

文章编号: 1000-8551(2015)05-0916-09

# 高压微射流法制备白藜芦醇纳米脂质体

陈琼玲<sup>1,2</sup> 刘红芝<sup>1</sup> 刘丽<sup>1</sup> 王强<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院农产品加工研究所/农业部农产品加工综合性重点实验室, 北京 100193; <sup>2</sup> 山西农业大学信息学院, 山西 晋中 030800)

**摘要:** 为提高白藜芦醇生物利用率与缓释作用, 采用高压微射流法制备白藜芦醇纳米脂质体, 以纳米脂质体包封率为评价指标, 在单因素试验的基础上, 通过二次旋转回归试验设计确定最佳制备工艺。结果表明, 最佳制备工艺为卵磷脂/ $V_E = 10:1$ , 卵磷脂/白藜芦醇 = 11.6:1, 卵磷脂/胆固醇 = 10.5:1, 微射流压力 18 366 PSI, 循环次数 3 次。在此条件下制得白藜芦醇纳米脂质体的包封率为  $87.74\% \pm 1.01\%$ , 平均粒径为  $78.31\text{nm} \pm 1.37\text{nm}$ , Zeta 电位为  $-55.5\text{mV}$ 。该方法制得的白藜芦醇纳米脂质体包封率高、粒径小、分布范围窄, 且体系稳定。该研究为白藜芦醇新剂型的开发及利用提供理论依据和实际指导。

**关键词:** 白藜芦醇纳米脂质体; 高压微射流; 包封率

DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2015.05.0916

白藜芦醇是一种天然多酚类物质, 广泛分布于虎杖、葡萄、花生、藜芦、桑葚等植物中<sup>[1-3]</sup>, 具有抗癌、抑菌、抗炎症、抑制血小板凝集、调节雌激素、保护神经和肝脏等生理功能, 且被美国《抗衰老圣典》列为“100 种最热门有效的抗衰老物质”之一<sup>[4-7]</sup>。但白藜芦醇化学性质不稳定且水溶性差, 存在口服吸收性差、生物利用率低、难以持久作用等缺点<sup>[8]</sup>。

纳米脂质体作为一种新型药物载体, 是以卵磷脂、胆固醇等为膜材对目的物质进行包封制成的一种具有类似生物膜结构的双分子层囊泡, 具有稳定性好、靶向性强、可延缓释放、无免疫毒性等特点<sup>[9-10]</sup>, 成为近年来现代医学和食品功能化学共同关注的焦点。将纳米脂质体用于白藜芦醇的包封与载运, 有利于提高白藜芦醇生物利用率与缓释作用, 可进一步扩大其在药品、食品、化妆品等行业的应用范围。

制备纳米脂质体的传统方法有薄膜法、乙醇注入法、逆向蒸发法、超声法等, 但这些方法均存在有机溶剂残留、磷脂成分易氧化、生产成本低、周期长、制备过程难以控制、放大为工业化生产存在难度等缺点<sup>[11]</sup>。高压微射流法作为一种新型纳米脂质体制备技术, 通

过高速撞击、剪切与空化作用达到均质与细化的目的, 具有操作简便、清洁安全、易于连续化生产等优点, 现已有用于制备阿糖苷<sup>[12]</sup>、中链脂肪酸<sup>[13]</sup>、茶多酚<sup>[14]</sup>及维生素 C<sup>[15]</sup>等纳米脂质体的实例。本文采用高压微射流法制备白藜芦醇纳米脂质体, 以期探寻一种环保、高效的白藜芦醇纳米脂质体制备工艺, 为白藜芦醇新剂型的开发及利用提供理论依据和实际指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

白藜芦醇标准品、 $V_E$  (美国 Sigma 公司); 白藜芦醇样品(纯度 97.01%) 中国农业科学院农产品加工研究所粮油加工与功能食品实验室自制<sup>[16-17]</sup>; 乙腈、冰醋酸(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 胆固醇(生物试剂纯, 北京奥博星生物技术有限公司); 大豆卵磷脂(注射级, 北京市索莱宝科技有限公司); 无水乙醇(分析纯, 北京市化学试剂公司)。

### 1.2 仪器与设备

Waters1525 型高效液相色谱仪(配有紫外和示差

收稿日期: 2014-06-20 接受日期: 2014-11-10

基金项目: 国家科技支撑计划课题“食用农产品加工适宜性评价及风险监控技术研究示范”(2012BAD29B03), 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-201X-IAPPST)

作者简介: 陈琼玲, 女, 主要从事粮油加工研究。E-mail: cq\_l\_txs@163.com

通讯作者: 王强, 男, 研究员, 主要从事粮油加工研究。E-mail: wangqiang06@caas.cn

检测器(美国 Waters 公司); MX5 型微量电子天平(德国 METTLER TOLEDO 公司); Zetasizer Nano ZS 型 Zeta 电位仪(英国 Malvern 仪器有限公司); Mini DeBEE 型高压微射流仪(美国 BEE 公司); RE5220 型旋转蒸发器、DLSB 型低温冷却液循环泵(上海振捷试验设备有限公司)。

### 1.3 白藜芦醇纳米脂质体包封率测定

1.3.1 白藜芦醇含量测定 采用高效液相色谱(HPLC)对白藜芦醇含量进行测定,色谱条件:色谱柱:  $C_{18}$  柱, 150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m; 流动相: 乙腈/水/冰醋酸 = 25:75:0.09 (v/v/v), 流速 0.7 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 检测波长 306 nm, 进样量 10  $\mu$ L, 柱温 30  $^{\circ}$ C<sup>[18]</sup>。

