

УДК 665.372+544.77

Получение липосом из соевого лецитина

Забодалова Л.А., Чернявский В.А.* , Ищенко Т.Н., Скворцова Н.Н.

Санкт-Петербургский государственный университет
низкотемпературных и пищевых технологий, г. Санкт-Петербург
zabodalova@inbox.ru,

ГУ Научно-исследовательский институт гриппа РАМН,
office@influenza.spb.ru

Липосомные технологии находят широкое применение в таких отраслях, как медицина, косметология, фармакология. Опыт инкапсулирования в липосомы биологически активных веществ может оказаться полезен для пищевой технологии. В данной работе двумя принципиально разными методами были получены липосомы из соевого лецитина и исследованы такие их параметры, как размеры частиц и внутреннее строение.

Ключевые слова: липосомы, метод дегидратации/регидратации, тепловой метод

Production of liposomes from soybean lecithin

Zabodalova L.A., Chernjavskij V.F.* , Ishchenko T.N., Skvortcova N.N.

Saint-Petersburg state university of refrigeration and food
engineering, zabodalova@inbox.ru,

*Research Institute of Influenza, office@influenza.spb.ru

Liposomal technology is readily applied in medicine, cosmetology and pharmacology. The experience of encapsulation of bioactive substances can be useful in food technology. In the study liposomes were prepared from soybean lecithin by two completely different methods. The structure of liposomes and particle size were analyzed and compared.

Key words: liposomes, dehydration/rehydration method, heating method

1. Введение

Липосомы – это искусственно создаваемые липидные везикулы (пузырьки), состоящие из одного или нескольких фосфолипидных бислоев, разделенных водной фазой. Термин «липосомы» в переводе с греческого означает «жировое тело». Впервые липосомы были описаны в 1965 году британским профессором Алеком Бэнгхемом и его коллегами. Липосомы были получены в лабораторных условиях, затем их наблюдали в электронный микроскоп, после чего был сделан вывод о большом сходстве липосом и биологических мембран.

По своей структуре липосомы бывают однослойными (моноламеллярные, unilamellar vesicles (ULV)) и многослойными (мультиламеллярные, multilamellar vesicles (MLV)). Однослойные липосомы подразделяются на мелкие (20 – 200 нм, small unilamellar vesicle (SUV)), большие (200 – 1000 нм, large unilamellar vesicle (LUV)) и крупные (более 1000 нм, giant unilamellar vesicle (GUV)). Многослойные липосомы имеют размеры от нескольких сотен до тысяч нм [1].

В водной фазе внутри липосомы может находиться гидрофильный (водорастворимый) компонент, например витамин С. А в липидном бислое может быть заключен гидрофобный (жирорастворимый) компонент – такой, как витамин А. Такая форма витаминов называется липосомальной.

Липосомные технологии нашли широкое применение в медицине, фармацевтике и косметологии как переносчики некоторых лекарственных препаратов и биологически активных веществ. Липосомальная форма позволяет решать некоторые важные задачи, так как обладает рядом преимуществ над свободной формой этих веществ, а именно:

- 1) повышенная биологическая совместимость;
- 2) пролонгированное действие вследствие длительного высвобождения;
- 3) защита от деградирующего действия активных форм кислорода и ферментов;
- 4) высокие локальные концентрации в тканях и органах при низких средних;
- 5) возможность введения в организм жирорастворимых БАВ в водной форме.

С начала 80-х годов в мире ведутся исследования по использованию липосом в пищевых технологиях. Начало исследований по применению липосом в пищевых технологиях относятся к 1980-м годам. В 1985 году английские исследователи Law и Wigmore предложили использовать

инкапсулированные в липосомы ферменты протеиназы для ускорения созревания сыров [2].

Одно из перспективных направлений для пищевых технологий – это инкапсулирование в липосомы различных биологически активных веществ. Инкапсулирование витаминов уже широко используется в косметической промышленности. В некоторых случаях защита, достигнутая инкапсулированием, позволяет избегать избыточного введения в рецептуры для компенсации потерь во время обработки и хранения [3].

