

番茄红素纳米脂质体的光谱研究

范远景, 易苗苗, 张必芳

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘要:目的: 制备番茄红素纳米脂质体, 并证明芯材番茄红素被壁材胆固醇与卵磷脂纳米脂质包埋。方法: 采用薄膜-超声法制备番茄红素纳米脂质体, 用傅立叶红外光谱(FTIR)、X射线衍射光谱(XRD)方法研究制备体光谱特征及分子表征。结果: FTIR、XRD对脂质体包裹前与后, 包裹与物理混合等图谱显示脂质体包裹体保持番茄红素的原有结构, 改善了番茄红素的物性状态, 并利用XRD衍射峰的特征估算晶粒尺度, 支持电镜观察番茄红素纳米脂质体的平均粒径小于40nm的结果。结论: 本实验制得粒径较小、分布均匀的微球体番茄红素纳米脂质体, 芯材番茄红素被成功的包裹在以胆固醇与卵磷脂的纳米脂质里。

关键词: 番茄红素; 纳米脂质体; 傅立叶变换红外光谱; X射线衍射

Spectroscopic Properties of Lycopene Nanoliposomes

FAN Yuan-jing, YI Miao-miao, ZHANG Bi-fang

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: FTIR spectroscopy and X-ray diffraction pattern were used to analyze the spectroscopic properties of lycopene nanoliposomes prepared by conventional rotary-evaporated film-ultrasonication method. The native structure of lycopene was remained in lycopene nanoliposomes and its water solubility was improved in the nanoliposomal delivery system. The particle size of lycopene nanoliposomes was found to be below 40 nm. The results demonstrate that lycopene has been successfully encapsulated into nanoliposomes which have low particle size and are homogeneous.

Key words: lycopene; nanoliposomes; FTIR spectroscopy; X-ray diffraction

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)17-0048-04

番茄红素是人体不能合成的一种类胡萝卜素, 具有很强的抗氧化性, 它对人体具有防癌、抗癌, 提高机体免疫力和延缓衰老等生理学效应。由于番茄红素不溶于水, 体内消化吸收时较大程度地依赖于油脂或借助于脂肪代谢, 通常经膳食吸收利用程度较低。以纳米脂质体作为输送载体的番茄红素可以促进其体内吸收, 提高体内的生物抗氧化效应。采用旋转薄膜-超声法获得了平均(49.88 ± 0.19)%包封率、(0.86 ± 0.10)%载药量的番茄红素脂质纳米制备体。通过电镜观察测定结果显示制备的番茄红素纳米脂质体粒径分布在40~50nm范围内, 满足选择性地浓集于肝脏靶部位被动靶向的微尺度要求^[1]。在此基础上, 本实验将进一步进行番茄红素脂质纳米体的表征学研究, 分析探讨纳米尺度的晶粒组成、性质、性能及结构特征。利用红外光谱分析、紫外光谱分析方法研究空白脂质体、载药脂质体组成和结构的表征与鉴别, 用X射线衍射分析方法(X-Ray Diffraction, XRD)分析脂质体物质的构象、形态, 纳

米粒的结构及物相鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

番茄红素粉末(纯度90%) 华北制药集团; 卵磷脂 上海源聚生物科技有限公司。

胆固醇 中国惠兴生化试剂; 石油醚 汕头市西捷化工厂有限公司; 氯仿 上海中试化工总公司。

1.2 仪器与设备

Spectrum100 傅立叶变换红外光谱仪 美国PE公司; D/Max-rB型X射线衍射仪 日本理学公司; LGJ-12冷冻干燥机 北京松源兴科技发展有限公司; 扫描电镜(FEI Sirion-200 field emission scanning electron microscope) 美国FEI公司。

1.3 X射线衍射仪实验条件

CuK辐射; 40kV × 100mA; 狭缝参数分别为DS狭缝1°、SS狭缝1°、RS狭缝0.3mm; 石墨单色器; 连

收稿日期: 2009-06-03

作者简介: 范远景(1958—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品科学。E-mail: swf89105@mail.hf.ah.cn

续扫描, 扫描速度 $4^\circ/\text{min}$, 步长 0.02° 。

1.4 方法

1.4.1 番茄红素纳米脂质体制备工艺

卵磷脂、胆固醇、番茄红素溶于三氯甲烷中, 恒温旋转减压成膜, 继续旋转约 10min 以除去残余溶剂, 加入水合介质和玻璃小珠, 恒温旋转洗膜形成脂质体混悬液, 冰水浴探针式超声 90 次(超声频率 200Hz , 每次 5s , 间歇 5s), 过 $0.8\mu\text{m}$ 的微孔滤膜以除去可能泄漏的药物和超声过程中探头释放的金属粒子即得番茄红素纳米脂质体, 制备得到微红色冻干粉, 作为电镜、红外、XRD 等分析样品。

