

УДК 577.115.7

SEPARATION OF LIPOSOMES FROM PHOSPHOLIPID ALCOHOL EXTRACT OF FOLLICULAR CHICKEN EGGS AND DEFINITION OF THEIR CHARACTERISTICS

V. Bondareva, V. Mank, A. Miroshnikov
National University of Food Technologies

Key words:

*Chicken follicular eggs
Extraction
Thin layer
chromatography
Liposomes
Ultrasound treatment*

ABSTRACT

This article describes the process of creation and studying by photon correlation spectroscopy of liposome fluid obtained from the lipid extract of the alcohol solution of chicken follicular eggs. The lipid extract was kept at low temperatures in order to transfer proteins, hydrocarbons and other minor compounds in precipitation and a maximum concentration of phospholipid in the supernatant parts of alcohol extract. Further work was carried out to obtain liposomes with the supernatant, which was separated into two parts. The first part of the method of column adsorption chromatography was cleared out of carotenoids, cholesterol, and a solution containing pure phosphatidylcholine, which was used to prepare liposomal liquid. The second part of the supernatant material, which contained a mixture of phospholipids, namely, phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine, were used to create liposomes without further purification.

Article history:

Received 08.008.2015
Received in revised form
09.09.2015
Accepted 23.09.2015

Corresponding author:

V. Bondareva
E-mail:
v.bond6995@gmail.com

ВИДІЛЕННЯ ЛІПОСОМ З ФОСФОЛІПІДНОГО СПИРТОВОГО ЕКСТРАКТУ ФОЛІКУЛЯРНИХ ЯЄЦЬ КУРЕЙ І ВИЗНАЧЕННЯ ЇХ ХАРАКТЕРИСТИК

В.Й. Бондарєва, В.В. Манк, О.М. Мірошников
Національний університет харчових технологій

У статті описано процес створення і дослідження методом фотонної кореляційної спектроскопії ліпосомальної рідини, отриманої з ліпідного екстракту спиртового розчину фолікулярних яєць курей. Ліпідний екстракт витримувався при низьких температурах з метою переведення білків, вуглеводнів та інших «мінорних» сполук в осаді й максимальної концентрації фосфоліпідів у надосадній частині спиртового екстракту. Подальші дослідження з отримання ліпосом проводилася з надосадною рідиною, яку поділяли на дві частини. Першу частину методом колонкової адсорбційної хроматографії звільняли від каротиноїдів, холестерину і отримували розчин, що містив чистий фосфатидилхолін, який використовували для отримання ліпосомальної рідини. Другу частину надосадної рідини, яка містила суміш фосфоліпідів — фосфатидилетаноламін і фосфатидилхолін, використовували для створення ліпосом без додаткового очищення.

Ключові слова: *фолікулярні яйця курей, екстракція, тонкошарова хроматографія, ліпосоми, ультразвукова обробка.*

Постановка проблеми. Сукупність фізико-хімічних і біологічних властивостей ліпосом (хімічна інертність, біосумісність, відсутність токсичних, антигенних властивостей та алергійних реакцій у відповідь на введення до організму) використовується як можливість цілеспрямованого транспортування внутрішньоклітинно активних речовин лікарських препаратів і біологічно-активних компонентів. З допомогою ліпосом були встановлені закономірності транспортування речовин крізь мембрану, вивчена взаємодія клітин та їх мембран з різними біологічно-активними компонентами. Здатність ліпосом інкапсулювати речовини з різними хімічними властивостями надає великі можливості для вирішення проблем фармацевтичної та косметичної промисловості, оскільки ліпосоми, отримані з нативних фосфоліпідів, на відміну від ліпосом із штучних полімерних оболонок, стимулюють репаративні процеси, що було встановлено при досліджах на бактеріях, макрофагах, клітинах шкіри, клітинах печінки та легенів [1, 2].

