

## 响应面法优化CBD广谱油纳米脂质载体的制备工艺

马永强, 唐可欣, 遇世友, 王鑫, 彭禹

### Optimization of Preparation Process for Nanostructured Lipid Carrier of CBD Broad-Spectrum Oil by Response Surface Methodology

MA Yongqiang, TANG Kexin, YU Shiyou, WANG Xin, and PENG Yu

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021070339>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 星点设计-响应面法优化月见草油-β-环糊精包合物的制备工艺

Optimization of preparation process of evening primrose oil-β-cyclodextrin inclusion complex by central composite design response surface method

食品工业科技. 2017(20): 211-215

#### 响应面分析法优化葫芦素B脂质纳米粒高压均质生产工艺

Optimization of solid lipid nanoparticle of cucurbitacin B by response surface methodology

食品工业科技. 2017(12): 254-257

#### 响应面法优化复方降脂片的成型性工艺及其降脂活性

Optimization of Formability Process of Compound Lipid Lowering Tablets by Response Surface Methodology and Its Lipid Lowering Activity

食品工业科技. 2021, 42(3): 115-121,126

#### 响应面法优化海湾扇贝壳赖氨酸螯合钙的制备工艺

Optimization of preparation of calcium-lysine chelate from bay scallop shell by response surface method

食品工业科技. 2017(12): 248-253

#### 响应面法优化磨盘柿果胶的提取工艺

Optimization of Extraction Process of Pectin from Mopan Persimmon by Response Surface Method

食品工业科技. 2018, 39(13): 167-172

#### 响应面法优化慈姑脆片微波加工工艺

Optimization of the Microwave Processing Technology of Arrowhead Chip by Response Surface Method

食品工业科技. 2020, 41(12): 144-149



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

马永强,唐可欣,遇世友,等. 响应面法优化 CBD 广谱油纳米脂质载体的制备工艺 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(7): 206–213. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070339

MA Yongqiang, TANG Kexin, YU Shiyou, et al. Optimization of Preparation Process for Nanostructured Lipid Carrier of CBD Broad-Spectrum Oil by Response Surface Methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(7): 206–213. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070339

· 工艺技术 ·

# 响应面法优化 CBD 广谱油纳米脂质载体的制备工艺

马永强<sup>1</sup>, 唐可欣<sup>1</sup>, 遇世友<sup>1</sup>, 王鑫<sup>1,\*</sup>, 彭禹<sup>2</sup>

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150028;

2. 哈尔滨汉博科技开发有限公司, 黑龙江哈尔滨 150028)

**摘要:** 采用薄膜-超声法, 以大豆卵磷脂和胆固醇为固体酯对大麻二酚 (CBD) 广谱油进行包埋, 以包封率为评价指标制备 CBD 广谱油纳米脂质载体 (CBD-NLC), 经单因素实验分析磷脂与胆固醇质量比、CBD 广谱油的质量浓度、缓冲溶液 pH、旋蒸温度、超声时间对 CBD-NLC 包封率的影响, 并通过响应面试验对影响较大的 4 个因素进行优化, 确定制备 CBD-NLC 的最佳工艺。结果表明, 最佳制备工艺为磷脂与胆固醇质量比 3.4:1、CBD 广谱油的质量浓度 9.5%、缓冲溶液的 pH 7.3、旋蒸温度 39.1 °C、超声时间 30 min。在此制备工艺条件下, CBD-NLC 包封率为 (91.3%±0.37%), 平均粒径为 (94.0±0.4) nm, 分散性指数 PDI 为 (0.213±0.017), Zeta 电位为 (-45.0±0.8) mV。CBD-NLC 悬浊液色泽为淡黄色, 分散均一性和稳定性好, 为后续 CBD 广谱油的深度开发和应用奠定基础。

**关键词:** CBD 广谱油, 纳米脂质载体, 制备工艺, 响应面法

中图分类号: TS222<sup>+.1</sup>

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)07-0206-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070339

本文网刊:



## Optimization of Preparation Process for Nanostructured Lipid Carrier of CBD Broad-Spectrum Oil by Response Surface Methodology

MA Yongqiang<sup>1</sup>, TANG Kexin<sup>1</sup>, YU Shiyou<sup>1</sup>, WANG Xin<sup>1,\*</sup>, PENG Yu<sup>2</sup>

(1. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China;

2. Harbin Hanbo Technology Development Co., Ltd., Harbin 150028, China)

**Abstract:** CBD-NLC was prepared by film ultrasonic method with soybean phospholipid and cholesterol as solid esters. The effects of mass ratio of phospholipid to cholesterol, mass concentration of CBD broad-spectrum oil, pH value of buffer solution, rotary evaporation temperature and ultrasonic time on the encapsulation efficiency of CBD-NLC were analyzed by single factor experiment. The four factors which have great influence on the preparation of CBD-NLC were optimized by response surface test. The results showed that the optimum preparation conditions were as follows: the mass ratio of phospholipid to cholesterol was 3.4:1, the mass concentration of CBD broad-spectrum oil was 9.5%, the pH of buffer solution was 7.3, the rotary evaporation temperature was 39.1 °C, and the ultrasonic time was 30 min. The results showed that the encapsulation efficiency of CBD-NLC was (91.3%±0.37%), the particle size was (94.0±0.4) nm, the PDI was (0.213±0.017), the zeta potential was (-45.0±0.8) mV. The color of CBD-NLC suspension is light yellow, with good dispersion uniformity and stability, which lays a foundation for the further development and application of CBD broad-spectrum oil.

**Key words:** CBD broad-spectrum oil; nanostructured lipid carrier; preparation technology; response surface method

收稿日期: 2021-07-28

作者简介: 马永强 (1963-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 食品化学, E-mail: qyma126@163.com。

\* 通信作者: 王鑫 (1984-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: wangxinfood@163.com。

大麻二酚(Cannabidiol, CBD), 分子式  $C_{21}H_{30}O_2$ , 几乎不溶于水, 溶于乙醇、甲醇、乙醚、苯、石油醚等有机溶剂。具有神经保护、抗痉挛、抗焦虑等多种生物活性, 食用含有 CBD 的食品能给人带来愉悦感<sup>[1-2]</sup>。由于大麻二酚在中枢神经系统中具有多种潜在的作用靶点, 因此 CBD 可用于神经系统疾病如癫痫、帕金森病、多发性硬化症及其他神经系统疾病的治疗<sup>[3-4]</sup>。近年来的研究表明, CBD 还具有杀菌抗炎、镇痛、抗氧化、改善学习记忆等作用, 在药品、食品、保健品和化妆品等领域具有广阔的开发应用前景<sup>[5-6]</sup>。随着 CBD 的价值逐渐被开发, 各国对大麻政策逐渐放宽, 目前全球已有 3 个国家(乌拉圭、加拿大和美国的部分州)将大麻合法化, 超过 50 个国家宣布 CBD 合法<sup>[7]</sup>。我国也允许在云南和黑龙江两省合法种植工业大麻, 规定药用大麻(CBD 含量高)和工业大麻(CBD 含量低)中四氢大麻酚含量低于 0.3% 即合法<sup>[8]</sup>。随着 CBD 研究的深入和相关产品的研发, 未来在中国市场出现的可能性极大。