1.4.2 番茄红素纳米脂质体的扫描电镜形态观察

将制备好的番茄红素纳米脂质体冷冻干燥后, 取少量干燥的固体粉末分散在导电胶上面, 用扫描电镜观察。

1.4.3 FTIR 分析

分别取干燥的番茄红素、空白纳米脂质体和番茄红素纳米脂质体 1.5mg , 在玛瑙研钵中研细, 加入 $100\sim 200\text{mg}$ 磨细干燥的溴化钾粉末, 混和均匀后, 加入压膜内, 在压力中边抽气边加压, 制成一定直径及厚度的透明片。然后将此薄片放入仪器光束中进行测定。

1.4.4 XRD 分析

分别取干燥的番茄红素、空白纳米脂质体和番茄红素纳米脂质体, 放入玻璃凹槽里铺平进行测试。测试条件: 扫描角度从 5° 到 $60^\circ(2\theta)$, 扫描靶 $\text{Cu}, \text{K}\alpha 1$ 1.5406 , 管压 40kV , 管流 100mA , 扫描速度 $4^\circ/\text{min}$ 。

2 结果与分析

2.1 番茄红素纳米脂质体基本形态

外观: 番茄红素纳米脂质体为透明带粉红色乳光的番茄红素纳米脂质体胶体溶液, 冻干粉外观呈红色膨松粉末; 分散性: 取番茄红素纳米脂质体冻干粉适量, 加入水中, 轻摇后, 迅速分散于水中, 形成均一的脂质体混悬液。番茄红素具有强亲脂性, 制成脂质包裹体后增加了水中溶解度。

2.2 番茄红素纳米脂质体电镜形态观察

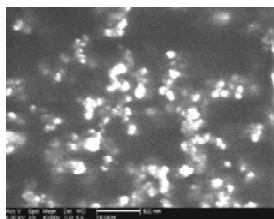


图1 放大 4×10^4 的番茄红素纳米脂质体的扫描电镜

Fig.1 SEM image of lycopene nanoliposomes (magnification: 4×10^4)

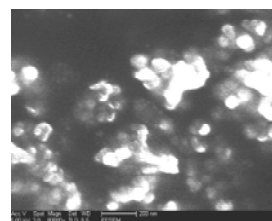


图2 放大 8×10^4 的番茄红素纳米脂质体的扫描电镜

Fig.2 SEM image of lycopene nanoliposomes (magnification: 8×10^4)

在扫描电镜下观察, 放大 4×10^4 、 8×10^4 倍的番茄红素纳米脂质体的扫描电镜照片(图1、2)显示, 脂质体分布均匀、颗粒间彼此分散、独立、连续呈圆形或椭圆形微球体, 平均粒径小于 40nm , 结果分析请参阅文献[2]。

2.3 FTIR 分析结果

2.3.1 番茄红素的红外光谱图

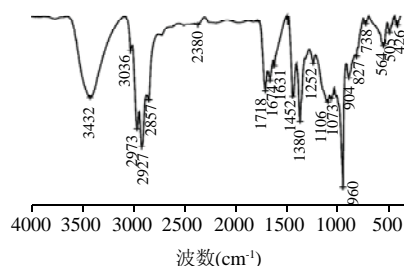


图3 番茄红素的红外光谱图

Fig.3 FTIR spectrum of lycopene

本实验得到番茄红素红外光谱特征与 Qiu 等^[3]、李伟等^[4]文献图谱一致。图3的番茄红素红外光谱图特征频率显示出番茄红素典型的类似共扼聚乙烯结构。 3432cm^{-1} 是番茄红素用 KBr 压片时含有水蒸气的特征吸收峰, 3036cm^{-1} 是 $=\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动吸收峰, 2927cm^{-1} 是 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动吸收峰, 2973cm^{-1} 是不对称甲基振动吸收峰, 2857cm^{-1} 是对称亚甲基伸缩振动吸收峰, 1674cm^{-1} 是 $\text{C}=\text{C}$ 伸长振动吸收峰, 1380cm^{-1} 处出现单峰是含甲基的一个特征, 960cm^{-1} 是反式单烯双取代的 $\text{R}_1\text{HC}=\text{CR}_2\text{H}$ (反式)摇摆振动吸收峰, 690cm^{-1} 无强吸收峰, 表明番茄红素的实验样品没有顺式结构存在。所测样品的 IR 图谱显示, 在 1640cm^{-1} 处有一 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 的特征伸缩振动峰, 这是番茄红素分子结构的基本特征。比较周丹红等^[5]皂化法提取番茄红素晶体 FTIR 图谱, 本品番茄红素含有一定的杂质。

