

DHA藻油纳米脂质体粉末制备:壁材对储存稳定性、体外消化及细胞摄取的影响

刘媛媛,赵家和,冯笑笑,CHEONG Lingzhi

(宁波大学食品与药学院,浙江宁波315211)

摘要:为开发具有更高储存稳定性和生物利用度的负载DHA藻油的脂质体粉末,以DHA藻油为原料,首先利用大豆卵磷脂制备负载DHA藻油的纳米脂质体悬液,继而分别使用3种壁材(麦芽糊精、羟丙基- β -环糊精及二者质量比为1:1的混合物)对脂质体悬液包埋后进行喷雾干燥,制得DHA藻油纳米脂质体粉末,最后比较了3种壁材对脂质体粉末氧化稳定性、体外消化和细胞摄取的影响。结果表明:DHA藻油脂质体悬液制备的最佳条件为大豆卵磷脂与DHA藻油质量比3:1、超声时间1 min、旋蒸温度45℃、PBS的pH 7.0、PBS浓度0.02 mol/L、PBS用量10 mL(大豆卵磷脂与藻油总质量0.4 g时),在此条件下DHA藻油脂质体悬液的包封率为88.01%;3种脂质体粉末粒径范围在(253.87 \pm 1.96)~(408.80 \pm 1.23) nm之间,Zeta电位在(-40.80 \pm 0.78)~(-34.87 \pm 0.25) mV之间;羟丙基- β -环糊精与麦芽糊精混合物为壁材时,DHA藻油纳米脂质体粉末具有更高的氧化稳定性、更低的水分含量和更慢的脂肪酸体外消化释放率;3种脂质体粉末使Caco-2细胞中SLC27A4、FABP4和CD36基因表达增加,说明脂质体粉末均具有良好的细胞摄取。综上,基于大豆卵磷脂制备的DHA藻油纳米脂质体及喷雾干燥技术有效改善了DHA藻油的氧化稳定性。

关键词:DHA;纳米脂质体;喷雾干燥;稳定性;消化;细胞摄取

中图分类号:Q939.9;TS229 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2023)09-0051-09

Powdered - nanoliposome loaded with DHA algal oil: effects of wall materials on storage stability, in vitro digestibility and cellular uptake

LIU Yuanyuan, ZHAO Jiahe, FENG Xiaoxiao, CHEONG Lingzhi

(College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China)

Abstract: In order to develop DHA algal oil - loaded liposome powder with higher storage stability and bioavailability, the liposome suspension loaded with DHA algal oil was prepared by using DHA algal oil and soy lecithin as raw materials, and then three kinds of wall materials (maltodextrin, hydroxypropyl - β - cyclodextrin and their mixture with a mass ratio of 1:1) were used to embed the liposome suspension and spray drying to obtain powdered - nanoliposome loaded with DHA algal oil. In addition, the effects of the three wall materials on the oxidative stability, in vitro digestibility and cellular uptake of the liposome powder were compared. The results showed that the optimal conditions for the preparation of DHA algal liposome suspension were as follows: mass ratio of soy lecithin to algal oil 3:1, ultrasonic time 1 min, evaporation

temperature 45℃, PBS pH 7.0, PBS concentration 0.02 mol/L, PBS dosage 10 mL (mass of soy lecithin and DHA algal oil 0.4 g). Under the optimal conditions, the encapsulation rate of DHA algal oil liposome suspension was 88.01%. The particle size range of the three liposome powders was between (253.87 \pm 1.96) - (408.80 \pm 1.23) nm, and the Zeta potential was (-40.80 \pm

收稿日期:2022-12-14;修回日期:2023-05-26

基金项目:浙江省“尖兵凌雁”科技企业基金(2022C04009);浙江省自然科学基金(LGJ20C200001)

作者简介:刘媛媛(1997),女,硕士研究生,研究方向为 ω -3多不饱和脂肪酸的微胶囊化及消化吸收(E-mail)3532434650@qq.com。

通信作者:CHEONG Lingzhi,教授,博士(E-mail)lingzhicheong@hotmail.com。

0.78) - (-34.87 ± 0.25) mV. When the mixture of hydroxypropyl- β -cyclodextrin and maltodextrin was used as wall material, powdered - nanoliposome loaded with DHA algal oil had higher oxidation stability, lower water content and slower in vitro digestion release rate of fatty acids. The three liposome powder increased the expression of *SLC27 A4*, *FABP4* and *CD36* genes in Caco-2 cells, indicating that the liposome powders had good cell uptake. In conclusion, DHA algal oil nanoliposomes prepared based on soy lecithin and spray drying technology can effectively improve the oxidative stability of DHA algal oil.

Key words: DHA; nanoliposome; spray drying; stability; digestion; cellular uptake

藻油是从微藻中提取的脂质,根据来源不同,通常含有 15% ~ 50% 的二十二碳六烯酸(DHA, C22:6 ω -3)^[1]。近年来,DHA 藻油由于产量高、DHA 含量高、污染低等优点而越来越受到关注^[2-3]。DHA 作为一种营养补充剂,在体内代谢过程中可由 α -亚麻酸生成,但生成量较低,主要通过食物补充^[4]。

脂质体是一种重要的微胶囊技术,它可以改善 ω -3 多不饱和脂肪酸(PUFA)在胃肠道的加工、储存和运输过程中的物理和化学稳定性^[5]。一般来说,脂质体液体分散体会发生生理化学降解^[6],在储存和运输过程中容易损坏和变质。与脂质体液体分散体相比,脂质体粉末制剂更稳定^[7],更适合长期储存,且在某些特定应用所需的特性方面可能更好调整^[8-9]。冷冻干燥、喷雾干燥和喷雾冷冻干燥是将脂质体液体分散体或悬液转换成粉末形式的常用技术^[10]。但喷雾干燥过程中的高温会破坏脂质体膜^[8]。因此,干燥过程中保护膜化合物——载体/壁材是必要的,其中麦芽糊精(MD)和羟丙基- β -环糊精(β -CD)是常用的载体/壁材^[11]。

