

АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ ТАДЖИКИСТАН

ИНСТИТУТ ХИМИИ им. В.И. НИКИТИНА

На правах рукописи

БОБОДЖОНОВА ГУЛМИРА НАЗИРОВНА

**ПОЛУЧЕНИЕ И ВОДОПОГЛОЩАЮЩАЯ
СПОСОБНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ
РАСПАДА ПРОТОПЕКТИНА КОРЗИНКИ
ПОДСОЛНЕЧНИКА**

02.00.04 – физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата технических наук

Научные руководители:

Доктор химических наук,
академик АН РТ, профессор
Д.Х. Халиков

Доктор технических наук,
доцент Р.М. Горшкова

ДУШАНБЕ 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 3 |
| ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР..... | 9 |
| 1.1 Общие сведения о природных и синтетических полимерных гидрогелях | 9 |
| 1.2 Природные полимеры – основа для получения гидрогелей..... | 17 |
| 1.3. Практическое применение гидрогелей | 30 |
| ГЛАВА 2 МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ | 36 |
| 2.1. Сбор и подготовка исходного сырья..... | 36 |
| 2.2. Характеристика реагентов и рабочих растворов | 36 |
| 2.3. Методы гидролиз-экстракции растительного сырья..... | 36 |
| 2.4 Очистка пектиновых веществ | 38 |
| 2.5. Количественные методы анализа функциональных групп пектиновых веществ | 38 |
| 2.9. Определение степени набухания, | 40 |
| растворимости и зольности пектиновых полисахаридов | 40 |
| 2.10. Карбазольный метод определения уронидных составляющих пектиновых веществ | 41 |
| 2.11. Количественное определение содержания кальция в макромолекулах пектина | 42 |
| 2.12. Определение сорбционной активности пектиновых полисахаридов | 43 |
| 2.13. Определение уоновых кислот с помощью мета-гидроксидифенильного метода..... | 46 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ | 48 |
| 3.1. Влияние кислотности раствора, фонового электролита и скорости потока на гидролиз-экстракции корзинки подсолнечника в динамическом режиме..... | 48 |
| 3.2. Набухаемость гидрогелей на основе пектиновых полисахаридов корзинки подсолнечника в воде | 61 |
| 3.3 Переход гидрогель-раствор в водной системе пектиновых полисахаридов корзинки подсолнечника | 67 |
| 3.4 Некоторые аспекты практического использования компонентов распада протопектина корзинки подсолнечника | 73 |
| 3.5. Алкопротекторное действие олигосахаридов | 77 |
| Выводы | 79 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 81 |
| Список литературы | 82 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ | 95 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. При разработке современных технологий получения пектиновых полисахаридов из вторичных ресурсов пищевой промышленности основное внимание направлено на увеличение выхода целевых продуктов и создание условий технологического процесса, приводящих к возрастанию содержания уронидных составляющих в составе мономерных звеньев пектиновых макромолекул. Как выход, так и уронидные составляющие пектинов и их производных, с одной стороны, зависят от источника сырья, а с другой – от способа проведения гидролиз-экстракции в статическом или динамическом режимах, а также от заданных физико-химических параметров данного процесса. В обоих режимах, в качестве главных целевых продуктов выделяются две фракции: водонабухающая – гидрогель или микрогель (МГ), и водорастворимая – пектиновые вещества (ПВ). Важнейшими физико-химическими параметрами процесса гидролиз-экстракции, способными регулировать соотношение компонентов распада протопектина (МГ и ПВ), их состав, структуру, молекулярно-массовые характеристики и свойства являются: рН, ионная сила раствора, температура, давление, а при проведении экстрагирования в динамическом режиме появляется дополнительный фактор – скорость потока гидролизующего раствора. В связи с этим выявление возможности непосредственного управления физико-химическими характеристиками и свойствами пектиновых полисахаридов путём регулирования перечисленных параметров процесса их получения, представляет собой актуальную задачу.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение воздействия режима и физико-химических параметров процесса гидролиз-экстракции на выход и моносахаридный состав компонентов распада протопектина (ПП) растительных материалов и обусловленные им набухаемость и растворимость в воде. В связи с поставленной целью, задачами настоящего исследования были:

- проведение сравнительного исследования воздействия режима гидролиз-экстракции и физико-химических параметров (рН, ионная сила и скорость потока) на выход и моносахаридный состав компонентов реакции;
- изучение кинетики набухания микрогеля корзинки подсолнечника (КП) при различных рН, расчёт кинетических параметров набухания и реакций, сопровождающих этот процесс;
- изучение условий фазового перехода пектиновых гидрогелей в раствор и построение соответствующих фазовых диаграмм;
- исследование сорбционной способности пектиновых полисахаридов по отношению к билирубину в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Работа проводилась в соответствии с планом НИР Института химии им. В.И. Никитина АН Республики Таджикистан «Полимерные композиционные материалы на основе вторичных ресурсов растительных и пищевых продуктов» (ГР 0102ТД926 от 2011г.) и «Создание носителей лекарственных веществ и пищевых ингредиентов на основе биополимеров (ГР 0116ТJ00543 от 2016г).

Методы исследования и использованная аппаратура. В качестве объектов исследования использовались высушенные и измельченные корзинки подсолнечника (КП). Гидролиз-экстракцию протопектина КП в динамическом режиме (ДР) проводили в растворе HCl в колончатом экстракторе, при фиксированных значениях рН, температуры и скорости потока. На выходе из колонки экстракт, изолированный по 50 мл, нейтрализовали гидроксидом аммония и разделяли на три фракции: МГ, ПВ и ОС. В статическом режиме (СР) гидролиз КП проводили в закрытой системе в течение 60 мин, при T=85 °C, гидромодуле 1 : 20 и непрерывном перемешивании. Экстракт разделяли на фракции МГ, ПВ и ОС аналогично ДР.

Содержание остатков ГК определяли карбазольным методом, используя спектрофотометр, а количество свободных (Кс) и этерифицированных карбоксильных групп (Кэ), а также степень этерификации – титриметрическим методом.

Математическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартного пакета приложения программы Microsoft Excel.

Научная новизна работы:

- Проведены сравнительные исследования гидролиз-экстракции протопектина корзинки подсолнечника в статическом и динамическом режимах в зависимости от рН (1.05-5.6), ионной силы ($C(\text{NaCl})$ 0-3 моль/л) и скорости потока (3-6 мл/мин) гидролизующего раствора. Определены значения выхода и моносахаридного состава компонентов распада - микрогеля, пектиновых веществ и олигосахаридов.
- На основании сравнительного исследования значений выхода и моносахаридного состава продуктов гидролиз-экстракции КП в условиях статики и динамики, в области рН от 1.05 до 5.6, концентрации раствора NaCl от 0 до 3 моль/л выявлена оптимальная область варьирования параметров реакции, приводящих к увеличению выхода отдельных компонентов распада ПП КП – МГ, ПВ и ОС.
- Выявлена исключительная роль скорости потока гидролизующего раствора в условиях динамического режима, приводящего с ростом её значения, к симбатному увеличению содержания всех компонентов реакции распада ПП – МГ, ПВ и ОС. При этом суммарное содержание основных компонентов МГ и ПВ достигает до 30 процентов от массы исходного сырья.
- На основании данных кинетики и равновесного набухания микрогеля корзинки подсолнечника в широкой области рН продемонстрирована преимущественная роль полиэлектролитического эффекта в проявлении МГ высокой набухаемости в кислой и щелочной области, с минимальным значением в нейтральной области.
- Впервые на основании данных растворимости микрогеля определена концентрационная зависимость температуры фазового (T_c) и критического значения температуры (T_k) перехода, а также, с использованием уравнения

Флори, произведён расчёт θ -температуры раствора пектиновых полисахаридов в воде.

- **Практическая значимость работы.** Полученные данные могут являться базой для разработки высокопроизводительной технологии получения пектиновых полисахаридов и создания на основе микрогеля и пектиновых веществ подсолнечника новых нетоксичных биологически активных веществ для удаления из желудочно-кишечного тракта экзогенных и эндогенных токсинов, таких как ионы тяжёлых металлов, билирубина, а на основе олигосахаридов – эффективной алкопротекторной добавки, снижающей токсическое действие этилового спирта.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Результаты сравнительного изучения гидролиз-экстракции ПП КП в статическом и динамическом режимах в зависимости от рН, ионной силы и скорости потока гидролизующего раствора и оптимизации параметров реакции.
- Влияние скорости потока гидролизующего раствора на возрастание выходов всех компонентов реакций распада ПП – МГ, ПВ и ОС.
- Экспериментальные данные по кинетике и равновесному набуханию МГ КП в широкой области рН и выявлении роли полиэлектролитического эффекта в этом процессе
- Результаты растворимости МГ, определение концентрационной зависимости температуры фазового (T_c) и критического значения температуры (T_k) перехода, а также данные по расчёт θ -температуры раствора пектиновых полисахаридов в воде.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых научных журналах и 21 материал конференций.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были представлены и обсуждены на Международной конференции “Комплексный подход к использованию и переработке угля” (г.Душанбе, 2013 г), Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы

науки о полимерах» (г.Ташкент 2013 г), Шестой Всероссийской Каргинской Конференции «Полимеры — 2014» (г. Москва, 2014 г), Республиканской научно-практической конференции «Роль молодёжи в решении важнейших проблем в процессе глобализации» (г.Душанбе, 2014 г), Международной научно-практической конференции, посвящённой 1150-летию учёного-энциклопедиста, врача, алхимика и философа Абу Бакра Мухаммада ибн Закария Рази (г.Душанбе, 2015 г), Международной научно-практической конференции, XII Нумановских чтений «Состояние и перспективы развития органической химии в Республике Таджикистан» (г.Душанбе, 2015г), Международной научно-практической конференции, XII Нумановских чтений «Состояние и перспективы развития органической химии в Республике Таджикистан» (г.Душанбе , 2016г), Международной научно-практической конференции, VI Ломоносовские чтения «Актуальные проблемы естественных и гуманитарных наук» (Душанбе, 2016г), Международной конференции «Современные проблемы науки о полимерах» (г.Ташкент 2013 г), VII Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры — 2017» (г. Москва, 2017 г), XIV Нумановских чтениях с международным участием «Вклад молодых учёных в развитие химической науки» (г.Душанбе 2017).

Объём и структура работы. Диссертация представляет собой рукопись объёмом 108 страниц, состоит из введения и 3 глав, посвященных обзору литературы, экспериментальной части, результатов исследований и их обсуждения, выводов. Иллюстрирована 28 рисунками, 14 таблицами. Список использованной литературы включает 175 наименований.

Во введении обосновывается актуальность темы, изложены цель и научная новизна диссертации, практическая ценность и ее структура.

В литературном обзоре (Глава 1) изложены краткие сведения, имеющиеся в первоисточниках, о природных и синтетических полимерных гидрогелях, об их строении и способах получения из мономеров на основе полисахаридов, обладающих собственной биологической активностью и синтезу гидрогелей путём сшивки макромолекул. Анализируется возможность использования природных полимеров, таких как хитозан, альгиновая кислота и пектиновых

полисахаридов в качестве основы для синтеза гидрогелей. Представлены сведения о термообратимых гидрогелях. Специальный раздел посвящен практическому использованию гидрогелей. В этом разделе обращается внимание на использование гидрогелей в качестве трансдермальных систем доставки лекарственных препаратов, для создания парентальных систем, а также полимерных пролонгаторов. Рассмотрены вопросы применения гидрогелей в косметической и фармацевтической отрасли промышленности, а также недостатки гидрогелей, обнаруженные при их применении на практике.

В экспериментальной части (Глава 2) приведена характеристика исходных материалов, реагентов и рабочих растворов, методика проведения гидролиз-экстракции в условиях статического и динамического режимов, методика количественного анализа функциональных групп пектиновых полисахаридов, содержания звеньев галактуроновой кислоты (ГК), степени растворения и набухания.

В Главе 3 «Результаты и их обсуждение», приводятся экспериментальные данные, полученные автором при проведении гидролиз-экстракции в статическом и динамическом режимах. Обсуждается воздействие рН и скорости потока гидролизующего раствора на выход и качество компонентов распада протопектина корзинки подсолнечника. Показаны результаты изучения кинетики набухания гидрогелей на основе пектиновых полисахаридов корзинки подсолнечника в широкой области изменения рН раствора, на которых рассчитаны значения постоянных набухания в зависимости от рН и сделан вывод о природе узлов трёхмерной сетки, образованной ионами кальция, водородными связями, гидрофобными взаимодействиями цепей сополимера галактуроновой кислоты. Представлены также результаты исследования процесса перехода гидрогеля в раствор и построение соответствующих фазовых диаграмм. На основании обширных экспериментальных данных дана интерпретация полученных результатов в соответствии с целью и задачами исследований.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Общие сведения о природных и синтетических полимерных гидрогелях

Существует достаточно большое количество определений понятия «гидрогель» (ГГ) с точки зрения коллоидной химии, физики и реологии [1,2]. В химии высокомолекулярных соединений, в частности в области, касающейся разработки и исследования полимерных материалов, гидрогелями называются сетки на основе синтетических и природных полимеров, способные к набуханию в жидкостях (рис. 1). Впитывающая способность ГГ варьируется от 10-20% до нескольких тысяч по отношению к исходной массе сухого вещества [3,4].

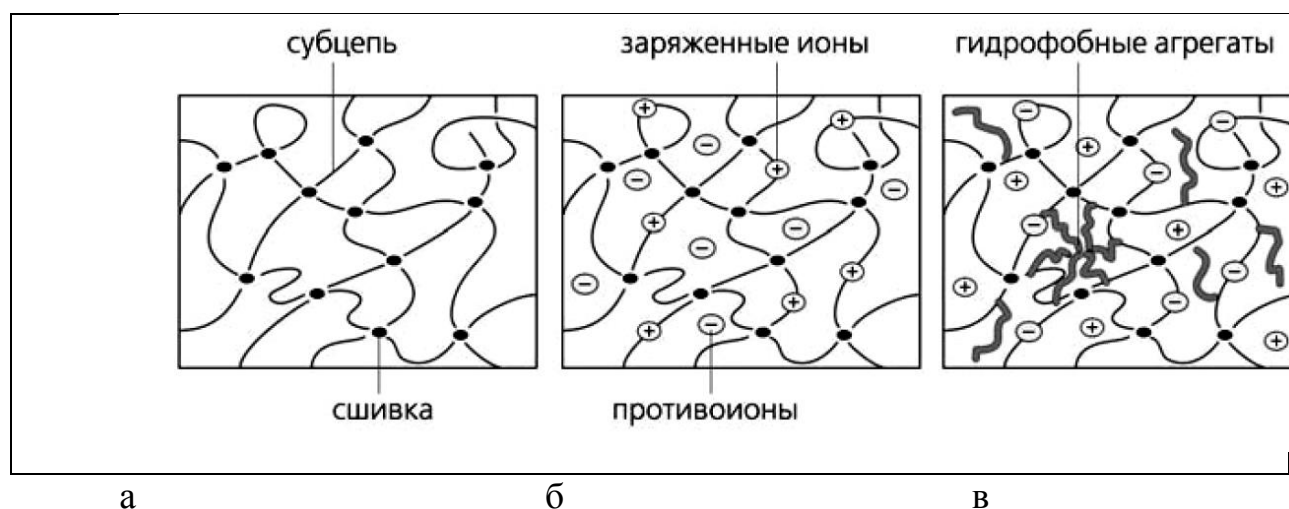


Рисунок 1 - Структура полимерного гидрогеля: а – незаряженная полиэлектролитная сетка, б – сетка, на полимерных цепях которой образовались заряженные звенья и низкомолекулярные противоионы, за счёт диссоциации ионогенных групп в водном растворе, в – сетка с гидрофобными группами, взаимодействующими друг с другом в водной среде [5].

С позиции коллоидной химии, гидрогели относятся к связнодисперсным системам с коагуляционной структурой [6]. ГГ обладают прочностью, эластичностью, упругостью, а также частично сохраняют форму, т.е. проявляют свойства, присущие твёрдым телам. В отличие от твёрдых тел, структурная сетка гидрогеля способна течь ввиду малой прочности связи между частицами. Таким

образом, гидрогели занимают промежуточное положение между твёрдыми телами и растворами.