世界范围内已经开展多项有关 CBD 的临床研究, 研究方向偏向治疗神经系统疾病, 抗癫痫及镇痛抗炎等药理方面<sup>[9]</sup>。国外市场已经出现 CBD 饼干、CBD 巧克力、CBD 糖果等食品以及 CBD 保健油、CBD 胶囊、CBD 糖浆等保健品<sup>[10-11]</sup>。国内对于 CBD 的研究偏向于其功效<sup>[12]</sup>、提取<sup>[13]</sup>和检测方面<sup>[14]</sup>。大麻二酚(CBD)广谱油是一种将全谱油 CBD 中的致幻成分四氢大麻酚去除后的固态油状物质, 成分主要为 CBD, 占 CBD 广谱油含量的 56%; 其余成分为大麻萜酚和大麻环萜酚。CBD 广谱油因其不溶于水性往往使其应用范围有所限制, 可能是结构中含有苯酚易被空气中的氧气氧化为苯醌的缘故, 又存在易氧化、稳定性较差等缺点, 难以有效发挥其生理功效<sup>[15]</sup>。纳米脂质载体为包埋、改善溶解性提供了良好的载体体系<sup>[16]</sup>, 可以解决 CBD 广谱油不溶于水性的问题, 还能使 CBD 不易被氧化, 提高其稳定性和生物利用率<sup>[17]</sup>。目前国内外对制备 CBD 广谱油纳米脂质载体方面的研究未见报道。

油脂类纳米脂质载体的制备方法主要有乙醇注入法、薄膜-超声法、超声法、熔融乳化-超声法等。同其他制备方法相比, 薄膜-超声法具备成本低, 制备的脂质体形状大小均匀等优点<sup>[18]</sup>。葛彦<sup>[19]</sup>利用薄膜-超声法以磷脂和胆固醇为固体酯成功制备了茶树精油纳米脂质体, 包封率达到(97.81%±0.33%)。因此本研究采用薄膜-超声法, 以具有极性的磷脂, 同时掺入起调节膜中磷脂凝聚结构作用的胆固醇作为固体酯, 对大麻二酚(CBD)广谱油进行包埋, 以包封率为评价指标制备 CBD-NLC, 并用响应面法优化 CBD-NLC 的制备工艺, 以期后续 CBD 广谱油的深度开发和应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

CBD 广谱油 哈尔滨汉博科技开发有限公司;

CBD 标准溶液(1.0 mg/mL in methanol) 武汉中昌国标物科技有限公司; 辛酸甘油酯、大豆卵磷脂、胆固醇 山东优索化工科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

PHS-3G 型 pH 计 上海仪电科学仪器有限公司; Agilent1260 高效液相色谱仪 安捷伦科技有限公司; AUY220 电子天平 SHIMADZU/日本岛津; KQ-250DE 型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; HWS-26 型电热恒温水浴锅 济南启科仪器设备有限公司; WB-2000 旋转蒸发器 上海力辰邦西仪器科技有限公司; SHZ-D(Ⅲ)循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司; Zetasizer Nano ZS90 激光粒度测定仪 英国 Malvern 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 CBD-NLC 的制备 方法参考文献 [20], 称取不同质量比的磷脂和胆固醇于烧杯中, 保证磷脂和胆固醇固体酯的总量为 100 mg, 将占总脂相不同比例的 CBD 广谱油加入其中, 再加入 200 mL 石油醚, 进行超声溶解(250 W, 20 min), 将溶解后的溶液倒入 100 mL 的圆底烧瓶中, 再置于旋转蒸发仪上, 转速设置为 20 r/min, 再旋转蒸发除去石油醚, 圆底烧瓶内壁形成一层脂质薄膜, 再加入 30 mL 不同 pH 的磷酸盐缓冲溶液, 使用同样的旋蒸条件洗脱薄膜, 得到初脂质体; 将初脂质体转移到烧杯中以 250 W 功率继续超声一定时间后, 静置 2 h, 即得纳米脂质载体。

#### 1.2.2 单因素实验

1.2.2.1 磷脂与胆固醇质量比对 CBD-NLC 包封率的影响 参考葛彦<sup>[19]</sup>以薄膜水化超声法制备茶树精油纳米脂质体的磷脂与胆固醇质量比。选择占总脂相比 5% 的 CBD 广谱油, 旋转蒸发温度 40 ℃, 磷酸盐缓冲溶液 pH7.2, 超声时间 20 min 条件。选取磷脂与胆固醇质量比 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1 探究对 CBD-NLC 包封率的影响。

1.2.2.2 CBD 广谱油的质量浓度对 CBD-NLC 包封率的影响 参考林云伟<sup>[18]</sup>以超声法制备南极磷虾油基纳米结构脂质载体的磷虾油占总脂相比。选择磷脂与胆固醇质量比 3:1, 旋转蒸发温度 40 ℃, 磷酸盐缓冲溶液 pH7.2, 超声时间 20 min 条件。选取 CBD 广谱油的质量浓度 5%、10%、15%、20%、25%、30% 探究 CBD 广谱油的质量浓度对 CBD-NLC 包封率的影响。

#### 1.2.2.3 缓冲溶液 pH 对 CBD-NLC 包封率的影响

参考任惠丽<sup>[20]</sup>利用薄膜超声法制备三丁酸甘油酯纳米脂质体缓冲溶液 PBS 的 pH。选择磷脂与胆固醇质量比 3:1, 旋转蒸发温度 40 ℃, 占总脂相比 10% 的 CBD 广谱油, 超声时间 20 min 条件。选取缓冲溶液的 pH6.0、6.4、6.8、7.2、7.6、8.0、8.4 探究缓冲溶液的 pH 对 CBD-NLC 包封率的影响。