Також при використанні ліпосом як носія для спрямованого руху біологічно-активних компонентів встановлено такі переваги: біологічна сумісність з організмом людини, нівелювання токсичного впливу транспортованих компонентів за рахунок наявності ліпідної захисної мембрани, підконтрольне звільнення сполук, пролонгованість впливу препаратів, що потрапили до клітин шкіри або до організму, відсутність алергічної дії, спрямований рух до тканин або клітин-мішеней [3]. Зважаючи на вищевикладене, створення та дослідження ліпосомних форм з різних біологічних матеріалів є актуальною проблемою сьогодення.

Найбільш актуальною сировиною для одержання лецитинів, які слугують вихідним матеріалом для створення ліпосом, є рослинні лецитини та курячі яйця. Попитом також користується соєвий лецитин, який має низьку комерційну ціну. Але його біологічні властивості значно нижчі, ніж у лецитині, отриманому з курячих яєць, який має високі біологічно-активні характеристики, проте є дорогим харчовим продуктом. До того ж білкова оболонка, яка оточує жовток у курячих яйцях, уповільнює проведення екстракції, що з технологічної точки зору є неприйнятним. Зважаючи на це, для отримання якісного лецитину було вирішено використати такий біологічний матеріал, як фолікулярні яйця курей. Ця сировина більш дешева порівняно з курячими яйцями, а відсутність білкової оболонки у фолікулярних яйцях значно спрощує проведення процесу екстракції для отримання ліпідних екстрактів фолікулярних яєць курей.

Мета статті полягає в отриманні та дослідженні двох ліпосомальних розчинів із надосадних рідин ліпідних екстрактів фолікулярних яєць курей, які містили чистий фосфатидилхолін і суміш фосфатидилетаноламіну та фосфатидилхоліну.

Виклад основного матеріалу. Для одержання ліпосомального розчину використовували фолікулярні яйця курей. У результаті екстракції цього біологічного матеріалу етиловим спиртом отримували спиртовий ліпідний

екстракт, який методом центрифугування поділяли на осад і надосадну рідину. Надосадна рідина поділялась на дві частини.

У першій (I) методом тонкошарової хроматографії визначили наявність таких фосфоліпідів, як фосфатидилхолін і фосфатидилетаноламін [4]. Другу частину надосадної рідини (II) методом адсорбційної колонкова хроматографії звільняли від каротиноїдів, холестерину, нейтральних ліпідів та отримували чистий фосфатидилхолін [5].

Для проведення колонкова хроматографії надосадну рідину упарювали та розчиняли у хлороформі. Хлороформний ліпідний екстракт дозовано налива-ли на поверхню сорбенту Al_2O_3 . Після повної адсорбції екстракту сорбентом крізь колонку пропускали елюент — суміш хлороформу та метанолу у співвідношенні 9:1. Елюент збирали порціями і кожну з 10 отриманих фракцій перевіряли за допомогою тонкошарової хроматографії (ТШХ) на наявність ліпідів і фосфоліпідів. Отримані дані представлені на рис. 1.