本研究旨在利用大豆卵磷脂和不同的壁材(MD、 β -CD)制备负载 DHA 藻油的脂质体粉末。首先,以 DHA 藻油包封率为指标,对脂质体悬液的制备条件进行了优化,然后使用不同的壁材对 DHA 藻油纳米脂质体悬液包埋后进行喷雾干燥,比较并阐明了不同壁材对喷雾干燥的纳米脂质体粉末粒径大小及分布、Zeta 电位、形貌特征、水分含量、溶解度、过氧化值、茴香胺值、体外消化率和细胞摄取的影响,以期开发出具有更高储存稳定性和生物利用度的负载 DHA 藻油的脂质体粉末提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

大豆卵磷脂(纯度 $\geq 60\%$),生工生物工程技术

服务有限公司;DHA 藻油(DHA $\geq 60\%$),嘉必优生物工程股份有限公司;羟丙基- β -环糊精($\geq 97\%$),麦芽糊精,源叶生物技术有限公司;脂肪酸甲酯标准(USP 标准)、黏蛋白、胃蛋白酶(≥ 250 U/mg)、胰蛋白酶(1 000 ~ 2 000 U/mg)、猪胰脂肪酶(100 ~ 500 U/mg)和 α -淀粉酶,阿拉丁化学公司;Caco-2 细胞,江苏康为世纪公司;高葡萄糖液体培养基(DMEM)、青霉素-链霉素溶液,美国犹他州思拓凡公司;牛血清白蛋白,默克公司;猪胆盐、氯化钠、氯化钙和磷酸二氢钠盐,索莱宝公司;ER501 TransZol Up Plus RNA Kit 试剂盒、AT311-03 Trans Script One-Step Kit 试剂盒、TG-AQ601-02 PrefectStart Green qPCR SuperMix 试剂盒,北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 仪器与设备

7890B-7000 C 气相色谱三重四极杆质谱仪,美国安捷伦科技公司;JY92-IID 超声细胞破碎仪,宁波新芝生物科技有限公司;H1850R 离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;YC-500 喷雾干燥机,上海雅程仪器设备有限公司;DTS-1060 动态光散射粒度分析仪,英国马尔文仪器有限公司;DSC 200F3 差示扫描量热仪,德国 Netzsch 公司;DZF-6056 真空干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;UV-2600 紫外分光光度计,日本岛津公司;Spectra max 190 酶标仪,上海分子器件有限公司;CFX96 实时荧光定量 PCR 仪,美国伯乐公司;蔡司 Sigma 300 扫描电子显微镜;KQ-300DE 超声波清洗机,昆山市超声仪器有限公司;晶芯 NanoQTM 微型分光光度计,博奥生物集团有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 DHA 藻油脂质体悬液的制备

称取一定量的大豆卵磷脂和 DHA 藻油(总质量 0.4 g),加入无水乙醇完全溶解,在超声波清洗机中超声一定时间,将混合溶液在一定温度下旋转蒸发,直到在圆底烧瓶上形成一层薄膜。将得到的

薄膜用一定量的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,在室温下水合2 h,得到粗脂质体悬液,再置于冰水浴中以300 W的功率每3 s开/关超声破碎10 min,得到具有均匀分散的负载DHA藻油的脂质体悬液,记为PC-L。

采用单因素实验对DHA藻油脂质体悬液制备条件进行优化,基本条件:大豆卵磷脂与DHA藻油质量比3:1,超声时间1 min,旋蒸温度45℃,PBS的pH 7.0,PBS浓度0.005 mol/L,PBS用量10 mL。

1.2.2 DHA藻油脂质体粉末的制备

将一定质量的壁材[β -CD、MD或二者质量比为1:1的混合物(β -CD-MD)]溶于0.02 mol/L、pH 7.0的PBS中,制得质量浓度为5 g/100 mL的壁材溶液。将壁材溶液与DHA藻油脂质体悬液按体积比2:1混合1 h,再用蠕动泵以1.8 m³/min的流量泵入喷雾干燥机,在入口和出口空气温度分别为150℃和50℃条件下进行喷雾干燥,得到DHA藻油脂质体粉末,置于密闭容器中,于4℃储存备用。将载体 β -CD、MD和二者质量比为1:1的混合物制备的DHA藻油脂质体粉末分别记为PC- β -CD、PC-MD和PC- β -CD-MD。

1.2.3 DHA藻油脂质体包封率的测定

1.2.3.1 脂质体悬液

将脂质体悬液在25℃下以10 000 × g离心15 min,取2 mL上清液于10 mL石油醚中,并在274 nm处测定吸光度,再根据藻油质量浓度(x)与吸光度(y)的标准曲线方程($y = 0.3269x + 0.0262$, $R^2 = 0.9575$)计算上清液中DHA藻油的量。按式(1)计算包封率(E)。

$$E = (m_1 - m_2) / m_1 \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_1 为脂质体悬液中DHA藻油的质量(初始加入量),g; m_2 为上清液中DHA藻油的质量,g。

1.2.3.2 脂质体粉末

根据文献[12]的方法并稍作修改测定脂质体粉末的包封率。取1.5 g脂质体粉末,加入15 mL石油醚轻轻混匀,收集石油醚层,在(60 ± 2)℃下蒸发2 h,称量质量(表面DHA藻油质量)。按式(2)计算包封率(E)。

$$E = (m_1 - m_2) / m_1 \times 100\% \quad (2)$$

式中: m_1 为脂质体粉末中DHA藻油的质量(理论加入量),g; m_2 为脂质体粉末表面DHA藻油质量,g。

1.2.4 DHA藻油脂质体粉末水分含量和溶解度的测定

1.2.4.1 水分含量

参考文献[13]的方法测定水分含量。

1.2.4.2 溶解度

将1 g脂质体粉末加入10 mL蒸馏水中,室温下8 000 r/min搅拌5 min,再在5 000 r/min离心10 min,取上清液并在105℃的烤箱内干燥直至恒重。溶解度(S)按下式计算。

$$S = m_1 / m_2 \times 100\% \quad (3)$$

式中: m_1 为上清液干燥后的质量,g; m_2 为脂质体粉末的质量,g。

1.2.5 DHA藻油脂质体粒径和Zeta电位测定

使用动态光散射粒度分析仪分别对脂质体悬液和粉末的平均粒径、粒径分布指数(PDI)和Zeta电位进行测定。其中,脂质体粉末需先溶解在0.02 mol/L、pH 7.0的PBS中再进行测定。