Полимерные гидрогели принято разделять на химические (термонеобратимые или гидрогели I-го рода) и физические (термообратимые или гидрогели II-го рода) [7]. Химические ГГ образованы сеткой ковалентных поперечных связей и являются стабильными. В физических – полимерная сетка закреплена за счёт межмолекулярных и гидрофобных взаимодействий и / или ионных, водородных связей. При изменении физических условий – ионной силы, значения рН, а также под действием давления и температуры или при добавлении растворов, способных конкурировать с полимерами, образующими ГГ, связи в физических гидрогелях могут быть разрушены.

К химическим гидрогелям относится подавляющее большинство ГГ на основе синтетических полимеров. Для их получения чаще всего используют сополимеризацию и свободнорадикальную полимеризацию. Гидрогели I-го рода возможно получить путём сшивки водорастворимых полимеров. Химические гидрогели возможно разрушить только путём термического воздействия, приводящему к деструкции полимера или воздействием напряжения и последующего течения, приводящего к перестройке ковалентных связей. Химические связи придают ГГ I-го рода свойства малой подвижности и эластичности [8-10]. Равновесное набухание химических ГГ находится в прямой зависимости от плотности сшивки полимерной сетки. Зачастую гидрогели I-го рода нерастворимы при любом физиологическом диапазоне рН, но обладают высокой набухающей способностью. В набухом состоянии химические ГГ проницаемы для воды и растворенных веществ [11,12].

Для получения ГГ II-го рода используют полимеры с дифильным строением. При этом достигается образование узлов полимерной сетки путём взаимодействия одних групп макромолекул друг с другом, а других – с растворителем [13-15]. Главным свойством физических ГГ является термообратимость. При изменении температуры в физическом гидрогеле возникают и разрушаются узлы трёхмерной сетки [16]. Узлы сетки ГГ II-го рода

образованы ассоциатами макромолекул, водородными связями, взаимодействием спиралей, а также кристаллитами и ионными связями [17,18]. Например, для гидрогеля полиэтилена установлено наличие на ИК спектрах «кристаллического» дублета $720/730\text{ cm}^{-1}$, интенсивность которого обратно пропорциональна повышению температуры, что указывает на наличие кристаллической фазы в ГГ [19].

Гидрогели I-го рода обладают недостатком, затрудняющим их практическое применение. Они, ввиду ковалентной природы поперечных связей, выводиться из организма не способны и чаще всего используются в качестве матрицы для создания трансдермальных систем доставки лекарственных веществ (СДЛ) пролонгированного действия. Физические гидрогели способны выводиться из организма и могут быть использованы в качестве пероральных СДЛ [8].

Выбором компонентов возможно регулировать свойства гидрогелей: от хрупких (образованными жёсткими частицами) до эластичных, образованных гибкими полимерными макромолекулами [20]. Эластичность ГГ возникает благодаря гибкости цепей компонентов и большого объёма растворителя. Если для макромолекул компонента, образующего гидрогель, характерна жёсткость цепей, полученный ГГ обладает хрупкостью [21].

Гидрогели, содержащие заряженные группы, названы полиэлектролитными. Их отличительной способностью является высокая влагопоглощающая способность. В водной среде полиэлектролитные ГГ диссоциируют с образованием заряженных звеньев и низкомолекулярных противоионов. При этом заряженные ионы связаны с цепью, а противоионы остаются в свободном состоянии [22]. Одноименно заряженные звенья полимерной сетки отталкиваются друг от друга, что приводит к выпрямлению изначально свёрнутых в клубок звеньев. При этом гидрогель поглощает растворитель и набухает, значительно увеличиваясь в размерах. В процессе набухания низкомолекулярные противоионы свободно перемещаются внутри геля, приобретая трансляционную энтропию [5]. Таким образом, набухание полиэлектролитных гидрогелей обеспечивается электростатическим взаимодействием звеньев цепи, так и осмотическим

давлением противоионов. Если в гидрогеле невелико количество заряженных звеньев, то набухание происходит в основном за счёт осмотического давления противоионов [23-25]. Для полиэлектролитных гелей характерна способность коллапсировать (резко уменьшать объём системы при незначительном изменении температуры, рН, состава растворителя и др.). Это объясняется тем, что за счёт усиления сил притяжения между макромолекулами полимера происходит вытеснение растворителя из объёма геля в наружный раствор.

Гидрогели, чувствительные к изменению внешних факторов, называются восприимчивыми. Наиболее распространёнными восприимчивыми гелями являются рН-, термо- и фоточувствительные. ГГ, восприимчивые к изменению рН, содержат в структуре группы слабого основания или группы слабой кислоты, обладающие способностью к ионизации при изменении кислотности окружающей среды. Термочувствительные гели набухают или сжимаются при изменении температуры растворителя [26-30].

На рисунке 2 показаны основные способы получения гидрогелей: из мономеров (а), их форполимеров (б), из полимеров (в) [31].

1. Синтез гидрогелей из мономеров. Сополимеризацией гидрофильных полимеров и полифункциональных сомономеров, одновременно выполняющих роль сшивающих агентов, получают гидрофильные сшитые структуры. Наиболее часто используемые мономеры – это гидрофильные метакрлиллаты и метакриламиды [32,33].

2. Синтез гидрогелей из преполимеров. Гидрогели получают путём сшивания низкомолекулярных соединений или олигомеров. К примеру, в литературе известны реакции между α,ω -гидроксил поли (этиленгликоля) с диизоцианатом в присутствии триола в качестве сшивающего агента. Установлено, что в результате образуются сшитые гидрофильные полиуретаны.

3. Синтез гидрогелей из полимеров. В результате химического сшивания гидрофильных полимеров образуются гидрогели (декстран, сшитый эпихлоридином; протеины, сшитые формальдегидом, глутеральдегидом или полиальдегидом [29,32] и др.). Ионные полимеры могут сшиваться добавлением

ди- или тривалентных противоионов. К примеру гелеобразование альгината натрия при введении ионов кальция (рис. 3).

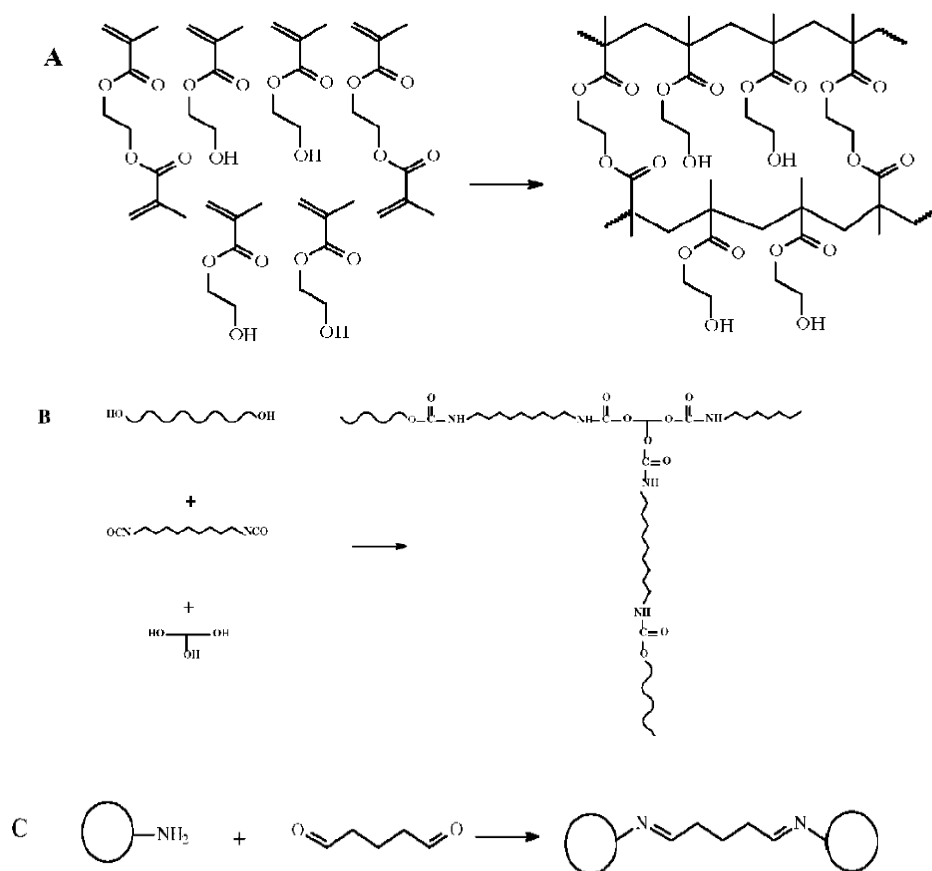


Рисунок 2 – Методы получения гидрогелей: из мономеров (А), предполимеров (В), из гидрофильных полимеров (С).

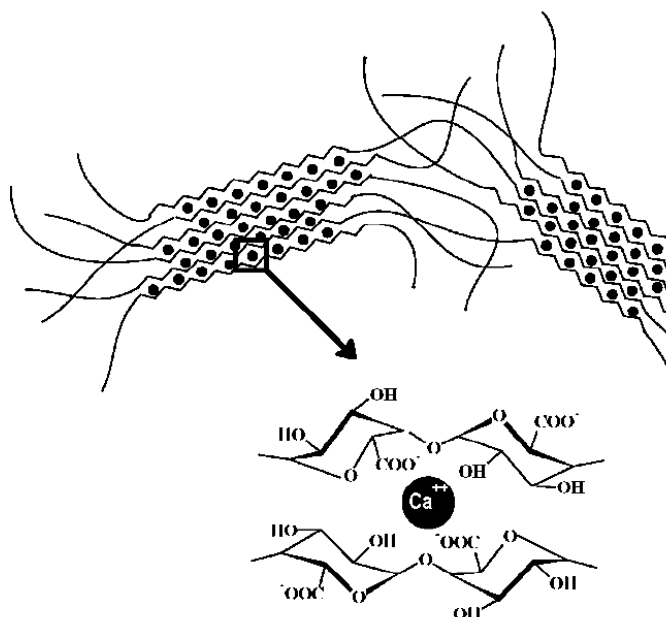


Рисунок 3 – Гелеобразование альгината натрия при введении ионов кальция.

Некоторые полимеры (желатин, агароза), способны образовывать гидрогели после охлаждения водного раствора. При этом гелеобразование происходит благодаря формированию спирали и ассоциации молекул (рис. 4):

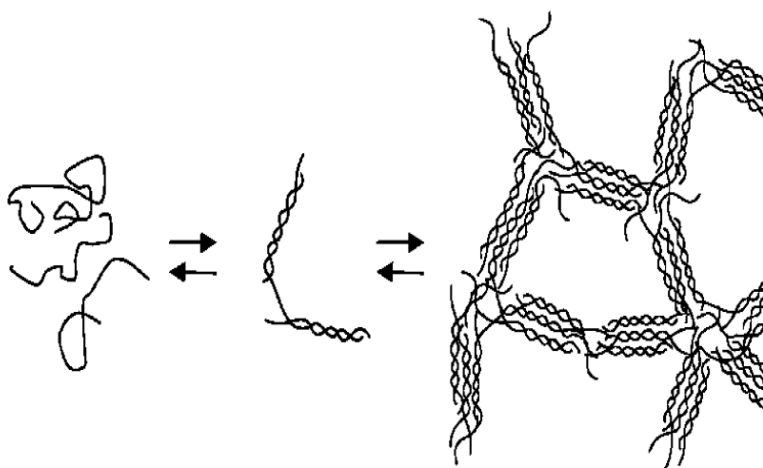


Рисунок 4 – Схема процесса гелеобразования

В начале 90-х годов прошлого столетия активно началось исследование макро- и суперпористых полимерных гидрогелей [3,4]. Был разработан метод получения пористых ГГ на основе сшитого поливинилового спирта (ПВС), основанный на получении пористых гелей путём сшивки модифицированного и очищенного ПВС [4]. У ПВС-гидрогелей была обнаружена выраженная влагоудерживающая способность, а также абсорбционно-десорбционные свойства, что позволило использовать их в качестве увлажняющего элемента раневого покрытия, снижающего травматичность при использовании перевязочных материалов и увеличивающего терапевтический эффект от применения гидрогелевого покрытия. Благодаря наличию развитых пор в ПВС-гидрогелях, абсорбирующих раневую экссудат, была доказана возможность введения лекарственных препаратов в полимерную сетку. Создание депо-материалов на основе ПВС-ГГ даёт возможность доставлять действующее

лекарственное вещество непосредственно в раневую поверхность, обеспечивая пролонгирующий эффект и стимулируя при этом эпителизацию раны.

Варьирование условий сополимеризации и мономерного состава даёт возможность направленного регулирования абсорбционно-десорбционными свойствами гидрогелей на основе синтетических полимеров. Это является несомненным преимуществом перед ГГ на основе природных полимеров. В то же время недостатком гидрогелей на основе синтетических полимеров является:

1. при сополимеризации мономеров, используемых при получении данных ГГ (полиакриламид, поли-2-гидроксиэтилметакрилат, поли-N-винилпирролидона и др.) остаточные мономеры, непрореагировавшие ингредиенты (инициаторы сополимеризации, катализаторы, сшивающие агенты) в качестве примесей присутствуют в целевом продукте. Поэтому при получении синтетических полимерных гидрогелей в производственный цикл обязательно включается операция отмывки реагентов, которая увеличивает себестоимость материала и не всегда гарантирует полное отсутствие примесей [11];

2. большинство синтетических гидрогелей не биodeградируемы и после применения требуют обязательного удаления и утилизации.

В настоящее время активно развивается область, посвящённая получению гидрогелей на основе полисахаридов, обладающих собственной биологической активностью (хитозан, альгинат натрия, пектиновые вещества) [34,35]. Данные природные полимеры биосовместимы, малотоксичны, биodeградируемы, обладают антимикробными, гепатопротекторными, металлосвязывающими и гемостатическими свойствами. Перечисленные свойства позволяют разрабатывать на основе биополимеров широкий спектр новых материалов медицинского, фармакологического и биотехнологического назначения. Гидрогели на основе природных полимеров перспективны для получения пролонгирующих пероральных и трансдермальных систем доставки лекарственных веществ контролируемого высвобождения [36,37]. Важным преимуществом биополимерных является их относительно низкая стоимость и доступность возобновляемых источников сырья.

Получение гидрогелей на основе биологически активных полисахаридов может быть осуществлено за счёт ковалентной сшивки, а также за счёт гидрофобного или ионотропного гелеобразования. Например, ГГ на основе производного хитина – хитозана получают методом ковалентной сшивки, используя реакцию аминогрупп с диальдегидами (глутаровый альдегид (ГА)) [38-40]. При этом реакционная способность компонентов, скорость гелеобразования, модуль упругости геля зависят от значения рН-среды и соотношения ГА/аминогруппа и связаны с изменением механизма сшивки и уменьшением степени протонирования аминогрупп хитозана.

Выбор метода получения пектиновых гидрогелей зависит от степени этерификации (СЭ) галактуроновой кислоты (ГК). Для пектинов с низкой СЭ предпочтителен метод ионного комплексообразования с поливалентными металлами. Для веществ с высокой СЭ – метод гидрофобного гелеобразования. Доказано, что ГГ на основе пектина являются перспективной матрицей для создания систем доставки лекарственных веществ различного профиля [37].

Соли альгиновых кислот – альгинаты обладают способностью к ионотропному гелеобразованию. В качестве сшивающих агентов используются поливалентные металлы (Ca, Ba, Cu, Al), взаимодействующие с карбоксильными группами гулуронатных блоков молекул биополимера. При этом маннуронатные блоки остаются свободными [41,42]. Между макромолекулами альгината образуется большое количество поперечных связей, обеспечивая формирование матрикса альгинатного геля. В зависимости от условий процесса сшивки структуру ГГ возможно варьировать от слабосшитой до среднесшитой [43].