精密称取 12.5 mg(精确至 0.0001 g) 白藜芦醇标准品, 甲醇溶解并定容至 250 mL, 得到 50 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 白藜芦醇标准贮备液。准确移取 1、2、4、6、8、10 mL 白藜芦醇标准贮备液, 用甲醇稀释并定容至 50 mL, 得到不同浓度的标准工作溶液, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程:

$$Y = 1.02 \times 10^5 X + 0.904 \times 10^5 \quad (R^2 = 0.9998)$$

式中: Y 为峰面积, X 为白藜芦醇浓度( $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)。

1.3.2 纳米脂质体包封率测定 取 1 mL 白藜芦醇纳米脂质体, 采用 HPLC 测定其质量浓度  $C_1$ 。取 5 mL 纳米脂质体于分子截留量为 8 000 ~ 14 000 D 的透析袋中, 置于 200 mL 0.01 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(pH 值 7.4) 中透析 24 h, 每隔 2 h 更换 1 次透析液<sup>[19]</sup>。取出透析后的纳米脂质体, 采用 HPLC 测定其质量浓度  $C_2$ 。计算其包封率  $EE = C_2 / C_1 \times 100\%$ 。

### 1.4 粒径与 Zeta 电位的测定

将白藜芦醇纳米脂质体用 0.01 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(pH 值 7.4) 稀释后, 采用 Zeta 电位仪测定其粒径分布与 Zeta 电位。测试角度为 173 $^{\circ}$ , 测试温度为(25

$\pm 0.1$ )  $^{\circ}$ C, 测试次数为 3 次。

### 1.5 白藜芦醇纳米脂质体的制备

称取处方量的卵磷脂、胆固醇、白藜芦醇、抗氧化剂  $V_E$ , 加入 500 mL 无水乙醇, 于 45 Hz、240 W 条件下水浴超声 3 min 至充分溶解, 45  $^{\circ}$ C 水浴条件下减压(真空度 -0.09 MPa) 旋转蒸发除去乙醇, 直至茄形瓶壁上形成一层均匀的脂质薄膜。加入 0.01 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(pH 值 7.4) 和适量玻璃珠, 45  $^{\circ}$ C 水浴条件下旋转水合 30 min, 得到白藜芦醇脂质体粗悬液。将其于高压微射流仪器中分散, 即得到白藜芦醇纳米脂质体。

### 1.6 试验设计

1.6.1 单因素试验 单因素基本条件为固定卵磷脂质量为 1 g、卵磷脂/ $V_E$ /白藜芦醇/胆固醇 = 10:1:1:1、磷酸盐缓冲液用量为 250 mL、微射流处理压力 18 000 PSI、循环次数 3 次。各因素对白藜芦醇纳米脂质体包封率的影响见表 1。

1.6.2 二次回归旋转组合设计试验 在单因素试验的基础上, 选择卵磷脂/ $V_E$ 、卵磷脂/白藜芦醇、卵磷脂/胆固醇、微射流处理压力与循环次数 5 个因素进行五因素三水平二次回归旋转组合设计试验, 以确定最佳制备条件。利用统计分析软件 SAS v8.0 专业版进行试验设计, 并对试验结果进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

2.1.1 卵磷脂/ $V_E$ 对包封率的影响 卵磷脂与  $V_E$  比值对白藜芦醇纳米脂质体包封率的影响如图 1 所示, 随着卵磷脂/ $V_E$  比值的降低, 白藜芦醇纳米脂质体包封率逐渐增大, 在卵磷脂/ $V_E$  = 10:1 时达到最大。比

表 1 单因素水平  
Table 1 Levels of single factors

水平 Levels	因素 Factors					
	$X_1$ 卵磷脂/ $V_E$ Phosphatidylcholine to vitamin E	$X_2$ 卵磷脂/白藜芦醇 Phosphatidylcholine to resveratrol	$X_3$ 卵磷脂/胆固醇 Phosphatidylcholine to cholesterol	磷酸盐缓冲液用量 Phosphate buffer volume/mL	$X_4$ 高压微射流压力 Microfluidization pressure/PSI	$X_5$ 循环次数 Microfluidization cycles
1	25:1	25:1	20:1	150	10 000	1
2	20:1	20:1	15:1	200	14 000	2
3	15:1	15:1	10:1	250	18 000	3
4	10:1	10:1	5:1	300	22 000	4
5	5:1	5:1	2:1	350	26 000	5
6	2:1	2:1	1:1		30 000	6

值继续降低时,包封率逐渐下降。 $V_E$ 可抑制脂质体中磷脂氧化反应,增强脂质膜稳定性<sup>[20]</sup>,但是当 $V_E$ 所占比例过大时, $V_E$ 在脂质双层膜中占据一定的空间,干扰了脂质囊泡的形成,导致包封率下降<sup>[21]</sup>。

2.1.2 卵磷脂/白藜芦醇对包封率的影响 由图2可知,随着白藜芦醇含量增加,白藜芦醇纳米脂质体包封率逐渐增大,在卵磷脂/白藜芦醇=10:1时达到饱和。当白藜芦醇含量继续增大时,脂质囊材没有足够的比表面积来封装大量的药物,脂质体的包封率降低<sup>[22]</sup>。

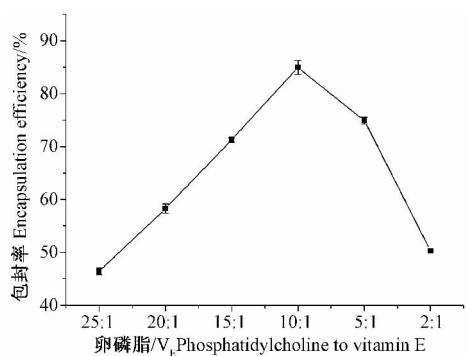


图1 卵磷脂/ $V_E$ 对包封率的影响

Fig. 1 Effect of the ratio of Phosphatidylcholine to  $V_E$  on encapsulation efficiency