1.2.6 DHA藻油脂质体粉末的形貌观测

将样品用金钼处理,再使用扫描电子显微镜在3.0 kV下观察样品的形貌。

1.2.7 DHA藻油脂质体粉末氧化稳定性测定

将DHA藻油及其脂质体粉末在45℃下避光储存15 d,分别于0、3、6、9、12、15 d时测定过氧化值(POV)和茴香胺值(p -AV),其中POV按照Ghorbanzade等^[14]的方法测定, p -AV参照栾霞等^[15]的方法测定。

1.2.8 DHA藻油脂质体粉末体外模拟消化

按照Mou等^[16]的方法配制口服消化液、胃消化液和小肠消化液,并测定脂质体粉末的体外消化情况。

口服阶段:将模拟口服消化液pH调至6.8,再与1 g脂质体粉末、50 mg α -淀粉酶混合,在37℃、100 r/min下孵育10 min。

胃阶段:将口腔消化所得样品与模拟胃液(体积比1:1)、胃蛋白酶(32 mg)混合,调节pH至2.0,在37℃、100 r/min下孵育2 h。

小肠阶段:将胃消化所得样品调pH至7.0,加入模拟肠液(2.6 mL)、胆盐溶液(2.6 mL)和猪胰脂肪酶溶液(2.6 mL),在37℃、100 r/min下孵育2 h。

为了测定消化过程中游离脂肪酸(FFA)释放率,在小肠消化阶段加入NaOH溶液(0.1 mol/L)以维持体系pH为7.0,根据NaOH的添加量估计FFA的量^[17],并按下式计算FFA释放率(H)。

$$H = \frac{V \times C \times M_w}{2 \times W \times 1\,000} \times 100\% \quad (4)$$

式中: V 为加入NaOH的体积,mL; C 为NaOH的浓度,mol/L; M_w 为DHA藻油的平均摩尔质量,g/mol; W 为脂质体粉末中DHA藻油的质量,g。

1.2.9 DHA藻油及DHA藻油脂质体粉末体外模拟消化液中脂肪酸组成及含量的测定

DHA藻油脂质体粉末小肠消化液中的脂质采用有机试剂提取。取15 mL DHA藻油脂质体粉末

小肠消化液于 30 mL 正己烷-异丙醇(体积比 3:1) 溶液中,在 160 r/min 振荡 15 min,在 8 000 r/min 下离心 15 min,收集有机相,以同样的方法萃取 2 次,合并有机相,在氮气回流下将有机相干燥,待分析。

参照文献[18]的方法并略有修改,对待测样进行甲酯化,再采用气相色谱三重四极杆质谱法(GC-QQQ-MS)测定脂肪酸组成。甲酯化:将 20 μL 待测样溶解在 4 mL 正己烷中,加入 500 μL 甲醇-氢氧化钠溶液(0.5 mol/L),在室温下涡旋 2 min,再加入无水硫酸氢钠,摇动混合物并静置 2 min,取上层有机相用正己烷稀释 10 倍,过滤并转移到 GC 小瓶中进行脂肪酸组成分析。GC-QQQ-MS 测定条件参照 Wu 等^[19]的方法。

1.2.10 Caco-2 细胞对消化后的 DHA 藻油脂质体粉末的摄取分析

1.2.10.1 细胞毒性测试

按照 1.2.8 和 1.2.9 的方法对 DHA 藻油脂质体粉末进行体外消化后提取脂质。取 30 mg 提取的脂质溶于 1 mL 乙醇中,制得脂质乙醇溶液。取 200 μL 脂质乙醇溶液于 10 mL 0.33 mol/L 牛血清白蛋白(0.01 mol/L PBS, pH 7.0)溶液中,得到 0.6 mg/mL 脂质溶液,再用 DMEM 稀释,使脂质的质量浓度分别为 0.3、0.15、0.075、0.037 5 mg/mL,作为待测样品。

将 Caco-2 细胞接种于含 20% 胎牛血清细胞营养液(FBS)的 DMEM 中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数 5% 的湿润环境中生长,并在组织培养瓶(75 cm^2)中扩大培养,每 2 d 更换培养基,最后将细胞悬液稀释至浓度为 3×10^4 个/mL。

参照文献[20]的方法并稍作修改,采用 CCK-8 实验测定细胞毒性。将细胞悬液以每孔 100 μL 加

入 96 孔板中,培养 24 h 后,去除培养液,加入 100 μL 新鲜培养液(含 20% FBS 的 DMEM)。向 96 孔板中加入 10 μL 不同质量浓度的待测样品,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数 5% 的培养箱中培养 24 h。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,孵育 1 h 后,使用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光值,并按下式计算细胞活力(A_c)。

$$A_c = \frac{A_2 - A_0}{A_1 - A_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中: A_0 为只加培养基和 CCK-8 溶液的吸光值; A_1 为加细胞和 CCK-8 溶液的吸光值; A_2 为加细胞、样品和 CCK-8 溶液的吸光值。

1.2.10.2 脂质摄取后相关基因表达

Caco-2 细胞在 6 孔细胞培养板中生长至 80% 融合^[21]。脂质体粉末消化提脂后的脂质溶液与 DMEM 按体积比 1:10 混合,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数 5% 条件下与 6 孔细胞培养板中的细胞一起孵育。孵育 24 h 后,用 1 mol/L PBS 洗涤 Caco-2 细胞 2 次,收集细胞液提取 RNA^[16]。以不加脂质溶液样品,只加牛血清白蛋白的 PBS 作为对照。

