

文章编号 :1009-038X( 2004 )04-0074-04

## 硫酸亚铁脂质体的研制

夏书芹, 许时婴

( 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036 )

**摘 要 :**采用 4 种不同的方法——薄膜法、超声处理法、逆相蒸发法及冰冻熔融法制备了硫酸亚铁脂质体,通过单因素试验和包封率测定,确定了逆相蒸发法制备硫酸亚铁脂质体的工艺条件,制得的硫酸亚铁脂质体的包封率为 67%。作者还初步研究了胆固醇和吐温 80 的添加量对脂质体物理稳定性的影响,研究结果表明,添加适量的胆固醇和吐温 80 有助于改善脂质体的物理稳定性。

**关键词 :**硫酸亚铁;脂质体;包封率;物理稳定性

**中图分类号 :**O 614.81

**文献标识码 :**A

## Preparation of Ferrous Sulfate Liposomes

XIA Shu-qin, XU Shi-ying

( School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China )

**Abstract :**Four kinds of methods, thin-film, sonication, reverse-phase evaporation and freeze-thawing were used to prepare liposomes of ferrous sulfate. The operational conditions of preparing liposomes of ferrous sulfate were determined via single factor trial and measurement of the encapsulation efficiency ( EE ). The EE of 67% was obtained by using reverse-phase evaporation method. In addition, the effect of cholesterol and Tween 80 on the physical stability of liposomes was also investigated. Results showed that the physical stability of liposomes could be improved by addition of certain amount of cholesterol and Tween 80.

**Key words :**ferrous sulfate; liposomes; encapsulation efficiency; physical stability

硫酸亚铁是一种生物利用率高且价格低廉的铁营养强化剂,但这种铁盐性质活泼,容易氧化变色,产生异味,将其直接加入食品中会影响食品的感官性质及货架寿命,且对胃肠有刺激作用<sup>[1~3]</sup>。众所周知,微胶囊技术可将敏感成分保护起来,使其免受外界的湿度、氧气、光线等因素的影响<sup>[1~2]</sup>,因此,硫酸亚铁微胶囊化是解决乳制品、面制品中铁营养强化的一种有效途径。

脂质体技术是一种新型的微胶囊技术<sup>[1]</sup>,它是

一种人工制备的类脂质小球体,由一个或多个酷似细胞膜的类脂双分子层包裹着水相介质组成<sup>[4]</sup>,脂质体的这种结构使其能够携带各种亲水的、疏水的和两亲的物质,但水溶性物质一般包封率不高。长期以来,脂质体大多应用于医药和化妆品领域,但近年来在食品工业上显示出较大的应用潜力,脂质体具有以下几方面特点<sup>[5~7]</sup>(1)天然无毒并具生物可降解性,主要是由有益于健康的天然成分卵磷脂组成(2)结构一般可分为大单层、小单层和多

收稿日期 2003-07-19; 修回日期 2003-11-19.

作者简介:夏书芹(1979-),女,江苏海安人,食品科学与工程博士研究生。

万方数据

层(3)尺寸最小的有几十纳米的单层脂质体,最大的为几微米的多层同心脂质体,由于它比其它微胶囊更小,因而在食品体系中能得到更好地分散。作者采用4种不同方法制备了硫酸亚铁脂质体并测定其包封率,选择了一种具有高包封率的制备硫酸亚铁脂质体的方法,并研究了胆固醇和吐温80对脂质体物理稳定性的影响,以期制备出包封率高、稳定性好的硫酸亚铁脂质体。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

七水合硫酸亚铁:上海化学试剂公司产品;卵磷脂:生化试剂,上海华东师范大学化工厂产品;胆固醇:上海化学试剂公司产品;吐温80:上海化学试剂公司产品;其它试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 硫酸亚铁脂质体的制备

1) 逆相蒸发法。将壁材( $m$ (卵磷脂): $m$ (胆固醇)=10:1)溶于30 mL无水乙醚,加入10 mL硫酸亚铁溶液,碎冰浴超声处理5 min,使成均匀乳状液,将该乳状液采用旋转蒸发仪减压蒸发至凝胶状,再加入适量水合介质使壁材的质量浓度为30 mg/mL,继续减压蒸发30 min以除去残余的有机溶剂,即得均匀脂质体,4℃冷藏。

2) 薄膜法。将壁材( $m$ (卵磷脂): $m$ (胆固醇)=10:1)溶于30 mL无水乙醚,在38℃下用旋转蒸发仪除去乙醚,在圆底烧瓶壁上形成均匀的薄膜后,加入硫酸亚铁溶液,38℃减压蒸发30 min以充分水化,4℃冷藏。