1.2.2.4 旋蒸温度对 CBD-NLC 包封率的影响 参考杨芳<sup>[21]</sup>利用薄膜分散法结合动态高压微射流技术

制备樟树籽油脂质体的旋转蒸发温度。选择磷脂与胆固醇质量比 3:1, 磷酸盐缓冲溶液 pH7.2, 占总脂相比 10% 的 CBD 广谱油, 超声时间 20 min 条件。选取旋蒸温度 20、30、40、50、60 °C 探究旋蒸温度对 CBD-NLC 包封率的影响。

1.2.2.5 超声时间对 CBD-NLC 包封率的影响 参考 KAROLLINE 等<sup>[22]</sup> 制备西番莲籽油纳米结构脂质载体的超声时间。选择磷脂与胆固醇质量比 3:1, 磷酸盐缓冲溶液 pH7.2, 占总脂相比 10% 的 CBD 广谱油, 旋转蒸发温度 40 °C 条件。选取超声时间 10、20、30、40、50、60 min 探究超声时间对 CBD-NLC 包封率的影响。

1.2.3 响应面试验 参考文献 [23-25], 在单因素设计的基础上, 以 CBD 广谱油纳米脂质载体包封率 (Y) 为响应值, 选取磷脂与胆固醇质量比 (A)、CBD 广谱油的质量浓度 (B)、缓冲溶液 pH (C) 和旋蒸温度 (D) 这四种影响较大的因素为自变量, 采用 4 因素 3 水平响应面设计, 以确定 CBD 广谱油纳米脂质载体制备的最佳工艺 (见表 1)。

表 1 响应面设计因素与水平

Table 1 Design factors and levels of response surface test

水平	因素			
	A 磷脂和胆固醇质量比	B CBD广谱油浓度 (%)	C 缓冲溶液 pH	D 旋蒸温度 (°C)
-1	2:1	5	6.8	30
0	3:1	10	7.2	40
1	4:1	15	7.6	50

#### 1.2.4 CBD-NLC 包封率的计算

1.2.4.1 标准曲线的制作 以 CBD 广谱油中的主要成分 CBD 作为指标, 利用高效液相色谱测定 CBD 含量。用甲醇配制浓度为 20、40、60、80、100 μg/mL 的 CBD 标准溶液, 在波长为 220 nm 处进样分析并绘制标准曲线<sup>[26]</sup>。在波长 220 nm 下, 各大麻素出峰时间不同, 可以实现 CBD 和其他大麻素的分离<sup>[27-28]</sup>。

1.2.4.2 CBD-NLC 包封率的计算 采用有机溶剂萃取法<sup>[29]</sup> 测定 CBD-NLC 的包封率。制备前, 记录加入 CBD 广谱油的含量  $m_1$ , 制备后, 将 CBD-NLC 用缓冲溶液定容到 50 mL 容量瓶中, 取其中 10 mL 加入 20 mL 正己烷, 3 次萃取游离的 CBD, 将上层有机相合并置于烧杯中并用氮气吹出正己烷, 再用甲醇定容于 10 mL 容量瓶中进入高效液相色谱分析, 在波长为 220 nm 处测定其峰面积以确定游离 CBD 含量  $m_2$ , 利用以下公式计算包封率。

$$\text{CBD-NLC 的包封率}(\%) = \frac{m_1 - \frac{m_2}{56\%}}{m_1} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

式中:  $m_1$  表示最初加入的 CBD 广谱油的质量, mg;  $m_2$  表示制备脂质体后游离 CBD 质量, mg; 56%

表示 CBD 占 CBD 广谱油的含量百分比。

$$m_2 = c \times v \quad \text{式 (2)}$$

式中:  $c$  表示由液相色谱峰面积值带入 CBD 标准曲线后得到的游离 CBD 的浓度, mg/mL;  $v$  表示用缓冲溶液定容后 CBD-NLC 的体积, mL。

#### 1.2.5 液相色谱条件

1.2.5.1 磷酸缓冲溶液的配制 分别配制 A 液 (取 6.8 g 磷酸二氢钾, 用蒸馏水定溶于 500 mL 容量瓶中)、B 液 (取 6.8 g 磷酸氢二钠, 用蒸馏水定溶于 500 mL 容量瓶中), 通过不同的混合比例配置 pH 为 6.0、6.4、6.8、7.2、7.6、8.0、8.4 的缓冲溶液。

1.2.5.2 色谱条件 参考文献 [26], 色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱; 流动相: V(乙腈): V(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)=75:25, 其中, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 的 pH 为 4.0; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL; 等度洗脱; 检测波长为 220 nm。

1.2.5.3 CBD 标准曲线的绘制 以浓度为 20、40、60、80、100 μg/mL 绘制的 CBD 标准曲线回归方程为  $y=170.77x+423.44$ ,  $R^2=0.9996$ , CBD 广谱油在 50~250 μg/mL 范围内线性关系良好。

1.2.6 CBD-NLC 粒径、PDI、Zeta 电位的测定 用移液管取 1 mL 以最佳工艺条件制备好的 CBD-NLC 样品于样品池中, 用 Zetasizer Nano ZS90 激光粒度测定仪检测其在室温时的粒径 Size、分散系数 PDI 和 Zeta 电位值; 每个样品测量三次取平均值。

#### 1.3 数据处理

所得数据均为三次重复试验的平均值±标准差, 利用 SPSS 进行单因素方差分析, 采用 Design Expert 8.0.6 进行响应面优化试验设计, 利用 Origin 2018 绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验

2.1.1 磷脂和胆固醇质量比对 CBD-NLC 包封率的影响 磷脂和胆固醇质量比对 CBD-NLC 包封率的影响结果见图 1。

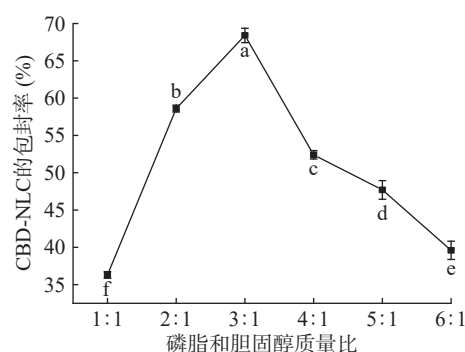


图 1 磷脂和胆固醇质量比对 CBD-NLC 包封率的影响  
Fig.1 Effect of phospholipid and cholesterol mass ratio on encapsulation efficiency of CBD-NLC