用 TransZol UP Plus RNA Kit 试剂盒从 Caco-2 细胞中提取总 RNA 并溶于无核酸酶的无菌水中,使用微型分光光度计测量 RNA 浓度,当 A_{260} 与 A_{280} 比值在 1.9~2.1 之间时 RNA 样品纯度较好^[22],可用于后续实验。取 1 μg RNA 使用 Trans Script One-Step Kit 试剂盒反转录为 cDNA(引物序列见表 1)。再使用 PerfectStart Green qPCR SuperMix 试剂盒和实时荧光定量 PCR 仪,以 *TBP* 为内参基因,测定 Caco-2 细胞中同脂肪酸摄取相关基因(*CD36*、*FABP4*、*SLC27 A4*)的表达量。

表 1 引物序列

基因	正向 (5'→3')	反向 (3'→5')
<i>CD36</i>	GGCTGTGACCGGAAGCTGTG	AGGTCTCCAAGTGCATTAGAA
<i>FABP4</i>	ACTGGGCCAGGAATTTGACG	CTCGTGGAAGTGACGCCTT
<i>SLC27 A4</i>	GTGAAGGCCAAAGGTGCGAC	CGGAAGGTCCAGTGCGGTATC

1.2.11 数据分析

所有实验均重复 3 次,以“平均值 \pm 标准差”表示。使用单因素方差分析(ANOVA)进行统计分析,然后使用 SPSS 软件进行邓肯事后检验,显著性差异设为 $p < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 DHA 藻油脂质体悬液制备条件的优化

采用单因素实验,以包封率为指标,对 DHA 藻

油脂质体悬液制备条件进行优化,结果见图 1。

由图 1 可知:随大豆卵磷脂与 DHA 藻油质量比的增加,包封率总体上呈先降低后升高的变化趋势,在大豆卵磷脂与 DHA 藻油质量比为 3:1 时包封率最高(78.33%),这是因为大豆卵磷脂用量的增加使可用于包埋藻油的磷脂双分子层增加,导致包封率升高,但过多的大豆卵磷脂会使脂质体有聚集和融合的趋势,导致包封率下降^[23];在超声时间为

1 min 时包封率达到最大值(78.08%),且随着超声时间的继续延长而降低,这是因为过大的超声应力可能导致脂质体的崩解^[18];当旋蒸温度为 45 °C 时,包封率最高,为 78.08%,这是因为较低的旋蒸温度不利于薄膜的形成,而较高的旋蒸温度可能导致藻油从脂质体中泄漏,从而降低藻油的包封率^[24-25];随着 PBS 浓度和用量的增加,包封率总体呈下降趋势,且分别在 0.02 mol/L 和 10 mL 时包封率最高,这是因为离子强度对脂质体物理稳定性有影响,且与脂质体的表面电荷有关^[26];在 PBS 的 pH 为 7.0

时,包封率最高,为 88.10%,增加或降低 PBS 的 pH,包封率均降低,这是因为大豆卵磷脂的水解主要受酸碱催化的影响,而大豆卵磷脂的水解会增加膜的通透性,导致包封率降低^[27]。

综上,DHA 藻油脂质体悬液的最佳制备条件为大豆卵磷脂与 DHA 藻油质量比 3:1、超声时间 1 min、旋蒸温度 45 °C、PBS 的 pH 7.0、PBS 浓度 0.02 mol/L、PBS 用量 10 mL。在最佳条件下,包封率为 88.01%。

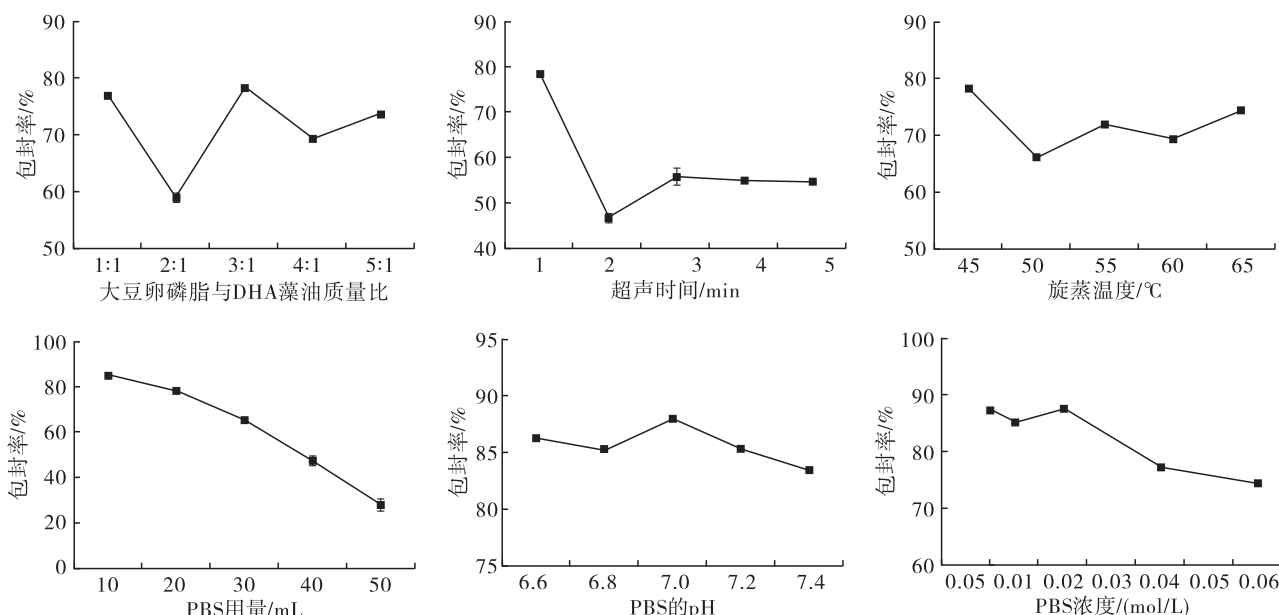


图1 DHA 藻油脂质体悬液制备条件优化

2.2 DHA 藻油脂质体粉末的包封率、干燥产率和理化性质

壁材对 DHA 藻油脂质体粉末包封率、干燥产率、水分含量和溶解度的影响见表 2。

由表 2 可见,β-CD-MD 为壁材时,脂质体粉末的包封率最高,而 β-CD 为壁材时,脂质体粉末干燥产率最大。3 种脂质体粉末均表现出较低的水分含量。粉状产品稳定性的一个重要指标是