2.3.2 空白纳米脂质体的红外光谱图

空白脂质纳米体主要由胆固醇与磷脂组成, 图4显示了空白纳米脂质体红外光谱图的特征频率, 3344cm^{-1} 是空白脂质中胆固醇的 $-\text{OH}$ 与压片时水蒸气缔合的特

征吸收峰, 2927cm^{-1} 是 C-H 伸缩振动吸收峰, 2857cm^{-1} 是 CH_2 对称伸缩, 1743cm^{-1} 是卵磷脂中 C=O 伸缩, 1467cm^{-1} 是 CH_2 剪切振动(六方晶系), 1158cm^{-1} 是卵磷脂中 CO-C-O 反对称伸缩, 1080cm^{-1} 是卵磷脂中 PO_2^- 对称伸缩(为 C-O- PO_2^- 特征振动频率)^[6-7], 988cm^{-1} 是 $\text{RCH}=\text{CH}_2$ 特征吸收峰, 886cm^{-1} 是 $\text{RRC}=\text{CHR}$ 特征吸收峰^[8]。其中, 胆固醇的特征吸收主要为 1467 、 1378 、 1080 和 530cm^{-1} ^[9]。

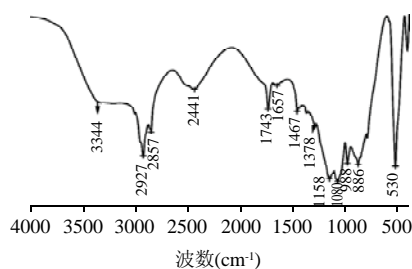


图4 空白纳米脂质体的红外光谱图
Fig.4 TIR spectrum of blank nanoliposomes

2.3.3 番茄红素纳米脂质体的红外光谱图

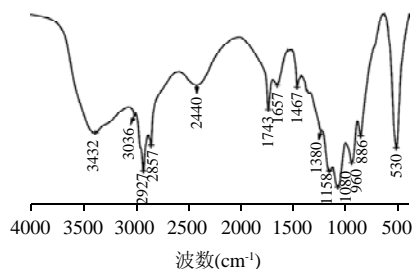


图5 番茄红素纳米脂质体红外光谱图
Fig.6 TIR spectrum of a physical mixture of lycopene, cholesterol and lecithin

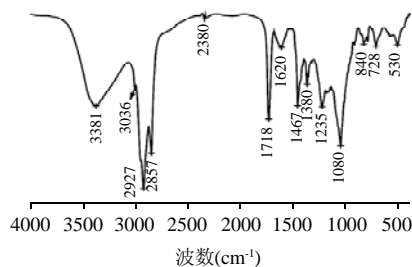


图6 番茄红素、胆固醇与卵磷脂物理混合物的红外光谱图
Fig.6 NIR spectrum of mixture with lycopene, cholesterol and lecithin

根据上述吸收特征分析, 图5的包埋药物纳米脂质体显示出番茄红素官能团区基团的特征吸收峰(如 3036 、 1380 、 960cm^{-1}), 这一现象与番茄红素、胆固醇、卵磷脂物理混合后的红外图谱(图6)比较有较大的差异, 混

合物图谱不仅可以显示出番茄红素官能团区基团的一些特征吸收峰, 也显示出指纹区($1300\sim 600\text{cm}^{-1}$)的一些吸收峰; 包埋体的红外图谱中只有 530cm^{-1} (胆固醇特征峰)有强的吸收峰以外, 受包埋的影响, 指纹区域的特征吸收峰消失。指纹区是因变形振动产生的光谱, 当分子结构稍有不同时, 其吸收峰在本区域即可表现出细微的差异; 此外在 690cm^{-1} 也没有吸收峰, 推测番茄红素仍以反式结构存在。

