

血红素铁脂质体的制备

葛 兰, 段相林, 常彦忠*

(河北师范大学生物制药研究中心, 河北省动物生理生化与分子生物学重点实验室, 河北 石家庄 050016)

摘 要: 目的: 制备血红素铁脂质体。方法: 采用乙醇注入法及旋转薄膜-超声法制备, 再经过不同孔径的滤膜得到不同粒径的血红素铁脂质体, 在原有技术的基础上优化血红素铁脂质体各组分的制备工艺, 应用紫外分光光度计测定血红素铁的含量, 计算出血红素铁脂质体的包封率, 用差示扫描量热法检测血红素铁脂质体各组成物质的相变过程。结果: 两种方法都能够得到较为理想的脂质体, 血红素铁:胆固醇:卵磷脂质量比范围为(0.1~200):(1~10):(10~100)。结论: 所得血红素铁脂质体呈均一大单室型, 通过 0.8 μm 的滤膜后有效粒径为 0.804 μm, 最大包封率 36%。

关键词: 血红素铁; 脂质体; 差示扫描量热法

Preparation of Heme Iron Liposomes

GE Lan, DUAN Xiang-lin, CHANG Yan-zhong*

(Key Laboratory of Animal Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Hebei Province, Center of Biopharmaceutical Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

Abstract: Ethanol injection and rotary film-ultrasonic methods were applied to prepare liposomes with heme iron in this study. Heme iron content and entrapment efficiency in liposomes obtained were measured by spectrophotometry, liposome morphology was observed under optical microscope and transmission electron microscope, and phase changes in cholesterol, lecithin and heme iron were determined by differential scanning calorimetry (DSC). Results showed that the heme iron liposomes prepared by the two methods were basically identical in most indicators. The mass ratio of heme iron to cholesterol to phospholipids was in range of (0.1–200): (1–10): (10–100). The liposomes obtained are uniform and big single-chamber particles with an effective diameter of 0.804 μm and the maximal entrapment efficiency is 36%.

Key words: heme iron; liposomes; differential scanning calorimetry

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)12-0048-04

铁是人体必需的重要营养元素, 缺铁或铁利用不良将导致代谢过程紊乱, 影响生长发育, 甚至引发贫血等各种疾病^[1]。食物中的铁有两种存在形式: 一类是离子铁, 这类铁在食物中尽管含量较高, 但是难于吸收^[2]。另一类是血红素铁, 又称卟啉铁^[3]。血红素铁是一种生物态铁, 与其他的补铁剂相比有较高的生物利用率, 可直接被肠道黏膜细胞吸收^[4], 消化道刺激症状轻。然而, 由于它由卟啉和一分子亚铁构成卟啉化合物, 结构不稳定。易氧化, 且不溶于水, 还带有特殊气味。更重要的是如果与血红素铁吸收的基因突变或受到低表达调控, 将会阻止和抑制血红素铁的吸收。另外, 铁有毒性, 急性大量摄入铁可引起严重中毒, 当铁的慢

性吸收和积累在量上超过正常铁运转及储存机制时也可引发慢性铁中毒^[5], 所以血红素铁作为一种具有较高吸收效率的补铁剂, 在更快的给机体补充铁的同时, 也有可能危害到机体的健康。这些特点大大限制了其在食品、保健品等工业中的应用, 尤其是作为口服保健品, 上述特性使其开发应用受到一定限制。

近年来出现了一种新型的生物药剂载体——脂质体。脂质体是由磷脂双层构成的具有水相内核的脂质微囊, 具有类似于细胞膜的结构。构成双分子层的类脂亲水性的头部形成膜的内表面, 而亲脂性的尾部则处于膜的中间, 内部为水相的闭合囊泡, 大小从几十纳米到几十微米, 同时在脂质体的水相和膜内可以包裹多种

收稿日期: 2008-09-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570957); 教育部博士点科学研究基金项目(20070094004);

河北省百名优秀创新人才支持计划项目(SPRC045)

作者简介: 葛兰(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能食品。E-mail: gelangelangelan@163.com

