

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021 年 12 月 9 日 (09.12.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/244597 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 9/127 (2006.01) *A61K 8/36* (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01) *A61K 8/14* (2006.01)
A61K 47/20 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
A61K 31/375 (2006.01) *A23L 33/15* (2016.01)
A61P 3/02 (2006.01) *A23L 33/12* (2016.01)
A61K 8/67 (2006.01) *A23L 29/00* (2016.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/098057

(22) 国际申请日: 2021 年 6 月 3 日 (03.06.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010497171.5 2020年6月4日 (04.06.2020) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 夏咏梅(XIA, Yongmei); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 柳欢(LIU, Huan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 孟新宇(MENG, Xinyu); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 方云(FANG, Yun); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 樊晔(FAN, Ye); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 沈洁(SHEN, Jie); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 刘

(54) Title: METHOD FOR PREPARING FATTY ACID-BASED VC LIPOSOME

(54) 发明名称: 一种脂肪酸基VC脂质体的制备方法

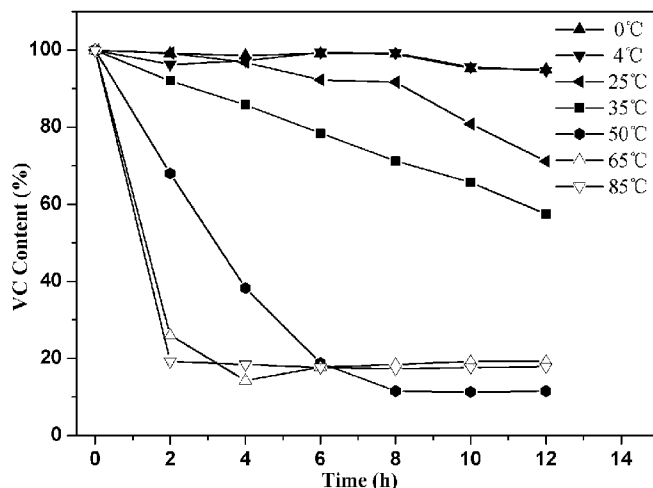


图 1

(57) Abstract: A method for preparing a fatty acid-based vitamin C (VC) liposome, which uses a complex of industrial conjugated linoleic acid, other fatty acids and sodium lauryl sulfate as a capsule material, and the capsule material self-assembles and embeds VC in a water phase under an acidic condition ($\text{pH} < 7$) so as to form a fatty acid-based VC liposome. The preparation method does not use organic solvents and other substances that are harmful to the human body, and has the characteristics of being safe and healthy; in addition, the prepared and obtained fatty acid liposome can not only encapsulate VC under an acidic condition, but can also have the effect of slowly releasing VC.

(57) 摘要: 一种脂肪酸基VC脂质体的制备方法, 以工业共轭亚油酸和其它脂肪酸以及十二烷基硫酸钠的复合物为囊材, 囊材在酸性条件($\text{pH} < 7$)下于水相自组装包埋维生素C形成脂肪酸基维生素C脂质体。所述制备方法不会用到有机溶剂等对人体有害的物质, 具有安全、健康的特性, 制备得到的脂肪酸脂质体除了能够在酸性条件下包封VC, 同时还能对VC起到缓释的作用。



湘 (LIU, Xiang); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 (HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E区501张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

一种脂肪酸基 VC 脂质体的制备方法

技术领域

本发明涉及一种脂肪酸基 VC 脂质体的制备方法，属于医药制剂领域。

背景技术

维生素 C (Vitamin C, VC)，又称 L-抗坏血酸，是常用的食品添加剂和化妆品的主要成分，可以作为维生素补充剂和化妆品中的抗氧化剂。然而，VC 在中性或碱性的水溶液中很不稳定。如附图 1 所示：在 25℃ 下，VC 在去离子水中的初始浓度为 0.27 mg/mL 时，12 h 后，VC 降解了 29%；当温度高于 50℃ 时，VC 在去离子水中经过 6 h 后，VC 降解率可达 80%。

因此，VC 的贮藏稳定性是一个需要解决的问题。为增强 VC 的贮藏稳定性，用各种壁材，如多糖、蛋白质、聚乙烯或聚乙二醇，以及各种脂质体包封 VC 的技术应运而生。

脂质体是由双亲性分子分散在水溶液中自发形成的闭合体系，其中最典型的是天然磷脂和胆固醇组成的脂质体，其具有良好的生物相容性和可降解性，常用于包封生物活性物质。脂质体包封 VC 已经有不少报道。例如，Farhang 等人 (Farhang, 2012) 采用微射流技术制备磷脂纳米乳脂质体，对抗坏血酸的包埋效率达到 26%。杨水兵等人 (杨, 2010) 以卵磷脂和胆固醇为膜材 (总脂质：VC=25:1)，采用薄膜-超声法制备 VC 脂质体，制备出的 VC 脂质体最佳条件下包封率可达 42.1%。鲍士宝等人 (鲍, 2013) 以卵磷脂和胆固醇为膜材 (总脂质：VC=5:2)，通过乙醇注入法在 pH 6.5、0.05 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 的缓冲盐中制备 VC 纳米脂质体悬浮液，VC 包封率达到 71.4%。

除了以上的传统脂质体外，还有多糖修饰的脂质体。例如，邹雪坤等人 (邹, 2017) 将壳聚糖和海藻酸钠两种多糖通过静电相互作用，pH 5.5 下层层自组装修饰在包封 VC 的传统脂质体表面，形成新型多聚物运载体系。Zhang 等人 (Zhang, 2019) 通过热熔挤出技术制备了麦芽糊精、麦芽糊精阿拉伯胶和麦芽糊精海藻糖基抗坏血酸 (分散相) 玻璃挤出物，所有挤出物的玻璃化转变温度 (T_g) 均在 40℃ 以上，抗坏血酸则均匀地分散在玻璃基质中。