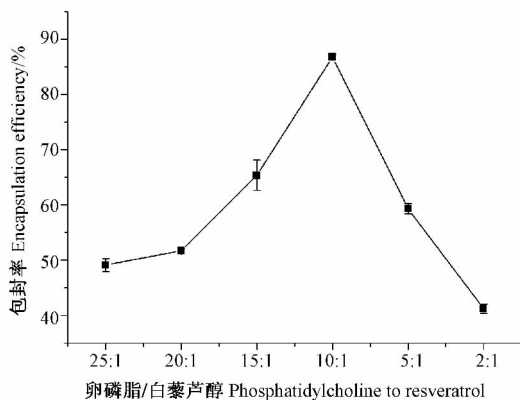


图2 卵磷脂/白藜芦醇对包封率的影响

Fig. 2 Effect of the ratio of Phosphatidylcholine to resveratrol on encapsulation efficiency

2.1.3 卵磷脂胆固醇对包封率的影响 卵磷脂与胆固醇比值对白藜芦醇纳米脂质体包封率的影响如图3所示,随着胆固醇含量的增加,白藜芦醇包封率逐渐增大,在卵磷脂/胆固醇=10:1时达到最大值87.25%。随着胆固醇含量的继续增加,包封率逐渐减小。这是由

于胆固醇对脂质膜的流动性具有调节作用,可增加脂质体的包封率,但是胆固醇含量过高时,会占据有限的脂质双分子层的空间位置,使包封率降低<sup>[9]</sup>。

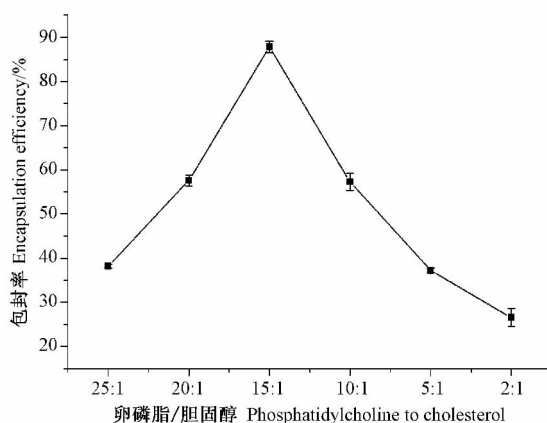


图3 卵磷脂/胆固醇对包封率的影响

Fig. 3 Effect of the ratio of Phosphatidylcholine to cholesterol on encapsulation efficiency

2.1.4 磷酸盐缓冲液用量对包封率的影响 由图4可知,磷酸盐缓冲液用量越大,水合越充分,白藜芦醇纳米脂质体的包封率越高。在磷酸盐缓冲液体积为250 mL(即白藜芦醇/磷酸盐缓冲液=0.4 g·L<sup>-1</sup>)时,制得纳米脂质体包封率为88.55 ± 0.70%,与300 mL时的包封率89.94 ± 0.83%无显著差异,因此确定水合介质体积为250 mL。

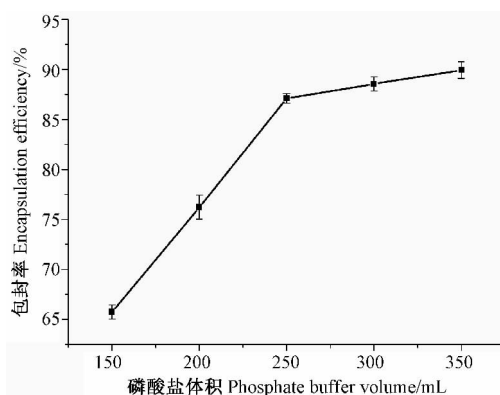


图4 磷酸盐缓冲液用量对包封率的影响

Fig. 4 Effect of the phosphate buffer volume on encapsulation efficiency

2.1.5 高压微射流压力对包封率的影响 由图5可知,随着高压微射流处理压力的增加,白藜芦醇纳米脂

质体包封率逐渐增加,在 18 000 PSI 时达到最大。当压力在 18 000 ~ 30 000 PSI 范围内,包封率随着压力的增加而降低。这是由于脂溶性的白藜芦醇主要是包裹或穿插于磷脂双分子层内,高压微射流处理压力的增加导致脂质体的比表面积增大,使白藜芦醇包裹量相应增加;当处理压力过大时,脂质体结构被机械力破坏,导致部分白藜芦醇漏泄,包封率降低<sup>[13]</sup>。

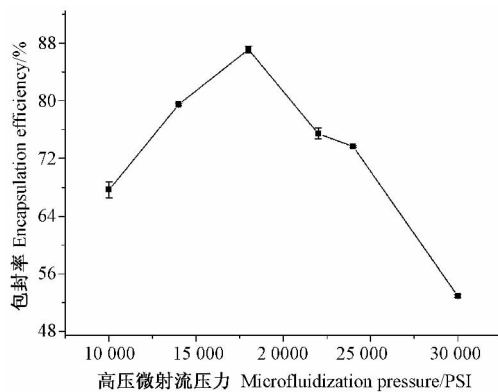


图 5 高压微射流压力对包封率的影响  
Fig. 5 Effect of the microfluidization pressure on encapsulation efficiency

2.1.6 微射流循环次数对包封率的影响 微射流循环次数对白藜芦醇纳米脂质体包封率的影响如图 6 所示。随着高压微射流循环次数的增加,白藜芦醇纳米脂质体包封率迅速增加,在 3 次循环时达到最大值 87.25%。循环次数继续增加时,纳米脂质体结构受到机械破坏,包封率逐渐降低。