注: 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); 图 2~图 5 同。



由图 1 可知,随着磷脂和胆固醇质量比的增大,CBD-NLC 包封率先增大后减小。磷脂和胆固醇质量比小于 3:1 时,随着磷脂和胆固醇质量比的增加,包封率逐渐增大,可能是因为随着磷脂的增加,磷脂中更多的疏水基团可以很好地覆盖在油滴表面将其包裹<sup>[30]</sup>,从而导致包封率增大,磷脂和胆固醇质量比为 3:1 时,CBD-NLC 包封率达到最大值,为 $(68.4\% \pm 0.96\%)$ ,磷脂和胆固醇质量比大于 3:1 时,磷脂含量达到一定程度后,随着磷脂和胆固醇质量比的增加,磷脂的疏水基团和 CBD 广谱油的结合达到饱和,导致包裹的油脂和磷脂出现聚集现象<sup>[31]</sup>,包封率反而逐渐减小,且胆固醇是类脂膜的重要组分<sup>[32]</sup>,磷脂和胆固醇质量比过大,固醇含量较少,脂质体成膜困难,包封率减小。由 SPSS 软件单因素方差分析可知,磷脂和胆固醇质量比的影响都存在显著差异( $P < 0.05$ )。因此,磷脂和胆固醇质量比 3:1 为单因素最优实验条件,选择质量比 2:1~4:1 作为响应面优化试验条件。

2.1.2 CBD 广谱油质量浓度对 CBD-NLC 包封率的影响 CBD 广谱油质量浓度对 CBD-NLC 包封率的影响结果见图 2。

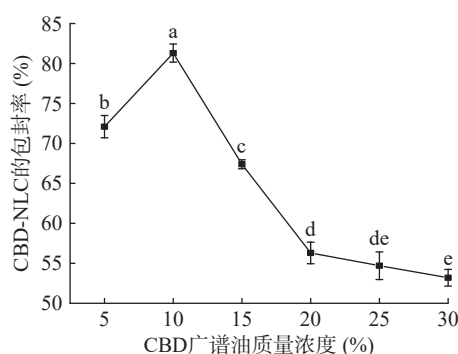


图 2 CBD 广谱油质量浓度对 CBD-NLC 包封率的影响  
Fig.2 Effect of CBD broad-spectrum oil mass concentration on encapsulation efficiency of CBD-NLC

由图 2 可知,随着 CBD 广谱油质量浓度的增加,CBD-NLC 的包封率先增大后减小。包封率增大的原因是液体脂比较少时,纳米结构脂质载体刚性较强,不能起到良好的包埋作用<sup>[33]</sup>;在质量浓度为 10% 时,CBD-NLC 包封率达到最大值,为 $(81.3\% \pm 1.13\%)$ ,质量浓度大于 10% 后,包封率逐渐减少,可能是因为随着液体脂的增加,体系粘度增加,纳米结构脂质载体刚性变弱,相互作用力变小,固体脂对液体脂的包埋能力减小,从而导致包封率逐渐减少<sup>[34]</sup>。由 SPSS 软件单因素方差分析可知,CBD 广谱油质量浓度为 5%、10%、15%、20% 和 30% 时存在显著性差异( $P < 0.05$ ),质量浓度为 20% 和 25% 差异不显著( $P > 0.05$ ),质量浓度为 25% 和 30% 差异不显著( $P > 0.05$ )。因此,选择 CBD 广谱油质量浓度 10% 作为单因素最优实验条件,选择质量浓度为 5%~15% 作为响应面优化试验条件。

### 2.1.3 缓冲溶液 pH 对 CBD-NLC 包封率的影响

缓冲溶液 pH 对 CBD-NLC 包封率的影响结果见图 3。

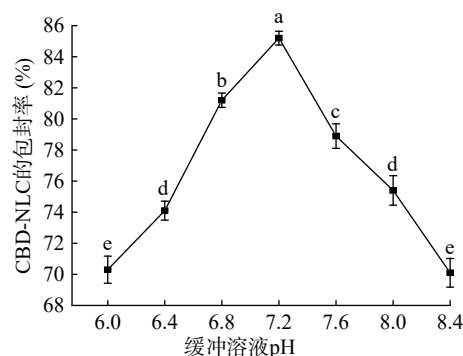


图 3 缓冲溶液 pH 对 CBD-NLC 包封率的影响  
Fig.3 Effect of pH value of buffer solution on encapsulation efficiency of CBD-NLC

由图 3 可知,随着缓冲溶液 pH 的增大,包封率先增大后减小。在 pH 为 7.2 时,CBD-NLC 包封率达到最大值,为 $(85.2\% \pm 0.44\%)$ 。原因是磷脂分子的头部亲水端为磷脂酰胆碱,既有带正电的胆碱部分,还有带负电的磷脂酰部分,同时还存在磷酸酯基等带有不同极性头部的杂质分子<sup>[19]</sup>,这些极性电荷的数量随 pH 的变化而变化,也代表了脂质体对水化介质中离子吸附能力的强弱,若磷脂-胆固醇薄膜吸附电荷过多,脂质体会发生聚沉,从而降低包封率<sup>[35]</sup>。由 SPSS 软件单因素方差分析可知,缓冲溶液 pH 为 6.4、6.8、7.2、7.6 和 8.4 时存在显著性差异( $P < 0.05$ ),pH 为 6.0 和 8.4 差异不显著( $P > 0.05$ ),pH 为 6.4 和 8.0 差异不显著( $P > 0.05$ )。因此,选择缓冲溶液 pH 7.2 作为单因素最优实验条件,选择缓冲溶液 pH 6.8~7.6 作为响应面优化试验条件。

### 2.1.4 旋蒸温度对 CBD-NLC 包封率的影响 旋蒸温度对 CBD-NLC 包封率的影响结果见图 4。

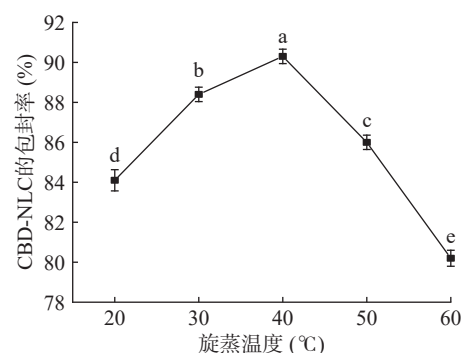


图 4 旋蒸温度对 CBD-NLC 包封率的影响  
Fig.4 Effect of rotary evaporation temperature on encapsulation efficiency of CBD-NLC

由图 4 可知,随着旋蒸温度的增加,CBD-NLC 包封率同样是先增大后减小。旋蒸温度与脂质体膜的物理性质密切相关,温度过低,脂质体成膜速度缓慢,制备的薄膜致密性差且易泄露,从而导致包封率低<sup>[36]</sup>,在 40 °C 时达到最大,为 $(90.3\% \pm 0.36\%)$ 。但