2.4 XRD 分析结果

2.4.1 番茄红素的 XRD 图谱

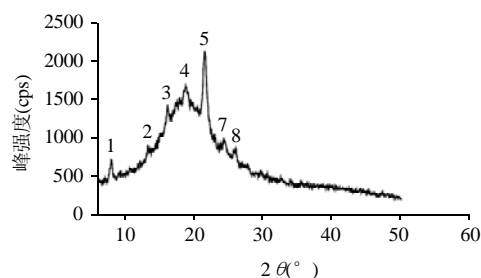


图7 番茄红素的 XRD 图谱
Fig.7 X-ray diffraction pattern of lycopene

X 射线衍射分析是研究 X 射线、晶体、化合物结构三者之间关系。用于食品、药学研究中, 根据不同分析目的, X 射线衍射技术包括单晶 X 射线衍射结构分析与粉末 X 射线衍射成分分析。图7是番茄红素单体 XRD 图谱, $5^\circ\sim 50^\circ$ 范围内只有 1、2、3、4、5、6、7 分别对应 8.06° 、 13.32° 、 16.18° 、 18.76° 、 21.54° 、 24.30° 和 26.02° 处有衍射峰。 $10^\circ\sim 40^\circ$ 之间有较弱的衍射峰包, 在 18.76° 位置的衍射峰最强, 21.54° 处有一尖峰(即 5 号衍射峰), 出现这种弥散的衍射峰包, 可以推测番茄红素实验样品以无定形非晶体结构为主^[10]。

2.4.2 空白脂质体的 XRD 图谱

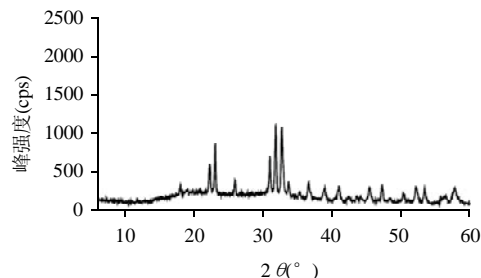


图8 空白脂质体的 XRD 图谱
Fig.8 X-ray diffraction pattern of blank nanoliposomes

胆固醇和卵磷脂组成空白脂质体(图8)的粉末 XRD 图谱中 X 射线衍射峰十分清晰, 图示衍射角(2θ)在 18.04° 、 22.28° 、 23.08° 、 25.92° 、 31.00° 、 31.84° 、 32.72° 、 33.70°

等处为结晶峰,但是也存在无定型区域对应的较大包块,说明脂质体粉末为半晶型粉末。

2.4.3 番茄红素纳米脂质体的 XRD 图谱

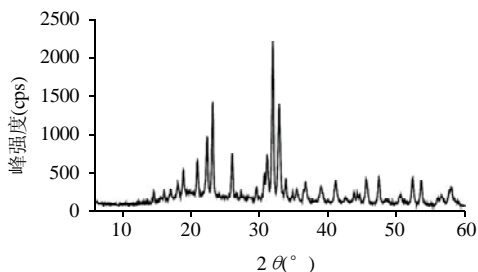


图9 番茄红素纳米脂质体 XRD 图谱

Fig.9 X-ray diffraction pattern of lycopene nanoliposomes

图9为包裹番茄红素的脂质体, XRD 谱图基线平稳、衍射峰窄且强度高,说明结晶度高、规整性好。图9中在番茄红素纳米脂质体中番茄红素出现的晶态衍射峰分别对应 2θ 在 13.32° 、 16.18° 、 18.76° 、 21.54° 处有衍射峰,而 8.06° 处衍射峰消失。为进一步分析鉴别,现将番茄红素(图10中的A线)、纳米脂质体(图10中的B线)与空白脂质体(图10中的C线)XRD 合并对照, 2θ 在 $10^\circ\sim 30^\circ$ 范围内显示出番茄红素的衍射特征峰, $30^\circ\sim 50^\circ$ 大都为卵磷脂与胆固醇衍射特征峰。

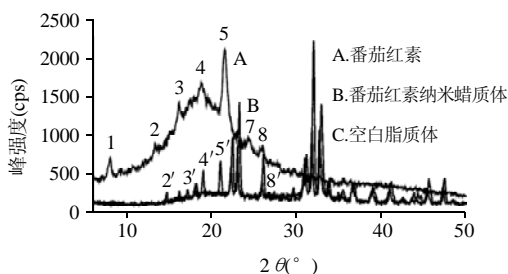


图10 番茄红素、空白脂质体和番茄红素纳米脂质体的 XRD 图谱

Fig.10 X-ray diffraction patterns of lycopene, blank nanoliposomes and lycopene nanoliposomes