В настоящее время исследователями активно изучается возможность создания гидрогелей на основе биологически активных полисахаридов и синтетических полимеров, обладающих способностью к ограниченному набуханию. В данных ГГ физические сшивки могут подвергаться деструкции и самовосстанавливаться, а также обладают новыми свойствами. Например, гидрогели на основе природных полимеров и полиуретанов способны к разложению под влиянием микроорганизмов [44]. На основе альгината и

полиуретана получены новые термопластичные, водоудерживающие материалы с высокими термическими и механическими свойствами [45,46].

1.2 Природные полимеры – основа для получения гидрогелей

Полимерные гидрогели широко применяются в ряде отраслей промышленности, а также в медицине для получения искусственных органов, покрытий, основы для терапевтических систем и др. [47]. К полимерам, предназначенным для медицинских целей, предъявляются особые требования: биосовместимость, нетоксичность, стабильность, способность выдерживать стерилизацию [48]. При создании терапевтических систем между полимерами и лекарственным веществом образуются Ван-дер-Ваальсовы, ионные, водородные, ион-дипольные, гидрофобные связи [49]. При этом аморфные области полимерной макромолекулы обуславливают сорбционные и транспортные свойства, а кристаллические отвечают за прочность волокон и пленок. Применение полимеров для создания СДЛ, благодаря их специфичным свойствам, обеспечивает контролируемое высвобождение, пролонгирующий эффект и направленную доставку ЛВ [50,51]. При этом возможно использование как синтетических, так и природных высокомолекулярных соединений.

Несмотря на то, что синтетические полимеры обладают устойчивостью к стерилизации, менее подвержены деструкции и воздействию микроорганизмов, для медицины более предпочтительным является применение биополимеров ввиду их высокой собственной биологической активности, за счёт которой реализуется синергический эффект, и совместимости. Наиболее часто в практике используются альгинат натрия, хитозан и пектиновые полисахариды [52]. Благодаря наличию функциональных групп они способны вступать в химические реакции, тем самым направленно варьируя физико-химические, реологические, а также медико-биологические свойства гидрогелей [53].

Хитозан – 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкан, продукт деацетилирования хитина. Данный полисахарид обладает собственной биологической активностью:

снижает уровень холестерина, обладает антиоксидантной и иммуномоделирующей, ранозаживляющей активностью, а также высокой био- и гемосовместимостью [54,55]. Благодаря высокой плотности положительных зарядов, хитозан (ХЗ) способен образовывать прочные плёнки. Его модифицированные производные способны к образованию физических гели и обладают высокой металлосвязывающей активностью [56]. Хитозан широко применяется в медицине, благодаря ряду свойств: высокая сорбционная способность; биосовместимость с тканями организма; гипоаллергенность, нетоксичность; биodeградируемость; хорошая адгезивная способность; иммуностимулирующая активность и др. [55].

Хитозан нерастворим в воде, что создаёт определённые сложности при его практическом применении и требует дополнительной модификации. Одним из его производных является сукцинат хитозана, обладающий схожими с ХЗ свойствами, растворимый в воде и способный к образованию гидрогелей [56,57].

Альгиновая кислота (АГ) и её соли широко применяются в промышленности, биотехнологии и медицине. АГ состоит из остатков β -D-маннуровой и α -L-гулуровой кислот, соединенных (1 \rightarrow 4)-связями [58]. Наибольшее применение получили натриево-кальциевые соли альгиновой кислоты в качестве местных тканевых стимуляторов процессов регенерации, эпителизации и развития грануляционной ткани. Соли АГ также широко используются в качестве вспомогательных материалов при производстве трансдермальных СДЛ. Материалы на основе солей альгиновой кислоты обладают выраженной способностью выводить из организма токсины и тяжёлые металлы. Процесс гелеобразования в альгинатных системах основан на образовании пространственных структур и переходе системы из свобододисперсного состояния в связнодисперсное [59]. Сшивка при осуществляется посредством введения ионов поливалентных металлов.

Пектиновые полисахариды – высокомолекулярные гетероглюканы, входящие в состав клеточной стенки высших цветковых растений [60]. Пектины широко используются в пищевой промышленности и медицине. Они повышают

сопротивляемость организма, обладают гемостатическими, токсин- и металлосвязывающими свойствами, детоксицирующим и противовирусным действием [61,62].

Свойства пектиновых полисахаридов зависят от ряда факторов, одним из которых является степень этерификации (СЭ) звеньев галактуроновой кислоты [63]. Высокометоксилированные пектины, имеющие СЭ свыше 50%, растворяются на порядок лучше низкометоксилированных. Полученный методом щелочного омыления нативного пектина с последующим осаждением, так называемой пектовой кислотой, полностью деметоксилированный пектин нерастворим в воде, имея способность лишь набухать в ней. Пектаты – натриевые, калиевые и аммонийные соли пектовой кислоты наоборот растворимы в воде, подобно солям органических оснований (аминов, пиридина, алкалоидов) [64].

На вязкость растворов пектинов значительное влияние оказывают концентрация, длина молекулярной цепи, степень этерификации, присутствие электролитов и температура. Вязкость раствора увеличивается с увеличением молекулярной массы. При статичной молекулярной массе возрастание вязкости связано с увеличением числа свободных карбоксильных групп в макромолекуле. Пектиновые полисахариды, имеющие различную степень этерификации, имеют максимальную вязкость раствора при рН 6-7, а минимальную при рН 4. Значение вязкости может снижаться вследствие разрушения ассоциатов пектиновых полисахаридов, вызванного за счёт повышения температуры [65].

На гелеобразование пектинов большое влияние оказывает степень этерификации. Образование гелей у высокоэтерифицированных пектинов происходит при помощи водородных связей с участием недиссоциированных свободных карбоксильных групп. Пектины с низкой степенью этерификации образуют студни только в присутствии сшивателя, например Ca^{2+} [59,61].

Гелеобразующая способность пектиновых полисахаридов также существенно зависит от химического строения макромолекулы. Отрицательное воздействие на формирование геля оказывает изменение конформации молекул пектина, связанное с наличием нейтральных полисахаридных остатков [38,50].

Одними из важнейших характеристик гидрогеля являются набухаемость и проницаемость, т.к. само понятие «гидрогель» определяет синтетический и/или природный полимер с трёхмерной сетчатой структурой, способный поглощать и удерживать в себе значительное количество жидкости [66]. При контакте ГГ с водой в первую очередь, гидратируются полярные гидрофильные группы и образуется прочно связанная вода толщиной в 2-3 молекулы. Далее, гидрофобные группы, оказавшиеся на поверхности в результате набухания полимерной сетки, образуют слабосвязанную воду. При заполнении за счёт осмоса пустот полимерной сетки образуется свободная вода. В зависимости от происхождения и состава ГГ, завершающим этапом поглощения воды является растворение или распад макромолекулы полимера [67].

Биологическая активность и способность к гель-золь переходу, присущие гидрогелям, полученным на основе биополимеров, в том числе и пектиновых полисахаридов, обусловлены тем, что данные ГГ относятся к физическим гелям. В зависимости от природы и структуры биополимера гидрогели формируют несколькими способами:

1) Формирование соединительных зон в гидрогеле путём нагрева и охлаждения раствора биополимера, приводящих к «запутыванию» молекулы со спиральной структурой.

2) Получение ионно-связанных ГГ путём добавления ионов поливалентных металлов, приводящего к формированию структуры в виде «яичной коробки». Данный способ используется для получения гидрогелей из пектинов со степенью этерификации $< 50\%$ [68].

3) Формирование гидрогеля из растворимых полисахаридов, обладающих способностью к собственному гелеобразованию, при рН 2,0-3,5 в присутствии низкомолекулярных углеводов. При помощи данного метода образуются ГГ из пектиновых веществ со степенью этерификации $> 50\%$. При этом данная область рН препятствует процессу депротонирования неэтерифицированных участков галактуроновой кислоты и способствует образованию водородных связей между цепями пектиновой макромолекулы [69].

4. Получение гидрогеля посредством последовательного замораживания и оттаивания, что приводит к увеличению прочности ГГ.

Таким образом, для получения гидрогелей на основе пектиновых полисахаридов в настоящее время применяют два способа, основанных на взаимодействии карбоксильных групп галактуроновой кислоты. При этом формируется структура ГГ либо в виде «яичной коробки» (для низкоэтерифицированных пектинов), либо образуются трёхмерные сетки с иммобилизованными углеводами, снижающими активность воды (для высокоэтерифицированных ПВ) [70].

Механические свойства гидрогелей, полученных разными способами, существенно отличаются. Например, модуль Юнга агарозного геля изменяется в зависимости от концентрации. Если при содержании агарозы 0.5% данная величина составляет 30 кПа, то при увеличении концентрации до 3%, модуль Юнга возрастает до 52 кПа, а при 5%-й концентрации – до 2300 кПа [71]. Данный факт объясняется тем, что низко концентрированные гидрогели несжимаемы (коэффициент Пуассона близок к 0,5), то концентрированные – сжимаемы (коэффициент Пуассона составляет 0,32) [73].

Для гидрогелей на основе пектиновых полисахаридов на значение модуля Юнга оказывает влияние температура формирования ГГ. Например, при температуре 5°C данная величина составляет для низкоэтерифицированных пектинов 1.8 кПа, а для высокоэтерифицированных – 0,95 кПа [74]. Установлено, что концентрация при этом практически не воздействует на значение модуля Юнга, который не превышает 10 кПа, во всех случаях [75]. При этом коэффициент Пуассона пектиновых гидрогелей составил 0.4-0.5 [76]. Ввиду низкого значения коэффициента Пуассона и модуля Юнга, а также наличия упругой деформации, ГГ на основе биополимеров, в том числе и пектиновых полисахаридов, можно отнести к эластомерам [77].

Структура полисахаридов оказывает существенное влияние на процесс образования гидрогеля. Механизм образования трёхмерной сетки и её узлов в ГГ на основе пектиновых веществ с высокой степенью этерификации недостаточно

изучены. Установлено, что формирование гидрогеля зависит от ряда особенностей первичной структуры макромолекулы [78]:

- 1) ограниченная гибкость основной цепи пектиновой макромолекулы;
- 2) расположение гидроксильных групп галактуроновой кислоты в положении С(2) и С(3), а также карбоксильной группы у С(5), способствующее образованию межмолекулярных связей;
- 3) равномерное чередование нерегулярно построенных участков, содержащих моносахаридные остатки, с регулярными, обеспечивающими достаточную способность к образованию связей. Нерегулярные участки за счёт ответвлений, образованных остатками сахаров, затрудняют формирование плотной полимерной сетки [79].

Как уже было отмечено выше, одним из важнейших факторов, определяющих гелеобразующую способность пектиновых полисахаридов, является степень этерификации. Пектины способны образовывать два типа гелей: ионообратимые (низкоэтерифицированные ПВ) и термообратимые (высокоэтерифицированные ПВ). Для получения гидрогеля на основе высокоэтерифицированных пектинов необходимо наличие реагента, способного снизить коэффициент активности H_2O (низкомолекулярные углеводы, некоторые соли и др.) и кислоты, препятствующей отталкиванию заряженных молекул. Пектиновые вещества со 100%-й степенью этерификации образуют гели без добавления кислоты в присутствии сахарозы [78, 79].

Долгое время считалось, что между значением степени этерификации ГК пектиновых полисахаридов и способностью к гелеобразованию наблюдается прямая зависимость [80]. Недавно было доказано, что данная зависимость носит гораздо более сложный характер и, помимо значения СЭ, на процесс формирования геля влияет ряд факторов. Несомненно, степень этерификации способна оказывать влияние на скорость и температуру образования геля, на его упругость и прочность, а также требует подбора оптимального значения рН раствора.

В зависимости от скорости и температуры образования геля пектиновые полисахариды разделяют на ПВ «медленной высадки» и «быстрой высадки». При равных условиях пектины первой группы образуют гели медленно и при низкой температуре (ПВ со степенью этерификации 45-70%), а второй группы – быстро и при более высокой температуре (ПВ со степенью этерификации > 70%) [81].

При изучении зависимости прочности гидрогеля на основе пектиновых полисахаридов цитрусовых установлено, что снижение значения степени этерификации с 73% до 50% приводит к увеличению продолжительности процесса гелеобразования [82]. При этом наибольшая прочность студня достигалась при СЭ = 45%. Несмотря на доказанный факт корреляции значения степени этерификации и времени формирования геля, авторами работы [82] не была учтена возможность деградации пектиновой макромолекулы, возникающей в процессе обработки образцов кислыми растворами для получения пектиновых полисахаридов с различной степенью этерификации.

Обработка образцов пектиновых полисахаридов диазометаном позволяет избежать снижения значения молекулярной массы [82]. Модуль сдвига был максимальным у веществ со степенью этерификации 40-75%.

Гелеобразующие свойства также значительно ухудшаются в присутствии ацетильных групп, связанных с гидроксильными группами пектиновых веществ [83]. Так, например, при содержании АсО~ в пектиновых макромолекулах в количестве 2,5% (т.е. одна АсО~ на 8 уронидных звеньев) гелеобразование полисахарида фактически прекращается, несмотря на сравнительно высокое значение молекулярной массы полимера. Причиной такого явления является нарушение регулярности полимерной цепи, но данные пектиновые полисахариды пригодны для получения термообратимого гидрогеля на их основе [84].

Процессы гелеобразования, рассмотренные выше, а также низкая скорость формирования студня пектиновых полисахаридов со степенью этерификации 45-70%, дают основание предположить, что для образования ГГ необходимо наличие небольших по размеру, но многочисленных областей кристаллизации (упорядочения), включающих несколько единиц галактуронана. Также

необходима взаимная ассоциация данных областей, что требует их определённой пространственной ориентации [78]. Данное предположение подтверждает тот факт, что гидрогель, полученный из пектиновых полисахаридов с блочным распределением CH_3O , обладает большей прочностью по сравнению с образцом, обладающим статичным распределением [85].

Существует два вида влияния СЭ на формирование гидрогелей и их свойства:

1) при образовании узлов полимерной сетки характер распределения метоксильных групп в цепи и их общее число оказывает влияние на размер и количество контактных зон в макромолекуле;

2) на механизм взаимодействия растворителя с полимером оказывают влияние гидрофобные заместители.

Общепринятой теории формирования гидрогелей на основе пектиновых полисахаридов в настоящее время не существует. Не установлен механизм образования полимерной сетки и её узлов, не выявлена роль функциональных групп полисахарида, а также веществ, без которых невозможно образование ГГ на основе высокоэтерифицированных пектиновых полисахаридов. Достоверные и убедительные экспериментальные и теоретические доказательства в данной области отсутствуют. Актуальной является гипотеза, выдвинутая авторами работы [78]:

1) сахара способствует дегидратации пектиновых полисахаридов;

2) действие кислоты заключается в облегчении коалесценции за счёт снижения отрицательного заряда пектиновой макромолекулы;

3) в процессе дегидратации равновесное состояние достигается за продолжительное время с учётом временных и температурных различий высадки пектиновых полисахаридов;

4) величина рН влияет на скорость осаждения и дегидратации (снижение рН приводит к увеличению данных параметров);

5) прочность ГГ достигает максимального значения в равновесной системе;

б) на скорость и равновесную прочность процесса образования геля оказывают влияние различные добавки.

Данная гипотеза не учитывает влияние природы связей между молекулами пектиновых полисахаридов в гидрогеле, связанное с представлениями о воздействии СЭ на растворимость ПВ. При образовании гидрогелей на основе высокоэтерифицированных пектиновых полисахаридов показано, что «температура высадки», вернее температура формирования геля, полученная экстраполяцией к бесконечно малой скорости охлаждения, связана с изменением параметров системы, оказывающих влияние на растворимость полимера [86]. В данном случае корректнее было бы употребить термин «средство к растворителю». При снижении значения рН, изменения состава буфера, увеличении концентрации пектиновых полисахаридов и сахарозы, снижается растворимость и, соответственно, «температура высадки» геля [87,88]. Взаимосвязь механических свойств гидрогелей от величины рН и значения степени этерификации, к сожалению, не обоснована.