温度过高, 磷脂氧化加速, 脂质体膜的渗透性变强, CBD 广谱油从薄膜中流失, 反而使包封率降低<sup>[21]</sup>。由 SPSS 软件单因素方差分析可知, 旋蒸温度的影响都存在显著性差异( $P<0.05$ )。因此, 选择旋蒸温度 40 ℃ 作为单因素最优实验条件, 选择旋蒸温度为 30~50 ℃ 作为响应面优化试验条件。

2.1.5 超声时间对 CBD-NLC 包封率的影响 超声时间对 CBD-NLC 包封率的影响结果见图 5。

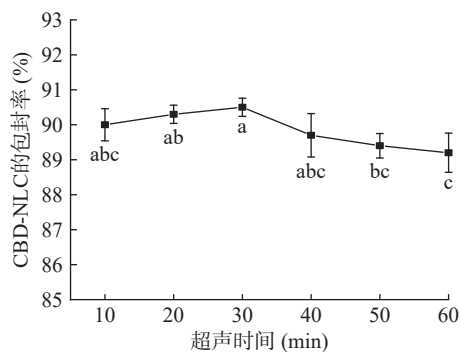


图 5 超声时间对 CBD-NLC 包封率的影响  
Fig.5 Effect of ultrasonic time on encapsulation efficiency of CBD-NLC

由图 5 可知, 随着超声时间的增加, CBD-NLC 包封率同样是先增大后减小, 但变化不大, 最小值和最大值只相差 1.4%, 超声时间 30 min, 包封率最大为(90.5%±0.26%)。由 SPSS 软件单因素方差分析可知, 超声时间为 30 min 分别和 50、60 min 时存在显著性差异( $P<0.05$ ), 超声时间为 20 min 和 60 min 时存在显著性差异( $P<0.05$ ), 其余差异均不显著( $P>0.05$ )。因此, 选择超声时间 30 min 作为单因素最优实验条件, 不选择超声时间作为响应面优化试验条件。

## 2.2 CBD-NLC 的制备响应面优化试验

根据单因素实验结果, 选择影响较大的 4 个因素磷脂和胆固醇质量比(A)、CBD 广谱油质量浓度(B)、缓冲溶液 pH(C)、旋蒸温度(D)进行 4 因素 3 水平的响应面试验设计, 试验结果见表 2。

对表 2 试验数据进行二次多项回归拟合, 获得 CBD-NLC 包封率(Y)的综合评分对磷脂和胆固醇质量比(A)、CBD 广谱油质量浓度(B)、缓冲溶液 pH(C)、旋蒸温度(D)的多元回归方程为:

$$Y=91.44+1.57A-1.49B+0.45C-0.34D+0.45AB-0.18AC+0.48AD+0.05BC+0.53BD-1.02CD-1.66A^2-7.27B^2-1.89C^2-1.67D^2。$$

该模型的方差分析见表 3。

由表 3 可知, 模型极显著( $P<0.01$ ), 失拟项不显著( $P>0.05$ ), 模型决定系数  $R^2=0.9153$ , 结果说明模型具有较高拟合度和相关性, 模型的实验预测值能够很好的反映实际值, 达到对 CBD-NLC 包封率进行分析和预测<sup>[37-38]</sup>。一次项 A、B 及二次项  $B^2$  对结果的影响达到极显著水平( $P<0.01$ ), 二次项  $A^2$ 、 $C^2$ 、

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface test design and results

实验号	因素				包封率(%)
	A	B	C	D	Y
1	-1	0	-1	0	83.2
2	0	1	0	-1	80.3
3	1	-1	0	0	82.9
4	0	1	0	1	81.4
5	1	0	1	0	92.0
6	0	-1	1	0	84.8
7	1	1	0	0	81.6
8	-1	0	1	0	85.2
9	0	0	-1	1	87.8
10	1	0	0	-1	89.1
11	1	0	-1	0	90.7
12	0	1	-1	0	80.0
13	0	0	0	0	92.3
14	1	0	0	1	90.1
15	0	0	0	0	90.6
16	0	-1	0	1	83.4
17	-1	-1	0	0	84.2
18	0	0	0	0	91.8
19	0	-1	0	-1	84.4
20	-1	1	0	0	81.1
21	0	0	0	0	92.1
22	0	0	-1	-1	87.9
23	-1	0	0	-1	87.4
24	0	0	1	1	85.7
25	0	0	1	-1	89.9
26	0	1	1	0	81.2
27	-1	0	0	1	86.5
28	0	0	0	0	90.4
29	0	-1	-1	0	83.8

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model

变异源	平方和	自由度	均方	F值	P	显著性
模型	412.65	14	29.47	10.81	<0.0001	**
A	29.45	1	29.45	10.80	0.0054	**
B	26.70	1	26.70	9.79	0.0074	**
C	2.43	1	2.43	0.89	0.3612	
D	1.40	1	1.40	0.51	0.4853	
AB	0.81	1	0.81	0.30	0.5943	
AC	0.12	1	0.12	0.045	0.8352	
AD	0.90	1	0.90	0.33	0.5742	
BC	0.01	1	0.01	3.668E-003	0.9526	
BD	1.10	1	1.10	0.40	0.5351	
CD	4.20	1	4.20	1.54	0.2348	
A <sup>2</sup>	17.91	1	17.91	6.57	0.0225	*
B <sup>2</sup>	343.22	1	343.22	125.88	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	23.09	1	23.09	8.47	0.0114	*
D <sup>2</sup>	18.18	1	18.18	6.67	0.0217	*
残差误差	38.17	14	2.73			
失拟项	35.08	10	3.51	4.54	0.0790	
纯误差	3.09	4	0.77			
总和	450.82	28				
$R^2=0.9153$			$R_{Adj}^2=0.8307$			

注: “\*”表示差异显著( $P<0.05$ ), “\*\*”表示差异极显著( $P<0.01$ )。

$D^2$  对结果的影响达到显著水平( $P<0.05$ )。各因素对 CBD-NLC 包封率的影响顺序分别是: 磷脂和胆

固醇质量比(A)>CBD 广谱油质量浓度(B)>缓冲溶液 pH(C)>旋蒸温度(D)。

各因素对 CBD-NLC 的包封率交互作用结果如图 6 所示。

图 6 反映了各两因素的交互关系,等高线图的因素 AB、BD、CD 等高线趋于椭圆形,说明因素 AB、BD、CD 交互作用对 CBD-NLC 包封率的交互影响程度相对其他各两因素较强,因素 AC、AD、BC 等高线趋于圆形,说明对 CBD-NLC 包封率的交互影响程度较弱,与方差分析的结果保持一致。模型预测的最佳工艺条件为:磷脂与胆固醇质量比 3.4:1、CBD 广谱油的质量浓度 9.5%、缓冲溶液的 pH7.3、旋蒸温度 39.1 °C、超声时间 30 min, 所得 CBD-NLC 包封率为 91.9%, 高于单因素实验的最大值。由此证明,应用响应面法优化 CBD 广谱油纳米脂质体的制备工艺较为理想。