Целью нашей работы являлась оценка технологических параметров получения липосом двумя методами.

2. Материалы и методы

Для получения липосом применялся соевый лецитин ЛециПРО 90С (порошковый) производства фирмы «Оризон Кемикалс Лимитед» и Ерікурон 200 (восковидный) производства фирмы «Сargill», содержащие 97% фосфолипидов, предоставленные ООО «Протеин Плюс» (Санкт-Петербург). В качестве растворителя применялся гексан (ч.д.а). Инкапсулируемый компонент – порошок β -каротин. В качестве антиоксиданта использовался витамин Е в виде раствора α -токоферола ацетата 30%-ного в масле («ГаленоФарм»).

Гомогенизирование эмульсий осуществляли с помощью механической мешалки Віоміх LE-402 со скоростью 15000 об/мин.

Электронную микроскопию липосом проводили на электронном просвечивающем микроскопе JEM-100С (JEOL, США). Корреляционные спектры липосом получали с применением лазерного корреляционного спектрометра ЛКС-03.

Липосомы получали классическим методом дегидратации/регидратации [4] с некоторыми изменениями и тепловым методом (heating method) [2,5].

2.1. Получение липосом

2.1.1. Метод дегидратации/регидратации

Лецитин ЛециПРО 90С и β -каротин смешивали в весовом соотношении 1:0,005, растворяли в гексане и добавляли витамин Е в количестве 0,01% от массы лецитина. Растворитель упаривали на ротационном испарителе при температуре водяной бани 45-50°C. К остатку после упаривания добавляли смесь вода-этанол (1:1, об.) в количестве, превышающем в 1,5 раза массу

взятого лецитина. Содержимое колбы встряхивали до полного переноса остатка после упаривания в водно-спиртовую смесь. Образовавшуюся эмульсию оставляли в прохладном темном месте. Через сутки отбирали навеску смеси и приливали дистиллированную воду с таким расчетом, чтобы содержание липида в среде составляло 1%. Смесь гомогенизировали на механической мешалке при 15000 об/мин в течение 2 мин.

2. 1. 2. Тепловой метод.

Лецитин Ерікугоп 200 заливали водой с таким расчетом, чтобы содержание липида в среде составляло 1% и оставляли на 2 часа для гидратации. К смеси прибавляли 3% (об.) глицерина, помещали в водяную баню с температурой 65-70°C и перемешивали на механической мешалке при частоте вращения 1000 об/мин в течение 30 мин. Далее смесь выдерживалась 1 час при указанной температуре.

2.2. Электронная микроскопия липосом

2.2.1. Метод негативного контрастирования:

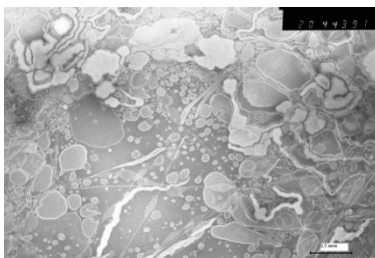


Рис. 1. Электронная микроскопия липосом, полученных методом дегидратации/регидратации (негативное контрастирование)

2.2.2. Ультратонкие срезы:

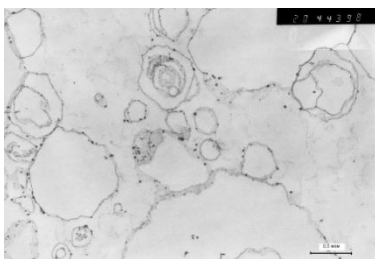


Рис. 2. Электронная микроскопия липосом, полученных методом дегидратации/регидратации (ультратонкий срез)

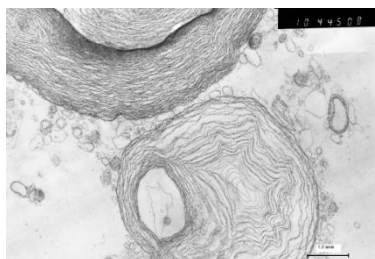


Рис. 3. Электронная микроскопия липосом, полученных тепловым методом (ультратонкий срез)

2.3. Определение размеров липосом

Таблица 1.

