

植物甾醇油酸酯的制备及其在负载 虾青素的脂质体中的应用

常振刚¹, 潘丽², 张新², 谷克仁², 田一凡²

(1. 河南金谷实业发展有限公司, 郑州 450003; 2. 河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450001)

摘要:为了探索植物甾醇酯构建脂质体的可行性,以植物甾醇和油酸为原料合成植物甾醇油酸酯并进行分离纯化,运用红外光谱法和核磁共振法对植物甾醇油酸酯进行表征。以大豆磷脂为主要膜材,运用薄膜-超声法构建虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体,并对其粒径大小及分布、Zeta 电位、包封率以及微观形貌性质进行研究。结果表明:制备的植物甾醇油酸酯经分离纯化后纯度为(96.51±0.93)%,构建的虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体近似球形,形状规则且分散性好,平均粒径为(124.0±12.5)nm,多相分散系数(PDI)为0.37±0.01,平均 Zeta 电位为(-33.3±1.6)mV,包封率为(93.95±0.92)%。综上,采用植物甾醇油酸酯负载虾青素,包封率高,制备的复合脂质体稳定,分布均一,说明植物甾醇油酸酯可应用于负载脂溶性生物活性物质的脂质体的构建。

关键词:植物甾醇酯;油酸;虾青素;复合脂质体

中图分类号: TQ645.9+8; TS202.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-7969(2022)11-0092-06

Preparation of phytosterol oleate and its application in astaxanthin – loaded liposomes

CHANG Zhengang¹, PAN Li², ZHANG Xin², GU Keren², TIAN Yifan²

(1. Henan Jingu Industry Development Co., Ltd., Zhengzhou 450003, China; 2. College of Food Science and Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In order to explore the feasibility of preparing liposomes by phytosterol esters, using phytosterol and oleic acid as materials, phytosterol oleate was prepared, separated and structure characterized by infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. The complex liposomes of astaxanthin – phytosterol oleate were prepared by using soy phospholipids as the main membrane material by a thin – film ultrasound method, and its particle size and distribution, Zeta potential, encapsulation efficiency, and morphology were studied. The results showed the purity of phytosterol oleate was (96.51±0.93)% after purification. The prepared astaxanthin – phytosterol oleate complex liposomes were nearly spherical with regular shape and good dispersion, and the average particle size was (124.0±12.5) nm with the polydispersity index (PDI) of 0.37±0.01, the average Zeta potential was (-33.3±1.6) mV and the encapsulation efficiency was (93.95±0.92)%. In conclusion, using phytosterol oleate for loading astaxanthin, the encapsulation rate is high and the prepared complex liposomes are stable and uniformly distributed, and the phytosterol oleate can be applied to the construction of liposomes loaded with lipid – soluble bioactive substances.

Key words: phytosterol esters; oleic acid; astaxanthin; complex liposomes

收稿日期:2022-04-18;修回日期:2022-07-26

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(32001738);河南省高等学校重点科研项目(21A550006);郑州市科技局自然科学项目(21ZZXTCX18);河南工业大学青年骨干教师培育计划

作者简介:常振刚(1982),男,工程师,研究方向为油料资源开发与利用(E-mail)changzhengang@163.com。

通信作者:潘丽(1982),讲师,博士,研究方向为食品纳米技术、食物资源的研究与开发(E-mail)panli215@163.com。

虾青素具有多种生理功能,包括抗炎、抗氧化以及增强免疫力等,但因其水溶性低、稳定性差等缺点,在实际应用过程中受到较多限制^[1]。脂质体是一种类似于细胞膜的闭合囊泡状结构,对包埋的生物活性物质具有运转、保护、靶向和缓释等作用,国内外研究报道胆固醇可提高脂质体膜的稳定性^[2-4]。然而,由于高浓度的胆固醇是引起各种疾病的重要因素之一^[5],以胆固醇为膜材料构建的脂质体在食品、保健品以及医药领域的应用受到极大限制。