3) 薄膜超声法。将薄膜法制得的脂质体在碎冰浴中超声处理2 min,4℃冷藏。

4) 冰冻熔融法。将薄膜超声法制得的脂质体在-18℃反复冻融3次,4℃冷藏。

#### 1.2.2 铁含量的测定 邻二氮菲比色法<sup>[8]</sup>。

1.2.3 包封率的测定 包封率(%)=[(总铁质量分数-表面铁质量分数)/总铁质量分数]×100%

总铁质量分数的测定:精确移取1 mL待测的脂质体,烘干、炭化,然后在550~600℃条件下灰化4 h,冷却后在坩埚中加入5 mL 3 mol/L的盐酸,在电炉上加热沸腾5 min,冷却后滤去杂质,收集滤液于50 mL容量瓶中,定容,用邻二氮菲比色法测定。

表面铁质量分数的测定:精确移取1 mL待测定的脂质体于处理好的透析袋中,封好袋口,置于100 mL去离子水中,4℃下透析24 h,以除去游离

的芯材。将透析外液浓缩、烘干、炭化、灰化,用邻二氮菲比色法测定。

1.2.4 Zeta电位的测定 取少量脂质体用超纯水稀释若干倍后,采用Zetasizer 2000电位测定仪测定脂质体的Zeta电位。

1.2.5 浊度的测定 使用分光光度计测定未经稀释的脂质体在500 nm处的吸光度作为浊度指标。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同方法制备硫酸亚铁脂质体的包封率

关于脂质体的制备方法有较多报道,如薄膜法、乙醚注入法、二次乳化法、超声处理法、冰冻熔融法及逆相蒸发法等,各种方法均有优缺点<sup>[4,5]</sup>。作者在相同配方条件下(水合介质均为去离子水)比较了4种方法——薄膜法、超声处理法、逆相蒸发法及冰冻熔融法制备硫酸亚铁脂质体的包封率。图1表明,采用逆相蒸发法所得的包封率高于其它3种方法,因此选择逆相蒸发法作为制备硫酸亚铁脂质体的主要方法。

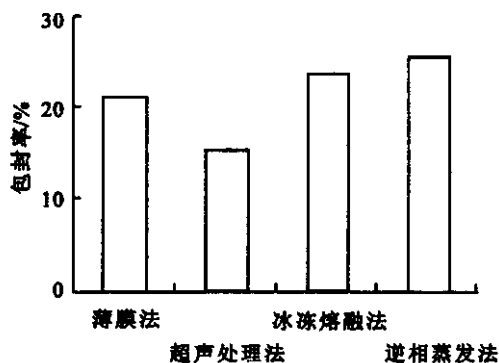


图1 不同方法制备硫酸亚铁脂质体的包封率

Fig.1 Encapsulation efficiency of ferrous sulfate in liposomes by using different preparation methods

### 2.2 芯壁比对硫酸亚铁脂质体包封率的影响

固定卵磷脂、胆固醇、有机溶剂的总量,以去离子水作为水合介质采用逆相蒸发法制备不同硫酸亚铁质量分数的脂质体,研究芯壁比对硫酸亚铁脂质体包封率的影响。由图2可知,当采用去离子水作为水合介质时,随着芯壁比的增加,包封率逐渐降低。呈现下降的原因是与芯材硫酸亚铁为强电解质有关,过高的离子强度会影响脂质体膜表面的电荷性质,因而使脂质体包封的水相体积变小<sup>[9]</sup>。

### 2.3 水合介质对硫酸亚铁脂质体包封率及表面电位的影响

由图3可见,3种不同的水合介质对硫酸亚铁

脂质体包封率的影响很大,采用柠檬酸-磷酸缓冲液或柠檬酸缓冲液作为水合介质能明显提高包封率,这是由于缓冲液中柠檬酸盐可以螯合芯材中的金属铁离子。

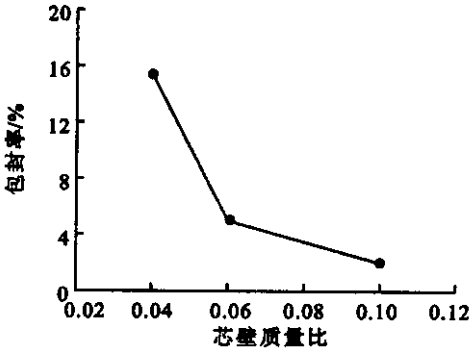


图 2 芯壁比与硫酸亚铁脂质体包封率的关系  
Fig. 2 Relationship between encapsulation efficiency and the mass concentration of ferrous

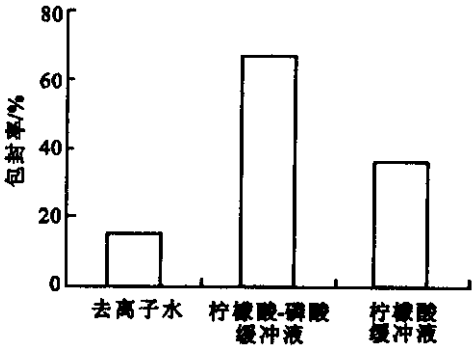


图 3 不同水合介质对硫酸亚铁脂质体包封率的影响  
Fig. 3 Effect of different hydrating media on encapsulation efficiency