## 2.2 二次回归旋转组合设计试验

在单因素试验基础上,选择卵磷脂/ $V_E$  ( $X_1$ )、卵磷脂/白藜芦醇 ( $X_2$ )、卵磷脂/胆固醇 ( $X_3$ )、高压微射流压力 ( $X_4$ ) 和循环次数 ( $X_5$ ) 进行五因素三水平二次回归旋转组合设计试验(表 2),试验结果见表 3。

2.2.1 回归方程的建立及检验 运用 SAS 软件进行

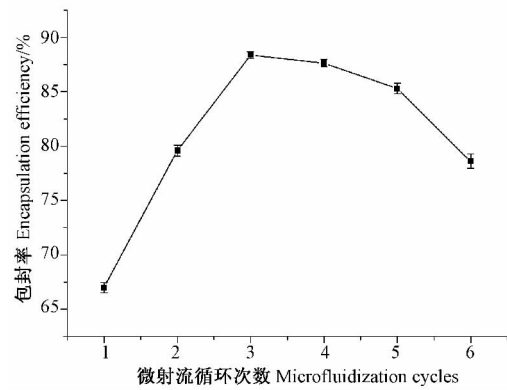


图 6 高压微射流循环次数对包封率的影响  
Fig. 6 Effect of the microfluidization cycles on encapsulation efficiency

数据分析,以白藜芦醇包封率为响应值,在  $\alpha=0.01$  水平剔除不显著项,得到多元二次回归方程为:

$$Y = 87.25333 + 4.24625X_2 + 5.535625X_4 - 5.493125X_1^2 - 3.5825X_1X_3 - 7.124792X_2^2 + 3.26X_2X_3 - 6.268125X_3^2 - 17.49729X_4^2 - 2.855X_4X_5 - 6.400625X_5^2$$

由方差分析可知,回归模型失拟性检验  $P = 0.067566 > 0.05$ ,差异不显著(表 4),说明所选用的二次回归模型合适,所得方程能对响应值进行很好地预测;回归方程的显著性检验  $P = 0.0001 < 0.01$ ,差异极显著,说明模型成立且可靠。

2.2.2 各因素影响程度分析 各因素的  $F$  值可反映出其对试验指标的重要性, $F$  值越大,表明对试验指标的影响越大。由表 3 可知, $FX_1 = 0.031096$ , $FX_2 = 42.39575$ , $FX_3 = 1.444329$ , $FX_4 = 72.05174$ , $FX_5 = 3.256656$ ,即各因素对白藜芦醇提取率的影响程度大小顺序为:高压微射流压力 > 卵磷脂/白藜芦醇 > 卵磷脂/胆固醇 > 循环次数 > 卵磷脂/ $V_E$ 。

2.2.3 双因素交互作用分析 由表 3 可知,试验所建

表 2 二次回归旋转组合设计因素水平

Table 2 Factors and levels of quadratic regression rotation combination design

水平 Levels	因素 Factors				
	$X_1$ 卵磷脂/ $V_E$ Phosphatidylcholine to vitamin E	$X_2$ 卵磷脂/白藜芦醇 Phosphatidylcholine to resveratrol	$X_3$ 卵磷脂/胆固醇 Phosphatidylcholine to cholesterol	$X_4$ 高压微射流压力 Microfluidization pressure/PSI	$X_5$ 循环次数 Microfluidization cycles
-1	5:1	5:1	5:1	14 000	2
0	10:1	10:1	10:1	18 000	3
1	15:1	15:1	15:1	22 000	4

表3 试验设计及结果  
Table 3 Experimental design and results

序号 Experiment number	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	包封率 Encapsulation efficiency/%	序号 Experiment number	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	包封率 Encapsulation efficiency/%
1	-1	-1	0	0	0	71.56 ± 0.01	24	1	0	0	1	0	70.48 ± 0.68
2	-1	1	0	0	0	75.86 ± 0.03	25	0	-1	-1	0	0	73.82 ± 0.05
3	1	-1	0	0	0	74.47 ± 0.02	26	0	-1	1	0	0	66.18 ± 0.85
4	1	1	0	0	0	78.39 ± 1.57	27	0	1	-1	0	0	76.18 ± 3.02
5	0	0	-1	-1	0	58.26 ± 1.32	28	0	1	1	0	0	81.58 ± 0.01
6	0	0	-1	1	0	68.90 ± 0.96	29	0	0	-1	0	-1	82.34 ± 0.48
7	0	0	1	-1	0	57.31 ± 0.34	30	0	0	-1	0	1	74.17 ± 0.07
8	0	0	1	1	0	67.78 ± 0.13	31	0	0	1	0	-1	70.08 ± 1.78
9	0	-1	0	0	-1	68.56 ± 1.24	32	0	0	1	0	1	71.27 ± 0.37
10	0	-1	0	0	1	67.17 ± 0.17	33	-1	0	0	0	-1	74.67 ± 0.04
11	0	1	0	0	-1	80.62 ± 0.58	34	-1	0	0	0	1	72.41 ± 0.42
12	0	1	0	0	1	75.31 ± 0.42	35	1	0	0	0	-1	76.23 ± 0.39
13	-1	0	-1	0	0	72.71 ± 0.64	36	1	0	0	0	1	77.94 ± 0.17
14	-1	0	1	0	0	83.34 ± 1.22	37	0	-1	0	-1	0	54.68 ± 0.50
15	1	0	-1	0	0	74.74 ± 0.03	38	0	-1	0	1	0	59.30 ± 0.16
16	1	0	1	0	0	71.04 ± 0.09	39	0	1	0	-1	0	60.25 ± 0.63
17	0	0	0	-1	-1	56.45 ± 0.55	40	0	1	0	1	0	75.49 ± 0.45
18	0	0	0	-1	1	59.86 ± 1.19	41	0	0	0	0	0	84.97
19	0	0	0	1	-1	74.52 ± 0.15	42	0	0	0	0	0	87.95
20	0	0	0	1	1	66.51 ± 1.95	43	0	0	0	0	0	87.09
21	-1	0	0	-1	0	61.09 ± 0.77	44	0	0	0	0	0	89.30
22	-1	0	0	1	0	68.78 ± 0.15	45	0	0	0	0	0	87.44
23	1	0	0	-1	0	55.29 ± 3.04	46	0	0	0	0	0	86.77