### 2.3 最佳工艺条件试验验证

为验证回归模型最佳工艺条件预测值与试验真

实值之间的拟合程度,选择预测的最佳工艺条件进行试验验证。将因素选定为磷脂与胆固醇质量比 3.4:1、CBD 广谱油的质量浓度 9.5%、缓冲溶液的 pH7.3、旋蒸温度 39.1 °C、超声时间 30 min, 进行 3 组平行试验, 得出 CBD-NLC 包封率为  $(91.3\% \pm 0.37\%)$ , 本次试验与回归模型预测值(91.9%)之间的相对误差为 0.65%。因此用回归模型和响应面法优化得到的制备 CBD-NLC 的最佳工艺条件的回归模型是符合实际的, 制备的 CBD-NLC 悬浊液色泽为淡黄色, 可以溶于水相, 包封率大于 90%, 较其他学者采用薄膜-超声法制备的纳米脂质载体相比, 包封率相对较高, 对今后制备 CBD-NLC 条件的选择具有一定的指导意义。

### 2.4 CBD-NLC 粒径、PDI、Zeta 电位的测定

选择最佳工艺条件, 进行 3 组平行试验, 得到 CBD-NLC 平均粒径为  $(94.0 \pm 0.4) \text{ nm}$ , 粒径符合小单层囊泡脂质体尺度要求(20~100 nm)<sup>[19]</sup>; 研究表明 PDI 越小, 体系分散均一性越好, CBD-NLC 的 PDI

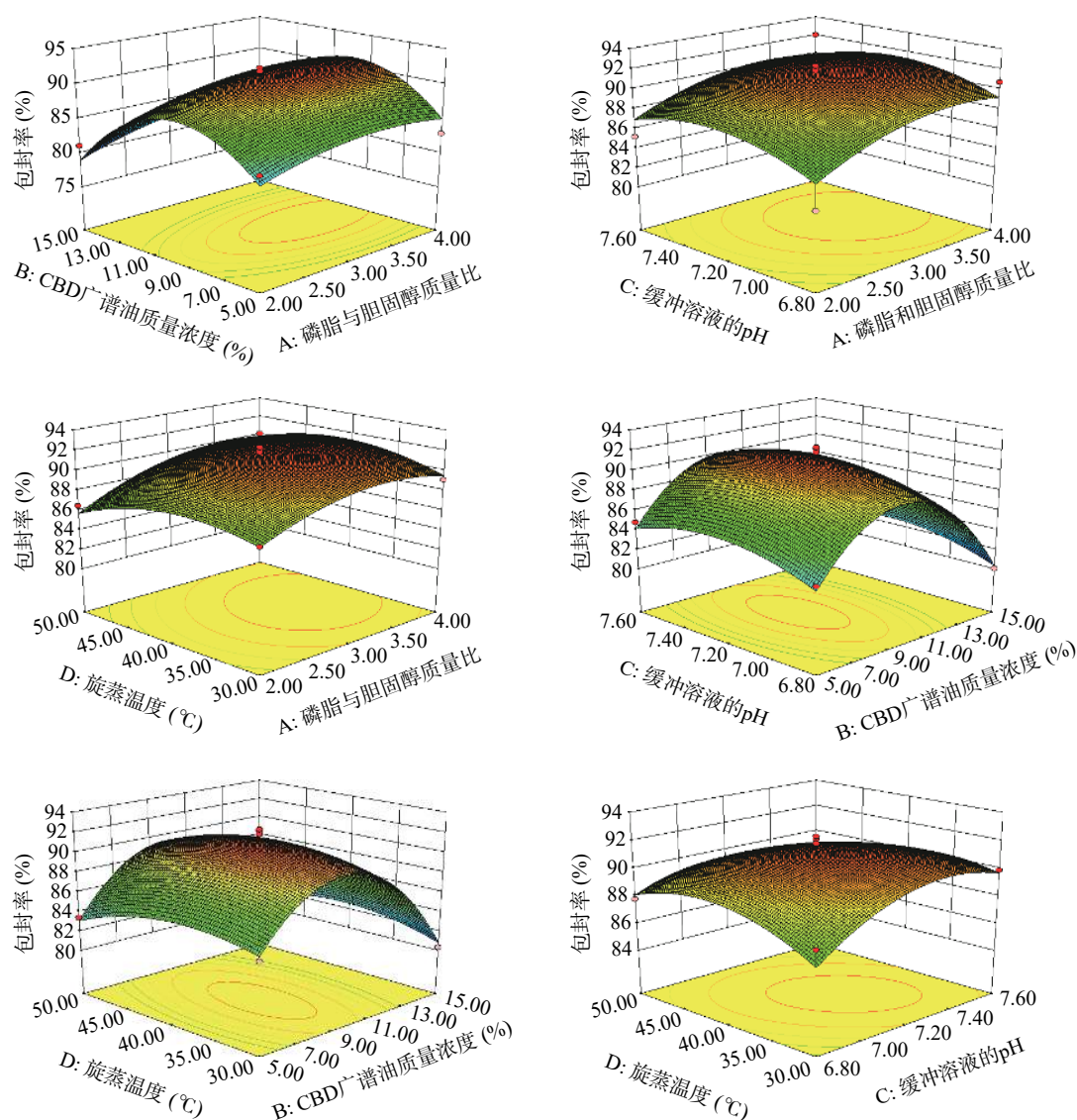


图 6 各两因素交互影响 CBD-NLC 包封率的响应面图

Fig.6 Response surface diagram of interaction between two factors affecting CBD-NLC encapsulation efficiency



为 $(0.213 \pm 0.017)$ , 体系的分散均一性好; 体系能够稳定存在所需的 Zeta 电位至少是 $\pm 30$  mV, 结合静电斥力和空间位阻的情况, 电位 $\pm 20$  mV 是保证微粒稳定存在而不聚集的最低界限<sup>[39]</sup>, CBD-NLC 的 Zeta 电位为 $(-45.0 \pm 0.8)$  mV, 体系稳定性好。