植物甾醇作为天然活性物质,具有抗炎^[6]、抗癌^[7]以及降低人体对胆固醇的吸收^[8]等功能。用植物甾醇构建脂质体,既可避免胆固醇的负面效应,还能调控脂质体稳定性^[9-10]。然而,植物甾醇不溶于水,脂溶性也较差,不易被人体消化利用,还具有较高的熔点,从而限制了其实际应用范围。植物甾醇酯的结构除了甾醇羟基中的H被脂肪酸取代外,仍保留了甾醇的刚性环状结构和烃链分支。植物甾醇酯不仅显著提高了植物甾醇的脂溶性^[11],而且抗氧化性优于植物甾醇^[12],熔点也更低^[13]。同时,植物甾醇酯兼具植物甾醇和脂肪酸双重生理功效。油酸属于不饱和脂肪酸,具有抗肿瘤、降血脂以及调节免疫力等功能,其含有一个双键,长期暴露在空气中容易发生自动氧化反应,而酯化后可降低油酸的氧化速度,提高其稳定性^[14]。基于此,本实验以植物甾醇和油酸为原料合成植物甾醇油酸酯,并对其分离纯化和表征。以大豆磷脂为主要膜材,采用薄膜-超声法制备虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体,并研究其粒径大小及分布、Zeta电位、包封率以及微观形貌等性质,以考察虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体制备的可行性,为植物甾醇酯应用于负载脂溶性生物活性物质脂质体的构建中以改善其功能性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

植物甾醇(菜油甾醇 38.73%、豆甾醇 11.33%、 β -谷甾醇 44.95%),陕西帕尼尔生物科技有限公司;油酸(纯度 85%)、胆固醇(纯度 95%),阿拉丁试剂(上海)有限公司;植物甾醇油酸酯标样(纯度 97%),西安海斯夫生物科技有限公司;硅胶,150~250 μm (60~100目),青岛海洋化工有限公司;大豆磷脂(纯度 98%),沈阳天峰生物制药有限公司;虾青素(纯度 98%),上海研域商贸有限公司;无水乙醚、正己烷、石油醚(30~60℃)、三氯甲烷(分析

纯),天津市凯通化学试剂有限公司;吐温 80(化学纯),天津市鼎盛鑫化工有限公司。

1.1.2 仪器与设备

GC-2010 气相色谱仪,岛津企业管理(中国)有限公司;Bruker Avance 400 MHz 超导核磁共振仪,瑞士布鲁克公司;PerkinElmer Spectrum TWO 傅里叶变换红外光谱仪,美国铂金埃尔默股份有限公司;Zetasizer Nano ZS90 马尔文激光纳米粒度仪,英国马尔文仪器有限公司;T6 新世纪紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;AUY120 电子分析天平,岛津国际贸易(上海)有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;JY92-IIN 超声乳化分散器,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 植物甾醇油酸酯的合成

参考陈茂彬^[15]方法并稍作修改:按质量比为 1:1.1 称取一定量油酸和植物甾醇,装入 250 mL 的三口烧瓶中,待植物甾醇溶解后,加入硫酸氢钠,于 135℃ 下冷凝回流 8 h,反应结束后冷却至室温,用超纯水水洗 2 次除去硫酸氢钠,并用无水乙醇洗涤以除去部分色素及过量油酸,得植物甾醇油酸酯粗品。

1.2.2 植物甾醇油酸酯的分离纯化

采用硅胶柱层析法进行纯化。先将适量正己烷倒入层析柱中,然后倒入硅胶,压实后平铺一层石英砂。称取 5.0 mg 样品溶解于少量的正己烷中,缓慢加入已装好的层析柱中,待样品吸附至硅胶上后加入洗脱剂,并接收洗脱液。洗脱剂为正己烷-乙醚(体积比 95:5),填料高度为 25 cm,洗脱速度为 2 mL/min,每根管的接收体积为 10 mL。薄层色谱检测分离效果,确定第二成分为目标物,然后将只含有第二成分的洗脱液合并,并利用旋蒸仪将溶剂蒸干得到终产物。