立的数学模型中  $X_1X_3$ 、 $X_2X_3$ 、 $X_4X_5$  交互作用显著。根据分析结果分别绘制双因素交互作用的曲面图和等高线(图7-图9)。结果表明3个交互作用响应面均为开口向下的凸性曲面,即在试验范围内存在响应值的极高值。其中,高压微射流压力( $X_4$ )响应曲面最陡峭,椭圆形等高线排列最密集,对白藜芦醇纳米脂质体包封率影响最大,与F值分析相符。

由图7可知,卵磷脂/白藜芦醇 = 10:1、微射流压力为18 000 PSI、循环次数3次时, $X_1X_3$ 交互作用中影响包封率的主要因素是卵磷脂/胆固醇( $X_3$ ),图中曲面呈现陡峭地先增高后降低的趋势。卵磷脂/ $V_E$ ( $X_1$ )接近中心点时提取率最大,偏离中心点越远,提取率越低。其等高线接近圆形,且分布稀疏,表明其交互作用较弱。

由图8可知,卵磷脂/ $V_E$  = 10:1、微射流压力为18

000 PSI、循环次数3次时, $X_2X_3$ 交互作用中二者均对响应值起着二次影响作用。图中曲面呈先升高后降低的趋势,即随着卵磷脂/白藜芦醇( $X_2$ )与卵磷脂/胆固醇( $X_3$ )的增加,包封率先增加后减小,在接近中心点时达到最大。

由图9可知,卵磷脂/ $V_E$ /白藜芦醇/胆固醇 = 10:1:1:1时, $X_4X_5$ 交互作用中影响包封率的主要因素是压力( $X_4$ ),随着微射流压力的增加,包封率急剧增加后减小。随着循环次数( $X_5$ )的增加,包封率先增加后减小,接近中心点时达到最大,但变化较缓慢。由等高线呈椭圆形密集排列可知,二者交互作用较显著。

2.2.4 提取条件优化及验证 对回归方程进行分析,取一阶导数等于0,解方程组得到提取白藜芦醇的最佳理论工艺参数为:卵磷脂/ $V_E$  = 10:1、卵磷脂/白藜芦醇 = 11.6:1、卵磷脂/胆固醇 = 10.5:1、微射流压力

表 4 试验结果方差分析表  
Table 4 Variance analysis of test results

变异来源 Variation sources	自由度 <i>df</i>	方差 SS	均方 MS	<i>F</i> 值 <i>F</i> value	<i>P</i> 值 Pr > <i>F</i>	显著性 Significance
X <sub>1</sub>	1	0.2116	0.2116	0.0311	0.8614	
X <sub>2</sub>	1	288.4902	286.7942	42.3958	0.0001	**
X <sub>3</sub>	1	9.8282	9.8282	1.4443	0.2407	
X <sub>4</sub>	1	490.2903	488.0786	72.0517	0.0001	**
X <sub>5</sub>	1	22.1601	22.1606	3.2567	0.0832	
X <sub>1</sub> * X <sub>1</sub>	1	263.0340	262.9411	38.6998	0.0001	**
X <sub>1</sub> * X <sub>2</sub>	1	0.0361	0.0361	0.0053	0.9425	
X <sub>1</sub> * X <sub>3</sub>	1	51.3372	51.3372	7.5444	0.0110	*
X <sub>1</sub> * X <sub>4</sub>	1	14.0625	14.0625	2.0666	0.1630	
X <sub>1</sub> * X <sub>5</sub>	1	3.9402	3.9402	0.5790	0.4538	
X <sub>2</sub> * X <sub>2</sub>	1	443.0195	444.5754	65.1050	0.0001	**
X <sub>2</sub> * X <sub>3</sub>	1	42.5104	42.5204	6.2472	0.0194	*
X <sub>2</sub> * X <sub>4</sub>	1	28.1961	27.1441	4.1436	0.0525	
X <sub>2</sub> * X <sub>5</sub>	1	3.8416	3.8416	0.5646	0.4594	
X <sub>3</sub> * X <sub>3</sub>	1	342.8892	342.4335	50.3901	0.0001	**
X <sub>3</sub> * X <sub>4</sub>	1	0.0072	0.0072	0.0011	0.9743	
X <sub>3</sub> * X <sub>5</sub>	1	21.9024	21.9024	3.2187	0.0849	
X <sub>4</sub> * X <sub>4</sub>	1	2 671.9000	2 675.7190	392.6552	0.0001	**
X <sub>4</sub> * X <sub>5</sub>	1	32.6041	32.6041	4.7914	0.0382	*
X <sub>5</sub> * X <sub>5</sub>	1	357.5389	357.0736	52.5430	0.0001	**
模型 Model	20	3 752.5360	187.6268	27.5731	0.0001	**
线性 Linear	5	810.9809	162.1962	23.8359	0.0001	
二次 Quadratic	5	2 743.1170	548.6235	80.6242	0.0001	
交互作用 Cross Product	10	198.4379	19.8438	2.9162	0.0145	
误差 Error	25	170.1174	6.8047			
失拟 Lack of fit	20	159.9345	7.9967	3.9265	0.0676	
纯误差 Pure Error	5	10.1829	2.0366			
总和 Total	45	3 922.6540				

注: \* 代表差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\*代表差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

Note: \* represents significant differences with each other ( $P < 0.05$ ), \*\*represents significant differences ( $P < 0.01$ ).