* 通讯作者: 常彦忠(1965-), 男, 教授, 博士, 研究方向为铁代谢分子生物学。E-mail: chang7676@163.com

物质。由天然膜成分组成的脂质体, 适合于生物体内吸收和降解。而且脂质体无毒性、无免疫原性, 作为药物载体, 具有靶向性。临床使用, 具有减少药物用量, 提高吸收效率, 降低毒性等优势^[6-7]。自从70年代人们发现脂质体以来, 其作为药物载体的研究已经显示出强大的优势, 一直备受广大药剂工作者的关注, 现有多个抗真菌和抗癌药物脂质体制剂在近二十个国家应用于临床。同时有多种维生素被制成脂质体应用于食品和化妆品中。

本实验的目的在于针对血红素铁结构不稳定, 易氧化、对消化道有刺激性及毒性的特点, 结合脂质体作为新型药剂载体的优越性, 采用乙醇注入法及旋转薄膜-超声法两种方法制备血红素铁新剂型——血红素铁脂质体, 以期进一步提高血红素铁的稳定性、减小血红素铁的毒性, 更好的开发血红素铁的利用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

水溶性血红素铁(纯度为90%) 和田龙生物技术公司; 血红素铁标样 Sigma公司; 大豆卵磷脂 北京华清美恒公司; 胆固醇 北京鼎国生物技术发展中心。

无水乙醇(色谱纯) 美国Dikmapure公司; 五聚甘油硬脂酸酯 山东圣源化学科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

RA-52型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; CPS2超声波粉碎机 宁波新芝超声有限公司; Olympus CK2倒置显微镜 日本Olympus光学公司; JEM 100SX透射电子显微镜 日本电子公司; JI-1155型激光散射粒度测定仪 成都精新粉体测试设备公司; TU-1800/1800S型紫外-可见分光光度计。

1.3 方法

1.3.1 血红素铁脂质体制备工艺

选用薄膜-旋转蒸发法以及乙醇注入法两种方法制备血红素铁脂质体。

1.3.1.1 薄膜-旋转蒸发法^[8]制备血红素铁脂质体

按比例称取适量胆固醇和卵磷脂, 加入一定量乙醇中, 待完全溶解后, 置于磨口梨形烧瓶中, 然后将梨形烧瓶置于旋转蒸发仪上, 在减压的条件下挥发有机溶剂, 使磷脂等成膜材料在烧瓶壁上形成均匀类脂薄膜, 再向烧瓶中充 N_2 120~200min, 使溶剂完全除去; 同时, 按血红素铁:胆固醇:卵磷脂质量比为(0.1~200):(1~10):(10~100)称取血红素铁, 完全溶于PBS(卵磷脂:PBS固液比为1:15, PBS的pH值为6.5)中, 得到血红素铁PBS溶液; 向磨口梨形瓶中加入适量温度的血红素铁

PBS溶液、吐温80(占总体积的0.05%)或五聚二硬脂酸酯(占总体的0.5%~1%)、同时加入直径为3~4mm的玻璃小珠, 在同温度条件下用旋转蒸发仪转动洗膜, 待形成的类脂薄膜水合变成牛奶状脂质体混悬液; 再将该脂质体用探针式超声波粉碎机(200~300W, 工作5s、间隙5s)超声分散10~15min, 减小脂质体的粒径, 同时在冷水浴条件下静置1~2h, 后用不同孔径的滤膜反复过滤5~35次得到直径在0.2~1 μ m的血红素铁脂质体, 静置1~2h, 置棕色瓶中, 充 N_2 , 密闭, 4 $^{\circ}$ C贮存。

1.3.1.2 乙醇注入法制备血红素铁脂质体

按比例称取磷脂和胆固醇, 完全溶于有机溶剂乙醇中。同时, 按血红素铁:胆固醇:卵磷脂质量比为(0.1~200):(1~10):(10~100)称取血红素铁, 完全溶于PBS中, 得到血红素铁PBS溶液。将完全溶解的磷脂-胆固醇溶液在恒温条件下, 缓慢滴入高速旋转的血红素铁PBS溶液中, 后恒温搅拌或旋转蒸发2~5h使乙醇充分挥发, 得到均匀乳状脂质体混悬液。将脂质体混悬液用超声仪超声分散10~15min(200~300W), 在冷水浴条件下控制混悬液温度在30 $^{\circ}$ C左右, 静置1~2h, 后用不同孔径的滤膜反复过滤5~35次得到直径在0.2~1 μ m的铁脂质体, 静置1~2h得铁脂质体, 入棕色瓶, 充 N_2 密闭、4 $^{\circ}$ C保存。