Фракционно-дисперсный состав липосом, полученных различными способами

Средний диаметр, нм	Содержание фракции, %
Метод дегидратации/регидратации без гомогенизации	
17500	30
730	33
260	33
80	3
Метод дегидратации/регидратации с гомогенизацией на высокоскоростной мешалке	
1100	12
430	60
126	28
Тепловой метод	
22000	92
80	8

3. Обсуждение результатов

Для получения липосом в работе использованы два метода: дегидратации/регидратации [4] и тепловой метод (heating method), рекомендуемый авторами для использования в пищевых технологиях [2,5]. Оба метода являются достаточно простыми в исполнении и не требуют сложного оборудования.

По классической методике дегидратации/регидратации все операции следует проводить в атмосфере азота или аргона для защиты липида от окисления кислородом воздуха. В нашей работе для защиты липида в смесь перед упариванием добавляли естественный антиоксидант – токоферол (витамин Е) в количестве 0,01% от массы взятого лецитина. В тепловом методе также не было соблюдено условие проведения всех операций в инертной атмосфере, так как исходный фосфолипид EpiKigon 200 содержит 0,2% α -токоферола. Факт образования липосом может быть подтвержден лишь при помощи электронного микроскопа. Снимки липосом получены на электронном просвечивающем микроскопе JEM-100С. Электронная пушка микроскопа обеспечивает электронный пучок с высокой яркостью и когерентностью, что играет ключевую роль в получении высокого разрешения и при анализе наноструктур. Для анализа использовали два методических подхода проведения электронной микроскопии липосом. Метод негативного контрастирования позволяет получить данные о форме и размерах липосом, но не дает представления о внутренней структуре. Метод ультратонких тонких срезов позволяет установить наличие внутренней полости, слоистости липосом. Размеры наночастиц определяли методом корреляционной спектроскопии с применением лазерного корреляционного спектрометра ЛКС-03. Принцип метода ЛКС состоит в регистрации и анализе изменений фракционного состава биологических жидкостей с размерами микрочастиц в диапазоне от 2 до 10000 нм. Метод позволяет оценить гидродинамический радиус липосом в указанных пределах, причем его показания представляют собой фракционно-дисперсный состав системы.

Данные электронной микроскопии свидетельствуют о том, что метод дегидратации/регидратации приводит к получению преимущественно однослойных липосом. Как следует из данных таблицы 1, фракционно-дисперсный состав исследованных образцов имеет существенные различия. По методу дегидратации/регидратации без гомогенизации в образце примерно 30% составляет фракция, размер частиц которой выходит за границу чувствительности метода исследования. Две более легкие фракции с размерами около 730 и 260 нм, содержатся примерно в равных количествах. После гомогенизации картина существенно меняется, так как три основные фракции смещаются в сторону уменьшения, причем в образце преобладают фракции с размерами около 430 и 126 нм.

Тепловой метод позволяет получить многослойные липосомы. Однако при анализе фракционно-дисперсного состава 90% составляют крупные частицы с размерами более 20 мкм, фракция с размером частиц около 80 нм получается в небольшом количестве.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сопоставить изученные методы получения с качественными и количественными характеристиками формы и размера липосомных частиц на основе фосфолипидов.

Список литературы

1. Jesorka A, Orwar O. Liposomes: Technologies and Analytical Applications // *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2008. P.801–32.
2. Mozafari MR, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology // *J. Liposome Res.* 2008. 18, P. 309–327
3. Красильников В.Н., Несмелов А.И. Липосомы в пищевой промышленности: перспективы использования // *Пищевая промышленность.* 1999. №12. С. 46
4. Ko S, Lee SC. Effect of nanoliposomes on the stabilization of incorporated retinol // *Afr. J. Biotech.* Vol. 9(37). 2010. P. 6158–6161.
5. Weissig V (ed.). *Liposomes : Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers.* / Mozafari MR. Ch. 2: Nanoliposomes: Preparation and Analysis // Springer. 2010. 12. P. 29-50.