

辅酶 Q₁₀ 前体脂质体的研制及其特性研究

祝青哲, 夏书芹, 许时婴*

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要:为提高辅酶 Q₁₀脂质体的稳定性,采用冷冻干燥法制备辅酶 Q₁₀前体脂质体。选择蔗糖、海藻糖、甘露醇、乳糖等作冻干保护剂,研究复水前后辅酶 Q₁₀脂质体的形态、粒径分布和包封率,并研究了辅酶 Q₁₀前体脂质体红外光谱性质,比较冷冻干燥保护剂种类及用量对辅酶 Q₁₀脂质体的保护作用。优选保护剂为海藻糖,与卵磷脂质量比为 4:1,辅酶 Q₁₀前体脂质体水合重建后平均粒径为 508nm,包封率达 75%。红外光谱分析表明海藻糖与磷脂 P=O 基团之间形成氢键作用最强。

关键词:辅酶 Q₁₀, 前体脂质体, 冷冻干燥法, 冷冻保护剂, 红外光谱

Study on preparation and characteristics of coenzyme Q₁₀ proliposomes

ZHU Qing-zhe, XIA Shu-qin, XU Shi-ying*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To enhance the stability of coenzyme Q₁₀ liposomes, freeze-drying method was used to prepare coenzyme Q₁₀ proliposomes. Sucrose, trehalose, mannitol and lactose were selected as cryoprotectant. The particle morphology, the size range and encapsulation efficiency of coenzyme Q₁₀ liposomes before freeze-drying and after hydrated were studied. The weight ratios of the optimized formulation were trehalose egg lecithin = 4:1. After coenzyme Q₁₀ proliposomes was hydrated, the average diameter of rehydration liposomes was 508nm, and the encapsulation efficiency was about 75%. The analysis of FTIR spectrum showed that the hydrogen bond between trehalose and lipid headgroups formed in the dry state.

Key words: CoQ₁₀; proliposomes; freeze-drying; cryoprotectant; FTIR

中图分类号: TS201.2⁺ 5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)01-0113-04

辅酶 Q₁₀ (CoQ₁₀)是天然抗氧化剂和细胞代谢激活剂^[1,2]。美国 FDA 早在 80 年代已批准辅酶 Q₁₀可作为膳食补充剂^[3]。采用脂质体包埋的辅酶 Q₁₀具有很好的水溶性,更利于人体吸收,在保健食品领域也将有广阔的应用前景^[4]。普通脂质体以液体形式存在,在贮存过程中易发生聚集沉降、磷脂氧化分解、包封物渗漏等问题,导致脂质体不稳定。前体脂质体由 Payne 等首次提出,将构成脂质体的膜材、药物及支撑剂用适当方法制成颗粒状、冻干状等干燥形式,用前加水水化后即可形成脂质体^[5]。1978 年 Vanleberghe 等首次报道采用冷冻干燥法提高脂质体的贮存稳定性。目前,该法已成为较有前途的改善脂质体制剂长期稳定性的方法之一^[6]。本文采用冷冻干燥法研制辅酶 Q₁₀前体脂质体,选择合适的保护剂以提高其复水稳定性,并研究有关性质,探讨保护剂对脂质体的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

辅酶 Q₁₀ 98.0%~101.0%,日清制药;蛋黄磷脂 (EPC) 生化试剂,华东师范大学化工厂;吐温 80 (Tween 80) 化学纯,国药(集团)上海化学试剂公司;海藻糖 (trehalose, Tre) 食品级,日本林原株式会社;乳糖 分析纯,上海恒信化学试剂有限公司;胆固醇 (Chol)、蔗糖、甘露醇、葡萄糖、山梨醇等均作为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

UV-1100型紫外-可见分光光度计 北京瑞利分析仪器公司;VCX50型超声处理器 美国 SONICS&MATERIALS公司;FreeZone 6升立式冻干机 Labconco公司;Nano-ZS90型粒径分析仪 英国 Malvern公司;Nexus傅立叶红外光谱仪 美国 Nicolet公司;CSEM4000扫描探针显微镜 广州本原纳米仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 辅酶 Q₁₀前体脂质体的制备

1.2.1.1 采用乙醇注入-超声法^[7]制备液态辅酶 Q₁₀脂质体 按配方称取磷脂、胆固醇、Tween 80及辅酶 Q₁₀,比例为 EPL CoQ₁₀ Chol Tween 80 = 2.5 1.2 0.4 1.8 (g/g),

