

一种壳聚糖修饰肉桂精油脂质体的制备方法

技术领域

本发明属于功能食品技术领域，具体涉及一种壳聚糖修饰肉桂精油脂质体的制备方法。

背景技术

肉桂精油是以樟科植物肉桂树的叶、枝等部位为原料，通过水蒸气蒸馏、超声萃取、膜分离等方法提取得到，其化学组成十分复杂，主要含有反式肉桂醛、反式邻甲氧基肉桂醛和乙酸桂酯等成分，这些成分具有强烈的抑制或杀死微生物的特性。研究表明肉桂精油对单核增生李斯特菌、肠沙门氏菌、大肠杆菌等革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有较强的抗菌和抗氧化作用，已成为替代食品合成防腐剂的潜在选择之一，广泛应用于功能性食品领域。但是由于肉桂精油一般具有强烈的气味，对光和热敏感、水溶性和稳定性差等问题，若直接应用于食品中不仅不利于贮藏，还会影响其杀菌效果。脂质体是一种类似于生物膜的双分子层囊泡，具有生物相容性、生物降解性、低毒性、双亲性、靶向性、缓释性等特性，可将一些维生素、抗菌肽、精油等活性生物成分物质封装，实现对活性物质的保护和缓释，是目前食品领域研究的热点。根据脂质体的两亲性，将天然防腐剂肉桂精油封装在脂质体中应用于食品中，可使精油在食品表面进行缓释，延长抗菌时间，提高精油生物利用率，改善食品风味并延长保质期。但是，脂质体在贮存的过程中存在芯材容易发生泄漏、脂质体颗粒发生聚集、融合等问题造成脂质体稳定性差，从而限制其应用。为此，CN106038327A 公开了一种酪蛋白-肉桂精油脂质体抗菌剂的制备方法和用途。该发明通过将肉桂精油包裹在酪蛋白脂质体中，以实现减少肉桂精油在施用过程中的挥发，从而减少肉桂精油的浪费，提高其利用率，达到长效抗菌与高效利用的目的。该发明是将肉桂精油包裹在酪蛋白脂质体中，但是，由于脂质体存在贮存过程中易发生聚集、融合、降解和氧化，导致其完整性的破坏，进而导致封装药物的泄露，造成脂质体体系的稳定性较差。缓释效果不明显，限制

了其应用。

发明内容

有鉴于此，本发明提供了一种壳聚糖修饰肉桂精油脂质体的制备方法，该方法可以增强肉桂精油在食品体系中的稳定性，提高精油的生物利用率。

为了实现上述发明目的，本发明采用以下技术方案：

第一个方面，本发明提供一种壳聚糖修饰肉桂精油脂质体的制备方法，包括以下步骤：

①将蛋黄卵磷脂、胆固醇、吐温 80、肉桂精油与无水乙醇混合，置于超声波清洗仪中超声使其完全溶解，得到混合液；

②将混合液在真空条件下旋蒸除去无水乙醇，得到脂质薄膜，在真空干燥箱干燥 24h；

③加入磷酸盐缓冲液水化，在水浴超声条件下扩散使脂质薄膜溶解，得到脂质体悬浊液；

④将所得脂质体悬浊液在高速均质机中以 10000r/min，高速剪切 3min；

⑤再使用高压均质机，在 60Mpa 高压，循环 3-4 次得到肉桂精油脂质体，放入 4℃ 保存；

⑥制备质量分数为 0.2%的壳聚糖溶液；

⑦在磁力搅拌作用下将步骤⑤制得的肉桂精油脂质体滴加到 0.2%壳聚糖溶液中，搅拌 60 分钟，静置后得到壳聚糖修饰的肉桂精油脂质体，置于 4℃ 保存。

进一步的，所述步骤①制得的混合液中，蛋黄卵磷脂与胆固醇的质量比为 4:1，肉桂精油浓度为 2.5mg/mL、吐温 80 浓度为 2.5mg/mL。

进一步的，所述步骤②中旋蒸条件为 45℃，旋蒸时间为 30min。

进一步的，所述步骤③中加入磷酸盐缓冲液水化时间为 10-15 min。

进一步的，所述磷酸盐缓冲液的 pH 值为 7.2。

进一步的，所述磷酸盐缓冲液与无水乙醇的体积比为 8：5。

进一步的,所述质量分数为0.2%的壳聚糖溶液是由0.2g壳聚糖与100mL1%乙酸混合制得的。

进一步的,所述步骤⑦中肉桂精油脂质体与0.2%壳聚糖溶液的体积比为1:1。

进一步的,所述步骤⑦中采用无菌注射器将精油脂质体注入到壳聚糖溶液中。

第二个方面,本发明提供一种壳聚糖修饰肉桂精油脂质体,是采用上述生产方法生产。

与现有技术相比,本发明所具有的优点和有益效果是:

壳聚糖是一种生物相容良好的阳离子聚合物,经甲壳素脱乙酰化得到的天然碱性多糖,具有生物可降解性、水溶性、粘附性、抑菌等优点。本发明利用壳聚糖对肉桂精油脂质体进行功能修饰,对脂质体进行壳聚糖表面修饰可以减少环境降解和磷脂双层渗透,增强脂质体系统的稳定性。还可延长活性物质释放时间,从而提高生物利用率。由于壳聚糖在酸性溶液中呈现阳离子性质,可以通过静电作用与带负电的脂质体结合,在脂质体表面形成一层保护膜,进一步提高肉桂精油脂质体稳定性,提高功能因子的功效发挥,达到控制释放的作用。可以提高其稳定性,并能够更方便地贮藏、运输,延长食品货架期。本发明通过利用脂质体运载精油中的活性成分可以延长精油的抗菌活性,使其功能因子的生物学活性进一步增强。

附图说明

下面结合附图和实施例对本发明作进一步详述:

图1为实施例1壳聚糖修饰肉桂精油脂质体透射电镜图;

图2为对比例1肉桂精油脂质体的电位图;

图3为实施例1所述壳聚糖修饰肉桂精油脂质体电位图;

图4为实施例2所述壳聚糖修饰肉桂精油脂质体电位图;

图5为实施例3所述壳聚糖修饰肉桂精油脂质体电位图;

图 6 为对比例 1 肉桂精油脂质体的平均粒径图；

图 7 为实施例 1 所述壳聚糖修饰肉桂精油脂质体平均粒径图；

图 8 为实施例 2 所述壳聚糖修饰肉桂精油脂质体平均粒径图；

图 9 为实施例 3 所述壳聚糖修饰肉桂精油脂质体平均粒径图；

图 10 为肉桂精油的标准曲线图。

具体实施方式

本发明公开了一种壳聚糖修饰肉桂精油脂质体的制备方法，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

本发明提供的一种壳聚糖修饰肉桂精油脂质体的制备方法中所用原料、试剂或仪器均可由市场购得。

下面结合实施例，进一步阐述本发明：

实施例 1

本实施例一种壳聚糖修饰肉桂精油脂质体的制备方法是采用薄膜分散-超高压均质制得一种壳聚糖修饰的肉桂精油脂质体。具体步骤如下：

①称取蛋黄卵磷脂 400mg、胆固醇 100mg、吐温 80 为 100mg、肉桂精油 100mg 于烧杯中，加入有机溶剂无水乙醇 25mL，然后置于超声波清洗仪中超声使其完全溶解得到混合液，混合液中蛋黄卵磷脂的浓度为 10mg/mL，胆固醇的浓度为 2.5mg/mL，吐温 80 的浓度为 2.5mg/mL、肉桂精油的浓度为 2.5mg/mL；其中蛋黄卵磷脂、胆固醇、吐温 80 作为膜材，肉桂精油作为芯材。

②将混合液转移到 250mL 圆底烧瓶中，使用旋转蒸发仪在 45℃、真空条件下旋蒸除去有机溶剂无水乙醇，烧瓶内侧壁形成一层脂质薄膜，在真空干燥箱干燥 24h；旋转蒸发条件选择温度为 45℃、时间为 30min，这时因为，如果温度高于 45℃，容易破坏脂质体结构，如果温度低于 45℃，不利于脂质体膜的形成。

在真空干燥箱干燥 24h 是为了进一步除去有机溶剂。

③再加入磷酸盐缓冲液 40mL 水化, 水化时间为 10min。磷酸盐缓冲液的 pH 值为 7.2, 在水浴超声条件下扩散使脂质薄膜溶解, 得到脂质体悬浊液。本步骤中磷酸盐缓冲液的 pH 值选择 7.2, 是因为如果 pH 值不适当, 会加速脂质体的氧化水解, 还会影响脂质体的稳定性、包埋率和缓释效应。