1.3.2 血红素铁脂质体的显微形态观察

将上述血红素铁脂质体混悬液, 分别用普通生物显微镜、透射电子显微镜进行观察; 透射电子显微镜采用磷钨酸负染法进行, 即取1滴待测脂质体混悬液滴于点滴反应瓷板的凹槽内, 并将喷碳铜网放于试液上(膜面向下), 1~2min后取出铜网, 用滤纸小片从铜网边缘吸干多余液体; 按上述同样方法, 将该铜网放在染液滴(4%磷钨酸溶液, pH7.0)上约30s, 用滤纸小片从铜网边缘吸干多余染液, 干燥, 观察脂质体磷钨酸染色铜网^[9]。

1.3.3 脂质体粒度测定

用激光散射粒度测定仪测血红素铁脂质体的粒径分布, 测试时用相应的水性介质稀释。

1.3.4 脂质体包封率测定

1.3.4.1 标准曲线的测定

准确称取血红素铁配制0.05mg/ml血红素铁标准储备液, 然后用PBS准确稀释15、20、30、40、50倍, 得到浓度梯度为0.00333、0.00250、0.00167、0.00125、0.00100mg/ml的血红素铁标准溶液, 后于波长386nm处分别测不同浓度的吸光度, 求得浓度与吸光度标准曲线方程为: $y = 0.0022x + 7 \times 10^{-5}$, $R = 0.9950$ 。

1.3.4.2 样品包封率的测定

取适量的血红素铁脂质体于透析袋中,透析去掉PBS中多余血红素铁,取出,置10ml的离心管中,加入相应体积的二甲苯,充分混匀后离心。离心条件为25℃、3500×g、20min,然后再于4000×g条件下,离心10min。弃上清液,下部为血红素铁溶液,在波长386nm处用分光光度法测定血红素铁吸光度。

$$\text{包封率(\%)} = \frac{CV}{m} \times 100$$

式中: C为血红素浓度(mg/ml); V为测定所用血红素体积(ml); m为样品所含药物总量(mg)。

1.3.5 差示扫描量热法对脂质体各组分的检测

在热分析系统中进行,利用差示扫描量热法对脂质体各组分的相变过程进行检测。本实验DSC检测过程为精确称量各组分于密闭的铝铂中,扫描加热温度范围为25~230℃,加热速率为10℃/min,充氮速率为15ml/min^[11]。

2 结果与分析

2.1 脂质体粒径分布结果

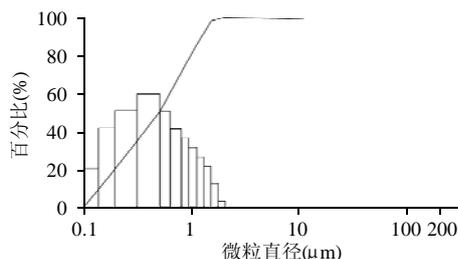


图1 血红素铁脂质体粒径及分布

Fig.1 Particle size distribution profile of heme iron liposomes prepared by rotary film-ultrasonic method

本实验分别采用薄膜-旋转蒸发法和乙醇注入法两种方法制备血红素脂质体,并对两种方法和各项指标进行检验,检验结果除部分数值上略有差异外基本一致,因此以下只列出薄膜旋转蒸发法各指标的检验结果,乙醇注入法中数值有差异的结果在其后用括号标出。

用激光散射粒度测定仪测试血红素铁脂质体的粒径分布。激光散射粒度测定法是通过测量颗粒的散射光强度或偏振情况来确定颗粒粒度的方法。颗粒对于入射光的散射服从经典的米氏理论,低能源半导体激光器发出一定波长的单色光,经空间滤波和扩束透镜,滤去杂光形成平行单色光束。该光束照射测量区中的颗粒时,会产生光的衍射现象。衍射光的强度分布服从夫朗和费衍射理论。在测量区后的接收透镜是傅立叶转换透镜(已知透镜的范围),在它的后聚焦平面上形成散射光的远场衍射图。图1中的曲线为体积累计分布百分比,横坐标表示微粒直径,图1中条形的分布图所测微粒粒径分布图,图中条形高度越高表示在一定直径下微粒占所测总微粒数目的百分比越大。