通过薄层色谱技术与标样对比,对纯化后的产物进行初步鉴定,展开剂条件同柱层析。

1.2.3 植物甾醇油酸酯的纯度测定

本实验将植物甾醇油酸酯先进行皂化处理,采用气相色谱法通过标准曲线测定皂化后的植物甾醇各组分含量,推测出植物甾醇油酸酯的含量。

气相色谱条件:DB-5 石英毛细管气相色谱柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm);升温程序为 200℃ 保持 1 min,以 30℃/min 升至 300℃,保持 15 min;检测器温度 350℃;进样温度 300℃;氢气流量 40 mL/min;空气流量 400 mL/min;载气(N_2)流量 50 mL/min;进样量 1.0 μL ;分流比 50:1。

1.2.3.1 标准曲线的绘制

参照陈茂彬^[15]方法,以胆固醇为内标物, β -谷甾醇为标样,绘制拟合得到 β -谷甾醇与内标物的标准曲线方程为 $y = 0.9038x - 0.0051$, $R^2 = 0.9991$ 。式中: y 为植物甾醇中某甾醇通过定性确定的峰面积与内标物峰面积比; x 为 β -谷甾醇与内标物质量比。测定各组分甾醇含量时均使用 β -谷甾醇作为标样。

1.2.3.2 样品植物甾醇油酸酯的纯度测定

称取0.3500g自制植物甾醇油酸酯、0.05g内标物胆固醇和2g氢氧化钠于圆底烧瓶中,加入30mL无水乙醇,在78℃下冷凝回流,用磁力搅拌器搅拌3h后向烧瓶中加入25mL超纯水并用100mL正己烷萃取,超纯水反复水洗直至下层水呈中性,取上层清液进行气相色谱测定,代入标准曲线方程计算出植物甾醇的含量,再根据相对分子质量比得到植物甾醇油酸酯的纯度。

1.2.4 植物甾醇油酸酯红外光谱分析

分别取少量植物甾醇、纯化后的植物甾醇油酸酯产品,采用傅里叶变换红外光谱仪进行测定,测定条件:扫描范围 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$,分辨率 4 cm^{-1} ,扫描16次。

1.2.5 植物甾醇油酸酯核磁共振分析

用移液枪取少量植物甾醇油酸酯溶解在氘代氯仿(CDCl_3)中,利用核磁共振仪对植物甾醇油酸酯进行核磁共振氢谱和碳谱分析。

1.2.6 虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体的构建

运用薄膜-超声法制备虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体,参考Pan等^[16]的方法并稍作修改。准确称取一定量的大豆磷脂、植物甾醇油酸酯和虾青素,三者质量比为100:20:1,加氯仿溶解。50℃下避光旋蒸除去氯仿后形成一层薄膜,继续旋蒸20min后加入20mL磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)和50%的吐温80(以大豆磷脂质量计)进行洗膜制成混悬液。将混悬液在冰水浴中探针式超声(180W,5s开,5s关)4min后制得虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体。

1.2.7 虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体粒径大小及分布、Zeta电位的测定

准确吸取虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体400 μL ,用超纯水稀释200倍。通过动态光散射技术,运用马尔文激光纳米粒度仪测定虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体的粒径大小及分布、Zeta电

位,测量3次取平均值。

1.2.8 游离虾青素含量的测定

标准曲线的绘制:参照Pan等^[16]的方法,采用分光光度计法绘制标准曲线,得到的标准曲线方程为 $y = 0.1403x - 0.0009$, $R^2 = 0.9999$ 。式中: y 为吸光度; x 为虾青素质量浓度, $\mu\text{g/mL}$ 。