④为了使乳液分散更均匀, 将所得脂质体悬浊液在高速均质机中以 10000r/min, 高速剪切 3min。

⑤然后再使用高压均质机, 在 60 Mpa 高压, 循环 3 次得到肉桂精油脂质体, 放入 4℃ 保存。

⑥将 0.2g 壳聚糖与 100mL 1% 乙酸混合制得质量分数为 0.2% 的壳聚糖溶液;

⑦在磁力搅拌作用下, 将步骤⑤所制得的肉桂精油脂质体采用无菌注射器以 1:1 体积比缓慢滴加到质量分数为 0.2% 壳聚糖溶液中, 搅拌时间为 60 分钟, 静置后得到壳聚糖修饰肉桂精油脂质体, 置于 4℃ 保存。由于脂质体在贮存过程易聚集、氧化, 置于 4℃ 保存可延缓氧化, 从而脂质体达到更好的效果。本步骤中采用质量分数为 0.2% 的壳聚糖溶液, 可以获得稳定性更好的壳聚糖修饰肉桂精油脂质体。

实施例 2

本实施例一种壳聚糖修饰肉桂精油脂质体的制备方法是采用薄膜分散-超高压均质制得一种壳聚糖修饰的肉桂精油脂质体。具体步骤如下:

①称取蛋黄卵磷脂 400mg、胆固醇 100mg、吐温 80 为 100mg、肉桂精油 100mg 于烧杯中, 加入有机溶剂无水乙醇 25mL, 然后置于超声波清洗仪中超声使其完全溶解得到混合液, 混合液中蛋黄卵磷脂的浓度为 10mg/mL, 胆固醇的浓度为 2.5mg/mL, 吐温 80 的浓度为 2.5mg/mL、肉桂精油的浓度为 2.5mg/mL; 其中蛋黄卵磷脂、胆固醇、吐温 80 作为膜材, 肉桂精油作为芯材。

②将混合液转移到 250mL 圆底烧瓶中, 使用旋转蒸发仪在 45℃、真空条件下旋蒸除去有机溶剂无水乙醇, 烧瓶内侧壁形成一层脂质薄膜, 在真空干燥箱干燥 24h; 旋转蒸发条件为 45℃、30min, 真空干燥是为了进一步除去有机溶剂。

③再加入磷酸盐缓冲液 40mL 水化, 水化时间为 15min。磷酸盐缓冲液的

pH 值为 7.2，在水浴超声条件下扩散使其脂膜溶解，得到脂质体悬浊液。

④将所得脂质体悬浊液在高速均质机中以 10000r/min，高速剪切 3min。

⑤然后再使用高压均质机，在 60 Mpa 高压，循环 4 次得到肉桂精油脂质体，放入 4℃ 保存。

⑥将 0.2g 壳聚糖与 100mL 1%乙酸混合制得质量分数为 0.2%的壳聚糖溶液；

⑦在磁力搅拌作用下，将步骤⑤所制得的肉桂精油脂质体采用无菌注射器以 1:1 体积比缓慢滴加到 0.2%壳聚糖溶液中，搅拌时间为 60 分钟，静置后得到壳聚糖修饰的肉桂精油脂质体，置于 4℃ 保存。

实施例 3

本实施例一种壳聚糖修饰肉桂精油脂质体的制备方法是采用薄膜分散-超高压均质制得一种壳聚糖修饰的肉桂精油脂质体。具体步骤如下：

①称取蛋黄卵磷脂 400mg、胆固醇 100mg、吐温 80 为 100mg、肉桂精油 100mg 于烧杯中，加入有机溶剂无水乙醇 25mL，然后置于超声波清洗仪中超声使其完全溶解得到混合液，混合液中蛋黄卵磷脂的浓度为 10mg/mL，胆固醇的浓度为 2.5mg/mL，吐温 80 的浓度为 2.5mg/mL、肉桂精油的浓度为 2.5mg/mL；其中蛋黄卵磷脂、胆固醇、吐温 80 作为膜材，肉桂精油作为芯材。