Возвращаясь к влиянию степени этерификации на растворимость пектинов, можно сказать что данные в этой области сильно ограничены и противоречивы. Нерастворимая в воде пектовая кислота приобретает растворимость после частичной или полной этерификации по карбоксильным группам (метилловые, гликолавые эфиры) [89] и гидроксильным группам при малых степенях замещения. Агрегация молекул в данных случаях предотвращается внутренними пластификаторами, в качестве которых действуют заместители по карбоксильной группе. Понижение растворимости пектиновых веществ может быть вызвано сильным замещением спиртовых групп, например, ацетилированием. Однако, в данном случае существенно возрастает растворимость в органических растворителях. Пектины растворимы и в таких полярных средах как формамид, этилендиамин, диметилсульфоксид, диметилформамид и тёплый глицерин [89]. Хорошую растворимость в воде показывают также пектаты и пектинаты одновалентных металлов.

В литературе зачастую встречаются ссылки на неопубликованные данные, согласно которым увеличение степени этерификации пектина приводит к уменьшению его растворимости. Опираясь на данное утверждение, ряд авторов постулирует гипотезу о механизме гелеобразования пектина, согласно которой гидрофобные эфирные группы выступают в качестве первичных центров кристаллизации при охлаждении. Дальнейшее охлаждение системы приводит к усилению водородных связей между полярными группами, тем самым обеспечивая жёсткость гелей пектина даже при его малых концентрациях. Согласно мнению авторов, поперечные связи в пектиновых гелях включают не только точечные взаимодействия, на что указывает их низкотемпературный коэффициент модуля упругости [78].

В литературе отмечается расхождение оценок роли функциональных групп в процессе гелеобразования: согласно Шнейдеру и Боку [90], сетку образуют поперечно связанные карбоксильные группы. Дойл и Солгис [78] говорят о несущественности карбоксильных и карбометоксильных групп для процесса гелеобразования. Сетка образуется благодаря межмолекулярным водородным связям, возникающим между гидроксилами у С (2) и С(3). Майер [91] утверждает, что в качестве первичных центров кристаллизации выступают именно эфирные группы.

Термообратимые гели На сегодняшний день в мировой литературе накоплен большой экспериментальный материал по феноменологии гелей, ставший основой для выявления общих закономерностей гелеобразования полимерных систем, и позволивший составить классификацию гелей, в зависимости от природы связей, образующих пространственную сетку, с известной долей условности [92,93]. Помимо гелей, образованных посредством ковалентных и ионных связей, был выделен довольно обширный класс гелей, пространственная сетка которых образовалась в ходе вторичных взаимодействий различной природы. Данный класс гелей принято называть термообратимыми, ввиду обратимости перехода из жидкого раствора в гель. Их образование вызвано соответствующим изменением термодинамических параметров системы, таких как

понижение или повышение температуры, давления, изменения состава растворителя и т.д.).

Общим закономерностям образования термообратимых гелей посвящены обзоры Хеймана [94]. Прошляковой и Липатова [92], Роговиной и Слонимского [93], Папкова [92] и др. Система полимер-растворитель подвергаясь какому-либо воздействию, приводящему к ухудшению термодинамического качества растворителя (изменение температуры, давления, состава среды и т.д.), смещается в направлении фазового разделения, что в предельном случае ведёт к осаждению полимера из раствора. Процесс перехода системы к состоянию осадка из жидкого раствора в некоторых случаях ведёт к образованию качественно нового состояния, именуемого гелеобразным. Гелеобразное состояние характеризуется наличием единой пространственной сетки, состоящей из достаточно прочных вторичных связей. Термообратимые гели возможно получить из раствора как при уменьшении растворимости полимера, так и при набухании твёрдого полимера.

Образование пространственной сетки у термообратимых гелей происходит лишь для полимеров, имеющих в составе макромолекул группы, отличающиеся сродством к растворителю. Данное условие образования гелей было впервые сформулировано Липатовым С.М. Отдельные участки цепочки полимера или функциональных групп имеют различную парциальную растворимость, что в свою очередь при изменении их соотношения создаёт условия при которых одна часть макромолекул находится в растворённом состоянии, а другая часть стремится выделиться из раствора. На основе этого можно сделать вывод, что основной характеристикой гелеобразного состояния выступает определенное число контактов рода полимер-полимер, подразумевая оптимальное сродство полимера к растворителю. Термообратимые гели в большинстве случаев образуются в плохих растворителях, что ведёт к процессу агрегации полимера до образования единой пространственной сетки. С теоретической точки зрения построение гелей из агрегированных частиц рассмотрено в работах Жоли [95]. Ряд исследователей также ссылался на существование двухстадийного механизма гелеобразования [93].

Фазовое состояние термообратимых гелей может оцениваться различными подходами [92,96], однако, несмотря на это, можно утверждать, что любые гели, в том числе и однофазные, в структурном отношении представляют собой микронеоднородные системы [93]. Ещё в начале прошлого века в работах Жигмонди, Бахмана и др. [97] было показано на примерах желатина и агар-агара, что возникновению единой пространственной сетки предшествует стадия образования агрегатов макромолекул. Схожие данные для целого ряда систем были получены благодаря методам методов электронной микроскопии, светорассеяния [98], спектра мутности [99], малоуглового рассеяния поляризованного света [100].

Ключевым фактором определяющим свойства термообратимых гелей является характер надмолекулярных образований, являющихся по сути их структурными элементами.

В литературе сведения о термодинамических свойствах пектина довольно ограничены. Старые данные обобщены в ряде обзоров [97]. Изучение свойств разбавленных раствором пектинов Беттельхеймом [104] при помощи метода осмометрии, позволило рассчитать из температурной зависимости второго вириального коэффициента дифференциальные термодинамические функции: изменения свободной энергии (ΔG), энтальпии (ΔH) и энтропии смещения (ΔS) для высокоэтерифицированного пектина, пектата натрия, пектата кальция и пектовой кислоты. Величина ΔG находится в обратной зависимости от величины концентрации соответствующих компонентов.

Согласно работам Торок [102] образование геля происходит в ходе одновременной деградации пектина и сахарозы. В работах Рис приводится, что отсутствие синерезиса в термодинамически стабильных гелях высокоэтерифицированного пектина возникает из-за низкой активности воды [97].

Обзор литературных данных не даёт возможность получить целостную картину механизма образования термообратимых гелей пектина и природы взаимосвязи между молекулярными характеристиками и свойствами, в том числе

механическими, гелей, ввиду небольшого объёма представленной информации. Различие в молекулярно-массовом распределении и химическом строении исследуемых образцов пектина не позволяет сопоставить данные исследований не только разных автором, но и данные в пределах одной работы. Наиболее надёжные результаты исследований представлены серией образцов, полученных методом метилирования пектовой кислоты диазومتаном [103]. Предположения о механизме гелеобразования представляются недостаточно обоснованными, ввиду отсутствия систематических термодинамических и структурных характеристик растворов пектинов. Вязкоупругий характер систем обычно не учитывается, ввиду чего обесценивается интерпретация данных о связи между молекулярными характеристиками пектинов и механическими свойствами их гелей [104].

Учитывая вышеизложенное, в данной работе была поставлена задача исследовать не только термодинамические, но и структурные характеристики как разбавленных, так и умеренно концентрированных жидких пектиновых растворов и гелей. Полученные данные могли послужить основой для формулировки представления о механизме процесса образования гелей. В частности предполагалось исследовать:

- а) зависимость степени этерификации пектина от его сродства к растворителю;
- б) изменение степени агрегации пектина в растворе в процессе образования гелей;
- в) энергетику процесса образования гелей и их структуру по упруговязким свойствам.

Для чувствительных к какому-либо влиянию полимерных растворов необходимы способные к отклику молекулярные строительные блоки. Примеры мономерных блоков, чувствительных к температуре и рН и поддерживающих отклики на их изменения в процессе полимеризации, представлены в работах [105]. Таким образом молекулярная структура основной цепи полимера даёт возможность контроля температуры. Известно, что фазовый переход при НКТР

(нижней критической температуры смешения) является переходом на уровне нанометров, где происходит изменение размеров частиц или агрегатов [106].

Фазовый переход полимера чувствительного к рН зачастую происходит очень остро, и в пределах 0,2-0,3 единиц рН.

Таким образом, пектиновые полисахариды являются перспективной основой для создания гидрогелевых материалов ввиду отсутствия побочных эффектов при контакте с живым организмом, биосовместимости, хорошей растворимости, высокой комплексообразующей способности.

1.3. Практическое применение гидрогелей

Благодаря уникальной пористой структуре полимерных гидрогелей, обеспечивающей их набухание в воде, хорошую биосовместимость и проницаемость для соединений различных молекулярных масс, ГГ нашли широкое применение в ряде отраслей промышленности и медицины. В медицине гидрогели особенно востребованы в качестве носителей иммобилизованных лекарственных веществ и биологически активных соединений. Создание гидрогелевых СДЛ превратилось в интенсивно развивающуюся отрасль химии полимеров медицинского назначения. Данный факт вызвал появление новых требований к структуре и свойствам современных гидрогелевых материалов, отличающихся от применяемых ранее волокнообразующих полимеров [107].

В качестве основы для создания трансдермальных систем доставки лекарственных препаратов в настоящее время используются как полимерные текстильные материалы (марлевые, трикотажные и нетканые подотна), так и гидрогели, спонжи, плёнки и плёночные композиции, [107,108]. Ввиду изолированности очага поражения, «отгороженного» некротическими тканями от здоровых тканей, при терапии локальных патологий (язв, ран, опухолей и др.) необходимым условием является достижение терапевтического и пролонгированного эффекта в поражённой области иммобилизованных в полимерном носителе лекарственных и биологически активных веществ (анальгетиков, антибиотиков, антиоксидантов, стимуляторов регенеративных

процессов, цитостатиков, иммуномодуляторов, фото- и радиосенсибилизаторов и др.).

Для создания парентальных систем доставки лекарственных веществ, когда препарат минует желудочно-кишечный тракт, важно учитывать сложность поддержания высокой концентрации ЛВ в пораженном участке. Зачастую при этом возникает необходимость поддержания ещё более высокой концентрации препарата в крови, тканях и жидкостях организма, что приводит к возникновению побочных эффектов и интоксикации. Решением данной проблемы является доставка лекарственного вещества непосредственно поражённый участок или орган, что позволяет увеличить концентрацию препарата более чем в 10 раз, по сравнению с системным приёмом ЛВ. Особенно актуален данный метод для введения токсичных ЛВ онкологическим и ослабленным пациентам длительным приёмом препаратов. Существует ряд способов направленной доставки: внутрикостное, внутриартериальное, внутривенное введение, инстилляция, инфильтрация, искусственная региональная перфузия, дренаж и др. [107]. Препараты при этом применяют в виде суспензий, растворов, мазей, эмульсий, порошков, паст, аэрозолей и гелей. Введение лекарственных веществ в традиционной форме при этом не обеспечивает длительность сохранения терапевтического эффекта в очаге поражения. Необходимо использование способов, обеспечивающих поддержания требуемых концентраций препарата на протяжении длительного времени в поражённой области даже при однократном введении. Для реализации данных способов эффективно применение полимерных носителей, обладающих пролонгирующими свойствами, в том числе и гидрогелевых. В настоящее время системы доставки лекарственных веществ пролонгирующего действия широко применяют для направленной доставки лекарственных веществ в стоматологии, хирургии при терапии заболеваний, сопровождающихся деструкцией костной ткани (раны, ожоги, костная патология), в онкологии, дерматологии и др. [34,109-111].

Среди многообразия форм полимерных пролонгаторов занимают гидрогели на основе гидрофильных полимеров. В отличие от традиционных медицинских

материалов наружного применения, гидрогелевые системы с инкапсулированным лекарственным веществом являются одноразовыми средствами с коротким эксплуатационным сроком. Биологическая активность таких систем должна быть максимально реализована при контакте с очагом поражения.

Гидрогели имеют ряд преимуществ перед тканевыми и мазевыми основами для введения лекарственных веществ: собственная биологическая активность, отсутствие побочных эффектов и закупоривания пор, возможность прогнозирования высвобождения ЛВ и проникновения его через кожу и слизистую. Применением ГГ с регулируемой структурой возможно управлять концентрацией, необходимой для терапевтического эффекта, действующего вещества в течение заданного времени. В настоящее время активно развивается направление исследования «восприимчивых» и «умных» полимерных систем, способных выдерживать резкие конформационные переходы при малых изменениях внешних условий. Доказано, что в данном аспекте актуальны редкосшитые полимерные гидрогели, обладающие высокой степенью набухания [112,113]. Благодаря их уникальным свойствам, возможно создание композиционных материалов на их основе с высокими скоростями отклика на внешние воздействия [114].

В настоящее время гидрогели нашли широкое применение в косметической промышленности в качестве основы для введения биологически активных компонентов. ГГ обладают рядом преимуществ перед традиционными косметическими средствами на жировой основе: продолжительный увлажняющий эффект, отсутствие нежелательного жирного блеска, усиление трансдермального транспорта биологически активных добавок с сохранением целостности липидного баланса и собственная биологическая активность [115].

Гидрогелевые системы косметического назначения подразделяются на безводные (дисперсные системы, включающие в состав углеводородную жидкость и гелеобразователь) и водные, состоящие из воды и гелеобразователя. Для создания косметических ГГ систем широко применяются гидрофильные полимеры, образующие стабильные композиции с содержанием воды 95-98 %.

При этом макромолекулы полимера, образующие гель, вследствие их высокой молекулярной массы не проникают в глубокие слои кожи, а распределяются на её поверхности, формируя своеобразную сетку. Данная структура после установления равновесного состояния между избытком воды, удаляемым при испарении, и водой, питающей кожу, обеспечивает ей гидратирующее действие, притягивая влагу из внешней окружающей среды. Она проницаема для кислорода, ионов металлов, углекислого газа, а также продуктов метаболизма клеток [116]. При производстве косметических средств применяются, как синтетические, так и природные полимеры, в частности полисахариды [117]. Процесс гелеобразования полисахаридов длится в течение продолжительного времени [118].

Широкое применение при производстве зубных паст и пен для бритья получил каррагинан – полисахарид морских водорослей. Для образования оптимальной структуры эмульсионной и гелеобразной формы достаточна концентрация каррагинана 1,5% [119].

При изготовлении косметических гелей, гелей для душа и зубных паст перспективно применение альгинатов – солей альгиновой кислоты, источником которой является ламинария. Например, альгинат натрия имеет хорошую растворимость в воде и совместимость с компонентами косметических композиций [120].

Наиболее широкое применение в текстильной, косметической и фармацевтической промышленности получили производные целлюлозы. Например, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) выполняет функции гелеобразователя, эмульгатора, стабилизатора, загустителя, пленкообразователя. Na-КМЦ перспективна в качестве основы для создания систем доставки лекарственных веществ пролонгированного действия [121]. При производстве различных кремов, паст и средств для укладки волос в качестве загустителя и эмульгатора используется метилцеллюлоза, способная образовывать стабильные системы в диапазоне pH от 2 до 12 [122].

Синтетические полимеры, в частности анионные полиэлектролиты, содержащие в структуре солевые карбоксилатные и карбоксильные группы,

нашли широкое применение в косметической и фармацевтической промышленности. Например, полимеры акриловой кислоты (ПАК), редкосшитые аллильными эфирами дивинилгликоля или пентаэритритола, именуемые по Международной классификации INCI карбомерами (Carbomer). Разница между различными модификациями состоит в количестве поперечных сшивок, изменяя которое можно варьировать свойства геля. Молекулярная масса (М) фрагмента ПАК около 75-78 Да. В работе [123] была теоретически рассчитана М геля, образованного карбомером, которая составила 700 тыс. – 4 млн. Да. При этом методов для определения реальной М не существует. Карбомеры характеризуются следующими функциональными преимуществами [124]: 1) высокая загущающая способность; 2) эффективность гелевой композиции в широком диапазоне температур; 3) высокая оптическая прозрачность гелей; 4) устойчивость к микробному заражению; 5) контролируемый транспорт БАВ и воды в гелевой системе и т.д. [125]

ПАК формируют полимерную матрицу геля, характеризующегося высокой вязкостью и совместимостью с БАВ, лекарственными препаратами и ферментами, и обеспечивают пролонгированный эффект данных активных субстанций направленного действия [126]. Механизм образования геля ПАК можно представить схемой (рис. 6).