游离虾青素含量的测定:准确吸取一定量的虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体于50mL含有磁子的圆底烧瓶内,然后加入5mL石油醚,避光条件下30℃水浴萃取虾青素10min。之后将溶液转移至离心管中3000r/min离心5min,吸取上清液,下层重复以上步骤,直至上清液不变色,合并石油醚层,35℃下避光旋蒸除去石油醚,加氯仿溶解,转移至容量瓶中定容,在最大吸收波长(492nm)处测定吸光度。代入标准曲线方程中计算出对应的虾青素含量。

1.2.9 虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体包封率的计算

根据公式(1)计算包封率(x)。

$$x = (m - m_1) / m \times 100\% \quad (1)$$

式中: m 、 m_1 分别为虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体中虾青素总质量和游离虾青素质量。

1.2.10 虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体透射电子显微镜观察

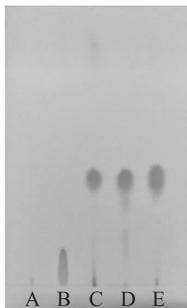
参照Pan等^[17]的方法,用移液枪吸取1mL样品用磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)稀释2倍,将其滴到铜网的正面,15min后用滤纸吸去多余的液体,滴加2%的磷钨酸对脂质体染色,8min后吸去剩余磷钨酸,室温下无尘风干,采用透射电子显微镜观察虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体的微观形态。

2 结果与分析

2.1 植物甾醇油酸酯的分离纯化与含量测定

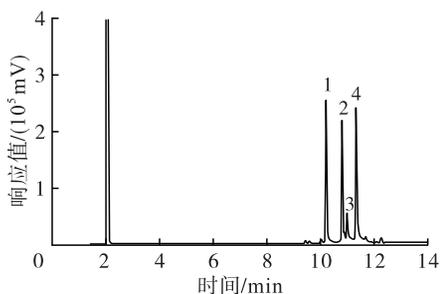
图1为植物甾醇油酸酯的分离纯化效果。由图1可以看出,粗产物中含有少量油酸,还有一些因为高温酯化反应而产生的杂质,经过柱层析分离纯化后,产物在薄层色谱中位置与植物甾醇油酸酯标样的斑点位置一致,且没有粗产物中的杂质,初步表明纯化后的产物为植物甾醇油酸酯,且分离效果较好。

图2为皂化后植物甾醇油酸酯(含胆固醇)的气相色谱图。从图2可知,样品中含有3种甾醇油酸酯,即菜油甾醇油酸酯、豆甾醇油酸酯以及 β -谷甾醇油酸酯。将各甾醇与胆固醇峰面积比分别代入标准曲线方程可得到各甾醇含量,除去皂化前所含甾醇量经换算后得出植物甾醇油酸酯的纯度为(96.51 \pm 0.93)%。



注:A. 植物甾醇;B. 油酸;C. 粗产物;D. 纯化后产物;E. 植物甾醇油酸酯标样

图1 薄层色谱图



注:1. 胆固醇;2. 菜油甾醇;3. 豆甾醇;4. β -谷甾醇

图2 皂化后植物甾醇油酸酯气相色谱图

2.2 植物甾醇油酸酯的红外光谱分析

红外光谱法是依照物质对吸收红外光区电磁辐射的选择性不同来进行结构分析,可以获得一些官能团的信息^[18]。图3为植物甾醇和植物甾醇油酸酯的红外光谱图。由图3可以看出,植物甾醇在 3420 cm^{-1} 和 1055 cm^{-1} 附近有明显的吸收峰,这分别是一OH的伸缩振动和弯曲振动^[18], 2934 cm^{-1} 和 2865 cm^{-1} 处分别是一 CH_2 、一 CH_3 等饱和碳的碳氢伸缩振动, 1463 cm^{-1} 和 1376 cm^{-1} 处分别是一 CH_2 、一 CH_3 等饱和碳的碳氢弯曲振动^[18]。植物甾醇油酸酯中观察不到一OH的伸缩振动和弯曲振动,说明植物甾醇中的一OH消失,然而在 1735 cm^{-1} 处和 1171 cm^{-1} 处出现了强烈的吸收峰,这分别是 $\text{C}=\text{O}$ 和 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 的吸收峰^[18],表明有酯键存在。综上,红外光谱分析表明纯化后的产物为植物甾醇油酸酯。