②将混合液转移到 250mL 圆底烧瓶中，使用旋转蒸发仪在 45℃、真空条件下旋蒸除去有机溶剂无水乙醇，烧瓶内侧壁形成一层脂质薄膜，在真空干燥箱干燥 24 h；旋转蒸发条件为 45℃、30min，真空干燥是为了进一步除去有机溶剂。

③再加入磷酸盐缓冲液 40mL 水化，水化时间为 17min。磷酸盐缓冲液的 pH 值为 7.2，在水浴超声条件下扩散使其脂膜溶解，得到脂质体悬浊液。

④将所得脂质体悬浊液在高速均质机中以 10000r/min，高速剪切 3min。

⑤然后再使用高压均质机，在 60 Mpa 高压，循环 3 次得到肉桂精油脂质体，放入 4℃ 保存。

⑥将 0.2g 壳聚糖与 100mL 1%乙酸混合制得质量分数为 0.2%的壳聚糖溶液；

⑦在磁力搅拌作用下，将步骤⑤所制得的肉桂精油脂质体采用无菌注射器以 1:1 体积比缓慢滴加到 0.2%壳聚糖溶液中，搅拌时间为 60 分钟，静置后得到壳聚糖修饰的肉桂精油脂质体，置于 4℃ 保存。

对实施例 1-3 制得的壳聚糖修饰肉桂精油脂质体进行表征：

1. 包埋率：

1) 肉桂精油标准曲线的制备：精确称量一定量的肉桂精油，配制 100 μ g/mL 的肉桂精油-无水乙醇溶液标准溶液，然后再依次稀释成 80、60、40、20、10 μ g/mL 的肉桂精油溶液，在 290nm 处测定其吸光度。以精油浓度为横坐标，吸光度为纵坐标绘制曲线，得到如图 10 所示的肉桂精油浓度的标准曲线图。

2) 包埋率测定：取 1mL 脂质体于 10mL 的离心管中，加入 4mL 石油醚，涡旋混合 1min，6000r/min 离心 10min，取上层石油醚层，重复提 2 次后，合并石油醚，并用无水乙醇定容至 10mL，以无水乙醇为空白组，测定样品在 290nm 测定吸光度值，通过标准曲线计算游离精油含量 A_1 。另取精油脂质体 1mL，置容量瓶中，加入无水乙醇定容至 10mL，混合均匀，测定其吸光度值，计算总的精油的量 A_2 ，按下式（1）计算包封率。

$$\text{包封率 (\%)} = \frac{A_2 - A_1}{A_2} \times 100\%。$$

2. 粒径：

利用激光粒度仪检测壳聚糖修饰的肉桂精油脂质体的电荷状况，粒径及其多分散指数（PDI）。

3. 电镜观察：

采用透射电镜对壳聚糖修饰的肉桂精油脂质体进行形貌观察。

4. 试验结果：

1) 根据肉桂精油标准曲线和在 290nm 处测得的吸光度值，得出经测定壳聚糖修饰肉桂精油脂质体的包埋率为 90.51%，如图 1 所示，本发明制备的壳聚糖修饰肉桂精油脂质体呈球形。由图 2、3、4、5 可以看出，原本肉桂精油脂质体带负电荷，但由于静电相互作用，使得壳聚糖修饰肉桂精油脂质体呈现正电荷，使其更加稳定。如图 7 所示，实施例 1 所述壳聚糖修饰肉桂精油脂质体平均粒径 122.2nm，PDI 为 0.406。如图 8 所示，实施例 2 所述壳聚糖修饰肉桂精油脂

质体平均粒径为 123.5nm, PDI 为 0.433。如图 9 所示, 实施例 3 所述壳聚糖修饰肉桂精油脂质体平均粒径为 133.0nm, PDI 为 0.406。