收稿日期: 2007-09-03 *通讯联系人

作者简介: 祝青哲 (1983-),女,在读硕士研究生,研究方向:功能性食品配料与添加剂。

基金项目: 863计划重点项目 (2007AA100403)。

EPL的浓度为 1.25% (g/mL),加入 2mL 无水乙醇,于 55℃ 水浴至溶,用注射器快速将其注入 20mL 水化介质,取适量保护剂用 pH7.4, 0.01mol/L 磷酸缓冲液溶解,搅拌水化 30min,旋转蒸发除去乙醇 (55℃, 真空度 0.1MPa),迅速冷却,冰浴超声处理 4min (脉冲 1s/1s),冷冻离心 30min (11000 ×g, 4℃) 后充入 N₂ 密封,置于冰箱冷藏保存。空白脂质体的制备则称取等量脂质溶于乙醇,其余步骤与辅酶 Q₁₀ 脂质体的制备相同。

1.2.1.2 冷冻干燥工艺 取 1mL 辅酶 Q₁₀ 脂质体分装于安瓿瓶中, -70℃ 预冻 24h,冷冻干燥 (-30℃ 20h, -10℃ 10h, -4℃ 5h, 25℃ 3h, 真空度 < 0.1MPa),压盖封口,即得辅酶 Q₁₀ 前体脂质体,冻干后的样品置干燥器中,于室温避光密闭保存。

1.2.1.3 复水 取 1 瓶辅酶 Q₁₀ 前体脂质体,加入 1mL 去离子水充分混匀,即得辅酶 Q₁₀ 脂质体。

1.2.2 辅酶 Q₁₀ 脂质体包封率的测定 辅酶 Q₁₀ 总含量的测定:采用 Tween 80 增溶-紫外分光光度法^[8];游离辅酶 Q₁₀ 含量的测定:采用正戊烷洗涤-紫外分光光度法^[8]。

包封率 (%) = $\frac{\text{总辅酶 Q}_{10}\text{含量} - \text{游离辅酶 Q}_{10}\text{含量}}{\text{总辅酶 Q}_{10}\text{含量}} \times 100\%$

1.2.3 辅酶 Q₁₀ 脂质体粒径的测定 采用配有 He/Ne 激光器 (λ = 633nm) 的 Nano-ZS90 粒径分析仪,散射角为 90°;将待测样品装入聚苯乙烯比色皿中 (折光指数 1.33), 25 ± 0.1℃ 下保温 3min,测定,记录平均粒径 (Dz) 和粒径分布情况 (多分散指数 PDI)。

1.2.4 辅酶 Q₁₀ 前体脂质体傅里叶红外光谱 (FTIR) 分析 取出少许辅酶 Q₁₀ 前体脂质体样品,与干燥的 KBr 混合。研磨至细粉状,充分混合后置入锭剂成型器中进行压片;将压片放入红外光谱仪样品槽中,测定红外吸收光谱,波数范围为 400~4000cm⁻¹。

1.2.5 复水前后辅酶 Q₁₀ 脂质体的形态观察 采用原子力显微镜观察复水前后辅酶 Q₁₀ 脂质体的外观形貌。将辅酶 Q₁₀ 脂质体用磷酸缓冲液稀释 50 倍,少量样品滴在新解理的云母表面并铺展,用滤纸吸走多余液体,室温下放置约 20min,置于原子力显微镜的扫描探头 (Si 探针) 下,以动态轻敲方式扫描 (频率 300kHz),在室温 (20~22℃) 和大气环境下进行观测。

2 结果与讨论

2.1 冻干保护剂的选择

本文比较了常用的几种冻干保护剂蔗糖、海藻糖、甘露醇、乳糖、葡萄糖及山梨醇,根据所得冻干产品的外观、复水后辅酶 Q₁₀ 脂质体的包封率和粒径筛选适宜的冻干保护剂。研究表明,当保护剂 EPC = 4:1 (g/g) 时,蔗糖、海藻糖、甘露醇作为冻干保护剂的辅酶 Q₁₀ 脂质体冻干后能形成有一定硬度的饼状物,复水时具有良好分散性;其中乳糖作为冻干保护剂的脂质体冻干后有拉丝现象出现;采用葡萄糖和山梨醇作为冻干保护剂的脂质体冻干后出现明显的干缩聚集现象。