18 366 PSI、循环次数 3 次,在此条件下白藜芦醇纳米脂质体理论预测包封率为 87.60%。为检验响应面法所得结果的可靠性,在上述条件下进行 3 次重复验证试验,得白藜芦醇纳米脂质体包封率为 87.74% ±

1.01%,与预测理论值相符。

### 2.3 粒径与 Zeta 电位测定

采用 Zeta 电位仪测定最佳工艺制得白藜芦醇纳米脂质体,其平均粒径为 78.31 ± 1.37nm,且分布范围

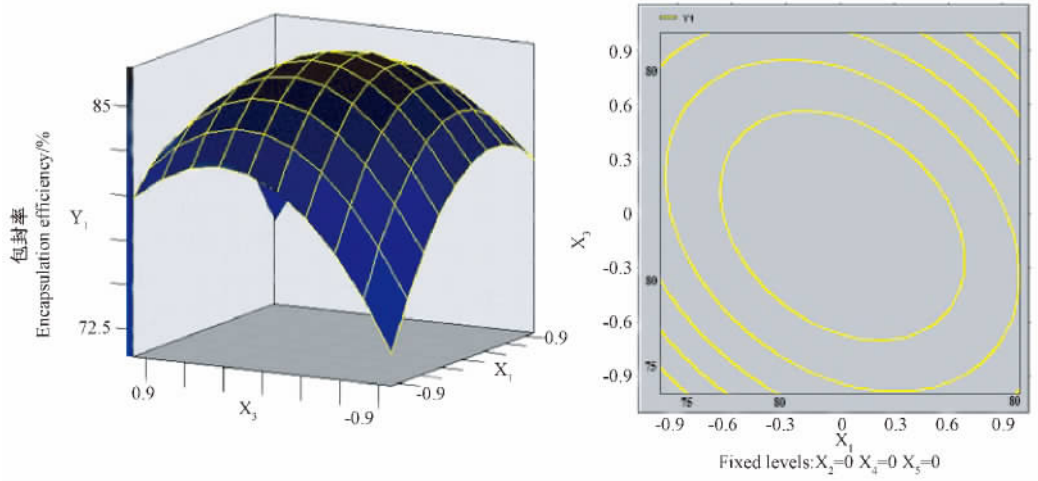


图7 卵磷脂/ $V_E$ 和卵磷脂/胆固醇对包封率的交互作用分析

Fig.7 Effect of the ratio of lecithin to  $V_E$  and lecithin to cholesterol on encapsulation efficiency

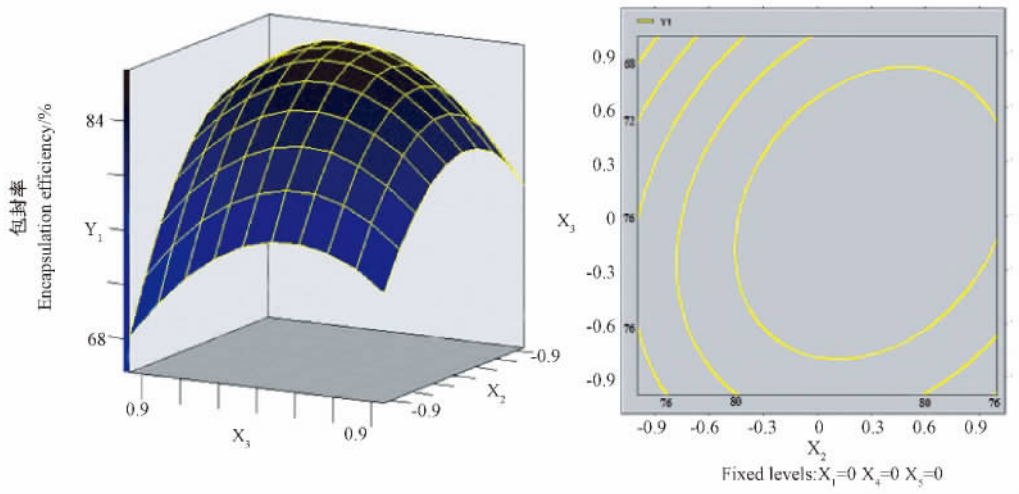


图8 卵磷脂/白藜芦醇和卵磷脂/胆固醇对包封率的交互作用分析

Fig.8 Effect of the ratio of lecithin to resveratrol and lecithin to cholesterol on encapsulation efficiency

较窄(图 10)。Zeta 电位为  $-55.5\text{ mV}$  ,绝对值大于  $30\text{ mV}$  小于  $60\text{ mV}$  表明白藜芦醇纳米脂质体具有物理稳定性<sup>[23]</sup>。

### 3 讨论

白藜芦醇被喻为继紫杉醇之后的又一新的绿色抗癌药物,自然资源十分丰富,且具有较高的安全性,因此在医药、食品、化妆品等行业中具有广阔的应用前景。因此,探寻与研究清洁安全、可工业化生产的白藜芦醇纳米脂质体制备工艺具有重要意义<sup>[24-25]</sup>。乐文慧等<sup>[26]</sup>采用乙醇注入法制备白藜芦醇纳米脂质体,包封

率为  $84.68\%$  ,但该方法乙醇注入速度不易控制,且生产周期较长。许汉林等<sup>[27]</sup>采用薄膜分散法制备白藜芦醇纳米脂质体,包封率为  $93.52\%$ 。王新春等<sup>[28]</sup>比较白藜芦醇纳米脂质体、固体脂质纳米粒和小麦醇溶蛋白纳米粒的物理性质与作用效果,发现白藜芦醇纳米脂质体的粒径最小,包封率最高,大鼠体内的绝对生物利用度最大。上述研究存在有机试剂残留和磷脂成分易氧化等问题,且制备方法生产成本低、周期长,制备过程难以控制,放大为工业化生产存在难度。本研究以乙醇作为溶剂,添加抗氧化剂  $V_E$ ,采用高压微射流法制备白藜芦醇纳米脂质体,粒径小( $78.31\text{ nm}$ )且包封率较高  $87.74\%$ ,物理性质稳定,同时工艺上较上述研究具有操作方便,清洁