以上举例中，脂质体包封 VC 的问题在于：所用的卵磷脂和胆固醇等原料价格较高；制备方法复杂，步骤较长，需要有机溶剂；以上脂质体对 VC 的包封大多在 pH 偏中性环境下进行。然而，VC 在 pH 中性以上环境中极其不稳定，只有在酸性条件下才能有效地包封和稳定 VC。

因此，需要提供一种成本低、简单易得又绿色环保的方法来在酸性条件下稳定包封 VC 的脂质体囊材。

共轭亚油酸（CLA）是各种十八碳二烯酸异构体的单一物质或者混合物，既天然存在也可从植物源亚油酸或亚麻油酸共轭化而来。CLA 和其它脂肪酸对食品和化妆品都有良好的相容性，对人类健康有益，用它们包封 VC 一举两得。然而，由于 CLA 和脂肪酸都只能在碱性环境（pH 8.5±0.5）自组装形成脂质体结构，而且 CLA 本身形成的脂质体很小，包封效率就会低。为了实现对 VC 的包封，使脂肪酸脂质体形成的 pH 范围向酸性方向迁移并且脂质体尺寸增大显得尤为重要。

发明内容

[技术问题]

本发明要解决的技术问题是，维生素 C 在酸性条件下稳定，而现有的利用脂质体包埋维生素 C 的方法需要在中性或碱性条件下进行，这会破坏维生素 C 的稳定性，且包封效率低。

[技术方案]

本发明提供了一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法，是以工业共轭亚油酸和其它脂肪酸以及十二烷基硫酸钠的复合物为囊材，囊材在酸性条件下于水相自组装包埋维生素 C 形成脂肪酸基维生素 C 脂质体；所述其它脂肪酸的分子简式符合通式 $C_nH_{2n+1}COOH$ ，其中 n 为大于 7 的正整数；

包括以下步骤：

（1）将工业共轭亚油酸和其它脂肪酸混合均匀，向其中添加 SDS 水溶液，SDS 的加入量为总脂肪酸的质量的 5-10%，用稀酸调整自组装液的 pH 至 pH 3.5-4.0，然后均质得到悬浊液；

（2）在搅拌条件下，向步骤（1）得到的悬浊液中滴加 VC 水溶液，滴加结束后，在 20 -50 rpm 下振摇 10 min-1 h。

所述脂肪酸基中的脂肪酸是包括共轭亚油酸（CLA）、其它脂肪酸以及工业共轭亚油酸原料中含有的各种含羧基的分子中碳数在 8 以上的有机酸。所述其它脂肪酸是分子简式符合通式 $C_nH_{2n+1}COOH$ 或 $C_nH_{2n}COOH$ 或 $C_nH_{2n-1}COOH$ 或 $C_nH_{2n-3}COOH$ 的单一或混合脂肪酸，其中 n 为大于 7 的正整数。

所述工业共轭亚油酸是通过食品级工业亚油酸的碱催化共轭化所得的产品，所述共轭亚油酸是各种十八碳二烯酸异构体的单一物质或者混合物，且，总十八碳二烯酸异构体含量占所述工业共轭亚油酸干物质的质量百分比为 70%-100%（以气相色谱峰面积百分比计算）。

所述其它脂肪酸的质量为总十八碳二烯酸异构体质量的 1%-40%。

所述脂肪酸在自组装液中的终浓度之和为 10-500 mM。

所述 SDS 的加入量为总脂肪酸的质量的 5%或 10%。

所述 VC 在滴加完毕后在悬浊液体系中的终浓度为 1-50 mg/mL。

在本发明的可选的实施方式中，在 5-50℃、10 min-2 h 条件下脂肪酸进行自组装并包封 VC。

[有益效果]

VC 在中性或碱性水溶液中很不稳定。本发明提供了一种在酸性水中制备脂肪酸基 VC 脂质体的方法，所用材料生物相容性好，过程简单、原料易得。

本发明通过向脂肪酸中加入十二烷基硫酸钠 (SDS)，拓宽了脂肪酸脂质体的形成范围，不仅可以使 CLA，也可以使其它脂肪酸形成脂质体的 pH 向酸性环境迁移，使其能够在酸性条件下自组装形成脂质体来包封 VC。

把本发明通过加入一定量的其它脂肪酸，特别是饱和脂肪酸，可以增强脂质体的尺寸，提高包封效率。而且所加入的其它脂肪酸的饱和度越高，形成的脂质体粒径越大。

本发明制备的脂肪酸脂质体除了能够在酸性条件下包封 VC，同时还能对 VC 起到缓释的作用。

本发明所用的载体脂肪酸本身就是人体必需的脂肪酸之一，与 VC 的协同效应更能促进二者的吸收，可用于食品或化妆品中。而且，本发明制备过程中不会用到有机溶剂等对人体有害的物质，具有安全、健康的特性。

附图说明

图 1 VC 水溶液中在不同温度下 VC 质量百分数随时间的变化。

图 2 脂肪酸基 VC 脂质体的 TEM 图，(A)：棕榈酸-CLA-VC，(B)：硬脂酸-CLA-VC。

图 3 VC 水溶液和混合脂肪酸基 VC 脂质体在水中的 VC 释放曲线，(A)：1mg/mL VC 水溶液，(B)：棕榈酸-CLA(10mM)-VC(1mg/mL)脂质体，(C)：棕榈酸-CLA(100mM)-VC(2mg/mL)脂质体，(D)：硬脂酸-CLA(100mM)-VC(5mg/mL)脂质体，(E)：棕榈酸-硬脂酸-CLA(10mM)-VC(5mg/mL)脂质体。