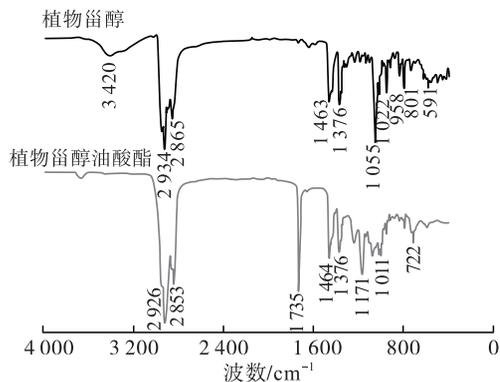


图3 植物甾醇和植物甾醇油酸酯的红外光谱图

2.3 植物甾醇油酸酯的核磁共振分析

核磁共振法为推测未知产物结构的一种常用方法,根据化学位移(δ)能够进一步判定产物中的官能团,从而证明所得产物为植物甾醇油酸酯。植物甾醇油酸酯的 ^1H NMR如图4所示。根据文献^[19]和图4可知,样品中含有烯氢($\delta=4.5\sim 6.5$)、芳氢($\delta=6.5\sim 8.0$),不含醛基氢($\delta=9.0\sim 10.0$)、羧基氢($\delta=10\sim 12.5$)以及烯醇氢($\delta=15.0\sim 16.0$),表明产物中不含植物甾醇的一OH。

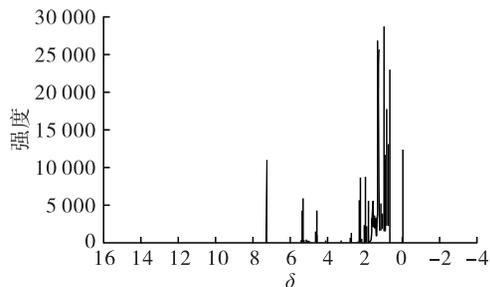


图4 植物甾醇油酸酯的 ^1H NMR(CDCl_3 溶剂)

图5为植物甾醇油酸酯 ^{13}C NMR。由图5可知,产物中含有酯碳($\delta=173.295$)、次甲基与氧结合碳($\delta=73.670$),表明油酸和植物甾醇酯化且酯化位点在植物甾醇六元环的羟基上。

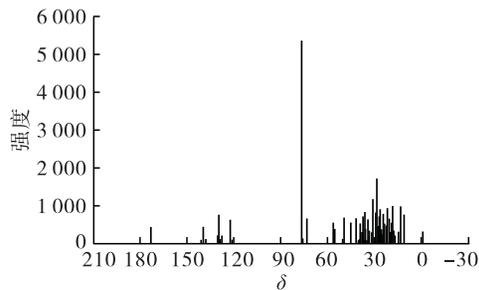


图5 植物甾醇油酸酯的 ^{13}C NMR(CDCl_3 溶剂)

综上,利用核磁共振可证明所得产物为植物甾醇油酸酯。

2.4 虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体的粒径大小及其分布

脂质体囊泡的大小对被包裹的营养素在人体的吸收和释放有直接的影响^[20],脂质体粒径的大小直接影响营养素在体内的装载、释放和消化吸收。控制颗粒的粒径,得到窄而均匀的粒径分布是制备纳米级脂质体的关键。粒径分布情况通常根据多相分散系数(PDI)值大小来进行判断。PDI值越小,表示粒径分布越集中;PDI值越大,说明样品中可能存在较大的颗粒,或者出现聚集、融合的现象。图6为虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体的粒径分布,表1为复合脂质体的平均粒径和PDI。由图6、表1可看出,所制备的虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体粒