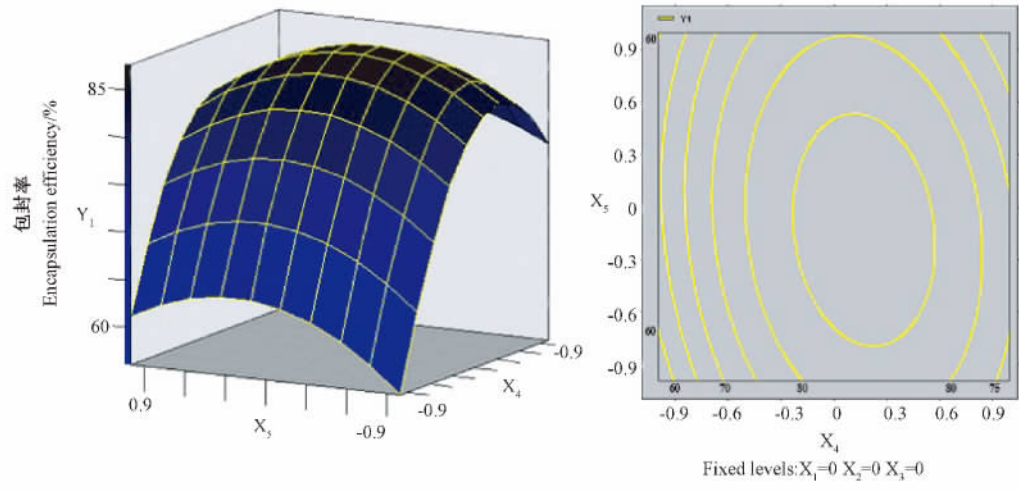
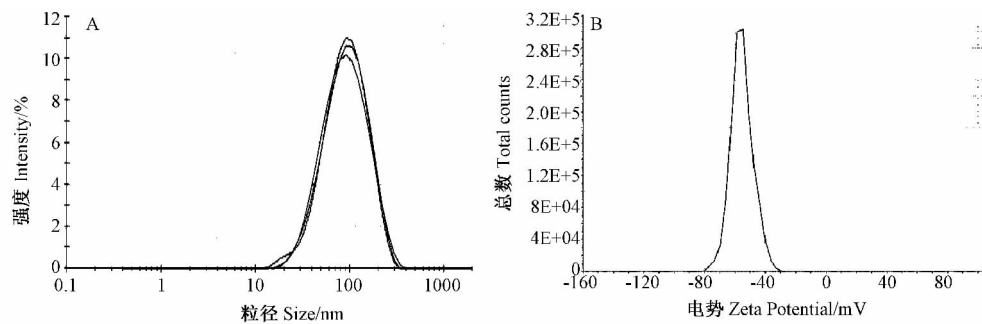


图9 微射流压力和循环次数对包封率的交互作用分析

Fig.9 Effect of the microfluidization pressure and cycles on encapsulation efficiency



注: A: 粒径分布图; B: Zeta 电位图。

Note: A: Size distribution by intensity. B: Zeta potential

图10 白藜芦醇纳米脂质体粒径分布与 zeta 电位

Fig.10 The size distribution and zeta potential of resveratrol nanoliposomes

安全,可工业化生产等优点。

## 4 结论

通过单因素试验和响应面分析研究,确立高压微射流法制备白藜芦醇纳米脂质体最佳工艺条件为:卵磷脂/ $V_E = 10:1$ 、卵磷脂/白藜芦醇 = 11.6:1、卵磷脂/胆固醇 = 10.5:1、磷酸盐缓冲液用量为 250 mL、微射流压力 18 366 PSI、循环次数 3 次,在此条件下白藜芦醇纳米脂质体包封率为  $87.74\% \pm 1.01\%$ 。各因素对白藜芦醇提取率的影响顺序为:微射流压力 > 卵磷脂/白藜芦醇 > 卵磷脂/胆固醇 > 循环次数 > 卵磷脂/ $V_E$ 。

制得的白藜芦醇纳米脂质体在不同给药方式下如何与体内细胞膜、线粒体等之间作用,其在体内结合位

点与作用通道有待进一步探讨;白藜芦醇纳米脂质体在体内的缓释时间及规律、抗肿瘤效果及其他生物活性的变化还有待深入研究。

## 参考文献:

- [1] Rabesiaka M, Rakotondramasy-Rabesiaka L, Mabilille I, Porte C, Havet J L. Extraction of trans-resveratrol from red wine and optimization by response surface methodology [J]. Separation and Purification Technology, 2011, 81(1): 56-61
- [2] Aziz M H, Kumar R, Ahmad N. Cancer chemoprevention by resveratrol: In vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms (Review) [J]. International journal of oncology, 2003, 23(1): 17-28
- [3] 陈琼玲. 花生根白藜芦醇提纯、纳米脂质体制备及抗肿瘤活性 [D]. 北京:中国农业科学院, 2013
- [4] Pandey K B, Rizvi S I. Anti-oxidative action of resveratrol: Implications for human health [J]. Arabian Journal of Chemistry, 2011, 4(3): 293-298