具体实施方式

分析方法：

1. **CLA 中脂肪酸组成的测定：**气相色谱法检测其甲酯衍生物。依据 GB5009.168—2016 食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定(气相色谱内标法)：在 0.2g CLA 中加入 2% 氢氧化钠甲醇溶液 8mL，连接回流冷凝器，80℃±1℃水浴上回流，直至油滴消失；从回流冷凝器上端加入 7mL 15%三氟化硼甲醇溶液，在 80℃±1℃水浴中继续回流

2min; 用少量水冲洗回流冷凝器, 停止加热, 从水浴上取下烧瓶, 迅速冷却至室温; 准确加入 10mL~30mL 正庚烷, 振摇 2min, 再加入饱和氯化钠水溶液, 静置分层; 吸取上层正庚烷提取溶液大约 5mL, 移至 25mL 试管中, 加入大约 3g~5g 无水硫酸钠, 振摇 1min, 静置 5min, 吸取上层溶液到进样瓶中等待测定。色谱条件: a) 毛细管色谱柱: 聚二氰丙基硅氧烷强极性固定相, 柱长 100m, 内径 0.25mm, 膜厚 0.2 μ m。b) 进样器温度: 270 $^{\circ}$ C。c) 检测器温度: 280 $^{\circ}$ C。d) 程序升温: 初始温度 100 $^{\circ}$ C, 持续 13min; 以升温速率 10 $^{\circ}$ C/min 升温至 180 $^{\circ}$ C, 保持 6min; 以升温速率 1 $^{\circ}$ C/min 升温至 200 $^{\circ}$ C, 保持 20min; 以升温速率 4 $^{\circ}$ C/min 升温至 230 $^{\circ}$ C, 保持 10.5min。e) 载气: 氮气。f) 分流比: 100: 1。g) 进样体积: 1.0 μ L。h) 检测条件应满足理论塔板数(n)至少 2000/m, 分离度(R)至少 1.25。

在上述色谱条件下将脂肪酸标准测定液及待测样品分别注入气相色谱仪, 以色谱峰峰面积定量计算出各脂肪酸含量。

2. **脂肪酸基 VC 脂质体的形貌表征:** 用 TEM 影像表征。用镊子夹取铜网并将铜网浸入浓度为 10 mM 的脂肪酸基 VC 脂质体分散液中 2 秒, 然后迅速将铜网取出并冷冻于液氮中, 再将铜网转移至冷冻干燥机中干燥 24h, 用 TEM (120 kV) 观察铜网上脂肪酸基 VC 脂质体的形貌并拍照。
3. **VC 包封率及缓释率:** 分别配制有一定浓度间隔的、浓度区间为 2-30 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 的 VC (L-抗坏血酸) 水溶液, 测量相应溶液在 260nm 处的吸光度 (A_{260}), 绘制 VC 水溶液的浓度-吸光度标准曲线。

将 5 mL 脂肪酸基 VC 脂质体溶液置于透析袋 (MW3500) 中, 将透析袋放置于装有 200 mL 去离子水的 250 mL 烧杯中, 在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌进行透析。同时用与此脂肪酸基 VC 脂质体溶液中同样终浓度的 VC 溶液作为对照样。透析 1 h 后, 对照样中的 VC 浓度与透析介质 (200 mL 去离子水) 中的 VC 浓度达到平衡, 可以认为脂肪酸基 VC 脂质体样品中的游离 VC 也已经被透析出来。此时测量脂肪酸基 VC 脂质体样品透析袋外溶液在 260 nm 处的吸光度 (A_{260}), 利用 VC 水溶液的浓度-吸光度标准曲线计算透析袋外溶液中 VC 的浓度。制备脂肪酸基 VC 脂质体所使用的 VC 的量, 与透析释放出来的游离 VC 的量的差, 即为被包封 VC 的量。因此, 脂肪酸基 VC 脂质体中, 脂肪酸脂质体对 VC 的包封率 (EE) 可采用如下公式进行计算:

$$\text{包封率 (wt\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%$$

m_1 为脂肪酸基 VC 脂质体所在初始透析袋中 VC 的量 (即为制备 5mL 脂肪酸基脂质体所

使用的 VC 的量); m_2 为透析 1 h 后, 透析袋外溶液中 VC 的量。

将上述被透析处理 1 h 后的脂肪酸基 VC 脂质体置于另一装有新鲜的 200 mL 去离子水或缓冲液的 250 mL 烧杯中进行透析, 每隔一定时间, 从透析袋外的透析液中取出 3 mL 溶液, 立即测量这 3 mL 溶液在紫外分光光度计上 260 nm 处的吸光度, 并及时向烧杯中补充等体积新鲜的透析液(去离子水或缓冲液)。通过测定透析袋外的透析液中的 VC 含量, 可以计算从脂肪酸基 VC 脂质体中释放出的 VC 的量, 从而计算脂肪酸基 VC 脂质体中 VC 的累计释放率, 计算公式如下:

$$\text{累计释放率(\%)} = \frac{c_n \times V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} (c_i \times V_s)}{m} \times 100\%$$

c_n 和 c_i ——第 n 次取样时, 透析袋外的透析液中的 VC 的浓度, $n \geq 1$;

V_0 ——开始释放 VC 时透析袋外的透析液的体积;

V_s ——每次取样的体积;

m ——脂肪酸基 VC 脂质体中 VC 的质量。

以下实施例中, 95% 工业 CLA 的脂肪酸组成(wt%)为: 总十八碳二烯酸异构体 93.5%、油酸 3.7%、棕榈酸 0.7%、硬脂酸 0.4%、亚油酸 1.7%, 其平均分子量为 278.73。