水分含量,其中 1%~6% 的水分含量是保证其稳定性的一个可取范围^[28]。本研究中的 3 种脂质体粉末水分含量与 6% 比较接近,因此其有望在理想的储存条件下满足用于干食品配料的需要。本研究中,3 种脂质体粉末的溶解度均高于 50%,说明其为水溶性较高的粉末^[13]。另外,3 种脂质体粉末的干燥产率和溶解度均无显著性差异($p > 0.05$)。

表 2 DHA 藻油脂质体粉末的包封率、干燥产率和理化性质

样品	包封率	干燥产率	水分含量	溶解度
PC-β-CD	63.42 ± 0.91 ^b	38.35 ± 1.43 ^a	6.82 ± 0.06 ^a	59.87 ± 0.06 ^a
PC-MD	51.29 ± 1.14 ^c	32.26 ± 3.98 ^a	7.22 ± 0.11 ^a	60.15 ± 0.18 ^a
PC-β-CD-MD	71.93 ± 1.11 ^a	35.89 ± 6.13 ^a	5.48 ± 0.13 ^b	59.62 ± 0.23 ^a

注:干燥产率为喷雾干燥后脂质体粉末与喷雾干燥前样品溶液中固形物的质量比;同列不同字母表示差异显著($p < 0.05$),下同;PC-L 的包封率为(88.01 ± 0.32)%,与脂质体粉末的包封率存在显著差异($p < 0.05$)

2.3 DHA 藻油脂质体的平均粒径、PDI、Zeta 电位

DHA 藻油脂质体的平均粒径、PDI 和 Zeta 电

位见表 3。

由表 3 可见,PC-L 平均粒径为(94.93 ± 0.03)

nm, PDI 为 (0.23 ± 0.01) , Zeta 电位为 (-36.80 ± 1.77) mV, 表明脂质体悬液粒径分布较窄, 具有较高的静电斥力和良好的稳定性^[29]。3 种脂质体粉末中, PC- β -CD 的平均粒径最大, 为 (408.80 ± 1.23) nm, 其次是 PC- β -CD-MD 和 PC-MD, 平均粒径分别为 (305.20 ± 4.03) nm 和 (253.87 ± 1.96) nm。这是因为与 MD 相比, β -CD 形成的乳液黏度较高, 在雾化过程中形成较大的液滴, 从而产生较大的粉末颗粒^[30]。与脂质体悬液相比, 脂质体

粉末的平均粒径均增大, 这是因为喷雾干燥过程破坏了脂质体的结构, 复溶过程可能会引起脂质体的絮凝和聚集, 从而增大了重组喷雾干燥脂质体的平均粒径^[11]。3 种脂质体粉末的 PDI 均不超过 0.5, 表明粒径分布较窄, 说明脂质体的絮凝和聚集现象不严重^[31]。在 3 种脂质体粉末中, PC-MD 的 Zeta 电位绝对值最低, 表明 PC-MD 的稳定性最差。Zeta 电位绝对值高于 30 mV 时则具有优异的稳定性^[32], 故 3 种脂质体粉末均具有较好的稳定性。

表 3 DHA 藻油脂质体的平均粒径、PDI、Zeta 电位

样品	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
PC-L	94.93 ± 0.03^d	0.23 ± 0.01^b	-36.80 ± 1.77^a
PC- β -CD	408.80 ± 1.23^a	0.50 ± 0.00^a	-40.03 ± 0.12^b
PC-MD	253.87 ± 1.96^c	0.48 ± 0.02^a	-34.87 ± 0.25^a
PC- β -CD-MD	305.20 ± 4.03^b	0.48 ± 0.02^a	-40.80 ± 0.78^b

2.4 DHA 藻油脂质体粉末的形貌

采用扫描电子显微镜分析 DHA 藻油脂质体粉末的形貌, 结果见图 2。

由图 2 可见, 3 种脂质体粉末均为球形, 具有喷

雾干燥粉末的典型特征凹皱 ($2 \sim 10 \mu\text{m}$), 颗粒表面有几个凸起, 这可归因于内部相的蒸汽逸出^[33]。与 PC-MD 和 PC- β -CD-MD 相比, PC- β -CD 表面更光滑, 有利于保证较高的包封率 ($>60\%$)。