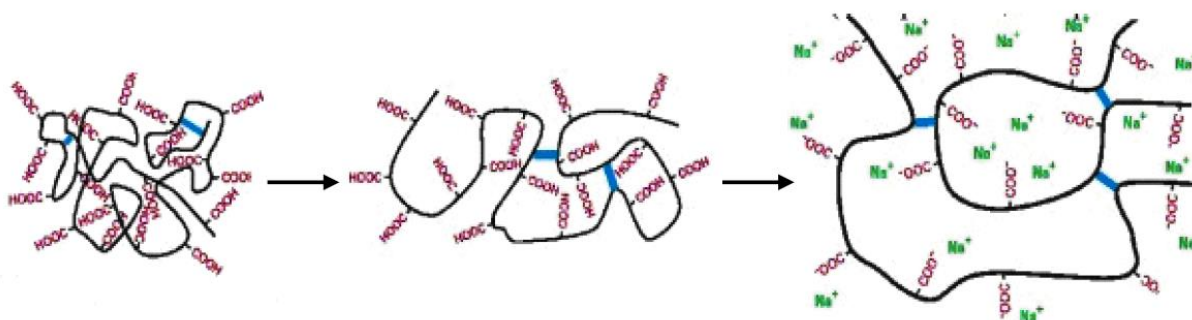


Рисунок 6 – Схематическое изображение золь-гель перехода полиакриловой кислоты (Карбомера)

Порошок карбомера представляет собой глобулы из жёстко связанных и переплетенных между собой макромолекул ПАК. В результате диспергирования

гелеобразователя в воде происходит разматывание макромолекулярного клубка вследствие склонности карбоксильных групп к гидратации. Заключительным этапом в процессе образования полимерной гелевой структуры является введение в дисперсию карбомера нейтрализующего агента щелочного характера (гидроксид натрия (рис. 6), триэтаноламин т.д.), что приводит к переходу в солевую форму кислотных групп карбомера, который характеризуется более высокой степенью диссоциации. При этом глобула макромолекул ПАК максимально увеличивается в объёме. В данном случае окружающая жидкость и микрогелевые макромолекулярные частицы характеризуются равновесием. При высоком их содержании происходит размещение данных компонент гелей по всему свободному объёму, вследствие чего возрастает вязкость геля. Загущение гелевой системы осуществляется при формировании больших агрегатов. Скорость этого процесса достаточно низкая. Для получения гелей исследователями наряду с полимерами акриловой кислоты отечественного производства (Карбомер, Ареспол, мАРС), применяются и зарубежного – Carbopol (Карбопол) 940, 941, 2001, 2020 (Германия) [127].

Несмотря на несомненную перспективность применения гидрогелей в практике и на то, что в настоящее время вопросам разработки способов получения ГГ на основе синтетических и природных полимеров посвящено значительное количество работ, большая часть полученных материалов, в том числе нашедших практическое применение, обладает рядом недостатков [4] :

- неудовлетворительной механической прочностью;
- низкой осмотической устойчивостью (способность к резкому изменению объёма при незначительном изменении значения, а также под действием ионной силы);
- явлении синерезиса при хранении;
- диффузионными затруднениями, возникающими при сорбции и десорбции веществ.

Перечисленные недостатки значительно уменьшают возможность практического применения полимерных гидрогелей, но обуславливают необходимость поиска путей оптимизации эксплуатационных характеристик ГГ.

ГЛАВА 2 МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Сбор и подготовка исходного сырья

Крупные и здоровые корзинки подсолнечника нарезают на небольшие куски и сушат на открытом воздухе. После чего измельчают с помощью дробилки или в ступке до размера частиц 100 мкм. Измельчённое сырьё обрабатывают горячей водой (85 °С) в течение 2 минут при гидромодуле сырья 1: 20, с последующей трехкратной декантацией. При необходимости водорастворимые компоненты анализируют на содержание пектина. Высушенные остатки корзинок подсолнечника промывают этиловым или изопропиловым спиртом. При этом экстрагируется 5,6 спирто-растворимых компонентов. Остатки сырья высушивают при 95-100 °С в сушильном шкафу и помещают для дальнейшего хранения в полиэтиленовые мешки.

Очищенные таким образом измельченные корзинки подсолнечника пригодны для исследования в течении 1 года.

2.2. Характеристика реагентов и рабочих растворов

Для проведения экспериментов были использованы соляная и серная кислоты марки (хч), гидроксид натрия (ч.д.а.), гидроксид аммония (хч), трилон Б (фиксонал), метанол (хч), этанол (ректификат) и изопропанол (хч).

Растворы соляной кислоты с определенным значением рН, приготовили путем разведения концентрированной кислоты с водой, рН раствора устанавливали на рН-метре. Стандартные растворы соляной кислоты, гидроксида натрия и трилона Б готовили из соответствующих фиксоналов.

2.3. Методы гидролиз-экстракции растительного сырья

Гидролиз-экстракция протопектина растительного сырья в статическом режиме. Гидролиз-экстракцию подготовленного растительного сырья проводят, используя в качестве гидролизующего агента растворы кислот с требуемым значением рН, при температуре 85 °С, гидромодуле 1 : 20, варьируя продолжительность процесса. Затем, раствор-гидролизат, отделяют от остатков

клеточной стенки (КС), тщательно промывают дистиллированной водой до полного удаления хлорид-ионов. Остатки КС высушивают при 55-60°C. Экстракт охлаждают до комнатной температуры, нейтрализуют до pH=3,5 и разделяют на три фракции, условно названные микрогель (МГ), пектиновые вещества (ПВ) и олигосахариды (ОС) [128].

Получение микрогеля. Раствор-гидролизат центрифугируют в течение 30 мин при 4000-7000 об/мин. Полученный осадок – полимер с сетчатой структурой отделяют от раствора, промывают 96%-ным спиртом до отрицательной реакции на хлорид-ионы и высушивают при 35-40°C.

Получение пектиновых веществ. Высокомолекулярные компоненты, оставшиеся в центрифугате, осаждают добавлением двух – трёхкратного объёма спирта. Образовавшийся гель отделяют при помощи тканевого фильтра, промывают и высушивают способом, аналогичным для получения микрогеля.

Получение олигосахаридов. Оставшийся после отделения пектиновых веществ водно-спиртовой раствор последовательно перегоняют, отделяя спирт и воду. Образовавшийся осадок – олигосахариды (низкомолекулярные сахара – моно- и олигосахариды) высушивают в сушильном шкафу при температуре 40-50°C.

Гидролиз-экстракция протопектина в динамическом режиме. Измельчённое растительное сырьё, после равновесного набухания, помещают в экстракционную колонку, устанавливают скорость потока элюанта (от 3 до 6 мл/мин), температуру 85°C и проводят гидролиз-экстракцию в течение 60 минут [129-130]. После окончания процесса экстракции, остатки клеточной стенки, находящиеся в колонке, тщательно промывают дистиллированной водой до полного удаления хлорид-ионов, затем извлекают и высушивают при 55-60°C. Раствор-гидролизат после охлаждения до комнатной температуры, нейтрализуют до pH = 3,5 и разделяют на микрогель, пектиновые вещества и олигосахариды.

Непрерывное фракционирование продуктов распада протопектина. Раствор-гидролизат на выходе из экстракционной колонки последовательно

собирают в отдельные ёмкости по 50 мл, получая, таким образом, 8-10 фракций, каждую из которых после нейтрализации разделяют на МГ, ПВ и ОС [129,131].

2.4 Очистка пектиновых веществ

Очистка этанолом. Пектиновые вещества обрабатывали смесью 70 %-ного C_2H_5OH , концентрированной HCl и воды в соотношении 14:3.6:2.4 в течение 24 часов при комнатной температуре. После этого промывали 70 %-ным раствором спиртом до отрицательной реакции на Cl^- - ионы, затем 96 %-ным этанолом и ацетоном и высушивали при температуре 40-60⁰ С.

Для удаления микрогеля 0.5 %-ный раствор пектина центрифугировали при 7100 центробежной скорости (g) в течение 1.5 ч, или ультрацентрифугировали при 60 000 g в течение 1 ч [131-132].

Мембранная очистка ПВ. Наряду с методом осаждения для получения ПВ был использован метод диа- и ультрафильтрации с помощью мембраны УПМ-100 на лабораторной ячейке при давлении 0.16 МПа, с последующей лиофилизацией очищенных растворов ПВ [133].

2.5. Количественные методы анализа функциональных групп пектиновых веществ

Определение свободных карбоксильных групп. Навеску (около 0,1 г) высушенного образца смачивали 96%-ным этанолом (5мл), добавляли 100 мл H_2O и перемешивали на магнитной мешалке до полного растворения вещества (1,5-2,0 часа). После фильтрации раствора взяли аликвоту (10-20 мл) и титровали 0,01 н раствором гидроксида натрия потенциометрически до рН 7,5 .Содержание свободных гидроксильных групп (K_c) рассчитывали по формуле [134]:

$$K, \% = \frac{N_{NaOH} \cdot V_{NaOH} \cdot 0,0045}{0,1q} \cdot 100, \quad (1)$$

где q- масса очищенного пектина, содержащаяся в аликвоте (1мл 0,1 н раствора NaOH соответствует 0,0045 г карбоксильных групп).

Определение этерифицированных карбоксильных групп. К оттитрованному раствору приливали точно 5 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия, плотно закрыли и оставили на два часа при 20-40°C для полного омыления. Избыток щелочи оттитровывали 0,1 н раствором HCl также потенциометрический до резкого скачка pH. Параллельно проводился холостой опыт. Содержание этерифицированных карбоксильных групп (Кэ) рассчитывали по формуле [134]:

$$K_{\text{э}} = N_{\text{HCl}} \cdot \frac{(V_{\text{HCl}}^1 - V_{\text{HCl}}^{11}) \cdot 0,0045}{0,1q} \cdot 100 \quad (2)$$

где V_{HCl}^1 - объем раствора HCl нормальности N , израсходованного на титрование холостого опыта,

V_{HCl}^{11} - объем раствора HCl, израсходованного на титрование пробы,

q - масса ПВ, г, содержащегося в аликвоте.

Наряду с этими методами определения функциональных групп, также были использованы традиционные методы определения карбоксильной и сложноэфирной групп. Сущность этих методов заключается в проведении вышеуказанных анализов на отдельных навесках фракций и расчета количества сложноэфирной группы по разности между общей и свободной карбоксильной группой.

2.6. Фотометрическое определение метоксильных групп [135]

Для быстрого гидролиза сложноэфирных групп выбранной фракции при 10 мг пектина растворяли в 8 мл 0,1 Н NaOH при комнатной температуре. Через 30 мин к щелочному раствору прилили 2 мл 2 н раствора H_2SO_4 , pH > 4,0. К 1 мл фильтрата прилили 1 мл 3×10^{-2} М KMnO_4 в 4,4 М H_3PO_4 , смесьоставили на 20 мин, затем прилили 0,5 мл свежеприготовленного 0,15 М водного раствора Na_2SO_3 . К 1 мл обесцвеченного раствора добавляли 0,5 мл раствора хромотроповой кислоты (30 мг/мл) и 3,5 мл H_2SO_4 (82 – 96 %), охлажденной до 0°C. Смесь выдерживали в кипящей водной бане 10 мин, охлаждали до комнатной

температуры и измеряли оптическую плотность при максимуме поглощения (570 нм) относительно нулевого раствора.

Содержание метоксильных групп в массовых процентах вычисляли по формуле:

$$\text{CH}_3\text{O} = \frac{D \cdot 100}{1,03 \cdot K \cdot l \cdot C_1} \quad (3)$$

Где D- оптическая плотность раствора при 570 нм;

l- толщина поглощающего слоя ;

K- условный коэффициент поглощения , равный $6,1 \text{ мл мг}^{-1} \text{ см}^{-1}$;

C₁- концентрация пектина в исходном растворе, мг/мл;

1,03- отношение молекулярных масс M CH₃OH/MCH₃O.

2.9. Определение степени набухания,

растворимости и зольности пектиновых полисахаридов

Навеску пектиновых полисахаридов в течение суток выдерживают в воде до равновесного набухания. Далее образцы помещают в центрифужную пробирку, снабжённую тефлоновой сеткой, при помощи центрифугирования со скоростью 5000 об/мин, отделяют межфазную воду. Образцы снова высушивают, взвешивают и по формуле (7) рассчитывают степень набухания [136]:

$$S = \frac{(W_1 - W_0)}{W_0} \quad (7),$$

где W₀ масса сухого образца; W₁-масса набухшего образца

Метод определения влажности. Образцы пектиновых полисахаридов в открытом бюксе помещают в сушильный шкаф и высушивают при температуре $98 \pm 2^\circ\text{C}$ до постоянной массы. Бюксы охлаждают в эксикаторе в течение 20-30 минут перед каждым взвешиванием. Первое взвешивание осуществляют через 180 минут, последующие – с интервалом 60 минут до стабилизации значений массы образцов. Погрешность взвешивания составляет не более $\pm 0,0002$ г.

Массовую долю влаги (W, %) рассчитывают по формуле (8), принимая за результат среднее арифметическое значение двух параллельных измерений. При

этом допустимое абсолютное расхождение между взвешиванием не должно превышать 0,5% ($P=0,95$) [137]:

$$W = \frac{m - m_0}{m} \cdot 100 \% \quad (8),$$

где, m – исходная масса образца, г ; m_0 - масса высушенного образца, г;

Для определения растворимости пектиновых полисахаридов в колбу, снабженную мешалкой и термометром, помещают образец и наливают дистиллированную воду. Колбу помещают в термостат, устанавливая температуру $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$, и включают мешалку. Через определённые интервалы времени отбирают необходимое количество полученного раствора, взвешивают и, затем, высушивают лиофильным способом. По формуле (9) рассчитывают значение растворимости пектиновых полисахаридов:

$$P = \frac{M_1}{M_2} \cdot 100 \% \quad (9),$$

где P - растворимость, %; M_1 – масса высушенного образца, г.; M_2 – масса раствора, взятого на анализ, г [138].

Для определения зольности пектиновых полисахаридов [139] 1 г образца помещают в предварительно доведённый до постоянного веса тигель, сжигают в муфельной печи и вновь взвешивают. Зольность рассчитывают по формуле:

$$Z = \frac{M_1}{M_2} \cdot 100 \% \quad (10),$$

где Z - зольность, % ; P_1 - масса вещества после сжигания, г; P_2 - масса вещества до сжигания, г [139,140].

2.10. Карбазольный метод определения уронидных составляющих пектиновых веществ

Перед проведением реакции с карбозолом необходимо провести деметоксилирование, так как различная степень метоксилирования затрудняет получение достоверных результатов [141]. Деметоксилирование проводят при комнатной температуре. Для этого к 0,5 мл раствора ПВ с концентрацией 0,5 мг/мл прилили 2 мл 0,05 н NaOH и через пол часа 2 мл 0,05 н HCl. Затем в пробирки отбирали по 0,5 мл деметоксилированного раствора пектина, помещали

в сосуд со льдом и осторожно по каплям приливали 3 мл раствора бората в серной кислоте (250 мг $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ х.ч. в 100 мл $\text{H}_2\text{SO}_4\rho=1,84$; химически чистую кислоту прогревали до начала выделения сернистого ангидрида, затем добавляли 0,15 г мочевины, хч). Пробирки с анализируемой пробой встряхивали в охлаждающей смеси и, после завершения реакции, нагревали 6 мин на кипящей водяной бане. После кипячения пробирки охлаждали в сосуде с водой и льдом. В две пробирки с экстрактом пектина и с водой добавляли по 0,1 мл 0,2 % -ного раствора карбазола в абсолютном этаноле (препарат карбазола перекристаллизован из бензола и очищен возгонкой) и вновь помещали в кипящую водяную баню на 10 мин. После охлаждения пробирок измеряли оптическую плотность раствора при 535 нм в кювете с рабочей длиной 1 см. Контролем служит третья пробирка, в которой смешивали раствор бората в серной кислоте с водой (3: 0,5) [141].