80% 工业 CLA 的脂肪酸组成(wt%)为: 总十八碳二烯酸异构体 81.1%、油酸 9.8%、棕榈酸 5.3%、硬脂酸 2.5%、亚油酸 1.3%, 其平均分子量为 278.71。

实施例 1 用棕榈酸-CLA-SDS 制备的 VC 脂质体

步骤(一)

60°C 下, 将 0.1g 棕榈酸和 1.3g 95% 的工业 CLA (CLA 平均分子量 278.73) 混合均匀, 然后将混合后的 CLA-棕榈酸加到 250 mL SDS 水溶液 (SDS 水溶液的质量浓度 0.056%, 含 SDS 0.14g) 中, 简单混匀, 得到混合物体系。用稀盐酸调整混合物体系的 pH 至 pH3.5, 均质后得到悬浊液。

步骤(二)

在 25°C、150 rpm 下边搅拌边向上述悬浊液中滴加 2 mg/mL 的 VC 水溶液 250 mL, VC 水溶液在 30min 内滴加完毕; 将滴加了 VC 后的混合的溶液在 50 rpm、25°C 下振摇 30min。

所得的脂肪酸基 VC 脂质体溶液中, 脂肪酸的浓度为 10 mmol/L, VC 浓度为 1 mg/mL。测得 VC 的包封率为 53.5%。所得 VC 脂质体形貌如附图 2A 所示。

对照例 1 用去离子水替代 SDS, 其余条件同实施例 1

步骤(一)

60℃下，将 0.1g 棕榈酸加入到 1.3 g 95%的工业 CLA（CLA 平均分子量 278.73）中，混合均匀。然后将混合后的 CLA-棕榈酸加到 250 mL 去离子水溶液中，简单混匀，得到混合物体系。然后，用稀盐酸调整混合物体系的 pH 至 pH3.5，均质后得到悬浊液。

步骤（二）

在 25℃、150 rpm 下边搅拌边向上述悬浊液中滴加 2 mg/mL 的 VC 水溶液 250 mL，于 30min 内完成滴加的动作，使得含 VC 的混合体系中脂肪酸的最终浓度为 10 mmol/L，VC 浓度为 1 mg/mL。将含 VC 的混合体系在 50 rpm、25℃下振摇 30 min。

振摇结束后，用显微镜观察，观察结果显示此时脂肪酸未形成脂质体，因而 VC 没有被包封。

对照例 2 用非离子表面活性剂 Tween 80 替代 SDS，其余条件同实施例 1

步骤（一）

60℃下，将 0.1g 棕榈酸和 1.3 g 95%的工业 CLA（CLA 平均分子量 278.73）混合均匀，然后将混合后的 CLA-棕榈酸加到 250 mL Tween 80 水溶液（Tween 80 水溶液的质量浓度 0.255%，含 Tween 80 0.637g）中，简单混匀，得到混合物体系。然后，用稀盐酸调整混合物体系的 pH 至 pH3.5，均质后得到悬浊液。

步骤（二）

在 25℃、150 rpm 下边搅拌边向上述悬浊液中滴加 2 mg/mL 的 VC 水溶液 250 mL，于 30min 内滴加完毕。将含 VC 的混合体系在 50 rpm、25℃下振摇 30min。

振摇结束后，用显微镜观察，观察结果显示此时脂肪酸未形成脂质体，因而 VC 没有被包封。

如果，在步骤（一）种，将混合物体系的 pH 调整为 7.4 或 6.0，则能够形成脂质体，VC 的包封率分别为 23.6%、29.7%。

对照例 3 用阴离子表面活性剂 CLA-Na 替代 SDS，其余条件同实施例 1

步骤（一）

60℃下，将 0.1g 棕榈酸和 1.3 g 95%的工业 CLA（CLA 平均分子量 278.73）混合均匀，然后将混合后的 CLA-棕榈酸加到 250 mL CLA-Na 水溶液（CLA-Na 水溶液的质量浓度 0.056%，含 CLA-Na 0.014g）中，简单混匀，得到混合物体系。然后，用稀盐酸调整混合物体系的 pH 至 pH3.5，均质后得到悬浊液。

步骤（二）

在 25℃、150 rpm 下边搅拌边向上述悬浊液中滴加 2 mg/mL 的 VC 水溶液 250 mL，于 30min

内滴加完毕。将含 VC 的混合溶液在 50 rpm、25℃下振摇 30min。

振摇结束后，用显微镜观察，观察结果显示此时脂肪酸未形成脂质体，因而 VC 没有被包封。

实施例 2 用棕榈酸-CLA-SDS 制备的 VC 脂质体

步骤（一）

60℃下，将 1g 棕榈酸和 13 g 95%的工业 CLA（CLA 平均分子量 278.73）混合均匀，然后将 250 mL SDS 水溶液（SDS 水溶液的质量浓度 0.56%，含 SDS 1.4g）加到混合后的 CLA-棕榈酸中，简单混匀，得到混合物体系。然后，用稀盐酸调整混合物体系的 pH 至 pH3.5，均质后得到悬浊液。

步骤（二）

在 25℃、150 rpm 下边搅拌边向上述悬浊液中滴加 10 mg/mL 的 VC 水溶液 250 mL，30min 内滴加完毕。将含 VC 的混合溶液在 30 rpm、25℃下振摇 90min。

所得的脂肪酸基 VC 脂质体体系中，脂肪酸的浓度为 100 mmol/L，VC 浓度为 5 mg/mL，测得 VC 的包封率为 64.1%。脂肪酸基 VC 脂质体形貌如附图 2B 所示。