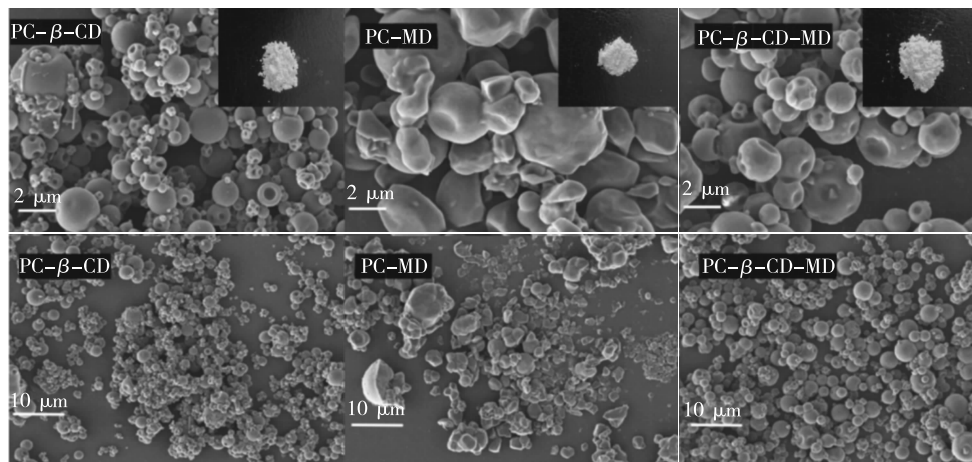


图 2 DHA 藻油脂质体粉末的形貌

2.5 DHA 藻油脂质体粉末的氧化稳定性

POV 和 p -AV 是脂质氧化的重要指标, 前者反映了初级氧化产物的浓度, 后者反映了二级氧化产

物的浓度^[34]。DHA 藻油及其脂质体粉末的氧化稳定性如图 3 所示。

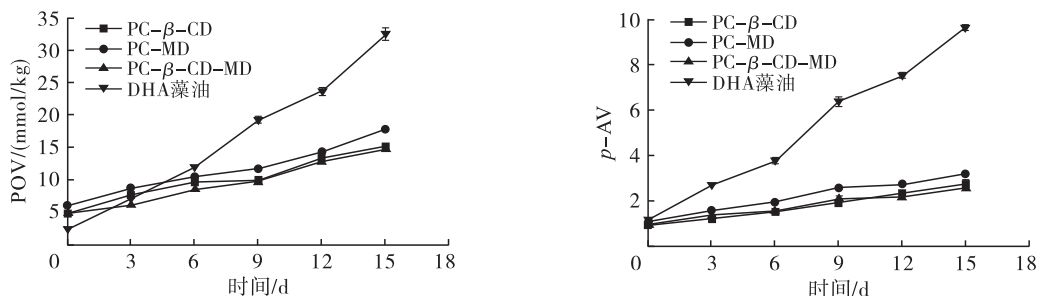
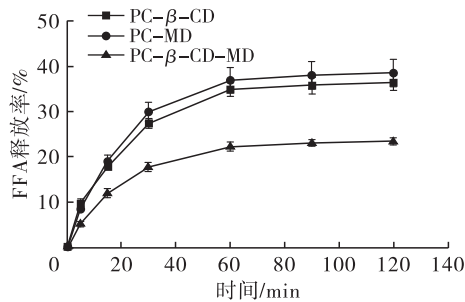


图 3 DHA 藻油及其脂质体粉末的氧化稳定性

由图 3 可知: DHA 藻油在加速氧化过程中 POV 上升速度最快, 从初始的 2.36 mmol/kg 上升至 15 d

时的 32.59 mmol/kg ; 3 种脂质体粉末中, 在加速氧化 15 d 时, PC-MD 的 POV 增加最显著, 从初始的

6.13 mmol/kg 上升至 17.86 mmol/kg, PC- β -CD-MD 的 POV 增加最少,从初始的 4.88 mmol/kg 上升至 14.79 mmol/kg。与 POV 的变化趋势相同,3 种脂质体粉末的 *p*-AV 均随着加速氧化时间的延长而逐渐增加,其中 PC- β -CD-MD 的 *p*-AV 增加最少,从



注:同一指标不同字母表示具有显著差异($p < 0.05$)。下同

图4 DHA藻油脂质体粉末的体外模拟消化 FFA 释放率和组成

由图4可知,在小肠消化的120 min内,3种脂质体粉末在前30 min内均快速释放 FFA,然后在120 min时趋于恒定。消化结束时,FFA 释放率最低的是 PC- β -CD-MD,为23.50%,说明 β -CD-MD可以抑制脂质体粉末在模拟肠道消化过程中的水解。

本研究中用于包封的 DHA 藻油含有硬脂酸(C18:0, 1.33%)、油酸(C18:1, 16.45%)、亚油酸(C18:2, 2.06%)、EPA(C20:5, 1.04%)、DPA(C22:5, 16.60%)和 DHA(C22:6, 62.52%)。由图4可知,与 DHA 藻油相比,3种脂质体粉末在未水解的脂质部分中显示出更高的油酸和亚油酸含量,这表明这些脂肪酸在体外消化过程中不太可能被水解。3种脂质体粉末消化后 DHA 保留率无明显差异,说明壁材种类对 DHA 的消化水解影响不大。

2.7 Caco-2 细胞对消化后的 DHA 藻油脂质体粉末的摄取

2.7.1 细胞毒性

Caco-2 细胞模型与人肠道上皮细胞具有相似的功能,被广泛用于评估生物活性物质的摄取^[35]。采用 CCK-8 实验测定体外消化产生的脂质的细胞毒性,结果如图5所示。