冻干保护剂对脂质体水合重建后的粒径及包封率的影响见图 1,以蔗糖、海藻糖、甘露醇为冻干保护

剂时,重建后脂质体的平均粒径在 500nm 左右,辅酶 Q₁₀ 包封率在 70% 以上。其中甘露醇为保护剂的辅酶 Q₁₀ 脂质体粒径最小,粒子分散范围也较小;海藻糖为保护剂的辅酶 Q₁₀ 脂质体包封率最高。结果表明,蔗糖、海藻糖及甘露醇对辅酶 Q₁₀ 脂质体的冻干保护作用相近,乳糖次之,葡萄糖及山梨醇效果较差。

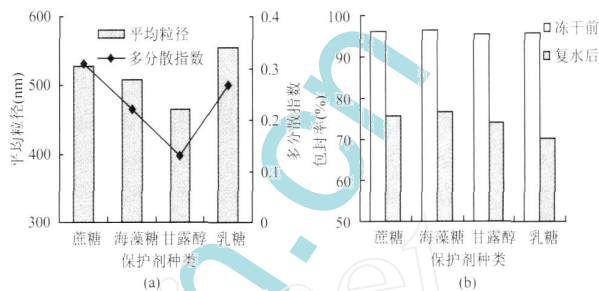


图 1 保护剂的种类对辅酶 Q₁₀ 脂质体冷冻干燥效果的影响

二糖是研究最多也是最有效的冻干保护剂,其中海藻糖为非还原性二糖,可在无水条件下保护生物膜功能,使脂质体在完全脱水时保持完整形态^[9]。甘露醇的低共熔温度较高,可有效保持样品冻干过程中的形状。但在本研究中发现贮存过程中甘露醇作为冻干保护剂的脂质体发生一定程度的皱缩,原因可能是其在室温贮存过程中产生的反玻璃化转变^[10],其长期稳定性有待研究。

2.2 不同浓度的保护剂对辅酶 Q₁₀ 脂质体包封率的影响

能够在冻干过程中稳定脂质体所需的保护剂与磷脂的比例取决于脂质体的配方和所选保护剂的种类^[11]。因此,在前述实验的基础上,选用蔗糖、海藻糖、甘露醇作为冻干保护剂进一步研究保护剂用量对辅酶 Q₁₀ 脂质体冷冻干燥的影响。选择保护剂与蛋黄磷脂的质量比为 1:1、2:1、4:1、8:1,测定复水后辅酶 Q₁₀ 脂质体的包封率,结果见图 2。

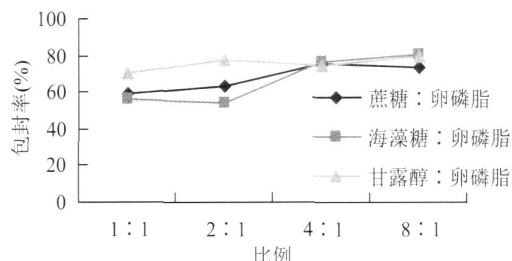


图 2 保护剂用量对辅酶 Q₁₀ 脂质体包封率的影响

图 2 表明,当蔗糖、海藻糖与磷脂比为 4:1,辅酶 Q₁₀ 脂质体包封率最高,进一步提高糖的浓度,包封率无明显提高;而甘露醇与磷脂比为 2:1 时,包封率就有明显的提高。也有研究表明对于冻干前样品溶液,糖浓度过大冻干过程会变为极为缓慢,冻干时间较长^[12],因此具有合适的保护剂的浓度才能达到较好的冻干效果。

2.3 辅酶 Q₁₀ 前体脂质体的 FTIR 分析

在前体脂质体中,磷脂头部基团和碳水化合物间可能存在相互作用。糖类的 -OH 与磷脂间形成的氢键可能会在磷脂分子 C=O 和 P=O 处形成^[13]。

为了研究不同保护剂对脂质体的作用机制,采用红外光谱分析添加不同保护剂的辅酶 Q₁₀前体脂质体。文献报道,卵磷脂的 P=O 在脂质体膜的界面区域,无保护剂时磷脂分子的 P=O 吸收波数在 1262cm⁻¹,当有保护剂糖类存在时,糖与磷脂的头部形成氢键, P=O 的伸缩振动峰的位置受氢键的形成影响会由高波数移至低波数,不同样品红外光谱图中 P=O 峰的位置的差异表明不同保护剂与磷脂头部的氢键作用强弱不同^[13]。图 3 显示磷脂分子的 P=O 吸收波数由高波数移至低波数。海藻糖的向低波数移动最明显,移至 1239.96cm⁻¹,蔗糖、甘露醇和乳糖的 P=O 峰均分裂为两个峰。图 3 表明海藻糖对磷脂保护作用最明显,甘露醇和蔗糖也有保护作用,而乳糖的效果不明显。