与实施例 1 相比，可以看出，脂肪酸浓度的增加可提高 VC 包封率。

实施例 3 用硬脂酸-CLA-SDS 制备的 VC 脂质体

步骤（一）

60℃下将 1g 硬脂酸和 13 g 95%的工业 CLA 混合均匀，然后将 250 mL SDS 水溶液（SDS 水溶液的质量浓度 0.56%，含 SDS 1.4g）加到混合后的 CLA-硬脂酸中，简单混匀，得到混合物体系。然后，用稀盐酸调整混合物体系的 pH 至 pH3.8，均质后得到悬浊液。

步骤（二）

在 25℃、150 rpm 下边搅拌边向上述悬浊液中滴加 10 mg/mL 的 VC 水溶液 250 mL，30min 内滴加完毕。将混合后的溶液在 20 rpm、20℃下振摇 50min。

所得的脂肪酸基 VC 脂质体体系中，脂肪酸的浓度为 100 mmol/L，VC 浓度为 5 mg/mL，VC 的包封率为 66.5%。

与实施例 1 相比，可以看出，饱和脂肪酸碳数的增加会稍许增加自组装体的尺寸，有利于增大 VC 包封率。

实施例 4 用棕榈酸-硬脂酸-CLA 制备的 VC 脂质体

步骤（一）

将 0.1 g 混合棕榈酸-硬脂酸（质量比 1:1）加入到 1.3 g 80%的工业 CLA（CLA 平均分子

量 278.71) 中, 将棕榈酸-硬脂酸-CLA 在 60℃、120 rpm 下振荡 60 min。然后, 将 250 mL SDS 水溶液 (SDS 水溶液的质量浓度 0.056%, 含 SDS 0.14g) 加到上述混合脂肪酸样品中, 简单混匀, 得到混合物体系。然后, 用稀盐酸调整混合物体系的 pH 至 pH3.8, 均质后得到悬浊液。

步骤 (二)

在 25℃、150 rpm 下边搅拌边向上述悬浊液中滴加 250 mL 浓度为 10 mg/mL 的 VC 水溶液, 于 30min 内滴加滴加完毕, 在 25℃、50 rpm 下振荡 60 min。

所得的脂肪酸基 VC 脂质体体系中, 脂肪酸的浓度为 10 mmol/L, VC 浓度为 5 mg/mL。VC 的包封率为 58.4%。

可见, CLA 中总十八碳二烯酸异构体含量降低会降低 VC 包封率。

实施例 5 脂肪酸-CLA-VC 脂质体中 VC 的缓释

脂肪酸基 VC 脂质体用于药物时, 对 VC 脂质体中 VC 的缓释有一定时间要求, 用于化妆品时则缓释越慢越好。由于无法测定膏霜状态下 VC 的缓释, 本实施例用通用的水介质透析分析不同脂肪酸基 VC 脂质体中 VC 的缓释。

将不同脂肪酸与 95%CLA 复配后, 参照上述实施例的工艺制备的脂肪酸基 VC 脂质体, 用通用的水介质透析分析 VC 的缓释情况。结果如图 3 所示, 透析 160 min 后, 对照样(1mg/mL VC 水溶液)中 VC 的累计释放率为 95.5%; 实施例 3 制备的硬脂酸-CLA(100mM)-VC(5mg/mL) 脂质体中 VC 的累计释放率为 43.2%, 按照以实施例 3 同样方法制备的棕榈酸-CLA(100mM)-VC(2mg/mL)脂质体中 VC 的累计释放速率为 36.5%; 说明短碳链脂肪酸倾向于延缓 VC 的释放。在实施例 1 制备的棕榈酸-CLA(10mM)-VC(1mg/mL)脂质体中 VC 释放率为 40.9%, 说明低浓度 CLA 加快 VC 的释放; 而在实施例 4 制备的棕榈酸-硬脂酸-CLA (10mM)-VC(5mg/mL) 脂质体中 VC 的累计释放率为 48.9%, 这是因为高浓度 VC 的浓度势能加快 VC 的释放。

实施例 6 用脂肪酸基 VC 脂质体制备 VC 护肤霜

取用缓释最慢的棕榈酸-CLA(100 mM)-VC(2 mg/mL)脂质体, 按下列配方和工艺制备 VC 护肤霜:

油相的制备: 60℃下将 5 g 的单甘酯、1 g 貂油、15 g 的甾醇、2 g 积雪草 50%乙醇提取物以及 5 g 的液体石蜡混合均匀得到油相;

水相的制备: 将 5 g 甘油和 2 g 人参皂甙 (50%总甙) 溶解在 50 mL 去离子水中, 最后加入 5 mL 棕榈酸-CLA(100 mM)-VC(2 mg/mL)脂质体, 混合均匀得到水相;

将油相和水相混合后在 6000 r/min 下均质 7 min, 脱气。在 50℃下加入质量分数为 0.3%

的香精和 0.2%的防腐剂，继续冷却搅拌至室温，脱气后得到 VC 护肤霜。

用 5mL VC 溶液（2mg/mL）替代上述配方中的 5mL 棕榈酸-CLA(100mM)-VC(2mg/mL) 脂质体，按照相同的工艺制备得到用 VC 溶液配制的 VC 护肤霜对照样。

取利用脂肪酸基 VC 脂质体制备得到的 VC 护肤霜和利用 VC 溶液制备得到的 VC 护肤霜各 100g，分别无菌装入 5 只 30mL 样品瓶中（每瓶中 20g），加盖置于 37°C 培养箱内加速氧化。利用脂肪酸基 VC 脂质体制备得到的 VC 护肤霜在放置 3 个月后未见颜色变化、没有分层。而利用 VC 溶液制备得到的 VC 护肤霜放置 3 个月后样品没有分层，但 1 个月后颜色就变黄并随时间加深。