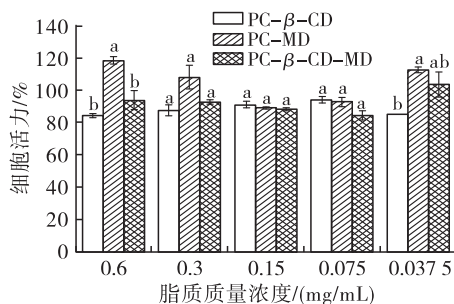


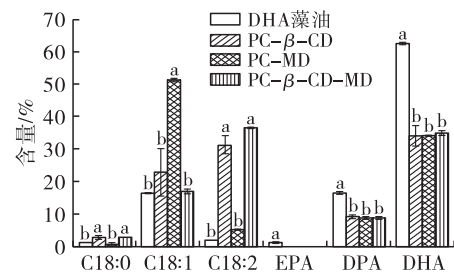
图5 DHA藻油脂质体粉末的细胞毒性

由图5可知,所有样品对细胞均无毒性,细胞活

力均高于80%。因此,选择质量浓度为0.6 mg/mL的样品用于 Caco-2 细胞吸收实验。

2.6 DHA 藻油脂质体粉末的体外模拟消化

根据 FFA 释放率和脂解产物评估 DHA 藻油脂质体粉末的体外消化情况,结果见图4。



力均高于80%。因此,选择质量浓度为0.6 mg/mL的样品用于 Caco-2 细胞吸收实验。

2.7.2 基因表达

图6显示了3种脂质体粉末消化液与 Caco-2 细胞共孵育后,与脂肪酸转运相关的基因(*SLC27 A4*、*FABP4*、*CD36*)的表达。

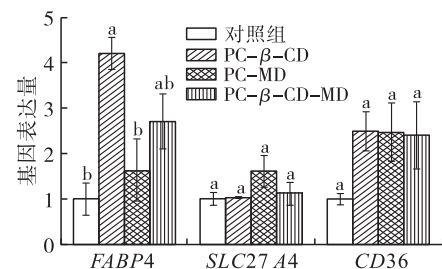


图6 DHA藻油脂质体粉末3种脂肪酸摄取相关基因表达

SLC27 A4 和 *CD36* 通过增加细胞内酯化效率增强对细胞外脂肪酸的摄取,而 *FABP4* 参与并调节体内与脂质代谢相关的过程。由图6可见,与对照组相比,3种脂质体粉末的 *FABP4* (PC- β -CD-MD、PC- β -CD 和 PC-MD 分别是对照组的2.71、4.20、1.63倍)、*SLC27 A4* (PC- β -CD-MD、PC- β -CD 和 PC-MD 分别是对照组的1.12、1.02、1.61倍)和 *CD36* (PC- β -CD-MD、PC- β -CD 和 PC-MD 分别是对照组2.41、2.49、2.47倍)基因表达增加,表明脂质体粉末具有良好的细胞吸收^[22]。

3 结论

利用大豆卵磷脂、MD 和 β -CD 成功制备了负载 DHA 藻油的脂质体粉末。研究了3种壁材[MD、 β -CD 及二者质量比为1:1的混合物(β -CD-MD)]对脂质体粉末物理性质、储存稳定性、体外消

化率和细胞吸收的影响。3种脂质体粉末粒径均为纳米粒子,在 $(253.87 \pm 1.96) \sim (408.80 \pm 1.23)$ nm之间,Zeta电位为负值,在 $(-40.80 \pm 0.78) \sim (-34.87 \pm 0.25)$ mV之间,以 β -CD-MD为壁材制备的DHA藻油脂质体粉末具有更高的氧化稳定性和更慢的FFA体外消化释放率。3种脂质体粉末使Caco-2细胞中SLC27A4、FABP4和CD36基因表达增加,表明脂质体粉末具有良好的细胞摄取。综上,基于大豆卵磷脂制备的DHA藻油纳米脂质体及喷雾干燥技术有效改善了DHA藻油的氧化稳定性,而且,该研究可以指导合成具有良好稳定性的DHA纳米脂质体,对食品药品的研究具有重要意义。但在细胞水平上对DHA的细胞吸收机制及基因调控作用仍有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] XU N, WU X, ZHU Y, et al. Enhancing the oxidative stability of algal oil emulsions by adding sweet orange oil: effect of essential oil concentration [J/OL]. Food Chem, 2021, 355: 129508[2022-12-14]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129508>.
- [2] DEMIRBAS A, FATIH DEMIRBAS M. Importance of algae oil as a source of biodiesel [J]. Energ Convers Manage, 2011, 52(1): 163-170.
- [3] ARTERBURN L M, OKEN H A, HOFFMAN J P, et al. Bioequivalence of docosahexaenoic acid from different algal oils in capsules and in a DHA-fortified food [J/OL]. Lipids, 2007, 42(11): 1011[2022-12-14]. <https://doi.org/10.1007/s11745-007-3098-5>.
- [4] AHONEN E, DAMERAU A, SUOMELA J P, et al. Oxidative stability, oxidation pattern and α -tocopherol response of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3)-containing triacylglycerols and ethyl esters [J/OL]. Food Chem, 2022, 387: 132882[2022-12-14]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132882>.
- [5] NACKA F, CANSELL M, MÉLÉARD P, et al. Incorporation of α -tocopherol in marine lipid-based liposomes: in vitro and in vivo studies [J]. Lipids, 2001, 36(12): 1313-1320.
- [6] INGVARSSON P T, YANG M, NIELSEN H M, et al. Stabilization of liposomes during drying [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2011, 8(3): 375-388.
- [7] 杨水兵, 刘丽, 易国富, 等. 鱼油DHA脂质体的制备及稳定性 [J]. 肉类研究, 2022(9): 37-41.
- [8] SEPÚLVEDA C T, ALEMÁN A, ZAPATA J E, et al. Characterization and storage stability of spray dried soy-rapeseed lecithin/trehalose liposomes loaded with a tilapia viscera hydrolysate [J/OL]. Innov Food Sci Emerg, 2021, 71: 102708[2022-12-14]. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102708>.
- [9] 项惠丹. 抗氧化微胶囊壁材的制备及其在微胶囊化鱼油中的应用 [D]. 江苏无锡: 江南大学, 2008.
- [10] KHATIB I, TANG P, RUAN J, et al. Formation of ciprofloxacin nanocrystals within liposomes by spray drying for controlled release via inhalation [J/OL]. Int J Pharm, 2020, 578: 119045[2022-12-14]. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119045>.
- [11] SARABANDI K, MAHOONAK A S, HAMISHEHKAR H, et al. Protection of casein hydrolysates within nanoliposomes: antioxidant and stability characterization [J]. J Food Eng, 2019, 251: 19-28.
- [12] JAFARI S M, ASSADPOOR E, BHANDARI B, et al. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying [J]. Food Res Int, 2008, 41(2): 172-183.
- [13] JAFARI S M, VAKILI S, DEHNAD D. Production of a functional yogurt powder fortified with nanoliposomal vitamin D through spray drying [J]. Food Bioprocess Technol, 2019, 12(7): 1220-1231.
- [14] GHORBANZADE T, JAFARI S M, AKHAVAN S, et al. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt [J]. Food Chem, 2017, 216: 146-152.
- [15] 栾霞, 祖丽亚, 樊铁. 食用油脂中p-茴香胺值的测定 [J]. 中国油脂, 2006, 31(11): 38-40.
- [16] MOU B, LIU Y, YANG W, et al. Effects of dairy processing on phospholipidome, in-vitro digestion and Caco-2 cellular uptake of bovine milk [J/OL]. Food Chem, 2021, 364: 130426[2022-12-14]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130426>.
- [17] SONG F, CHEN J, ZHANG Z, et al. Preparation, characterization, and evaluation of flaxseed oil liposomes coated with chitosan and pea protein isolate hydrolysates [J/OL]. Food Chem, 2023, 404: 134547[2022-12-14]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134547>.
- [18] YOTSUYANAGI T, HASHIMOTO H, IWATA M, et al. Effect of cholesterol on liposome stability to ultrasonic disintegration and sodium cholate solubilization [J]. Chem Pharm Bull, 1987, 35(3): 1228-1233.
- [19] WU Y, MOU B, SONG S, et al. Curcumin-loaded liposomes prepared from bovine milk and krill phospholipids: effects of chemical composition on storage stability, in-vitro digestibility and anti-hyperglycemic properties [J/OL]. Food Res Int, 2020, 136: 109301[2022-12-14]. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109301>.
- [20] XU X, TIAN M, DENG L, et al. Structural degradation and uptake of resveratrol-encapsulated liposomes using an in vitro digestion combined with Caco-2 cell