Содержание галактуроновой кислоты в пектине рассчитывали по формуле :

$$X, \% = \frac{a \cdot V_2 \cdot V \cdot 100}{g \cdot V_3 \cdot V_1 \cdot 1000000} , \quad (4)$$

где a - содержание галактуроновой кислоты в пробе, найденное по калибровочной кривой, мкг;

g - навеска образца, г;

V_1 - объем, взятый для разведения, мл;

V_2 - объем, полученный после разведения, мл;

V_3 - объем пробы, взятой для реакции с карбазолом, мл;

100 - коэффициент перевода в проценты;

1000000 - коэффициент перевода в граммы.

2.11. Количественное определение содержания кальция в макромолекулах пектина

Для определения содержания кальция в растительном сырье, необходимо перевести его из связанного в растворимое состояние. Для растворения кальция необходимы сильные кислоты, такие как HCl , H_2SO_4 , HNO_3 и др [142].

Для определения Ca^{2+} в ПВ, необходимое количество (100мг) образца обработали 4н раствором соляной кислоты (20 мл) и нейтрализовали 4н раствором NaOH (20 мл). Полученный раствор разбавили до 100мл, добавили 5 мл аммиачного буферного раствора, рН=10-11 (буферный раствор готовят следующим образом: взвешивают на технических весах 54 г NH_4Cl , отмеряют мензуркой 350 мл концентрированного раствора NH_4OH , смешивают их и разбавляют дистиллированной водой до общего объема 1л. NH_4Cl и NH_4OH не должны содержать щелочноземельных, цветных и черных металлов). Далее в раствор добавляли 0,5- 1,0 мл раствора индикатора эриохрома черного Т. (вместо раствора индикатора можно взять его порошкообразную смесь с NaCl 1:100, прибавляя ее небольшими порциями до получения винно- розовой окраски раствора). Раствор нагрели до 40°C и титровали 0,05н раствором трилона Б до перехода окраски в сине-зеленую. Если раствор не содержал заметных количеств солей магния, то перед титрованием вводили 5 г комплексоната магния $(\text{Na}^+)_2[\text{MgY}]^{2-}$ Если в растворе имелось небольшое количество тяжелых металлов, то в него добавляли 0,5 г Na_2S . Содержание кальция вычисляли по формуле [142]:

$$X_{\text{Ca}^{2+}} = \frac{V \cdot N \cdot V_1 \cdot 20,04}{V_2}, \quad (8)$$

где, V-объем раствора полученного после разведения, мл;

V_1 - объем раствора трилона Б, мл;

V_2 - объем пробы раствора, взятой для титрования, мл;

N- нормальность раствора трилона Б;

20.04- эквивалент ионов кальция [128].

2.12. Определение сорбционной активности пектиновых полисахаридов

К 50 мг исследуемого образца добавляют 3,0 мл раствора сорбата требуемой концентрации, 1 мл 1М буфера с необходимым значением рН, объём доводят дистиллированной водой до 5 мл. Содержимое ёмкости перемешивают и инкубируют при комнатной температуре. После окончания инкубации отбирают 2,5 мл пробы. Количество связавшегося сорбата вычисляют по формуле (11):

$$q = V(Q - C_f) / M, \quad (11)$$

где V - объём раствора в инкубационной ёмкости (л); Q - исходная концентрация сорбата (ммоль/л); C_f - равновесная концентрация сорбата; M – масса образца пектинового полисахарида (г).

Для определения концентрации ионов металлов в растворе применяют титриметрический (комплексометрический) метод [143]. Для оценки сорбционной ёмкости образцов по отношению к билирубину применяют биохимические методы. В инкубационную ёмкость помещают раствор билирубина с необходимой концентрацией, вносят навеску исследуемого вещества. После окончания инкубации, в надосадочной жидкости при помощи спектрофотометрического метода (длина волны 546 нм) определяют остаточное количество билирубина. Разницу между его начальной и конечной концентрацией в растворе принимают за количество связанного билирубина [143,144].

Для исследования скорости протекания процесса сорбции, навеску исследуемого образца инкубируют при комнатной температуре и $pH=5,0$. Продолжительность инкубации для пектиновых полисахаридов, растворимых в воде, составляет от 15 сек. до 120 мин. Максимальное значение сорбционной ёмкости, зарегистрированной в процессе исследования, принимают за 100%, а количество связанных ионов сорбата выражают в процентах от максимальной сорбционной ёмкости.

Изучение зависимости сорбционной ёмкости от равновесной концентрации сорбата проводят при $pH 6,0$, продолжительности инкубации 120 мин., температуре $24^{\circ}C$. К исследуемому образцу добавляют 10 мл раствора сорбата при постоянном перемешивании. Диапазон концентраций, использованных в работе, приведён в Главе 5 настоящей работы. Полученные результаты обрабатывают при помощи уравнений связывания [145]:

1. Уравнение Лэнгмюра, позволяющее описать процесс сорбции на одинарном гомогенном слое сорбента с конечным количеством активных центров связывания:

$$q = q_{\max} \frac{bC_f}{1 + bC_f} \quad (12),$$

где q – сорбционная ёмкость; q_{\max} – максимальная сорбционная ёмкость; b – коэффициент аффинитета между сорбентом и сорбатом; C_f – остаточная концентрация металла в растворе.

При помощи данного уравнения определяется коэффициент q_{\max} , отражающий количество сорбционных центров в молекуле сорбента, активно взаимодействующих с сорбатом, и коэффициент b , указывающий на степень аффинитета между конкретным сорбентом и сорбатом. Для расчета параметров изотермы Лэнгмюра был использован метод линеаризации [145,146]:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_{\max}} + \frac{1}{q_{\max}}$$

2. Уравнение Фрейндлиха, применимое для описания процессов сорбции веществ на одинарном гетерогенном слое сорбента с неопределённым количеством активных центров связывания. Особенностью этой модели является невозможность расчета количества активных центров на единице связывающего агента. Уравнение расчёта Фрейндлиха выглядит следующим образом:

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e,$$

где q_e – сорбционная ёмкость при данной равновесной концентрации; C_e – равновесная концентрация; K_F – коэффициент Фрейндлиха, отражающий количество и прочность образующихся связей между сорбатом и сорбентом; n – коэффициент, отражающий интенсивность течения сорбционных процессов.

Данная модель позволяет оценить прочность и скорость образования химических связей между сорбентом и сорбатом [146].

Для определения содержания тяжёлых металлов и токсинов в биологических образцах материал высушивают в термостате при 85°C до постоянной массы. Измельчённые навески переводят в раствор с помощью мокрого озоления в смеси концентрированных кислот ($\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4$, 2:1 об/об). Высушенный остаток растворяют в 0,1 н. HCl и используют для анализа металлов

[143]. Определение активности аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови проводят с помощью наборов реактивов «Биолахема-тест», определение содержания общего и прямого билирубина – используя стандартный набор «Билирубин – Витал» [147].

Расчёт коэффициентов уравнений Лэнгмюра и Фрейндлиха проводят с использованием программного обеспечения Microsoft Office for Windows, Excel, 2010. Для статистического анализа и обработки результатов исследования рассчитывают средние арифметические величины и ошибки средних арифметических. Оценку достоверности различия результатов экспериментальных наблюдений проводят в сравнении с контролем с применением t-критерия Стьюдента для малых величин ($n < 30$) [148]. Для оценки результатов исследований с несколькими выборками используют метод однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими проведением теста Tukey's [149]. Уровень значимости считают достоверным при $p < 0,05$ [140].

2.13. Определение уроновых кислот с помощью мета-гидроксифенильного метода

Используют готовый стандартный раствор ГК или образца ПВ с концентрацией 100 мкг/мл. Перед растворением стандарта или образца их необходимо поместить в вакуум на сутки. Работать можно максимум с 10-ю пробирками. Готовят серию растворов для построения калибровочной кривой: 25 %, 50 %, 75 % и 100 % .

В пробирку помещают 0.4 мл раствора, добавляют 40 мкл 4 молярного раствора сульфаминовой кислоты. Пробирки закрывают и перемешивают. Далее, помещают в сосуд с водой и льдом, осторожно приливают 2.5 мл раствора тетрабората натрия в серной кислоте.

Пробирки встряхивают в охлажденной смеси и нагревают 15 минут в кипящей водяной бане. После этого, пробирки охлаждают в сосуде с водой и льдом в течение 1 – 1.5 мин. Далее, в пробирки добавляют 80 мкл 0.5 % - ного раствора метагидроксифенила и оставляют на 3 минуты. После чего, пробирки

перемешивают до появления окраски. Оптическую плотность измеряют при 525 нм (окраска стабильна в течение 13 минут). Содержание ГК вычисляют по формуле.

$$X = a \cdot V_2 \cdot V \cdot 100 / H \cdot V_3 \cdot V_1 \cdot 1000000 \quad (2.4)$$

где а – содержание ГК в пробе, найденное по калибровочной кривой, мкг;

H – масса навески, г;

V – объем, экстракта, полученного из навески, мл;

V1 – объем, взятый для разведения, мл;

V2 – объем, полученный после разведения, мл;

V3 – объем пробы, взятой для реакции, мл;

100 – коэффициент перевода в проценты.

Построение калибровочной кривой ГК (м – гидроксидифенильный метод).

Готовили стандартный раствор ГК с концентрацией 100 мкг/мл. Путем разбавления была приготовлена серия растворов для калибровки: 25 %, 50 %, 75% и 100 %. Для повышения достоверности результатов также готовили растворы: 20 %, 40 %, 60 % и 85 %. Дальнейшие исследования проводились по методу 2. На основании полученных данных строили калибровочную кривую галактуроновой кислоты [131,141].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние кислотности раствора, фонового электролита и скорости потока на гидролиз-экстракции корзинки подсолнечника в динамическом режиме

Разработка новых способов получения пектиновых полисахаридов направлена, как на увеличение выхода целевых продуктов, так и на оптимизацию их основных физико-химических параметров и студне- и комплексообразующих свойств. Главными факторами, определяющими выход, состав, структуру и свойства пектинов является природа сырьевого источника, а также способ, режим и параметры процесса гидролиз-экстракции [150,151]. Ранее сотрудниками лаборатории ВМС Института химии им. В.И.Никитина АН РТ на примере различного сырья, методами кислотного гидролиза-экстракции в статическом (СР) и динамическом (ДР) режимах [151] было показано преимущество последнего метода для получения высококачественных пектиновых полисахаридов с высоким выходом. О качестве продуктов распада протопектина, как правило, судят по содержанию в них звеньев галактуроновой кислоты (ГК) и степени их метоксилирования или степени этерификации (СЭ). Как правило, с увеличением значений этих параметров улучшаются желирующие свойства пектиновых полисахаридов. Важнейшими физико-химическими параметрами процесса гидролиз экстракции, способными регулировать моносахаридный состав пектиновых веществ является рН, ионная сила раствора, температура и давление, а в динамическом режиме появляется дополнительный параметр - скорость потока гидролизующего раствора.

Целью данной части работы явилось выявление воздействия рН, ионной силы и скорости потока гидролизующего раствора на распад ПП КП, а также на выход и содержание уронидных составляющих пектиновых полисахаридов, полученных в условиях динамического режима.

Действие скорости потока. В качестве сырья были использованы корзинки подсолнечника (КП), являющиеся источником большого количества

водонабухающих и водорастворимых компонентов распада протопектина. Экстрагентом служил раствор соляной кислоты. Была выбрана прямоточная экстракционная колонка общей высотой 78 см, высотой нагревательного элемента 44 см и диаметром 3,3 см. Максимальная загрузка сырья в экстрактор составляла 20 г. В процессе гидролиз-экстракции раствор-гидролизат выводился из системы со скоростью, равной скорости поступления гидролизующего агента в экстрактор.

Исследование процесса распада протопектина в ДР были проведены при температуре процесса 85°C, скорости потока элюанта от 3 до 6 мл/мин, при $pH_{исх}=1,2$. Раствор-гидролизат разделяли на выходе на восемь фракции по 50 мл. В пределах каждой фракции пектиновые полисахариды разделяли на три фракции: водонабухающую часть (гидрогель), условно названную нами микрогель (МГ), отделяли центрифугированием, осаждением этиловым спиртом из маточного раствора выделяли пектиновые вещества (ПВ) и выпариванием оставшегося раствора – олигосахариды (ОС).

В качестве примера на таблицах 3.1 и 3.2 приводятся значения выхода фракций МГ, ПВ и ОС. Эти данные отнесены в процентах по отношению к исходному количеству сухих КП при фиксированной скорости потока гидролизующего раствора 5 мл/мин. В этих же таблицах приводятся также содержание остатков ГК и их метоксилированных звеньев во фракциях МГ и ПВ, а также экспериментальные данные по численным значениям кислотных и эфирных чисел. На рисунке 3.1 представлено изменение суммарного содержания фракций МГ, ПВ и ОС в зависимости от исходного значения скорости потока. Возрастание скорости потока гидролизующего раствора приводит к пропорциональному увеличению выходов всех компонентов реакции – МГ, ПВ и ОС. При этом содержание основных компонентов МГ и ПВ очень близки между собой, хотя имеется тенденция к увеличению содержания первого по сравнению со вторым, с ростом скорости потока. Суммарное содержание этих продуктов, в зависимости от скорости потока, достигает от 20 до 30 процентов, что значительно больше, чем выход пектиновых полисахаридов в СР.

Таблица 3.1

Выход и параметры фракций МГ

| V р-ра, мл | Выход, % | ГК, % | Кс, % | Кэ, % | СЭ, % |
|---------------|----------|-------|-------|-------|-------|
| 50 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 100 | 1.13 | 63.00 | 10.44 | 5.04 | 32.56 |
| 150 | 6.54 | 81.00 | 9.18 | 7.02 | 43.33 |
| 200 | 3.27 | 72.00 | 9.54 | 6.12 | 39.08 |
| 250 | 1.54 | 66.00 | 10.80 | 4.68 | 30.23 |
| 300 | 0.53 | 64.20 | 10.98 | 4.50 | 29.07 |
| 350 | 0.22 | 62.40 | 11.16 | 4.32 | 27.91 |
| 400 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| сумма | 13.23 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

Таблица 3.2

Выход и параметры фракций ПВ

| V р-ра, мл | Выход, % | ГК, % | Кс, % | Кэ, % | СЭ, % | ОС, % |
|---------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 50 | 0.18 | 40.2 | 10.26 | 4.86 | 32.14 | 0.40 |
| 100 | 0.27 | 55.2 | 9.90 | 5.22 | 34.52 | 1.48 |
| 150 | 0.33 | 63.0 | 9.54 | 5.76 | 37.65 | 1.68 |
| 200 | 1.78 | 70.2 | 8.46 | 7.02 | 45.35 | 1.85 |
| 250 | 3.10 | 75.0 | 8.10 | 7.56 | 48.28 | 2.37 |
| 300 | 3.20 | 73.8 | 8.28 | 7.38 | 47.13 | 3.12 |
| 350 | 3.35 | 67.9 | 8.82 | 6.66 | 43.02 | 4.89 |
| 400 | 3.60 | 61.2 | 9.54 | 5.94 | 38.37 | 7.15 |
| сумма | 15.81 | 0.0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 22.94 |

Наибольшее количество продуктов распада ПП приходится на долю ОС, содержание которых находится в области 20% и мало изменяется с изменением скорости потока. Наиболее ценные продукты распада ПП – МГ и ПВ достигают 30%. Распад ПП составляет почти 60%. Данный факт доказывает, что при гидролиз-экстракции в динамическом режиме выделяется намного больше гидролизованного протопектина, по сравнению с другими способами получения пектиновых полисахаридов. Несмотря на близость суммарных выходов МГ и ПВ, распределение этих фракций внутри объёмов выхода существенно различаются (рис. 3.2).