上述实施例中所用的工业共轭亚油酸原料为市售商品，可购自大连医诺生物技术有限公司和青岛海之源等多家公司。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

1. 一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法，其特征在于，以工业共轭亚油酸和其它脂肪酸以及十二烷基硫酸钠的复合物为囊材，囊材在酸性条件下于水相自组装包埋维生素 C 形成脂肪酸基维生素 C 脂质体；所述其它脂肪酸的分子简式符合通式 $C_nH_{2n+1}COOH$ ，其中 n 为大于 7 的正整数；

包括以下步骤：

(1) 将工业共轭亚油酸和其它脂肪酸混合均匀，向其中添加 SDS 水溶液，SDS 的加入量为总脂肪酸的质量的 5-10%，用稀酸调整自组装液的 pH 至 pH 3.5-4.0，然后均质得到悬浊液；

(2) 在搅拌条件下，向步骤(1)得到的悬浊液中滴加 VC 水溶液，滴加结束后，在 20-50 rpm 下振摇 10 min-1 h。

2. 根据权利要求 1 所述的一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法，其特征在于，所述工业共轭亚油酸是通过食品级工业亚油酸的碱催化共轭化所得的产品，所述共轭亚油酸是各种十八碳二烯酸异构体的单一物质或者混合物，且，总十八碳二烯酸异构体含量占所述工业共轭亚油酸干物质的质量百分比为 70%-100%。

3. 根据权利要求 1 所述的一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法，其特征在于，所述脂肪酸基中的脂肪酸是包括共轭亚油酸、其它脂肪酸以及工业共轭亚油酸原料中含有的各种含羧基的分子中碳数在 8 以上的有机酸；所述其它脂肪酸的分子简式符合通式 $C_nH_{2n+1}COOH$ ，其中 n 为大于 7 的正整数。

4. 根据权利要求 1 所述的一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法，其特征在于，所述脂肪酸基的脂肪酸中，其它脂肪酸的质量为总十八碳二烯酸异构体的质量的 1%-40%。

5. 根据权利要求 2 所述的一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法，其特征在于，所述脂肪酸基的脂肪酸中，其它脂肪酸的质量为总十八碳二烯酸异构体的质量的 1%-40%。

6. 根据权利要求 3 所述的一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法，其特征在于，所述脂肪酸基的脂肪酸中，其它脂肪酸的质量为总十八碳二烯酸异构体的质量的 1%-40%。

7. 根据权利要求 2 所述的一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法，其特征在于，所述脂肪酸在自组装液中的终浓度之和为 10-500 mM。

8. 根据权利要求 3 所述的一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法，其特征在于，所述脂肪酸在自组装液中的终浓度之和为 10-500 mM。

9. 根据权利要求 1 所述的一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法，其特征在于，步骤(2)中，滴加结束后，悬浊液体系中的 VC 的终浓度为 1-50 mg/mL。

10. 根据权利要求 2 所述的一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法, 其特征在于, 步骤 (2) 中, 滴加结束后, 悬浊液体系中的 VC 的终浓度为 1-50 mg/mL。
11. 根据权利要求 1 所述的一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法, 其特征在于, 步骤 (1) 中 SDS 的加入量为总脂肪酸的质量的 5%或 10%。
12. 根据权利要求 2 所述的一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法, 其特征在于, 步骤 (1) 中 SDS 的加入量为总脂肪酸的质量的 5%或 10%。
13. 根据权利要求 4 所述的一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法, 其特征在于, 步骤 (1) 中 SDS 的加入量为总脂肪酸的质量的 5%或 10%。
14. 根据权利要求 7 所述的一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法, 其特征在于, 步骤 (1) 中 SDS 的加入量为总脂肪酸的质量的 5%或 10%。
15. 根据权利要求 9 所述的一种制备脂肪酸基维生素 C 脂质体的方法, 其特征在于, 步骤 (1) 中 SDS 的加入量为总脂肪酸的质量的 5%或 10%。
16. 应用权利要求 1-15 任一项所述方法制备得到的脂肪酸基维生素 C 脂质体。