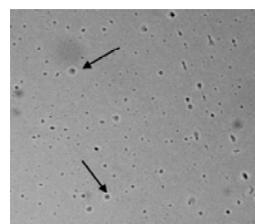
从图1可看出,有60%^[9]的脂质体的粒径分布都集中于0.804μm处(乙醇注入法为0.935μm处),因此可得:有效粒径为0.804μm(乙醇注入法为0.935μm),平均粒径为0.59μm。

2.2 血红素铁脂质体的包封率

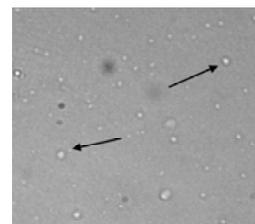
根据1.3.4节的方法,测得血红素铁脂质体包封率为36%左右。

2.3 血红素铁脂质体显微形态观察结果

普通生物显微镜观察,脂质体轮廓清晰,呈圆球状囊形颗粒(图2)。透射电镜观察脂质体呈典型单室,其双分子膜规整、均一、连续,呈椭圆形微球体(图3)。



A



B

A. × 20; B. × 40.

图2 血红素铁脂质体光镜图片

Fig.2 Morphological observation of heme iron liposomes under optical microscope (A. × 20; B. × 40)

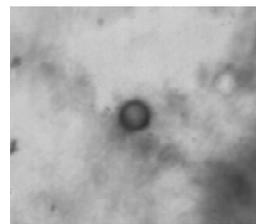


图3 血红素铁脂质体负染电镜图片(× 8000)

Fig.3 Morphological observation of heme iron liposomes under transmission electron microscope (× 8000, negative staining)

2.4 差示扫描量热法对脂质体各组分的检测结果

差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)即DSC曲线(也称为DSC热分析相图)。可以考察脂质体制备方法过程中物质结构的变化、药物与脂质体的相互作用、表面活性剂对脂质体柔性的影响^[10]。

单一组分磷脂形成的脂质体DSC曲线上可发现两个特征不同的吸热峰。前一吸热峰峰形平缓且峰面积较小,来源于磷脂分子中极性端的热运动,磷脂Lβ双层结构转变为Pβ称为预相变。磷脂极性区结合其他分子特

别极性物质会显著影响预相变。后出现的吸热峰称为主相变，峰面积较大，来源于磷脂分子中碳氢链的熔融，结构中含有不饱和键会降低主相变温度(T_m)，增加碳链长度会提高(T_m)，同样，结合脂溶性物质主要影响(T_m)^[8]。脂质体中添加不同物质，可诱导脂膜表面产生区域结构，如药物、表面活性剂等有可能影响脂质体膜的 T_m 变化^[7]。