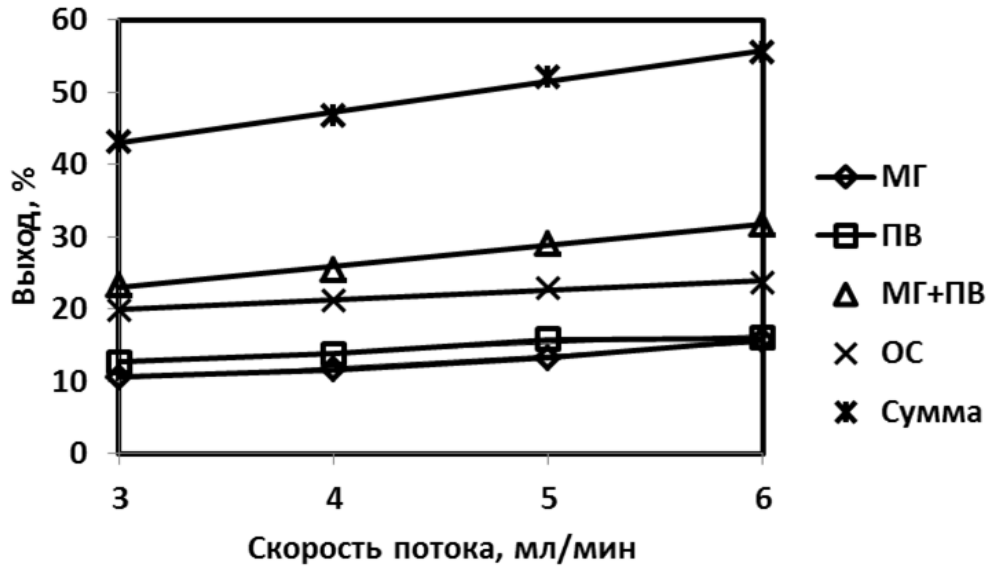


Рис. 3.1. Действие скорости потока гидролизующего раствора на распределение продуктов распада протопектина. $T=85^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=1,2$.

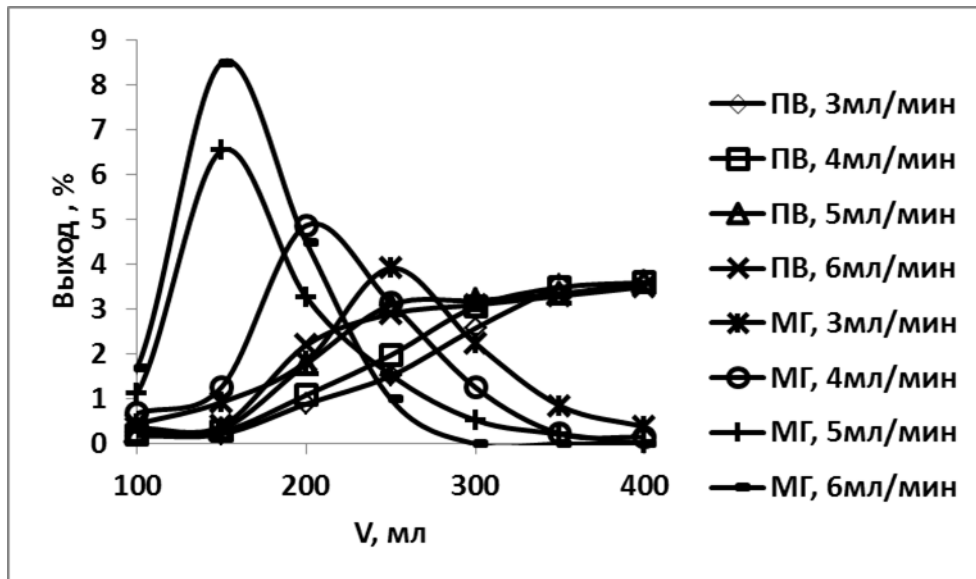


Рис.3.2. Зависимость выхода МГ и ПВ от объёма выхода при различных скоростях потока гидролизующего раствора. $T=85^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=1,2$.

С ростом скорости потока растворителя максимум выхода МГ смещается в сторону меньшего объёма и наибольшее значение, при скорости потока 6 мл/мин, достигается в области 150 мл, в то время как максимум выхода ПВ находится в

области более 300 мл. При этом выход ПВ в 2.5 - 3 раза меньше, чем МГ (рис 3.2). Так, например, при скорости потока 3 мл/мин выход МГ и ПВ в области максимума ($V=250$ мл) практически находится на одном уровне, а при скорости 6 мл/мин выход МГ почти в 3 раза больше, чем ПВ и максимум выхода этих компонентов, соответственно, приходится на 150 и 300 мл.

Такое распределение МГ и ПВ, в зависимости от объёма выхода, является косвенным доказательством ранее выдвинутых предположений [152,153] о последовательности распада ПП на МГ и далее на ПВ. Важно, что в динамическом режиме с изменением скорости потока удаётся регулировать молекулярную массу компонентов распада ПП, а также, выход МГ и ПВ.

Важность такого подхода заключается в том, что путём регулирования скорости потока растворителя, наряду с другими параметрами процесса, можно направить реакцию распада ПП преимущественно в сторону получения МГ или ПВ. Что касается ОС, с ростом скорости потока происходит снижение его выхода (рис. 3.3), что связано, по-видимому, с уменьшением процесса деструкции макромолекул ПП из-за снижения контакта гидролизующего раствора с растительным материалом.

Наряду с перераспределением значений выхода компонентов распада протопектина – МГ, ПВ и ОС существенное изменение претерпевает и распределение моносахаридных остатков в макромолекулах соответствующих продуктов. При этом, чем больше выход МГ, тем выше в нём содержание ГК (рис. 3.4), а степень этерификации ГК выше в ПВ, несмотря на меньший выход, (рис. 3.5), что обуславливает хорошую растворимость ПВ в воде с ростом в них этерифицированных остатков ГК.

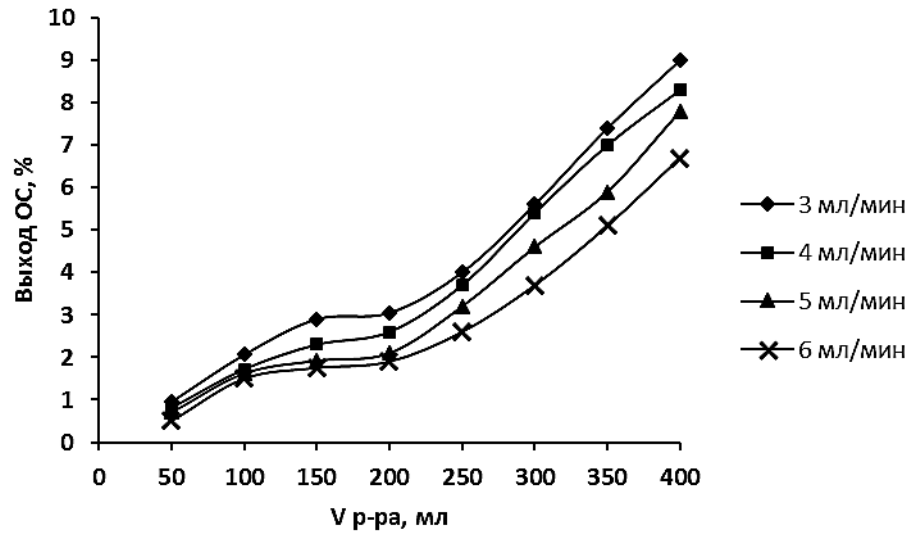


Рис. 3.3. Зависимость выхода ОС от объёма выхода компонентов при различной скорости потока гидролизующего раствора. $T=85^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=1,2$.

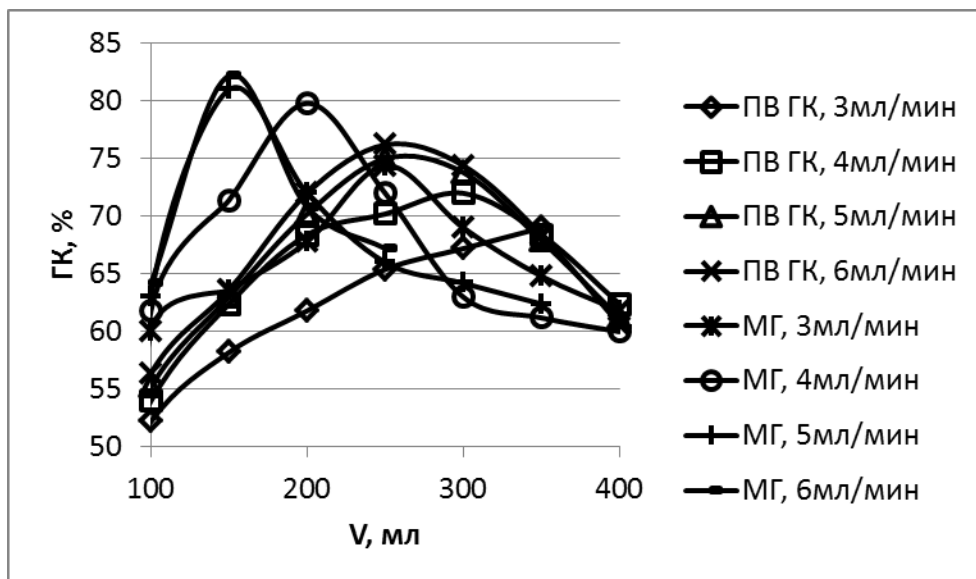


Рис. 3.4. Содержание остатков ГК в МГ и ПВ в зависимости от объёма выхода компонентов при различной скорости потока гидролизующего раствора. $T=85^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=1,2$.

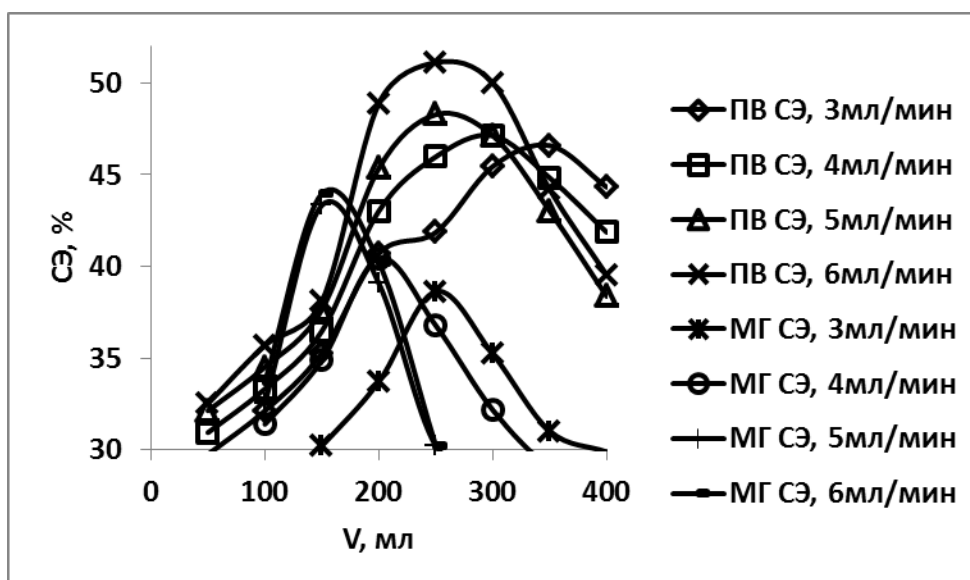


Рис. 3.5. Содержание этерифицированных остатков ГК в МГ и ПВ в зависимости от объема выхода компонентов при различной скорости потока гидролизующего раствора. $T=85^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=1,2$.

Таким образом, изучение воздействия скорости потока гидролизующего раствора на выход и моносахаридный состав компонентов распада ПП КП показывает возможность широкого варьирования этих параметров непосредственно на стадии получения пектиновых полисахаридов с получением широкого набора водонабухающих и водорастворимых продуктов на основе природных макромолекулярных полиэлектролитов.

Влияние кислотности раствора и фонового электролита. На рисунке 3.6 приводится значение выхода фракций МГ, ПВ и ОС при различных величинах pH раствора в условии гидролиза-экстракции в СР и ДР.

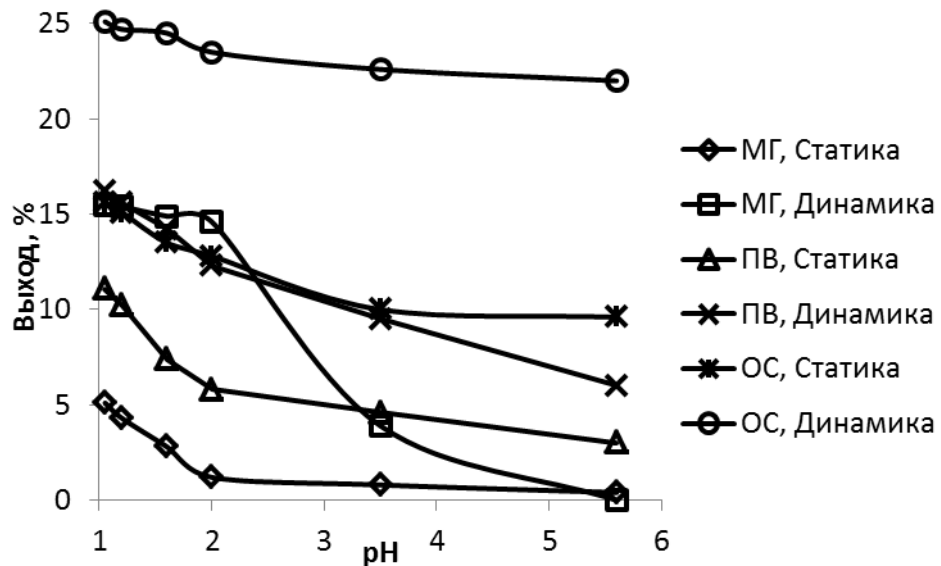


Рис.3.6. Действие рН гидролизующего раствора на выход продуктов распада протопектина КП в СР и ДР. $T=85^{\circ}\text{C}$.

На данном рисунке видно, что наибольшее значение выходов всех компонентов распада ПП (МГ, ПВ, ОС) наблюдается при минимальных, из выбранных значений рН раствора (рН от 1.05 до 1.2) и происходит пропорциональное снижение выходов до значений рН=2. В этой области значений рН, выход МГ в ДР более 3 раза превышает значения выхода МГ в СР, а значение этого параметра для ПВ в аналогичных условиях 1.5 раза больше.

Выход олигосахаридов достаточно высокий, как для СР, так и для ДР. Это, скорее всего, связано с распадом боковых ответвлений макромолекул пектиновых полисахаридов, состоящих в основном из остатков нейтральных сахаров. Последующее возрастание значений рН гидролизующего раствора, как и ожидалось, приводит к пропорциональному снижению выходов всех компонентов реакции – МГ, ПВ и ОС. При прочих равных условиях содержание всех компонентов реакции распада ПП КП в ДР больше, чем в СР. Одним из основных параметров, определяющих качество пектиновых полисахаридов, является содержание звеньев галактуроновой кислоты (рис. 3.7) и степень их этерификации (рис.3.8).

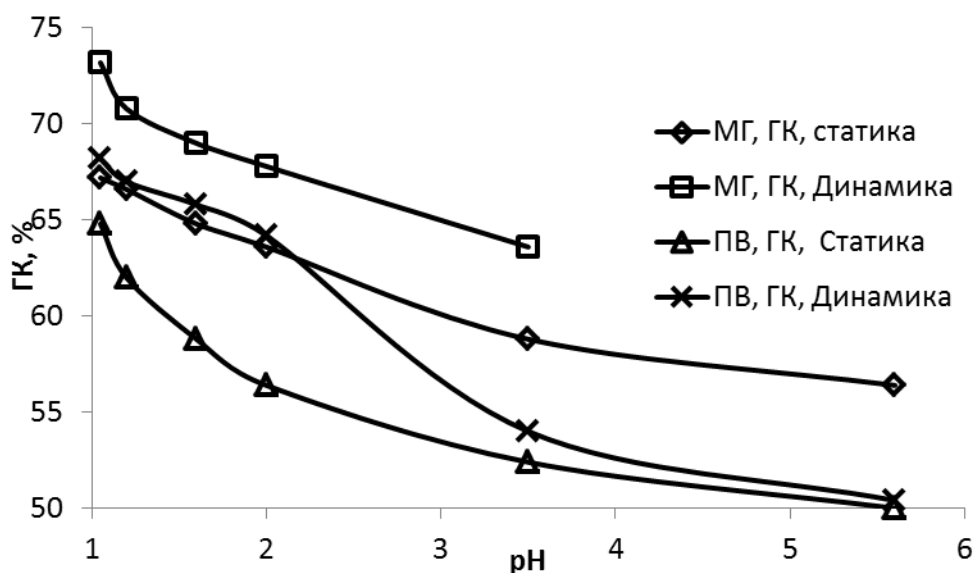


Рис. 3.7. Содержание звеньев ГК в МГ и ПВ, полученных в условиях СР и ДР. $T=85^{\circ}\text{C}$.