### 3 结论

本研究采用薄膜-超声法制备 CBD 广谱油纳米脂质载体, 得到最佳制备工艺为磷脂与胆固醇质量比 3.4:1、CBD 广谱油的质量浓度 9.5%、缓冲溶液的 pH7.3、旋蒸温度 39.1 °C、超声时间 30 min。在此制备工艺条件下, CBD 广谱油纳米脂质体包封率为 $(91.3\% \pm 0.37\%)$ , 较其他学者采用薄膜-超声法制备的纳米脂质载体相比, 包封率较高, 脂质体质量较好。CBD-NLC 悬浊液色泽为淡黄色, 可以溶于水相, 粒径为 $(94.0 \pm 0.4)$  nm, 粒径符合小单层囊泡脂质体的尺度要求(20~100 nm), PDI 为 $(0.213 \pm 0.017)$ , Zeta 电位为 $(-45.0 \pm 0.8)$  mV, 整个 CBD 广谱油纳米脂质载体体系具有良好的分散均一性和稳定性。CBD 广谱油纳米脂质载体的制备为后续 CBD 广谱油的深度开发和应用奠定基础, 推动 CBD 食品、药品、保健品等相关产品的开发。但本研究未将 CBD-NLC 实际应用于食品中, 未研究 CBD-NLC 在动物试验中大麻二酚 CBD 的功能特性, 缺乏实践性, 望今后的研究能够深入解决这个问题。

### 参考文献

- [1] 孔剑梅, 沈琰. 工业大麻花叶提取大麻二酚工艺技术综述[J]. 云南化工, 2019, 46(8): 1-4. [KONG J M, SHEN Y. Review on extraction technology of cannabiniol from industrial hemp leaves[J]. Yunnan Chemical Industry, 2019, 46(8): 1-4.]
- [2] BURSTEIN S. Cannabidiol(CBD) and its analogs: A review of their effects on inflammation[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2015, 23(7): 1377-1385.
- [3] BRIDGEMAN M B, ABAZIA D T. Medicinal cannabis: History, pharmacology, and implications for the acute care setting[J]. A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management, 2017, 42(3): 180-188.
- [4] 吴军, 于海波. 大麻二酚在神经精神疾病中的作用与分子机制研究进展[J]. 药学报, 2020, 55(12): 2800-2810. [WU J, YU H B. Research progress on the role and molecular mechanism of cannabiniol in neuropsychiatric diseases[J]. Journal of Pharmacy, 2020, 55(12): 2800-2810.]
- [5] 郭蓉, 陈璇, 郭鸿彦. 四氢大麻酚和大麻二酚的药理研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(8): 1449-1453. [GUO R, CHEN X, GUO H Y. Pharmacological research progress of tetrahydrocannabinol and cannabiniol[J]. Research and Development of Natural Products, 2017, 29(8): 1449-1453.]
- [6] MECOULAM R, PETERS M, MURILLO R E, et al. Cannabidiol-recent advances[J]. Chemistry and Biodiversity, 2007, 4(8): 1678-1692.
- [7] 蒋鸿雁, 张瑞林, 曹艳, 等. 大麻二酚在医学上的应用前景[J]. 昆明医科大学学报, 2021, 42(2): 147-152. [JIANG H Y, ZHANG R L, CAO Y, et al. Application prospect of cannabiniol in medicine[J]. Journal of Kunming Medical University, 2021, 42(2): 147-152.]
- [8] 张际庆, 陈士林, 尉广飞, 等. 高大麻二酚(CBD)含量药用大麻的新品种选育及生产[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(21): 4772-4780. [ZHANG J Q, CHEN S L, WEI G F, et al. Breeding and production of new varieties of medicinal marijuana with high content of bisphenol(CBD)[J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2019, 44(21): 4772-4780.]
- [9] 宁康, 董林林, 李孟芝, 等. 非精神活性药用大麻的应用及开发[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(8): 228-240. [NING K, DONG L L, LI M Z, et al. Application and development of non psychoactive medicinal hemp[J]. Chinese Journal of Experimental Prescriptions, 2020, 26(8): 228-240.]
- [10] SUNDAY A M, ROTIMI E A. A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed(*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 43: 743-752.
- [11] 魏承厚, 牛德宝, 任二芳, 等. 火麻仁的产品开发与综合利用进展研究[J]. 食品工业, 2019, 40(2): 267-270. [WEI C G, NIU D B, REN E F, et al. Research on product development and comprehensive utilization of hemp seed[J]. Food Industry, 2019, 40(2): 267-270.]
- [12] 王语聪, 谢智鑫, 杨文敏, 等. 汉麻叶中大麻二酚的分离纯化及其抗抑郁功能[J]. 精细化工, 2021, 38(4): 795-800, 805. [WANG Y C, XIE Z X, YANG W M, et al. Separation and purification of cannabiniol from hemp leaves and its antidepressant function[J]. Fine Chemical Industry, 2021, 38(4): 795-800, 805.]
- [13] 高哲, 张志军, 李晓君, 等. 火麻叶中大麻二酚的热回流法提取工艺研究[J]. 中国油脂, 2019, 44(3): 107-111. [GAO Z, ZHANG Z J, LI X J, et al. Study on the extraction process of cannabiniol from hemp leaves by thermal reflux[J]. China Oil, 2019, 44(3): 107-111.]
- [14] 周莹, 陈念念, 韩丽, 等. UPLC-MS/MS 同时测定四种食品基质中痕量四氢大麻酚、大麻二酚和大麻酚[J]. 现代食品科技, 2019, 35(12): 315-321, 301. [ZHOU Y, CHEN N N, HAN L, et al. Simultaneous determination of trace tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabiniol in four food matrices by UPLC-MS/MS[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(12): 315-321, 301.]
- [15] AMIN M R, ALI D W. Pharmacology of medical cannabis[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2019, 1162(5): 151-165.
- [16] 高艺敏, 张震, 陈佩敏, 等. 乳化挥发法和薄膜-超声法制备阿魏酸固体脂质纳米粒工艺比较[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(6): 127-132. [GAO Y M, ZHANG Z, CHEN P M, et al. Comparison of preparation processes of ferulic acid solid lipid nanoparticles by emulsion evaporation method and film ultrasonic method[J]. Food and Fermentation Industry, 2019, 45(6): 127-132.]
- [17] CHEE C C, ZAFARIZAL A B, SIAW K C, et al. Formulation and characterization of novel nanostructured lipid carriers with photoprotective properties made from carnauba wax, beeswax, pumpkin seed oil, and UV filters[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2020, 97(5): 531-542.
- [18] 林云伟. 南极磷虾油基纳米结构脂质载体的制备及性质研