径分布为一个单峰且呈正态分布,平均粒径为 (124.0 ± 12.5) nm,属于纳米级,有利于复合脂质体的稳定以及负载营养素的消化吸收。复合脂质体的PDI为 0.37 ± 0.01 ,小于0.5,表明复合脂质体囊泡分散性好、分布均一,不易出现聚集、融合等现象^[21]。

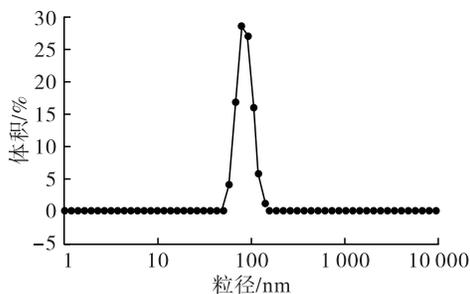


图6 复合脂质体的粒径分布

表1 复合脂质体的粒径、PDI、Zeta 电位及包封率

指标	虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体
平均粒径/nm	124.0 ± 12.5
PDI	0.37 ± 0.01
平均 Zeta 电位/mV	-33.3 ± 1.6
包封率/%	93.95 ± 0.92

2.5 虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体的 Zeta 电位

作为衡量脂质体质量的重要指标之一,Zeta 电位绝对值的大小与分散体系的稳定性有直接联系。当 Zeta 电位绝对值较大时,表明脂质体表面的电荷量较多,形成的静电斥力较大,体系更加稳定。一般认为达到脂质体稳定的必要条件是 Zeta 电位的绝对值大于 30 mV,否则不利于脂质体的长期储存^[22]。如表 1 所示,虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体的平均 Zeta 电位为 (-33.3 ± 1.6) mV,表明复合脂质体能够形成足够大的静电斥力来抑制粒子发生聚集,从而更有利于脂质体的稳定。这可能归因于虾青素分子的羟基与磷脂极性头基胆碱的相互作用,产生的偶极子取向从而增加了脂质体的表面负电荷^[23]。

2.6 虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体的包封率

包封率是评价脂质体运载效果的关键指标^[16]。如表 1 所示,虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体的包封率为 $(93.95 \pm 0.92)\%$,与不掺入植物甾醇油酸酯的虾青素脂质体的 $(88.49 \pm 0.04)\%$ 相比,包封率得到明显提高,说明植物甾醇油酸酯的掺入能有效提高脂质体的包封率,这可能是由于植物甾醇油酸酯掺入后包埋芯材的容积相应增大,包埋效果也更好^[24]。

2.7 虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体的透射电子显微镜观察

图 7 为复合脂质体的透射电子显微镜图。从图

7 可以看出,构建的虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体微观形态近似球形,分散性较好,粒径大小在 120 nm 左右,与粒度仪测定结果基本一致。

