椰子油脂质体制备的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(9): 175-180.
LU Fang-fang, CHEN Hua, SONG Fei, et al. Optimization of preparation process of carboxymethyl chitosan coated coconut oil liposomes[J]. Technology of Food Industry, 2018, 39(9): 175-180.
- [19] 韩月颖, 张喜庆, 王琦, 等. 基于响应面法优化以 ABTS 为底物的漆酶测定方法及其应用[J]. 化学试剂, 2021, 43(8): 1 095-1 101.
HAN Yue-ying, ZHANG Xing-qi, WANG Qi, et al. Optimization of laccase determination method using ABTS as substrate and its application based on response surface methodologies[J]. Chemical Reagent, 2021, 43(8): 1 095-1 101.