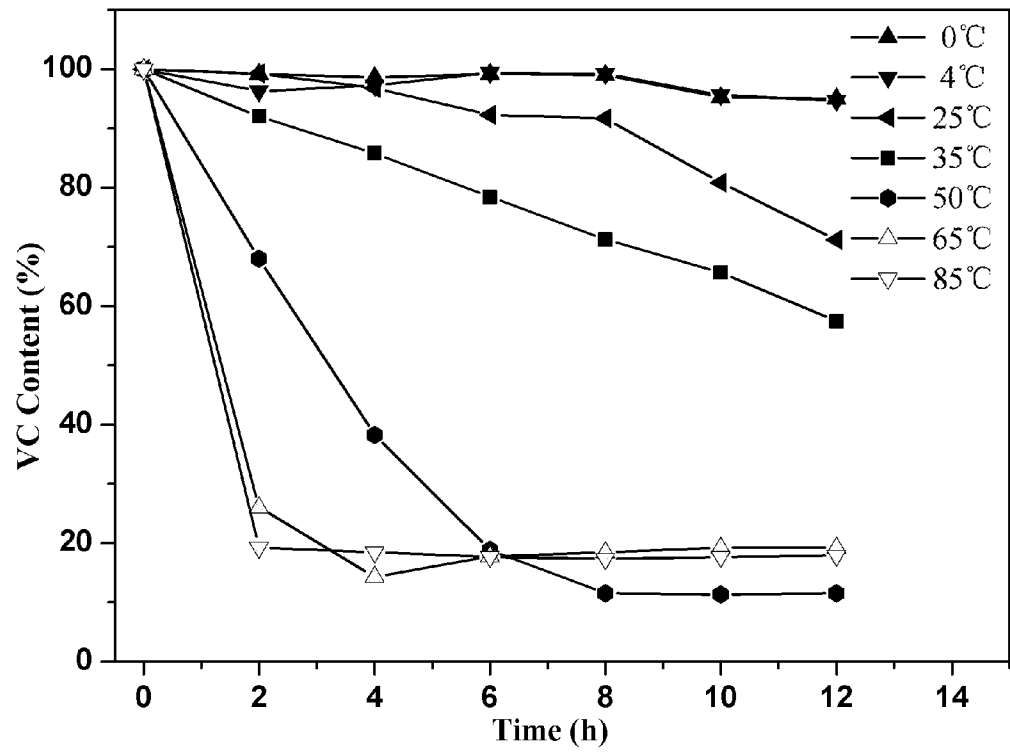


图 1

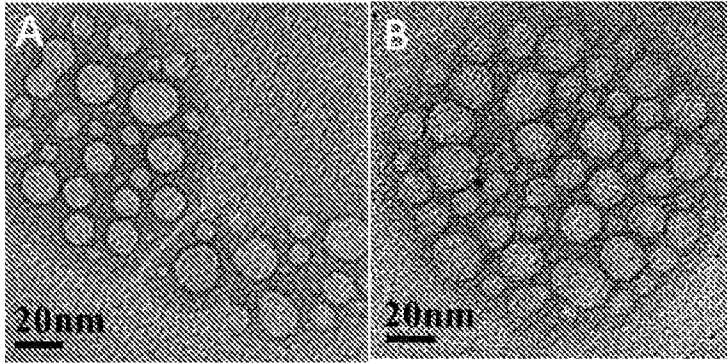


图 2

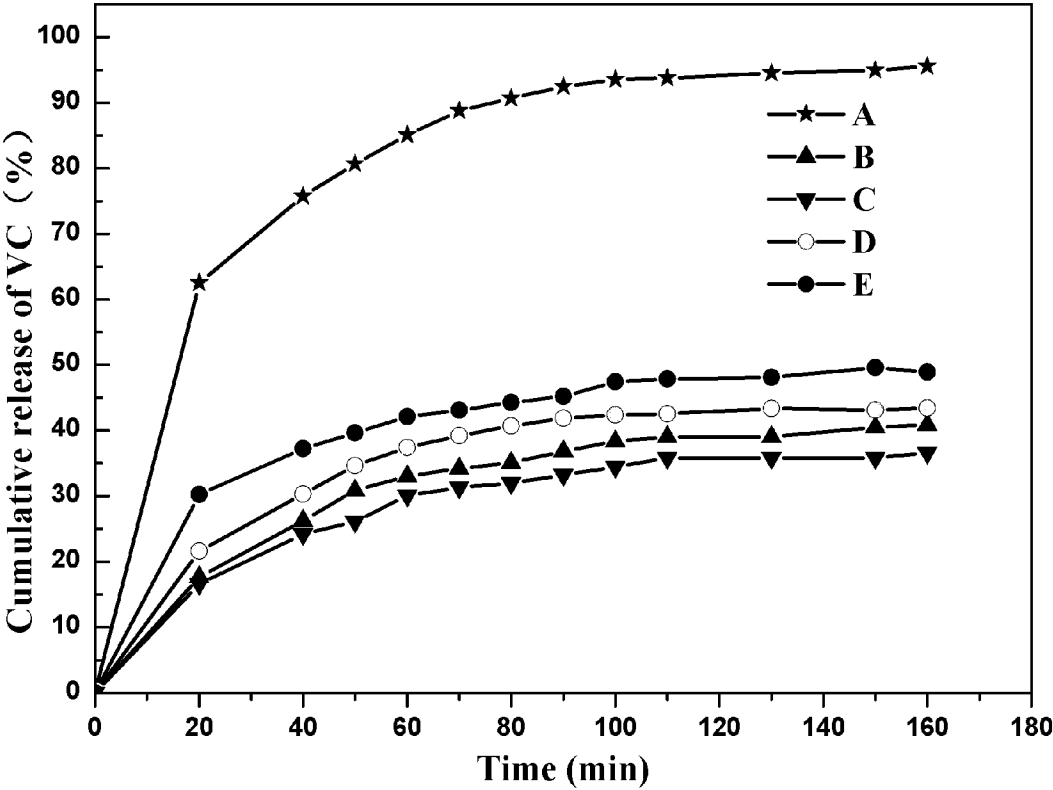


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/098057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/127(2006.01)i; A61K 47/12(2006.01)i; A61K 47/20(2006.01)i; A61K 31/375(2006.01)i; A61P 3/02(2006.01)i;
A61K 8/67(2006.01)i; A61K 8/36(2006.01)i; A61K 8/14(2006.01)i; A61Q 19/00(2006.01)i; A23L 33/15(2016.01)i;
A23L 33/12(2016.01)i; A23L 29/00(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P; A61Q; A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNTEXT, CNABS, CNKI, DWPI, WOTXT, USTXT, JPTXT, PUBMED, 万方数据, 江南大学, 夏咏梅, 柳欢, 孟新宇, 方云, 樊晔, 脂质体, 囊材, 包埋, 共轭亚油酸, 十八碳二烯酸, 脂肪酸, 十二烷基硫酸钠, 硬脂酸, 棕榈酸, 肉豆蔻酸, 维生素 C, 抗坏血酸, 酸性, JIANG NAN UNIVERSITY, CLA, conjugated linoleic acid, fatty acid, liposome, liposomal, vesiculation, vesicle, SDS, sodium dodecyl sulfate, VC, vitamin C, ascorbic acid, palmitic acid, stearic acid, myristic acid, acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 111557912 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 21 August 2020 (2020-08-21) claims 1-10, and embodiments 1-4	1-16
A	CN 103386132 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 13 November 2013 (2013-11-13) entire description	1-16
A	CN 107998978 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 08 May 2018 (2018-05-08) entire description	1-16
A	JP 2006225327 A (NOF CORP. et al.) 31 August 2006 (2006-08-31) entire description	1-16
A	YANG, Shuibing et al., "Preparation and Characterization of Nanoliposomes Entrapping Medium-Chain Fatty Acids and Vitamin C by Lyophilization," <i>Int. J. Mol. Sci.</i> , Vol. 14, 30 September 2013 (2013-09-30), pp. 19763-19773	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 August 2021