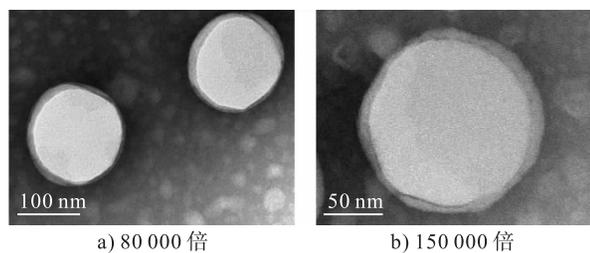


图7 复合脂质体的透射电子显微镜图

3 结论

本研究以植物甾醇和油酸为原料合成植物甾醇油酸酯,通过柱层析和薄层色谱技术对植物甾醇油酸酯进行分离纯化,并初步确定纯化产物为植物甾醇油酸酯,经气相色谱检测其纯度为 $(96.51 \pm 0.93)\%$ 。此外,通过红外光谱法和核磁共振法进一步证实了纯化后的产物为植物甾醇油酸酯。以植物甾醇油酸酯、大豆磷脂和虾青素为原料,采用薄膜-超声法制备虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体,测得该复合脂质体的包封率为 $(93.95 \pm 0.92)\%$,平均粒径为 (124.0 ± 12.5) nm, PDI 为 0.37 ± 0.01 ,平均 Zeta 电位为 (-33.3 ± 1.6) mV。透射电子显微镜观察所构建的虾青素-植物甾醇油酸酯复合脂质体近似球形,形状规则且分散性好。研究结果说明植物甾醇油酸酯代替胆固醇构建负载脂溶性生物活性物质的脂质体具有可行性,为新型脂质体的开发提供了新思路。

参考文献:

- [1] 潘丽,常振刚,陈娟,等. 虾青素的生理功能及其制剂技术的研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2019, 40(6): 123-129.
- [2] 邵克东,赵苏茂,杨紫恒,等. 高压均质对脂质体囊泡特性和稳定性的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(17): 169-177.
- [3] KRAUSE M R, TURKYILMAZ S, REGEN S L. Surface occupancy plays a major role in cholesterol's condensing effect[J]. Langmuir, 2013, 29(33): 10303-10306.
- [4] KADDAH S, KHREICH N, KADDAH F, et al. Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule[J]. Food Chem Toxicol, 2018, 113: 40-48.
- [5] 张秀秀,曲佳林,李晓东,等. 植物甾醇酯的微囊制备及其在夸克干酪中的应用[J]. 中国食品学报, 2018, 18(5): 78-87.
- [6] GEMMA V, SOUMAYA B A, ELISA D R, et al. Phytosterols and inflammation[J]. Curr Med Chem, 2019,