由于蛋黄卵磷脂与胆固醇质量比值增大, 肉桂精油的包埋率呈先增大后减少趋势, 因此最终确定蛋黄卵磷脂与胆固醇质量比为 4:1。原因是在磷脂双层中, 胆固醇分子通过磷脂的脂性酰基链的羰基与胆固醇羟基头之间的氢键相互作用, 保持着与磷脂分子处于平行排列的位置。这种相互作用降低了磷脂双层中分子流动性, 增强膜的刚性和致密性, 从而在水合过程增强了脂质体膜的稳定性。一定数量的脂质体对肉桂精油的承载能力有限, 为达到最大包埋率, 确定肉桂精油浓度为 2.5 mg/mL。吐温-80 的加入可提高脂质体包埋率, 吐温 80 通过物理吸附在脂质体双层膜表面时, 形成一定厚度的亲水相, 使脂质体在体系中更加均匀、稳定, 并且在制备过程中有利于脂质体的水化, 随着吐温 80 用量的增加, 包埋率增加, 但是过多的表面活性剂可能溶解脂质体囊泡, 对脂质体有破坏作用, 故确定吐温-80 在混合液中的浓度为 2.5mg/mL。

对比例 1

本对比例为一种肉桂精油脂质体的制备方法, 具体步骤如下:

①称取蛋黄卵磷脂 400mg、胆固醇 100mg、吐温 80 为 100mg、肉桂精油 100mg 于烧杯中, 加入有机溶剂无水乙醇 25mL, 然后置于超声波清洗仪中超声使其完全溶解得到混合液, 混合液中蛋黄卵磷脂的浓度为 10mg/mL, 胆固醇的浓度为 2.5mg/mL, 吐温 80 的浓度为 2.5mg/mL、肉桂精油的浓度为 2.5mg/mL; 其中蛋黄卵磷脂、胆固醇、吐温 80 作为膜材, 肉桂精油作为芯材。

②将混合液转移到 250mL 圆底烧瓶中, 使用旋转蒸发仪在 45℃、真空条件下旋蒸除去有机溶剂无水乙醇, 烧瓶内侧壁形成一层脂质薄膜, 在真空干燥箱干燥 24h; 旋转蒸发条件为 45℃、30min, 真空干燥是为了进一步除去有机溶剂。

③再加入磷酸盐缓冲液 40mL 水化, 水化时间为 10-15min。磷酸盐缓冲液的 pH 值为 7.2, 在水浴超声条件下扩散使其脂膜溶解, 得到脂质体悬浊液。

④将所得脂质体悬浊液在高速均质机中以 10000r/min, 高速剪切 3min。

⑤然后再使用高压均质机, 在 60Mpa 高压, 循环 3 次得到肉桂精油脂质体,

放入 4℃ 保存。

经测定本对比例肉桂精油脂质体的包埋率为 81.80%。

图 6 为该对比例 1 所述肉桂精油脂质体的平均粒径图，其平均粒径为 94.16nm，PDI 为 0.18。

稳定性试验：

将实施例 1 制备的壳聚糖修饰肉桂精油脂质体和对比例 1 制备的肉桂精油脂质体分别放置在 4℃ 和 25℃ 保存，测定 15d 中包埋率的变化，观察其稳定性，结果见表 1。

表 1

项目	0d		5d		10d		15d	
	实施 例 1	对比 例 1	实施 例 1	对比 例 1	实施 例 1	对比 例 1	实施 例 1	对比 例 1
25℃ 包埋率	89.89	81.42	87.32	77.39	82.09	75.63	79.98	70.28
4℃ 包埋率	90.51	81.80	88.46	79.22	84.57	77.54	81.39	73.22

由表 1 可知，肉桂精油脂质体包埋率为 81.80%，而经壳聚糖修饰肉桂精油脂质体包埋率为 90.51%，其包埋率提高了 8.71%，并且在贮藏 15d 中发现，4℃ 比 25℃ 条件贮存的包埋率稍高，原因是 4℃ 可以延缓脂质体的氧化，使其脂质体在一定时间保持稳定。

通过图 6 与图 7，图 8，图 9 对比发现，经壳聚糖修饰的肉桂精油脂质体平均粒径增大，多分散指数变大，原因是壳聚糖携带电荷，包覆在脂质体表面，其高电荷增加了静电排斥作用，使得粒径增大，克服了脂质体聚集融合的自然倾向，防止药物泄露，进而提高脂质体体系的稳定性。增强肉桂精油在食品体系中的稳定性，缓释效果好，延长抗菌时间。本发明经壳聚糖修饰的肉桂精油脂质体的包埋率为 90.51%，与对比例 1 相比，经壳聚糖修饰的脂质体包埋率提高了 8.71%，本发明能够增加肉桂精油缓释时间，延长精油抗菌时间，进而扩大了其在食品中应用价值。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详

细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。