Date of mailing of the international search report

26 August 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China**

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/098057

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	马洁 (MA, Jie). "迁移和扩张共轭亚油酸囊泡pH窗口的研究 (The Investigation of Migration And Extension of pH Window for Forming Conjugated Linoleic Acid Ufasomes)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库 (硕士) 工程科技I辑 (Chinese Selected Doctoral Dissertations and Master's Theses Full-Text Databases (Doctoral), Engineering Science & Technology I), No. 12, 15 December 2015 (2015-12-15), pages B018-37	1-16
A	FAN, Ye et al., "Neutral and acid-adapted fatty acid vesicles of conjugated linoleic acid," <i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i> , Vol. 167, 20 April 2018 (2018-04-20), pp. 385-391	1-16
A	DAVIS, Janelle L. et al., "Liposomal-encapsulated Ascorbic Acid: Influence on Vitamin C Bioavailability and Capacity to Protect Against Ischemia-Reperfusion Injury," <i>Nutrition and Metabolic Insights</i> , 29 April 2016 (2016-04-29), pp. 25-30	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/098057

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111557912	A	21 August 2020	None			
CN	103386132	A	13 November 2013	None			
CN	107998978	A	08 May 2018	CN	107998978	B	06 August 2019
JP	2006225327	A	31 August 2006	JP	5177338	B2	03 April 2013

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/098057

A. 主题的分类

A61K 9/127(2006.01)i; A61K 47/12(2006.01)i; A61K 47/20(2006.01)i; A61K 31/375(2006.01)i; A61P 3/02(2006.01)i; A61K 8/67(2006.01)i; A61K 8/36(2006.01)i; A61K 8/14(2006.01)i; A61Q 19/00(2006.01)i; A23L 33/15(2016.01)i; A23L 33/12(2016.01)i; A23L 29/00(2016.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P; A61Q; A23L

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNXTX, CNABS, CNKI, DWPI, WOTXT, USTXT, JPTXT, PUBMED, 万方数据, 江南大学, 夏咏梅, 柳欢, 孟新宇, 方云, 樊晔, 脂质体, 囊材, 包埋, 共轭亚油酸, 十八碳二烯酸, 脂肪酸, 十二烷基硫酸钠, 硬脂酸, 棕榈酸, 肉豆蔻酸, 维生素C, 抗坏血酸, 酸性, JIANG NAN UNIVERSITY, CLA, conjugated linoleic acid, fatty acid, liposome, liposomal, vesiculation, vesicle, SDS, sodium dodecyl sulfate, VC, vitamin C, ascorbic acid, palmitic acid, stearic acid, myristic acid, acid

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 111557912 A (江南大学) 2020年 8月 21日 (2020 - 08 - 21) 权利要求1-10, 实施例1-4	1-16
A	CN 103386132 A (江南大学) 2013年 11月 13日 (2013 - 11 - 13) 说明书全文	1-16
A	CN 107998978 A (江南大学) 2018年 5月 8日 (2018 - 05 - 08) 说明书全文	1-16
A	JP 2006225327 A (NOF CORP. 等) 2006年 8月 31日 (2006 - 08 - 31) 说明书全文	1-16
A	YANG, Shuibing等, . "Preparation and Characterization of Nanoliposomes Entrapping Medium-Chain Fatty Acids and Vitamin C by Lyophilization, " Int. J. Mol. Sci., , 第14卷, 2013年 9月 30日 (2013 - 09 - 30), 第19763-19773页	1-16

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:	"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件
"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性
"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	"&" 同族专利的文件
"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	
"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	

国际检索实际完成的日期

2021年 8月 9日

国际检索报告邮寄日期

2021年 8月 26日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)
中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

于莉

电话号码 (86-10)-53961883

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	马洁, . "迁移和扩张共轭亚油酸囊泡pH窗口的研究," 中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士)工程科技I辑, , 第12期, 2015年 12月 15日 (2015 - 12 - 15), B018-37页	1-16
A	FAN, Ye等, . "Neutral and acid-adapted fatty acid vesicles of conjugated linoleic acid," Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, , 第167卷, 2018年 4月 20日 (2018 - 04 - 20), 第385-391页	1-16
A	DAVIS, Janelle L.等, . "Liposomal-encapsulated Ascorbic Acid: Influence on Vitamin C Bioavailability and Capacity to Protect Against Ischemia-Reperfu- sion Injury," Nutrition and Metabolic Insights, , 2016年 4月 29日 (2016 - 04 - 29), 第25-30页	1-16

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/098057

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	111557912	A	2020年 8月 21日	无	
CN	103386132	A	2013年 11月 13日	无	
CN	107998978	A	2018年 5月 8日	CN 107998978	B 2019年 8月 6日
JP	2006225327	A	2006年 8月 31日	JP 5177338	B2 2013年 4月 3日