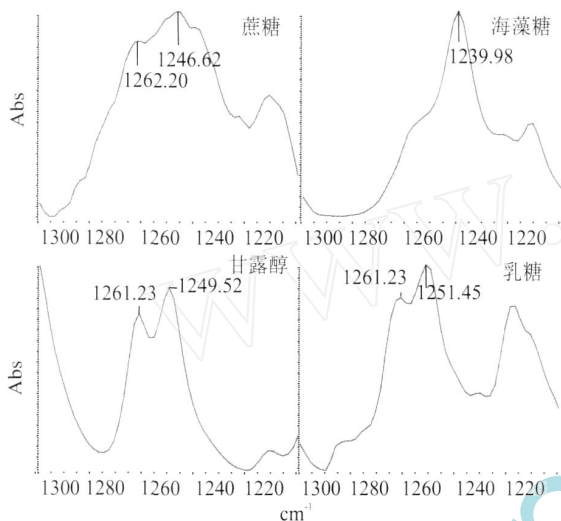


图 3 辅酶 Q₁₀前体脂质体 P=O 键红外谱图

卵磷脂的 C=O 位于疏水的烃链和亲水的头部区域之间,未加保护剂的干燥态脂质体 C=O 峰的位置在 1738cm⁻¹^[13]。图 4 显示磷脂分子的 C=O 吸收波数无明显变化,说明糖并没深入膜的内部。

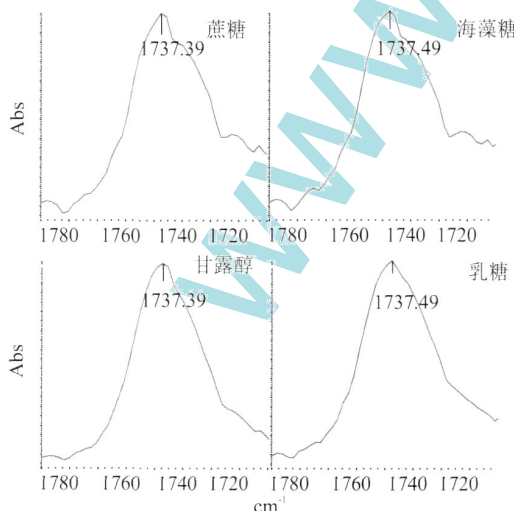


图 4 辅酶 Q₁₀前体脂质体 C=O 键红外谱图

关于保护剂的作用机制目前存在两种假说^[11]:一种是 Crowe 提出的“水代替假说”(water replacement hypothesis)认为,生物体中大分子均被一层水膜保护着,干燥过程中若有冻干保护剂可与脂

质体磷脂的极性基团形成氢键,脱水后代替水作为脂质体的稳定剂,保持膜的完整性。另一种是 Koster 等人提出的玻璃化作用(vitrification),认为保护剂的存在降低磷脂的相转变温度,阻止其从凝胶态向液晶态转变中发生药物的渗漏。

红外光谱分析表明:海藻糖与磷脂间的氢键作用强于蔗糖、甘露醇和乳糖,海藻糖在冻干过程中能有效替换与卵磷脂极性头基团相结合的水,形成氢键,防止脂质体的聚集和融合,与“水代替假说”一致。

2.4 辅酶 Q₁₀脂质体冻干前和冻干复水后的形态比较

本实验采用原子力显微镜观察海藻糖作为保护剂的辅酶 Q₁₀脂质体冻干前和冻干复水后的形态。冷冻干燥前的辅酶 Q₁₀脂质体液体样品中囊泡分散均匀,平均粒径为 58.08nm。而复水后的脂质体中有少部分囊泡聚集成较大颗粒状态,粒径最大为 600nm,仍存在大量粒径较小的脂质体(<100nm)。说明复水过程中有部分脂质体发生了聚集融合的现象,导致出现粒径较大的脂质体,可能是影响前述实验中平均粒径的测定结果偏大的原因之一。