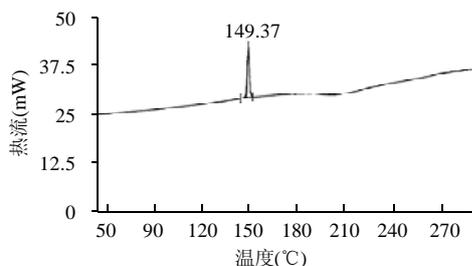


图4 胆固醇DSC相变图

Fig.4 DSC phase transition graph of cholesterol

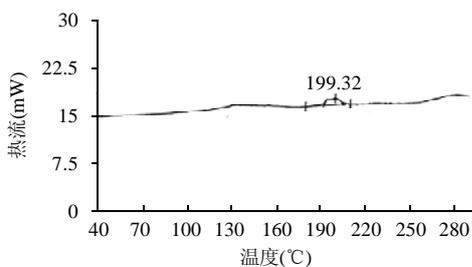


图5 卵磷脂DSC相变图

Fig.5 DSC phase transition graph of lecithin

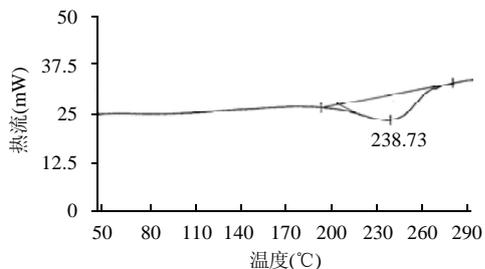


图6 血红素铁DSC相变图

Fig.6 DSC phase transition graph of heme iron

图4~6分别是组成血红素铁脂质体各组分经过差示扫描量热法(DSC)检测后的相变过程。从图4~6可以看出，胆固醇、卵磷脂和血红素铁的主相变温度分别是149.37、199.32及238.73°C。图7、8分别是空白脂质体和血红素铁脂质体经过差示扫描量热法(DSC)检测后的相变过程。如图7所示，在空白脂质体(只含有胆固醇、卵磷脂)的DSC曲线上，其主相变温度为97.41°C(乙醇注入法制备的空白脂质体的主相变温度为97.49°C)，而胆固醇、卵磷脂相变峰消失。提示，胆固醇和卵磷脂的结构发生了变化，二者的结合致使相变峰有了变化。而在血红素铁脂质体的DSC曲线上(图8)，其相变峰只有一个，主相变温度为93.40°C(乙醇注入法制备的血红素

铁脂质体的主相变温度为92.92°C)，两者相变温度和峰形、峰位置相近，说明加入血红素铁后，仍然能形成磷脂双分子层结构的变化。以上证据充分证明：脂质体已经形成，其中包含着血红素铁，达到了研究目的。

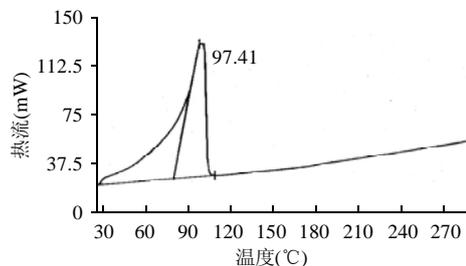


图7 空白脂质体DSC相变图

Fig.7 DSC phase transition graph of blank liposomes

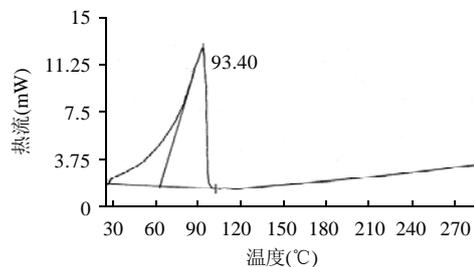


图8 血红素铁脂质体DSC相变图

Fig.8 DSC phase transition graph of heme iron liposomes

3 结论

本实验建立了血红素铁脂质体的两种制备方法，经检测血红素铁脂质体呈均一大单室型，经过0.8 μm的滤膜过滤后有效粒径为0.804 μm(乙醇注入法的有效粒径为0.935 μm)，最大包封率为36%。差示扫描量热法对脂质体各组分的检测结果证明：血红素铁与脂质体中的磷脂双分子层发生了结合，成功获得了血红素铁脂质体。

参考文献:

- [1] QMAR S, FEKI M, KAABACHI N. Iron metabolism, overview and recent insights[J]. Ann Biol Clin (Paris), 2006, 64(6): 523-534.
- [2] 曹泽虹. 血红素铁的研究进展[J]. 农产品加工, 2006(11): 31-35.
- [3] 吴斌. 血红素铁防止缺铁性贫血研究[J]. 海峡学报, 1997, 9(1): 130-131.
- [4] NGUYEN N S, COTTET-MAIRE F, BUETLER T M, et al. Metabolism-dependent stimulation of reactive oxygen species and DNA synthesis by cyclosporin A in rat smooth muscle cells[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 27(11/12): 1267-1275.
- [5] 钱钟明. 铁代谢基础与临床[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [6] LASIC D D. Novel applications of liposomes[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(7): 307-321.
- [7] FELNEROVA D, VIRET J F, GLUCK R, et al. Liposomes and virosomes as delivery system for antigens, nucleic acids and drugs[J]. Curr Opin Biotechnol, 2004, 15: 518-529.
- [8] 田艳燕, 段相林, 常彦忠. 番茄红素脂质体的制备[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 128-132.
- [9] 朱全刚, 胡晋红, 孙华君, 等. 来氟米特脂质体的工艺优化[J]. 华西医学杂志, 2000, 15(2): 85-88.
- [10] 宁美英, 郭颖志, 顾忠伟. 差示扫描量热法在脂质体研究中的应用[J]. 国外医学: 药学分册, 2005, 32(1): 56-61.
- [11] BHALERAO S S, HARSHAL A R. Preparation, optimization, characterization, and stability studies of salicylic acid liposome[J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2003, 29(4): 451-467.