2.4.4 Scherrer 公式计算晶粒尺寸

根据 X 射线衍射理论,在晶粒尺寸小于 100nm 时,随晶粒尺寸的变小衍射峰宽化变得显著,考虑样品的吸收效应及结构对衍射线型的影响,样品晶粒尺寸可以用 Debye-Scherrer 公式计算。

$$D_{hkl} = \frac{k\lambda}{\beta \cdot \cos \theta}$$

式中: D_{hkl} 为沿垂直于晶面(hkl)方向的晶粒直径; k 为 Scherrer 常数(通常为 0.89); λ 为入射 X 射线波长(Cuka 波长为 0.15406nm); θ 为布拉格衍射角($^\circ$); β 为衍射峰的半高峰宽(FWHM)。

以下利用 XRD 文件转换软件、jade 5.0 软件和 XRD 计算软件联合运算,对 XRD 图谱(图7)中的 39 个衍射峰分别计算后得到番茄红素纳米脂质体产物的 D_{hkl} 平均值为 $(27.21 \pm 9.7194)\text{nm}$ (最小值为 11.83462 ,最大值为 54.92945)。通过计算产物的 D_{hkl} 值与电镜测量结果相比偏小,通常采用 Scherrer 公式估算的晶粒尺寸会比实际数据要小^[11]。但是比较用同样方法计算得到图8的空白脂质体晶粒尺度 $(25.76 \pm 8.083)\text{nm}$,最小值为 11.69009 ,最大值为 42.75103 存在尺度变化的趋势。

3 讨论

20 世纪 60 年代初, Banham 发现并制备了脂质体,70 年代开始人们将其作为药物的载体并用于控制药物的释放,因其具有制备简单、无毒、无免疫原性、易实现药物的靶向性等特点而日益受到人们的重视。本实验利用脂质体包埋番茄红素制备的纳米体进行了扫描电镜与光谱学的表征与分析,可以得到如下结果:以纳米脂质体为载体包埋亲脂性番茄红素改善了其水溶性,制备体形成分散性良好粉末;制备体通过傅立叶变换红外光谱分析,被脂质包埋的番茄红素仍然保持包埋前的反式结构不变,官能团区基团的特征吸收峰仍能保留,但是指纹区的红外特征吸收峰消失,此结果对于鉴定芯材番茄红素被包埋在胆固醇和卵磷脂为壁材的脂质体内有着重要意义;制备体的 X 射线衍射分析显示番茄红素的包埋前、后的物相变化,根据 XRD 图谱表示,包埋前的番茄红素(90% 纯度)是无定形非晶体结构为主的,包埋后受到番茄红、卵磷脂和胆固醇物质分子之间的相互作用或影响,可能形成亚微晶结构或微晶结构。这就意味着脂质包埋体无需番茄红素的高纯度或晶体制备,可以大幅度的降低制造脂质包埋体的成本。

参考文献:

- [1] 王黎. 肝靶向给药系统的研究[J]. 国外医学: 药学分册, 2001, 28(3): 160-164.
- [2] 范远景, 张必芳, 刘艳. 番茄红素纳米脂质体的制备研究[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 238-241.
- [3] QIU W F, JIANG H H, WANG H F, et al. Effect of high hydrostatic pressure on lycopene stability[J]. Food Chemistry, 2006, 97: 516-523.
- [4] 李伟, 肖刚, 丁霄霖. 番茄红素标准样的制备及定性定量分析[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(9): 29-33.
- [5] 周丹红, 史铁钧, 翟林峰, 等. 皂化法提取番茄红素及其晶体的表征[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(6): 41-43.
- [6] 高鸿宾. 有机化学[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 156.
- [7] 许时婴, 张晓鸣, 夏书芹, 等. 微胶囊技术: 原理与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 103.
- [8] 朱淮武. 有机分子结构波谱解析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 247.
- [9] 曾繁清, 海汇, 金利凡. 人体胆结石红外光谱的比较分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2001, 21(3): 314-316.
- [10] 张泽南. X 射线衍射在纳米材料物理性能测试中的应用[J]. 浙江工业大学学报, 2002, 30(1): 31-35.
- [11] 桑文斌, 彭小雷, 史伟民, 等. 溶胶络合转化法制备 CdS 纳米微晶及其特性研究[J]. 功能材料, 2000, 31(5): 508-512.