脂质体的粒径对其在冻干过程中稳定性也有较大的影响。小粒径脂质体具有较高的曲率,易引起融合。多层脂质体(MLV)中冻干保护剂分布不均匀,导致局部糖脂比例小于所需值,药物渗漏增加^[6]。实验中发现,有部分辅酶 Q₁₀脂质体冻干前后粒径发生了较大变化,但芯材包封率仍可保持在 70%以上。推测芯材渗漏可能主要发生在复水重建阶段,当复水时温度高于水化脂质体的凝胶-液晶相转变温度(T_c)、低于冻干脂质体的凝胶-液晶相转变温度(T_m)时,会发生相转变,药物渗漏增加。适宜的冻干保护剂可抑制 T_m 升高,减少药物渗漏。但预冻、冷冻干燥及复水过程对脂质体的结构仍存在一定程度的破坏作用。

3 结论

本研究通过比较保护剂的种类和用量,选择海藻糖为冻干保护剂,它与卵磷脂质量比为 4:1。采用冷冻干燥法制得的辅酶 Q₁₀前体脂质体呈疏松、淡黄色固体状态,水分散性好,水合重建后平均粒径为 508nm,辅酶 Q₁₀包封率达 75%。红外光谱分析表明,海藻糖与磷脂 P=O 基团之间形成氢键作用最强,但磷脂分子的 C=O 吸收波数无明显变化,说明糖并没深入膜的内部,初步认为保护剂的作用机制与“水代替假说”相符合。采用扫描探针原子力显微镜观察到复水后有部分脂质体发生了聚集现象,但仍存在很多较小粒径的脂质体,说明冷冻干燥复水过程对脂质体的结构有一定的影响。

参考文献:

[1] B Makabi- Panzu, et al. Coenzyme Q₁₀ in vesicles composed of archaeal ether lipids or conventional lipids enhances the immunoadjuvanticity to encapsulated protein[J]. Nation Research Council (下转第 118 页)

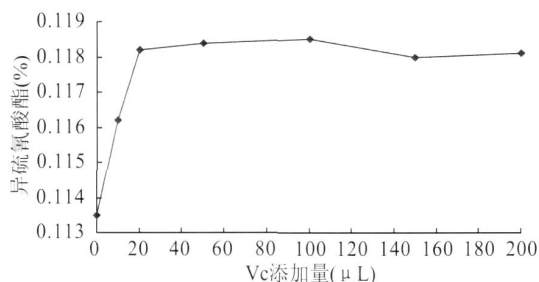


图5 Vc对芥子苷酶活性的影响

添加量为 0.5%、1%、3%、5%、7%、9%、11%，不添加 Vc。料液比 1:3, 70℃ 下恒温水解 1.5h, 考察 NaCl 的影响, 为山葵腌渍品的加工提供一定的理论依据, 结果见图 6。

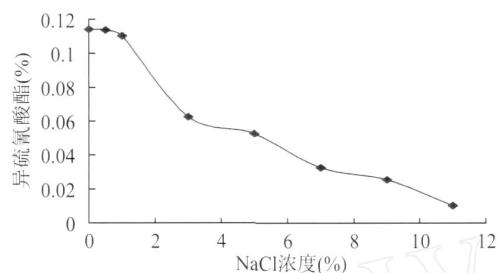


图6 NaCl浓度对芥子苷酶活性的影响

由图 6 可以看出, NaCl 对芥子苷酶活性影响很大。0.5% 时影响不明显; 1% NaCl 对芥子苷酶活性有抑制作用; 3% 时, 抑制率达 45%; 9% 时, 抑制率达 80% 左右; 11% 时几乎完全抑制。赵大云等研究雪菜中芥子苷酶酶解特性时, 通过正交实验表明, NaCl 浓度是影响芥子苷酶活性的显著性因素。因此, 在山葵腌渍时, 为了产生其特有的风味, 应考虑到食盐的用量。

表 2 正交实验因素水平表

水平	因素			
	A 温度 (°C)	B pH	C 料液比	D 时间 (h)
1	50	6.0	1:1	0.5
2	60	6.7	1:3	1
3	70	8.0	1:5	1.5
4	80	9.0	1:7	2

(上接第 115 页)

of Canada, 1998, 16(16): 1504~1510.

[2] Juan A, Crestanello M D, et al. Effect of coenzyme Q₁₀ supplementation on mitochondrial function after myocardial ischemia reperfusion [J]. Journal of Surgical Research, 2002, 102(2): 221~228.