- [5] 毕海丹. 酿酒葡萄皮渣中反式白藜芦醇的提取纯化及其抗氧化性的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006
- [6] Ou H C, Chou F P, Sheen H M, Lin T M, Yang C H, Sheu W H. Resveratrol, a polyphenolic compound in red wine, protects against oxidized LDL-induced cytotoxicity in endothelial cells [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 364(1): 196–204
- [7] Pallas M, Gemma C, Smith M A, Coto-Montes A, Pelegri C, Vilaplana J, Camins A. Resveratrol and neurodegenerative disease: activation of SIRT1 as the potential pathway towards neuroprotection [J]. *Current Neurovascular Research*, 2009, 6(1): 70–81
- [8] Kim S, Ng W K, Dong Y, Das S, Tan R B H. Preparation and physicochemical characterization of trans-resveratrol nanoparticles by temperature-controlled antisolvent precipitation [J]. *Journal of Food Engineering*, 2012, 108(1): 37–42
- [9] Mozafari M R. Nanoliposomes: Preparation and Analysis [J]. *Liposomes, Methods in Molecular Biology*, 2010, 605: 29–48
- [10] Gharib A, Faezizadeh Z, Godarzee M. Therapeutic efficacy of epigallocatechin gallate-loaded nanoliposomes against burn wound infection by methicillin-resistant staphylococcus aureus [J]. *Skin Pharmacology Physiology*, 2013, 26(2): 68–75
- [11] Fan M, Xu S, Xia S, Zhang X. Preparation of salidroside nanoliposomes by ethanol injection method and in vitro release study [J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 227(1): 167–174
- [12] Mayhew E, Lazo R, Vail W J, King J, Green A M. Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1984, 775(2): 169–174
- [13] 刘伟, 刘玮琳, 刘成梅, 杨水兵, 郑会娟, 刘建华, 王建红. 高压微射流制备纳米中链脂肪酸脂质体的研究 [J]. *高压物理学报*, 2010, 24(4): 293–299
- [14] Yang S B, Liu W, Liu C M, Liu W L, Tong G H, Zheng H J, Zhou W. Characterization and bioavailability of vitamin C nanoliposomes prepared by film evaporation-dynamic high pressure microfluidization [J]. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2012, 33(11): 1608–1614
- [15] 陈琼玲, 刘红芝, 刘丽, 何轩辉, 王强. 高压-微波法提取花生根中白藜芦醇 [J]. *食品科学*, 2013, 34(20): 43–46
- [16] 陈琼玲, 刘红芝, 刘丽, 何轩辉, 王强, 胡晖. 大孔树脂-硅胶柱层析法纯化花生根中白藜芦醇 [J]. *中国食品学报*, 2014, (6): 127–132
- [17] 国家粮食局. GB/T 24903-2010 花生中白藜芦醇的测定高效液相色谱法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010
- [18] 陈洪轩, 陈倩倩, 刘万路, 史荣, 徐志杰. 白藜芦醇乳脂体的制备和工艺考察 [J]. *河南大学学报: 医学版*, 2010, 29(4): 266–269
- [19] Crommelin D J A, Grit M, Talsma H, Zuidam N J. Liposomes as carriers for drugs and antigens: approaches to preserve their long term stability [J]. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1994, 20(4): 547–556
- [20] 旷英姿. 茶多酚脂质体制备与表征 [D]. 南京: 东南大学, 2006
- [21] 阴婷婷, 杨水兵, 刘成梅, 刘伟, 刘伟琳, 童桂鸿, 章瑜, 郑会娟. 中链脂肪酸-VC 复合脂质体制备及初步稳定性 [J]. *食品科学*, 2011, 32(12): 106–110
- [22] Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust J E, Benoit J P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(23): 4283–4300
- [23] 李万忠, 田景振. 白藜芦醇新剂型研究进展 [J]. *中国医药生物技术*, 2014, 6(2): 138–140
- [24] 陈琼玲, 刘红芝, 刘丽, 何轩辉, 王强. 白藜芦醇纳米脂质体研究进展 [J]. *核农学报*, 2013, 27(7): 962–967
- [25] 乐文慧, 黄早成, 肖苏尧, 曹庸. 白藜芦醇固体脂质体制备工艺研究 [J]. *食品科学*, 2010, 31(18): 59–62
- [26] 徐汉林, 张念, 刘浩, 程光明, 黄晶. 白藜芦醇脂质体的制备工艺研究 [J]. *湖北中医杂志*, 2009, 31(2): 55–56
- [27] 王新春, 侯世祥, 李文, 李小英, 周亚伟. 白藜芦醇纳米脂质体体外释药和大鼠小肠吸收特性的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(11): 1084–1087

## Preparation of Resveratrol Nanoliposomes by High Pressure Microfluidization

CHEN Qionglin<sup>1,2</sup> LIU Hongzhi<sup>1</sup> LIU Li<sup>1</sup> WANG Qiang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Agro-Products Processing and quality control, Ministry of Agriculture/Institute of Agro-products processing science and technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences,

Beijing 100193; <sup>2</sup> College of information, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi 030800)

**Abstract:** The technology of preparing resveratrol nanoliposomes by high pressure microfluidization method was investigated to improve the bioavailability and slow-release effect of resveratrol. On the basis of single factor experiments, the preparation conditions were optimized by quadratic regression rotation design experiment, taking the encapsulation efficiency as evaluation index. The results showed that the optimum preparation conditions were as follows: the mass ratio of lectine to vitamin E 10:1, lecithin to resveratrol 11.6:1, lecithin to cholesterol 10.5:1, microfluidization pressure 18366 PSI and cycles 3 times. Under these conditions, the encapsulation efficiency of resveratrol nanoliposomes was as high as 87.74% ± 1.01%, the average particle size was 78.31 ± 1.37 nm and the zeta potential was -55.5 mV. The optimized operation is reasonable and practicable to prepare resveratrol nanoliposomes with high encapsulation efficiency, small particle size, narrow distribution range and good stability. This study provided the theoretical basis and practical guidance for exploitation and utilization of new resveratrol formulation.

**Keywords:** resveratrol nanoliposomes, high pressure microfluidization, encapsulation efficiency