- absorption model [J/OL]. Food Chem, 2023, 403: 133943[2022 - 12 - 14]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814622019057>.
- [21] CALVELLO R, ARESTA A, TRAPANI A, et al. Bovine and soybean milk bioactive compounds: effects on inflammatory response of human intestinal Caco - 2 cells [J]. Food Chem, 2016, 210: 276 - 285.
- [22] VINCENT M, MÉNARD O, ETIENNE J, et al. Human milk pasteurisation reduces pre - lipolysis but not digestive lipolysis and moderately decreases intestinal lipid uptake in a combination of preterm infant in vitro models [J/OL]. Food Chem, 2020, 329: 126927[2022 - 12 - 14]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126927>.
- [23] JIN H H, LU Q, JIANG J G. Curcumin liposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids and soybean lecithin [J]. J Dairy Sci, 2016, 99(3): 1780 - 1790.
- [24] ICKENSTEIN L M, SANDSTRÖM M C, MAYER L D, et al. Effects of phospholipid hydrolysis on the aggregate structure in DPPC/DSPE - PEG2000 liposome preparations after gel to liquid crystalline phase transition [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1758(2): 171 - 180.
- [25] 黄茜, 王淑慧, 崔婧, 等. DHA 藻油脂质体制备及性质的研究 [J]. 中国粮油学报, 2019, 34(7): 92 - 97.
- [26] MOLINA M I, PETRUCCELLI S, AÑÓN M C. Effect of pH and ionic strength modifications on thermal denaturation of the 11S globulin of sunflower (*Helianthus annuus*) [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(19): 6023 - 6029.
- [27] RASTI B, JINAP S, MOZAFARI M R, et al. Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods [J]. Food Chem, 2012, 135(4): 2761 - 2770.
- [28] LI J, SHEN Y, ZHAI J, et al. Enhancing the oxidative stability of algal oil powders stabilized by egg yolk granules/lecithin composites [J/OL]. Food Chem, 2021, 345: 128782[2022 - 12 - 14]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128782>.
- [29] SAHARI M A, MOGHIMI H R, HADIAN Z, et al. Physicochemical properties and antioxidant activity of *alpha* - tocopherol loaded nanoliposome's containing DHA and EPA [J]. Food Chem, 2017, 215: 157 - 164.
- [30] TURCHIULI C, JIMENEZ MUNGUÍA M T, HERNANDEZ SANCHEZ M, et al. Use of different supports for oil encapsulation in powder by spray drying [J]. Powder Technol, 2014, 255: 103 - 108.
- [31] RAMEZANZADE L, HOSSEINI S F, NIKKHAH M. Biopolymer - coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin - derived antioxidant peptides [J]. Food Chem, 2017, 234: 220 - 229.
- [32] 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 Chem, 2016, 213: 143 - 148.
- [33] HU S, DING Z, ZHANG G, et al. Fabrication and spray - drying microencapsulation of vitamin C - loaded W₁/O/W₂ emulsions: influence of gel polymers in the internal water phase on encapsulation efficiency, reconstituted stability, and controlled release properties [J/OL]. LWT - Food Sci Technol, 2022, 170: 114113[2022 - 12 - 14]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114113>.
- [34] FU J, SONG L, LIU Y, et al. Improving oxidative stability and release behavior of docosahexaenoic acid algae oil by microencapsulation [J]. J Sci Food Agric, 2020, 100(6): 2774 - 2781.
- [35] HU Y Y, MA C G, ZHOU T L, et al. Enzymatic synthesis of hydrophilic phytosterol polyol esters and assessment of their bioaccessibility and uptake using an in vitro digestion/Caco - 2 cell model [J/OL]. Food Chem, 2022, 370: 131324[2022 - 12 - 14]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131324>.
-
- (上接第 36 页)
- [28] 孟欣, 吴梦洁, 杨洁, 等. CATA 方法应用于手膜的消费者感官研究 [J]. 日用化学品科学, 2021, 44(7): 38 - 44.
- [29] MEYNEERS M, CASTURA J C, CARR B T. Existing and new approaches for the analysis of CATA data [J]. Food Quality Prefer, 2013, 30(2): 309 - 319.
- [30] 邓龙. 菜籽油特征香气成分和营养物质组成的研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2017.
- [31] 徐士琪, 白佳伟, 杨文熙, 等. 干草果中的关键香气成分分析 [J]. 精细化工, 2019, 36(9): 1857 - 1862, 1873.
- [32] 王雪梅, 孙文佳, 李亚隆, 等. 不同产地鲜辣椒发酵郫县豆瓣的品质分析 [J]. 食品科学, 2020, 41(10): 213 - 221.
- [33] VAN GEMERT L J. Odour thresholds - compilations of odour threshold values in air, water and other media [M]. Netherlands: Oliemans Punter & Partners BV, 2011: 230 - 354.
- [34] 美国香料和提取物制造商协会. 风味图书馆 [EB/OL]. [2021 - 12 - 29]. <https://www.femaflavor.org/flavor-library>.