- 26(37): 6724 – 6734.
- [7] FAKIH O, SANVER D, DAVID K, et al. Exploring the biophysical properties of phytosterols in the plasma membrane for novel cancer prevention strategies [J]. *Biochimie*, 2018, 153: 150 – 161.
- [8] GAUTAM M, THAPA R K, GUPTA B, et al. Phytosterol – loaded CD44 receptor – targeted PEGylated nano – hybrid phyto – liposomes for synergistic chemotherapy[J]. *Expert Opin Drug Del*, 2020, 17(3): 423 – 434.
- [9] JOVANOVIĆ A A, BALAN Ć B D, OTA A, et al. Comparative effects of cholesterol and β – sitosterol on the liposome membrane characteristics [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2018, 120(9): 1 – 11.
- [10] TAI K D, RAPPOLT M, HE X Y, et al. Effect of β – sitosterol on the curcumin – loaded liposomes; vesicle characteristics, physicochemical stability, in vitro release and bioavailability[J]. *Food Chem*, 2019, 293: 92 – 102.
- [11] HE W S, ZHU H Y, CHEN Z Y. Plant sterols: chemical and enzymatic structural modifications and effects on their cholesterol – lowering activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(12): 3047 – 3062.
- [12] MIETTINEN T A, VUORISTO M, NISSINEN M, et al. Serum, biliary, and fecal cholesterol and plant sterols in colectomized patients before and during consumption of stanol ester margarine [J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71(5): 1095 – 1102.
- [13] 张品, 邓乾春, 黄庆德, 等. 不饱和脂肪酸植物甾醇酯的合成工艺研究进展[J]. *中国油脂*, 2009, 34(7): 37 – 41.
- [14] 张文华, 石碧. 不饱和脂肪酸结构与自动氧化关系的理论研究[J]. *皮革科学与工程*, 2009, 19(4): 5 – 9.
- [15] 陈茂彬. 植物甾醇酯的制备、生物活性及应用研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [16] PAN L, ZHANG S W, GU K R, et al. Preparation of astaxanthin – loaded liposomes: characterization, storage stability and antioxidant activity [J]. *CyTA – J Food*, 2018, 16(1): 607 – 618.
- [17] PAN L, ZHANG X, FAN X Z, et al. Whey protein isolate coated liposomes as novel carrier systems for astaxanthin [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2020, 122(4): 1 – 10.
- [18] 宁永成. 有机波谱学谱图解析 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 106 – 114.
- [19] 张品. α – 亚麻酸甾醇酯的合成及品质特性研究 [D]. 武汉: 中国农业科学院, 2009.
- [20] PAN L, WANG H Y, GU K R. Nanoliposomes as vehicles for astaxanthin: characterization, in vitro release evaluation and structure [J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 1 – 12.
- [21] TAMJIDI F, SHAHEDI M, VARSHOSAZ J, et al. Design and characterization of astaxanthin – loaded nanostructured lipid carriers [J]. *Innov Food Sci Emerg*, 2014, 26: 366 – 374.
- [22] ZHAO L S, TEMELLI F, CURTIS J M, et al. Preparation of liposomes using supercritical carbon dioxide technology: effects of phospholipids and sterols [J]. *Food Res Int*, 2015, 77: 63 – 72.
- [23] FAN M H, XU S Y, XIA S Q, et al. Preparation of salidroside nano – liposomes by ethanol injection method and in vitro release study [J]. *Eur Food Res Technol*, 2008, 227(1): 167 – 174.
- [24] ALEXANDER M, ACERO L A, FANG Y, et al. Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: encapsulation efficiency and stability [J]. *LWT – Food Sci Technol*, 2012, 47(2): 427 – 436.
-
- (上接第 55 页)
- [2] 杨敏, 魏冰, 孟橘, 等. ω – 3 多不饱和脂肪酸的来源及生理功能研究进展 [J]. *中国油脂*, 2019, 44(10): 110 – 114.
- [3] 于喆. DHA 来源及分离纯化方法的研究进展 [J]. *天津农业科学*, 2017, 23(7): 29 – 32.
- [4] SAINI R K, KEUM Y S. *Omega* – 3 and *omega* – 6 polyunsaturated fatty acids: dietary sources, metabolism, and significance; a review [J]. *Life Sci*, 2018, 203: 255 – 267.
- [5] 马方, 杨宜婷, 陈则华. 不同类型 n – 3 多不饱和脂肪酸对心血管疾病的防治作用及其机制研究进展 [J]. *中国油脂*, 2018, 43(2): 65 – 69.
- [6] 荆珊, 谭莉, 杨克旭, 等. ω – 3 – 脂肪酸乙酯在中国健康受试者中单次和多次给药的药代动力学研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(10): 1226 – 1230.
- [7] 张兆倩, 刘飞, 张金华, 等. 二十碳五烯酸生物活性及药理作用研究进展 [J]. *食品与药品*, 2020, 22(4): 316 – 320.
- [8] 张小林, 林志雄. 内源性大麻素系统抗胶质瘤的作用机制 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2011, 16(3): 274 – 277.
- [9] 张春, 李学艳, 杨兴, 等. 大麻素类物质应用于骨关节炎疼痛治疗 [J]. *国际骨科学杂志*, 2021, 42(3): 158 – 161.
- [10] FANG H, ZHANG J Y, AO M T, et al. Synthesis and discovery of ω – 3 polyunsaturated fatty acid – alkanolamine (PUFA – AA) derivatives as anti – inflammatory agents targeting Nur77 [J/OL]. *Bioorg Chem*, 2020, 105: 104456 [2021 – 08 – 13]. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104456>.
- [11] 方华, 谢全灵, 黄晓燕, 等. 多不饱和脂肪酸酞乙醇胺的合成工艺研究 [J]. *中国油脂*, 2013, 38(12): 53 – 56.
- [12] 丁养军, 赵先恩, 朱芳, 等. 液相色谱 – 质谱大气压化学电离源鉴定深海鱼油中长链不饱和脂肪酸 [J]. *分析化学*, 2007, 35(3): 375 – 381.