螯合剂的添加不仅有助于提高硫酸亚铁脂质体的包封率,而且能增强脂质体的静电稳定性。由表 1 可知,以去离子水作为水合介质时,芯材  $\text{Fe}^{2+}$  会导致脂质体 Zeta 电位极性的反转,表面呈现正电荷,严重影响了包封率。这是由于带正电荷的  $\text{Fe}^{2+}$  与表面带负电荷的磷脂酰胆碱(PC)脂质体产生静电引力的作用。随电解质浓度的增加,有更多的反离子进入紧密层,导致脂质体表面双电层被压缩,Zeta 电位很快降低。脂质体表面的净电荷为零时,扩散层厚度也为零,若脂质体表面还有多余的结合位点,继续增加电解质浓度,吸附高价  $\text{Fe}^{2+}$  会导致正电荷的过量积累,过量的正电荷需要溶液中高价反离子来补偿,于是又建立了新的双电层,产生了正的 Zeta 电位。如果采用柠檬酸-磷酸缓冲液作为水合介质,脂质体表面电位均高于水溶液,这一现象与表面带负电荷的 PC 脂质体在电解质环境中受到高价阴离子的作用有关。根据 Gouy-Chapman

的扩散双电层理论,由于结合同号离子发生了特性吸附,即高价阴离子( $\text{PO}_4^{3-}$  和  $\text{HPO}_4^{2-}$ )携其高的荷电量穿过磷脂表面的电荷屏障和水化层与胆碱基团结合,使原来的负电势趋于更负,从而提高脂质体的静电稳定性。而且,柠檬酸对  $\text{Fe}^{2+}$  有较强的螯合能力就能够抑制 Zeta 电位极性的反转,从而有效地提高了包封率。

表 1 不同水合介质对脂质体表面电位的影响

Tab. 1 Effect of different hydrating media on Zeta potential of liposomes

水合介质	Zeta 电位/ mV	
	空白脂质体	硫酸亚铁脂质体
去离子水	- 36. 2	5. 9
柠檬酸-磷酸缓冲液	- 45. 4	- 17. 9

2. 4 超声强度对硫酸亚铁脂质体包封率的影响

作者采用探头式、冰浴间隙超声乳化,处理时间固定为 5 min(开 1 s 停 1 s),观察超声强度的变化对包封率的影响。从图 4 可以看出,随着超声处理强度的增加,包封率呈先上升再下降趋势,最佳超声处理强度为 70%。超声处理后可以形成稳定的 W/O 型乳状液,脂质体小而均匀,但强度过高可能导致脂质体的破坏,从而使包封率降低。

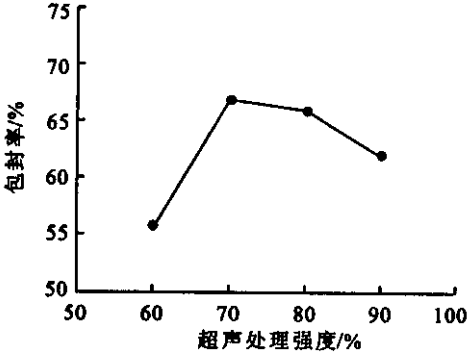


图 4 超声处理强度与硫酸亚铁脂质体包封率的关系  
Fig. 4 Relationship between encapsulation efficiency and the sonication strength

2. 5 脂质体的物理稳定性

脂质体属于胶体分散体系,是一种热力学不稳定体系,在贮存的过程中易于发生聚集融合并导致内容物的漏出<sup>[11]</sup>,通过增强胶粒之间的排斥力(包括静电作用和空间稳定作用)可以提高脂质体物理稳定性。

2. 5. 1 胆固醇对空白脂质体静电稳定性的影响

胆固醇是脂质体类脂膜的重要组成部分,具有调节双分子层流动性及稳定双分子膜的功能<sup>[4]</sup>,作者采用逆相蒸发法制备了含有不同比例的卵磷脂-胆固醇的脂质体样品,并分别测定了它们的 Zeta 电位。

从图 5 可以看出,随着胆固醇浓度增加,Zeta

电位先呈增加趋势,这是因为胆固醇的极性头部带有羟基基团,在磷脂酰胆碱(PC)的极性区易与胆碱结合,将胆碱基团拉向膜内,起着稳定磷酸酯基在脂质体表面的作用,这种偶极取向增加了脂质体表面的负电效应<sup>[10]</sup>,使Zeta电位增大,脂质体静电稳定性增强,但随着胆固醇摩尔分数继续增加,Zeta电位又逐渐下降,反而不利于脂质体的稳定。