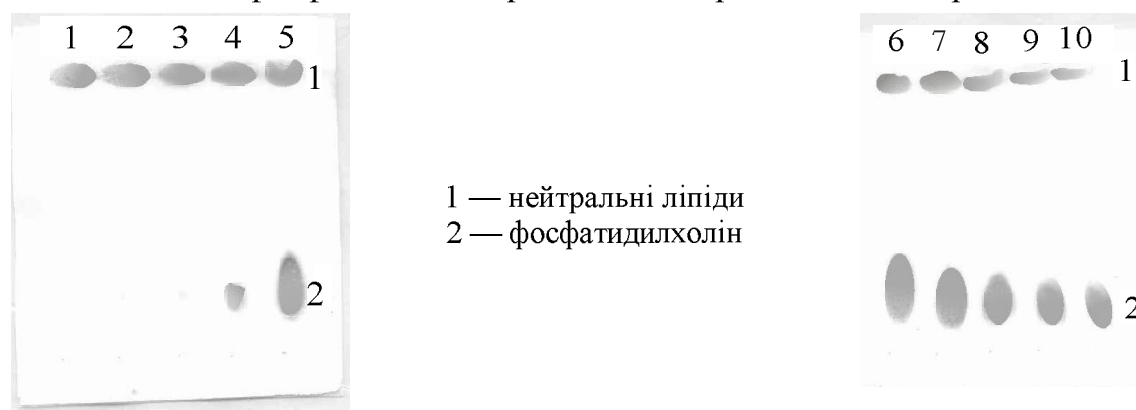
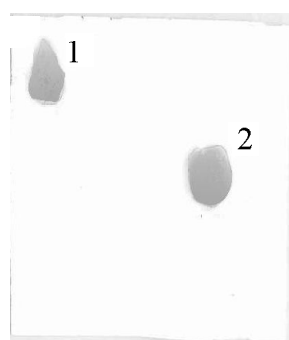


Рис. 1. Одномірна тонкошарова хроматографія (ТШХ) фосфоліпідів (ФЛ) у системі розчинника (хлороформ:метанол:вода, 65:25:4)



1 — сліди дифосфатидилгліцерину
2 — фосфатидилхолін

Рис. 2. Двомірна тонкошарова хроматографія складу фосфоліпідів надосадної рідини ліпідного спиртового екстракту фолікулярних яєць курей

Для індивідуального визначення складу ФЛ, виявлених при проведенні ТШХ, була проведена двомірна хроматографія ліпідного екстракту за методом Васьковського [6—8]. Визначення проводилося у системі розчинників I та II (I система — хлороформ:метанол:бензол:аміак у співвідношенні 65:27:10:6, II система — хлороформ:метанол:бензол:ацетон:оцтова кислота:вода у співвідношенні 70:35:10:5:4:1). Було виявлено наявність слідів дифосфатидилгліцерину та фосфатидилхоліну (рис. 2).

Для одержання розчинів з ліпосомними формами надосадні рідини (I) та (II) піддавали ультразвуковій обробці ($t=5^\circ C$, частота 22 кГц, термін обробки — 1 хв) [9—10].

Розмір отриманих ліпосом у розчинах (I) та (II) досліджували методом фотонної кореляційної спектроскопії на лазерному кореляційному спектро-

метрі “ZetaSizer-3” (Malvern Instrument, Велика Британія), обладнаного He-Ne лазером ЛГН-111 ($P = 25$ мВт, $\lambda = 633$ нм) [11—12]. Діапазон вимірювання розмірів частинок становить від 1 нм до 20 мкм.

Реєстрацію та статистичну обробку лазерного випромінювання, розсіяного від водної ($n=1.33$) суспензії ліпосом, проводили п'ятиразово протягом 60 с при температурі $+22$ °С під кутом розсіювання 90° . Отримані результати вимірювань обробляли за допомогою сервісної комп'ютерної програми PCS-Size mode v1.61.

Дані досліджень ліпосомних форм у надосадній рідині (I) із вмістом суміші фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну наведені на рис. 3.

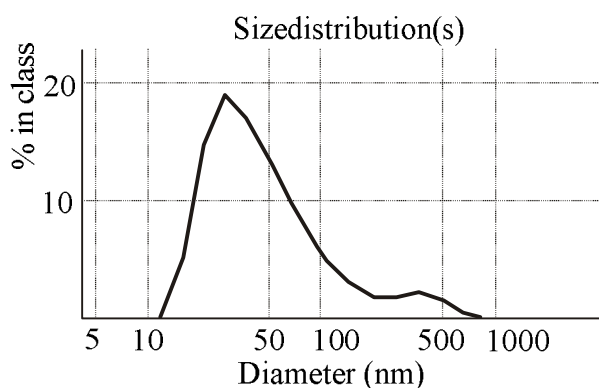


Рис. 3. Розподілення ліпосом різних розмірів у надосадній рідині (I) з вмістом суміші фосфатидилетаноламіну і фосфатидилхоліну, отримано на підставі даних табл. 1