- 究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020. [LIN Y W. Preparation and properties of Antarctic krill oil-based nanostructured lipid carriers[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.]
- [19] 葛彦. 茶树精油脂质体/壳聚糖缓释抗菌材料的制备及性能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015. [GE Y. Preparation and properties of tea tree essential oil liposome/chitosan sustained-release antibacterial material[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.]
- [20] 任惠丽. 三丁酸甘油酯纳米脂质体的制备及其性质研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2017. [REN H L. Preparation and properties of triglyceride nanoliposomes[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2017.]
- [21] 杨芳. 樟树籽油纳米脂质体制备工艺及其性质的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2013. [YANG F. Study on preparation technology and properties of camphor seed oil nano lipids[D]. Nanchang: Nanchang University, 2013.]
- [22] KAROLLINE K, VERA S, RENATA S, et al. Design and characterization of nanostructured lipid carriers(NLC) and nanostructured lipid carrier-based hydrogels containing *Passiflora edulis* seeds oil[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2021, 600: 120444.
- [23] DANIEL J L, RUSSELL G, DALE S. An experimental methodology for response surface optimization methods[J]. *Journal of Global Optimization*, 2012, 53(4): 699–736.
- [24] 梁浩, 钱玺丞, 杜晓静, 等. 响应面优化羟丙基- $\beta$ -环糊精对血根碱的包合工艺[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(18): 182–186. [LIANG H, QIAN X C, DU X J, et al. Response surface optimization of hydroxypropyl- $\beta$ -Inclusion process of sanguinarine with cyclodextrin[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2020, 41(18): 182–186.]
- [25] 杨孝辉, 郭君. 响应面法优化超高压提取枸杞多糖工艺[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(17): 187–192. [YANG X H, GUO J. Optimization of ultra-high pressure extraction process of *Lycium barbarum* polysaccharides by response surface methodology[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2020, 41(17): 187–192.]
- [26] 傅强, 舒智, 邓轲, 等. 反相 HPLC 法同时测定大麻植物中的三种有效成分[J]. *法医学杂志*, 2016, 32(4): 261–263. [FU Q, SHU Z, DENG K, et al. Simultaneous determination of three active components in cannabis plants by RP-HPLC[J]. *Journal of Forensic Medicine*, 2016, 32(4): 261–263.]
- [27] AIZPURUA O O, OMAR J, NAVARRO P, et al. Identification and quantification of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406(29): 7549–7560.
- [28] 刘胜贵, 马海悦, 李智高, 等. HPLC 法测定工业大麻花叶中的 CBD 和 THC 的含量[J]. *云南化工*, 2020, 47(5): 62–64. [LIU S G, MA H Y, LI Z G, et al. Determination of CBD and THC in industrial hemp leaves by HPLC[J]. *Yunnan Chemical Industry*, 2020, 47(5): 62–64.]
- [29] 熊文慧, 姜欣, 孙清瑞, 等. 高顺式占比番茄红素纳米结构脂质载体的制备及贮藏稳定性研究[J]. *中国油脂*, 2019, 44(9): 29–35. [XIONG W H, JIANG X, SUN Q R, et al. Preparation and storage stability of high CIS lycopene nanostructured lipid carrier[J]. *China Oil*, 2019, 44(9): 29–35.]
- [30] 吴劲轩, 夏文银, 夏川林, 等. 磷脂与食品中蛋白质相互作用机制及对蛋白质特性的影响研究进展[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(17): 345–351. [WU J X, XIA W Y, XIA C L, et al. Research progress on the interaction mechanism between phospholipids and proteins in food and its influence on protein properties[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2020, 41(17): 345–351.]
- [31] 李秋慧, 齐宝坤, 隋晓楠, 等. 大豆分离蛋白-磷脂复合乳化体系乳化及氧化稳定性研究[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(5): 46–52. [LI Q H, QI B K, SUI X N, et al. Study on emulsification and oxidation stability of soybean protein isolate phospholipid composite emulsification system[J]. *Chinese Journal of Food*, 2016, 16(5): 46–52.]
- [32] 杨贝贝, 曹栋, 耿亚男, 等. 植物甾醇与胆固醇对脂质体膜性质的影响[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(7): 77–81, 85. [YANG B B, CAO D, GENG Y N, et al. Effects of phytosterols and cholesterol on liposome membrane properties[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2013, 34(7): 77–81, 85.]
- [33] PORNPUTTAPITAK W, PANTAKITCHAROENKUL J, TEERANACHAIDEEKUL V, et al. Effect of oil content on physicochemical characteristics of  $\gamma$ -Oryzanol-loaded nanostructured lipid carriers[J]. *Journal of Oleo Science*, 2019, 68(8): 699–707.
- [34] YAN X J, ZHANG W K, CHENG X L, et al. Preparation of simvastatin loaded nanostructured lipid carriers and its therapeutic effect on patients with severe acute lung injury[J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2021, 21(2): 1184–1189.
- [35] 王欢, 冯红霞, 张雅娜, 等. 大豆分离蛋白-磷脂复合乳化体系的制备及 pH 对其影响的研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(24): 159–162, 176. [WANG H, FENG H X, ZHANG Y N, et al. Preparation of soy protein isolate phospholipid composite emulsion system and the effect of pH on it[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2013, 34(24): 159–162, 176.]
- [36] 林琳, 代娅婕, 纪悦, 等. 茶树油/ $\beta$ -环糊精纳米脂质体的制备及其在牛肉抗菌中的应用研究[J]. *中国食品添加剂*, 2017(11): 123–127. [LIN L, DAI Y J, JI Y, et al. Tea tree oil/ $\beta$ -Preparation of cyclodextrin nanoliposomes and their application in beef antibacterial[J]. *China Food Additives*, 2017(11): 123–127.]
- [37] XUE H Y, LI J R, LIU Y G, et al. Optimization of the ultrafiltration-assisted extraction of Chinese yam polysaccharide using response surface methodology and its biological activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 1186–1193.
- [38] 祁百巍, 陈炼红. 响应面优化广西红蓝草红色素提取工艺及其特性研究[J]. *中国调味品*, 2021, 46(5): 151–160. [QI B W, CHEN L H. Response surface methodology optimization of extraction process and characteristics of red pigment from Guangxi red and blue grass[J]. *Chinese Condiments*, 2021, 46(5): 151–160.]
- [39] PARICHEHR F, AHMAD S B, VICIT R E, et al. Preparation and characterization of palm oil in water microemulsion for application in the food industry[J]. *British Food Journal*, 2020, 122(10): 3077–3088.