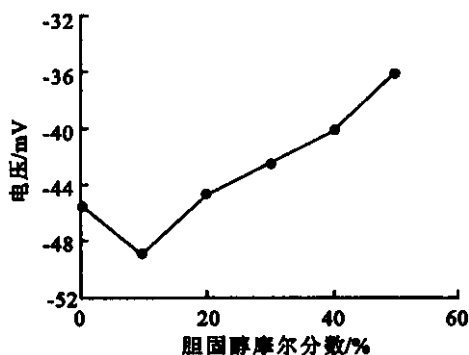


图5 卵磷脂-胆固醇脂质体表面电势随胆固醇摩尔分数的变化(电导率为0.01 ms/cm)

Fig.5 The change of Zeta potential of PC-Chole liposome with cholesterol concentration( conductivity 0.01 ms/cm )

实验结果表明,胆固醇对脂质体表面的电性质有很大的影响,因此适当控制卵磷脂与胆固醇的比例,对于提高硫酸亚铁脂质体的包封率及其稳定性具有重要意义。

### 2.5.2 吐温80对空白脂质体空间稳定性的影响

在脂质体双层中掺入非离子表面活性剂如聚氧乙烯山梨醇脂酸酯80(吐温80)可以制备立体化学稳定的脂质体,这种脂质体无毒,当两个立体稳定的脂质体相互接近时,由于存在水溶性链,脂质体间的化学位能降低,通过渗透作用,脂质体间进入

大量的水而分离。由于吐温80的加入,吐温80与脂质体相互作用,导致脂质体浊度发生变化,结果见图6( $Re$ 为吐温80与卵磷脂的摩尔比)。随着 $Re$ 值增加,脂质体在500 nm处的吸光值逐渐下降,这表明表面活性剂吐温80对脂质膜逐渐增溶。但并非表面活性剂吐温80的添加量越多越好,根据Lichtenberg的三阶段模型<sup>[12]</sup>,当表面活性剂浓度达一定值时,磷脂将被逐渐增溶成混合胶束,脂质体的双层的结构遭到完全破坏,包封的芯材漏出,有关吐温80的合适添加量有待深入研究。

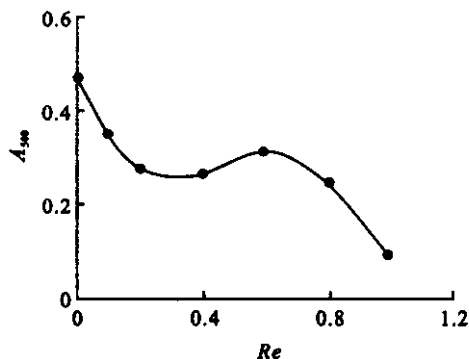


图6 脂质体浊度随 $Re$ 的变化

Fig. 6 Turbidity change of PC-liposomes with  $Re$  Concentration

## 3 小结

确定了逆相蒸发法制备硫酸亚铁脂质体的工艺条件:水合介质为柠檬酸-磷酸缓冲液,芯壁比为0.04,超声处理强度为70%。对影响脂质体物理稳定性的因素进行了初步研究,制备得到了包封率为67%、稳定性较佳的微胶囊化硫酸亚铁脂质体。

## 参考文献:

- [1] 梁治齐. 微胶囊技术及其应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- [2] Jackson LS, Lee K. Microencapsulated iron for food fortification[J]. *Journal of Food Science*, 1991, 56(4):1047-1050.
- [3] 林庆文, 苏和平, 张兆德. 微胶囊化硫酸亚铁之制备对全脂乳粉脂肪安定性之影响[J]. [台湾]食品科学, 1995, 22(2):141-148.
- [4] 张灵芝. 脂质体的制备及其在生物医学中的应用[M]. 北京:北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [5] Lasic DD. Liposomes: From Physics to Application[M]. Netherlands: Elsevier science publisher, 1993.
- [6] AFRC. Delivering the goods with liposomes[J]. *Food, Flavours, Ingredients, Packaging and Processing*, 1988, 10(8):31-35.
- [7] Jean Pierre Armand. 前脂质体技术在食品原料包埋的应用[J]. 中国食品工业, 1997(12):36-37.
- [8] 大连轻工业学院. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1994.
- [9] 赵健, 王富军, 周玲. 冻融法制备SOD脂质体[J]. 中国医药工业杂志, 1996, 27(8):346-348.
- [10] 童华, 姚松年. 不同电解质溶液对脂质体Zeta电势的影响[J]. 物理化学学报, 1998, 14(11):1043-1047.
- [11] Keller B C. Liposomes in nutrition[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2001, (12):25-31.
- [12] Alino S F, Iruarizaga A, Alfaro J, et al. Stabilization of liposomes with collagen[J]. *Int J Pharm*, 1991, 77:33-40.