Таблиця 1. Середні значення кількісного вмісту ліпосом у розчині з вмістом суміші фосфатидилетаноламіну і фосфатидилхоліну

Peak	Area	Mean	Width
Peak Analysis by intensity			
1	100,0	195,5	328,5
Peak Analysis by volume			
1	92,4	50,1	50,5
2	7,6	348,6	277,4
Peak Analysis by number			
1	100,0	26,5	17,5

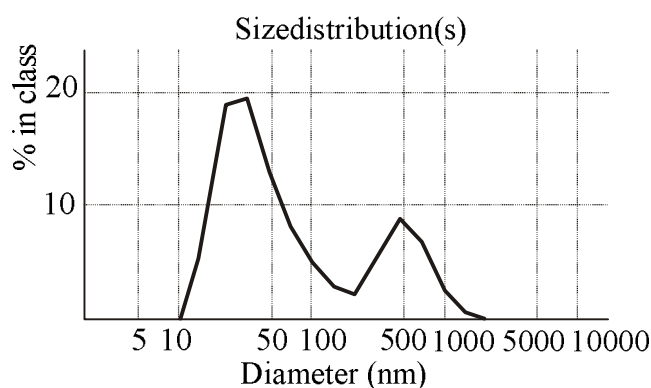


Рис. 4. Розподілення ліпосом за розмірами в надосадній рідині (II) з вмістом фосфатидилхоліну

Таким чином, експериментальні дані дають змогу стверджувати, що у розчині з вмістом суміші фосфатидилетаноламіну та фосфатидилхоліну в діапазоні від від 12 до 200 нм зосереджено 92,4 % ліпосом з розміром 50,1 нм, а в діапазоні від 200 нм до 800 нм — 7,6 %, середній розмір яких складає 348,6 нм (рис. 3).

Дані досліджень розмірів ліпосомних форм у надосадній рідині (II) з вмістом фосфатидилхоліну наведено на рис. 4, отримано на підставі даних табл. 2.

Таблиця 2. Середні значення кількісного вмісту ліпосом у розчині з вмістом фосфатидилхоліну

Peak	Area	Mean	Width
Peak Analysis by intensity			
1	100.0	309.6	593.1
Peak Analysis by volume			
1	74.8	49.2	45.9
2	25.2	541.0	546.4
Peak Analysis by number			
1	100.0	26.6	21.5

Таким чином, у розчині з вмістом фосфатидилхоліну, отриманому додатковим очищенням методом колонкової адсорбційної хроматографії, розподілення ліпосом за об'ємом у діапазоні від 11 до 200 нм знаходиться 74,8 % ліпосом з розміром 49,2 нм. У діапазоні від 200 нм до 2000 нм відсотковий вміст ліпосом з розміром 541,0 нм складає 25,2 %.

Висновки

У розчині (I) з вмістом суміші фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну в діапазоні від від 12 до 200 нм зосереджено 92,4 % ліпосом з розміром 50,1 нм, а в діапазоні від 200 нм до 800 нм — 76 %, середній розмір яких складає 348,6 нм.

У розчині (II) з вмістом фосфатидилхоліну в діапазоні від 11 до 200 нм зосереджено 74,8 % ліпосом з розміром 49,2 нм, а в діапазоні від 200 нм до 2000 нм — 25,2 % ліпосом, середній розмір яких становить 541,0 нм.

На підставі отриманих експериментальних даних при аналізі ліпосомальних розчинів (I) та (II) встановлено, що показники розміру ліпосом у розчинах збігаються.

Отже, найбільш доцільним для використання у косметичній та інших галузях є ліпосомальний розчин, який містить суміш фосфатидилхоліну й фосфатидилетаноламіну. Варто підкреслити, що розчин був отриманий без використання таких шкідливих речовин, як хлороформ і метанол.