[3] Selze, Jonzthan, et al. Coenzyme Q₁₀ dietary supplement [P]. United States Patent: 6652891, 2003-9-25.

[4] Keller B C. Liposomes in nutrition [J]. Trends in Food Science & Technology, 2001(12): 25~31.

[5] 陈建明, 张仰眉, 高申. 维生素 A 前体脂质体的研制及其特性考察 [J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(2): 207~209.

[6] 王健, 李明轩. 冷冻干燥对提高脂质体稳定性的研究概况 [J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36: 576~579.

[7] 夏书芹, 许时婴. 辅酶 Q₁₀ 纳米脂质体的制备 [J]. 食品工业科技, 2006, 27(2): 164~167.

[8] 夏书芹, 许时婴. 吐温 80 增溶-紫外分光光度法测定辅

酶 Q₁₀ 脂质体的载量及包封率 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(10): 131~135.

2.2.7 山葵根茎芥子苷酶解的最佳条件确定 根据单因素实验结果, 设计 4 因素 4 水平的正交实验, 不考虑交互作用, 因素水平见表 2, 结果表略。
由方差分析可知, 影响异硫氰酸酯得率的主次因素为 B > D > C > A, 即 pH > 时间 > 料液比 > 温度, pH 对山葵根茎酶解有极显著影响, 而温度有显著影响, 这与赵大云等研究雪菜中芥子苷的酶解特性的结论一致。最佳组合为 A₃B₂C₃D₄, 料液比 1:5, 70℃ 下恒温水解 2h。经多次重复实验, 异硫氰酸酯得率为 0.1365% (鲜重)。

3 结论

3.1 贮藏方式对山葵根茎中芥子苷酶活性影响不大, 不同方式下芥子苷酶的活性主要与温度有关。冰箱冷藏与真空冷冻干燥比较, 相对于鲜样来说, 芥子苷酶活性基本不变; 烘箱恒温干燥影响比较明显, 芥子苷酶活性 40℃ 下损失影响相对较小, 而 60℃ 下损失为 92.7%; 晒干跟烘箱 50℃ 恒温干燥结果一致, 芥子苷酶活性损失 60%; 室内晾干, 芥子苷酶活性损失相对较小, 为 25% 左右; 综合比较, 由于冰箱冷藏和真空冷冻干燥成本高, 不适合大规模生产, 因此选用室内晾干贮藏。

3.2 水解 pH 是影响山葵中芥子苷酶活性的显著性因素; 山葵根茎中芥子苷水解最佳条件为: 料液比 1:5, 水解温度 70℃、水解时间 2h, 在该条件下, 异硫氰酸酯得率约为 0.1365% (鲜重); Vc 对芥子苷酶有很强的激活作用; 11% NaCl 几乎能完全抑制芥子苷酶活性。该结论为山葵根茎风味物质的产生及提取和山葵深加工技术提供了理论基础。

参考文献:

[1] 姜子涛, 李荣, 等. 芥末中的辛辣物质—异硫氰酸酯成分的研究 [J]. 中国调味品, 1996(2): 30~32.

[2] 刘恒烈, 战广琴, 葛惠民. 油菜中 1-硫代葡萄糖苷总量分析 (简报) [J]. 安徽农业大学学报, 1994, 21(1): 37~40.

[3] 刘恒烈, 战广琴, 曹流俭. 油菜中硫代葡萄糖苷总量测定方法—内源酶法 [J]. 中国油料, 1994, 16(4): 46~49.

[9] Christensen D, Foged C, Rosenkrands I, et al. Trehalose preserves DDA/IDB liposomes and their adjuvant effect during freeze-drying [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, In Press.

[10] 刘占杰, 华泽钊, 陶乐仁. 不同保护剂浓度和不同降温速率对脂质体玻璃化转变温度的影响 [J]. 低温工程, 2000, 118(6): 1~5.

[11] Mohammed A R, Branwell V W, et al. Lyophilisation and sterilisation of liposomal vaccines to produce stable and sterile products [J]. Methods, 2006, 40: 30~38.

[12] 苏树强, 华泽钊, 丁志华. HB-1a 冻干脂质体粒径及其分布的研究 [J]. 中国医药工业杂志, 2004, 35(3): 154~157.

[13] Hincha Dirk K, Hagemann Martin. Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms [J]. Biochem J, 2004, 383(2): 277~283.