Література

1. *Gregoriadis G.* Drug entrapment in liposomes // *FEBS Lett.* — 1973. — Vol. 36, # 3. — P. 292—296.
2. *Посте Дж.* Взаимодействие липидных везикул (липосом) с клетками в культуре и их использование как переносчиков лекарств и макромолекул / *Дж. Посте* // *Липосомы в биологических системах.* — М.: Медицина, 1988. — С. 107—155.
3. *Bangham A.D., Horne R.W.* Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope // *J. Mol. Biol.* — 1965. — Vol. 8. — P. 660—664.
4. *Бондарева В.Й.* Визначення фосфоліпідів та білка в ліпідному екстракті, отриманому із спиртового розчину фолікулярних яєць курей / *В.Й. Бондарева, В.В. Манк, О.М. Мірошников* // *Наукові праці Національного університету харчових технологій.* — 2014. — Т. 20, № 5. — С. 199—203.
5. *Мотл О.* Адсорбционная колоночная хроматография / *О. Мотл, Л. Новотный* // *Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам.* — М.: Мир, 1982. — С. 273.

6. Vaskovsky V.E. A universal reagent for phospholipids analysis / V.E. Vaskovsky, K.G. Kostetsky, J.M. Vasendin // *Chromatogr.* — 1975. — Vol. 114, # 1. — P. 645—647.
7. Veronika R. Practical High-Performance liquid chromatography/ R. Veronika Veyer // John Wiley&Sons. — 2013. — P. 432.
8. Cavazzini A., Pasti L., Massi A., Marchetti N., Dondi F. Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: A review // *Analytica Chimica Acta.* — 2011. — V. 706, Issue 2. — P. 205—222.
9. Кузякова Л.М. Методологические подходы и разработка технологии липосомальных лекарственных и лечебно-профилактических препаратов: автореф. дис. на соиск. науч. степени д-ра фарм. наук / Л.М. Кузякова. — Пятигорск, 2000. — 20 с.
10. Gregoriadis G. Liposome Technology / Gregoriadis Gregory // The School of Pharmacy University of London. — New York, London, 2007. — 422 p.
11. Petrov E.P., Schwille P. State of the art and novel trends in fluorescence correlation spectroscopy, Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II: Bioanalytical and Biomedical Applications // Springer Berlin Heidelberg. — 2008. — Vol. 6. — P. 145—197.
12. Rigler R., Elson E.L. Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Applications. — Springer, Berlin, 2001. — 487 p.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИПОСОМ ИЗ ФОСФОЛИПИДНОГО СПИРТОВОГО ЭКСТРАКТА ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ ЯИЦ КУР И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ ХАРАКТЕРИСТИК

В.И. Бондарева, В.В. Манк, А.Н. Мирошников

Национальный университет пищевых технологий

В статье описан процесс создания и исследования методом фотонной корреляционной спектроскопии липосомальной жидкости, полученной из липидного экстракта спиртового раствора фолликулярных яиц кур. Липидный экстракт выдерживался при низких температурах с целью перевода белков, углеводов и других «минорных» соединений в осадки и максимальной концентрации фосфолипидов в надосадочной части спиртового экстракта. Дальнейшая работа по получению липосом проводилась с надосадочной жидкостью, которую разделяли на две части. Первую часть методом колоночной адсорбционной хроматографии освобождали от каротиноидов, холестерина и получали раствор, содержащий чистый фосфатидилхолин, который использовали для получения липосомальной жидкости. Вторую часть надосадочного вещества, которая содержала смесь фосфолипидов — фосфатидилэтанолламин и фосфатидилхолин, использовали для создания липосом без дополнительной очистки.

Ключевые слова: *фолликулярные яйца кур, экстракция, тонкослойная хроматография, липосомы, ультразвуковая обработка.*