На рисунке 3.7 видно, что содержание ГК, при прочих равных условиях в МГ больше, чем в ПВ и в зависимости от режима гидролиз экстракции в области рН от 1.05 до 3.5 происходит возрастание значение этого параметра от 53 до 74%, т.е. более, чем на 20%.

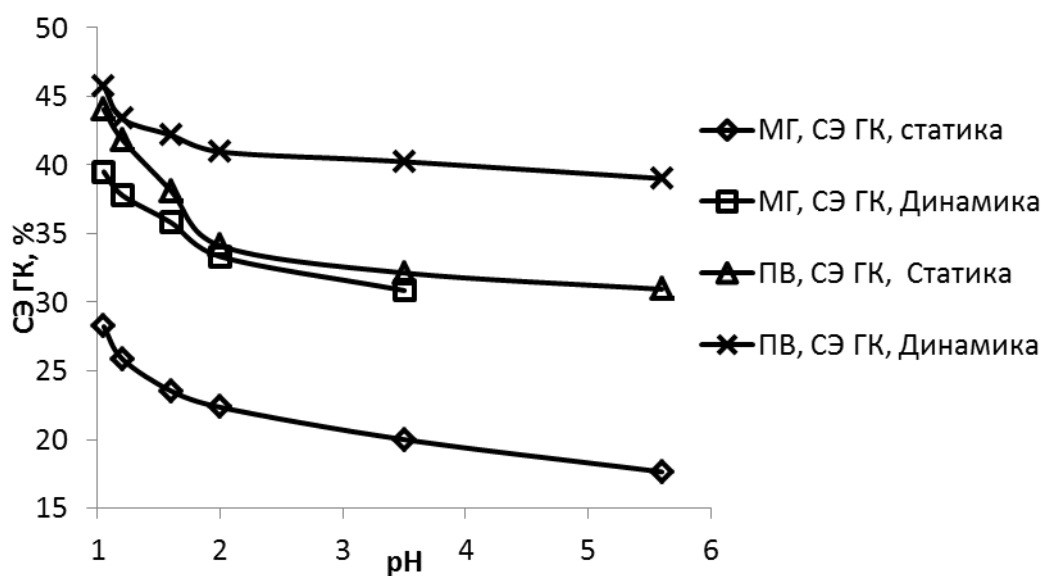


Рис. 3.8. Содержание этерифицированных звеньев ГК в МГ и ПВ, полученных в условиях СР и ДР. $T=85^{\circ}\text{C}$.

Это существенное изменение величины данного параметра и приводит к значительному улучшению качества соответствующих продуктов распада ПП КП. Во всех случаях возрастание содержания звеньев ГК в моносахаридном составе пектиновых полисахаридов независимо от условий гидролиз экстракции, по-видимому, связано с распадом ПП КП, в основном по связям, образованным остатками нейтральных сахаров. Устойчивость участков цепи, содержавших остатки ГК, по-видимому, связано, межмолекулярным образованием с участием карбоксильных групп и ионов кальция. Что касается влияния режимов гидролиз экстракции на содержание звеньев ГК в продуктах распада ПП КП, то как видно на рисунке 3.7 содержание ГК, во всех продуктах распада в условиях ДР больше, чем СР. Это связано, по-видимому, в неизменностью величины рН в потоке гидролизующего раствора в условиях ДР и увеличением рН раствора в условиях СР [153]. Относительно степени этерификации ГК следует отметить, что с увеличением величины этого параметра растворимость пектиновых полисахаридов возрастает и, естественно, они из МГ переходят во фракцию ПВ. Действительно, как видно на рисунке 3.8 в целом все продукты распада ПП КП содержат низкоэтерифицированные звенья ГК. Тем не менее, при прочих равных условиях содержания этерифицированных звеньев в ПВ больше, чем во фракции МГ. В области рН от 1.05 до 3.5 величина этого параметра изменяется от 20% в МГ полученном в условии СР до 45% в ПВ, полученной в условии ДР.

Таким образом, проведение процесса гидролиз экстракции КП в условиях СР и ДР и широкой области рН гидролизующего раствора показало, значительное преимущество второго способа по сравнению с первым, заключающегося в увеличении выходов как МГ, так и ПВ одновременно с возрастанием содержания уронидных составляющих моносахаридного состава, приводящего к улучшению качества продуктов распада протопектина КП.

Учитывая улучшение основных показателей продуктов распада ПП КП в условиях ДР по сравнению с СР, дальнейшее изучение процесса проводили в ДР проводя предварительную промывку исходного сырья в колонке раствором хлорида натрия разной концентрации с последующей гидролиз экстракцией.

Предполагается, что при этом происходит ионообменная реакция, с одновременным разрушением связей, образованными ионами кальция с карбоксильными группами остатков ГК и его замена на ионы натрия. На рисунке 3.9 приводится зависимость выхода компонентов распада ПП КП, предварительно обработанными растворами NaCl разной концентрации. При прочих равных условиях, в полном соответствии с высказанным предположением, с увеличением концентрации NaCl из-за вымывания ионов кальция из матрицы ПП происходит снижение выхода МГ с одновременным увеличением выходов водорастворимых ПВ. При этом в области рН 1.05 до 2.0 выход МГ снижается от 16 до 6 процентов, а выход ПВ возрастает от 12-16 до 19%, одновременно возрастает содержание звеньев ГК достигая более 80% в МГ (рис. 3.10) и в ПВ до 75%. Предварительная обработка раствором NaCl приводит, также к возрастанию степени этерификации, как МГ, так и ПВ, достигая соответственно до 40 и 53% (рис. 3.11).

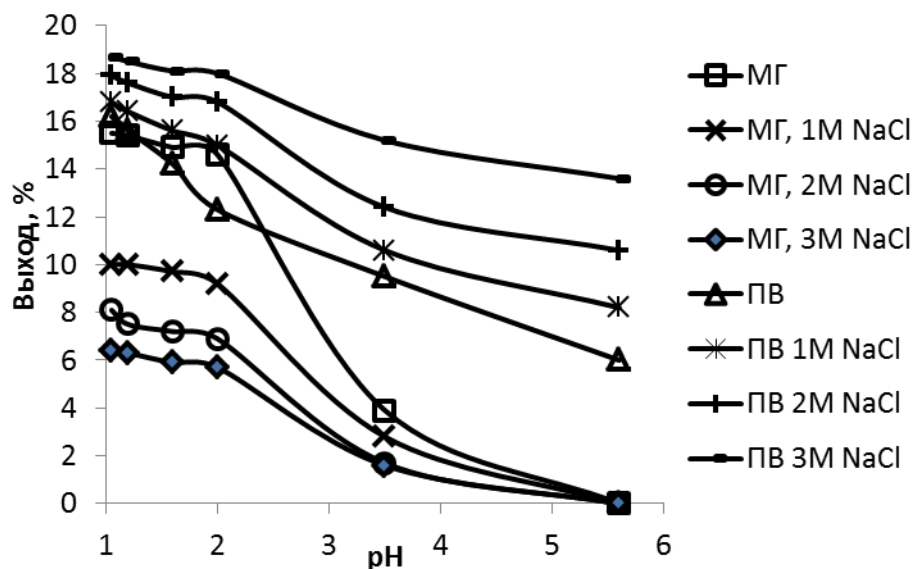


Рис.3.9. Зависимость выхода МГ и ПВ от рН при предварительной обработке КП раствором хлорида натрия разной концентрации. T=85°C.

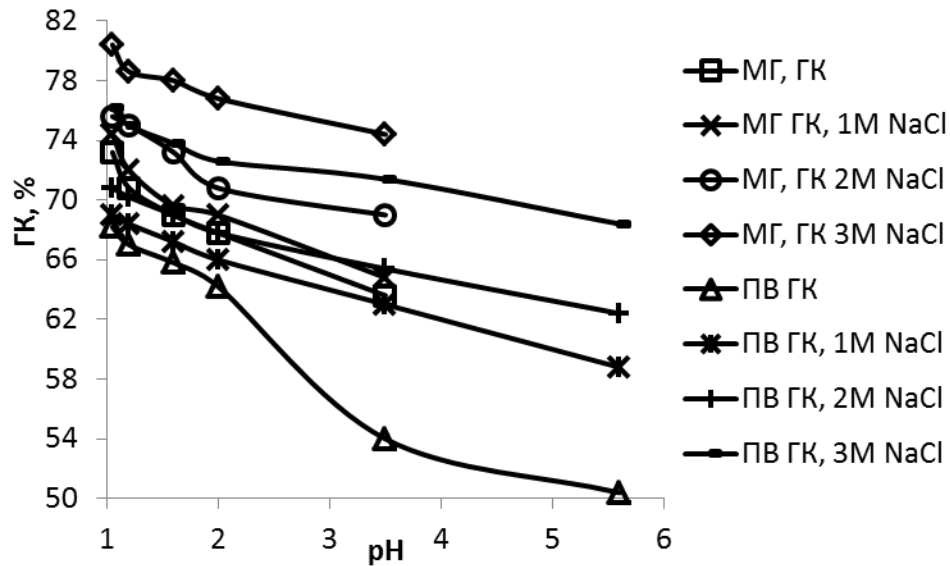


Рис.3.10. Содержание остатков ГК в МГ и ПВ при различных pH гидролизующего раствора. T=85°C.

Механизм воздействия концентрации неорганических ионов, как уже была показана в работе [154] заключается в ускорении реакции не только под действием кислоты, но и ему способствует анионы и молекулы недиссоциированных кислот на основании следующей формулы:

$$\vartheta = \vartheta_0 + (k_{A^-} + k_M \frac{[HA]}{[A^-]}) [A^-]$$

где, $[A^-]$ – концентрации аниона.

ϑ_0 - скорость реакции в отсутствии неорганической соли.

Скорость реакции образования ПВ на основании этой уравнение при гидролизе ПП должна увеличиваться по прямой линии с повышением концентрации соли, дающей анион A^- . В таблице 3.3 приводится взаимосвязь скорость реакции от концентрации NaCl в соответствии приведённой уравнении в исследованной области pH гидролизующего раствора.

Как видно из данных таблицы 3.3 во всей области pH гидролизующего раствора с ростом концентрации соли скорость реакции образования ПВ возрастает по уравнению прямой линии с коэффициентом корреляции во всех случаях более 0,96.

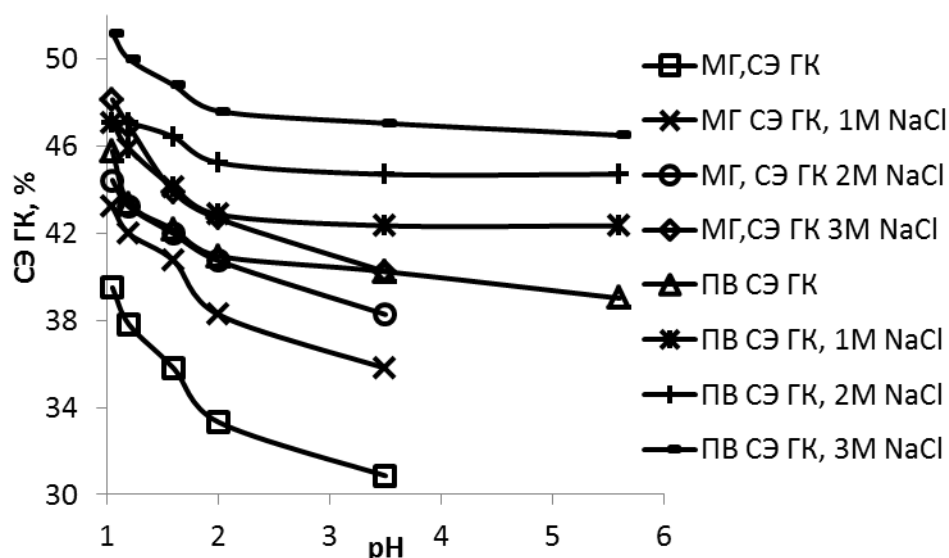


Рис.3.11. Содержание этерифицированных остатков ГК в МГ и ПВ при различных рН гидролизующего раствора. $T=85^{\circ}\text{C}$.

Таблица 3.3

Уравнение корреляции, описывающее взаимосвязь скорости образования ПВ от концентрации NaCl при распаде ПП КП при различных рН в условиях ДР

| рН | Уравнение корреляции | Коэффициент корреляции |
|------|---|------------------------|
| 1.05 | $v(\text{ПВ}) = 0.0143[\text{NaCl}] + 0.2685$ | $R^2 = 0.9888$ |
| 1.2 | $v(\text{ПВ}) = 0.0165[\text{NaCl}] + 0.2590$ | $R^2 = 0.9945$ |
| 1.6 | $v(\text{ПВ}) = 0.0218[\text{NaCl}] + 0.2377$ | $R^2 = 0.9969$ |
| 2.0 | $v(\text{ПВ}) = 0.0315[\text{NaCl}] + 0.2115$ | $R^2 = 0.9692$ |
| 3.5 | $v(\text{ПВ}) = 0.0315[\text{NaCl}] + 0.1515$ | $R^2 = 0.9609$ |
| 5.6 | $v(\text{ПВ}) = 0.0420[\text{NaCl}] + 0.0970$ | $R^2 = 0.9947$ |

Таким образом, изучение воздействия рН и ионной силы, наряду с такими параметрами как температура, давление [129] и скорость потока [155] гидролизующего раствора на выход и моносахаридный состав компонентов распада ПП КП показывает, что они также оказывают существенное влияние на свойства и формирование структуры пектиновых полисахаридов корзинки подсолнечника.

3.2. Набухаемость гидрогелей на основе пектиновых полисахаридов корзинки подсолнечника в воде

Набухание полимеров в растворителе, в частности в воде, является важнейшей стадией растворения полимеров. Изучение кинетики и термодинамики процесса набухания макромолекулярных систем позволяет установить наличие различных надмолекулярных образований, макромолекул с линейной и сетчатой структурой, которые, в свою очередь, влияют на комплекс физико-механических свойств соответствующих продуктов. Пектиновые полисахариды по своей сути являются сетчатым природным полимером, и располагаются в межклеточной области растительных материалов в виде протопектина (ПП). Поэтому при кислотном гидролиз-экстракции растительного сырья, в качестве главных продуктов выделяются водонабухающая фракция – гидрогель (микроголь) и водорастворимая фракция – пектиновые вещества (ПВ).

В предыдущем разделе нами приведены различные способы регулирования значений выхода МГ и ПВ, которые позволяют управлять процессом гидролиз-экстракции в сторону преимущественного увеличения выхода, как первого, так и второго компонента распада протопектина. Несмотря на множество сведений о структуре и свойствах пектиновых веществ [156] в литературе имеется очень мало данных об аналогических свойствах гидрогеля пектиновых полисахаридов. В связи с этим целью настоящей части работы явилось изучение кинетики набухания МГ КП при различных рН, расчёт кинетических параметров набухания и реакций, сопровождающих этот процесс.

Гидрогели пектиновых полисахаридов КП были получены в статическом режиме при температуре 85°C, продолжительности реакции гидролиз-экстракции 60 минут, с последующем центрифугированием раствора-гидролизата. Характеристики полученного гидрогеля были следующими: выход гидрогеля 3.35%, содержание ГК – 66.6%, содержание этерифицированных групп ГК – 25.88%, содержания ионов кальция – 4.25%. Степень набухания гидрогеля (S) в воде определяли, как количество поглощённой полимером жидкости (V),

отнесённое к единице объёма исходного полимера (V_0) и рассчитывали по формуле: $S=(V-V_0)/V_0$.

По экспериментальным данным зависимости степени набухания (S) от продолжительности процесса (t) (рис. 3.12), предполагая возможность его описания кинетическим уравнением первого порядка ($dS/dt=k(S_{пр}-S)$), были рассчитаны значения предельной степени набухания ($S_{пр}$), а используя интегральную форму этого уравнения: $\ln(S_{пр}-S)=\ln S_{пр}-kt$ значения постоянного набухания (k) (рис.3.13, табл.3.4).

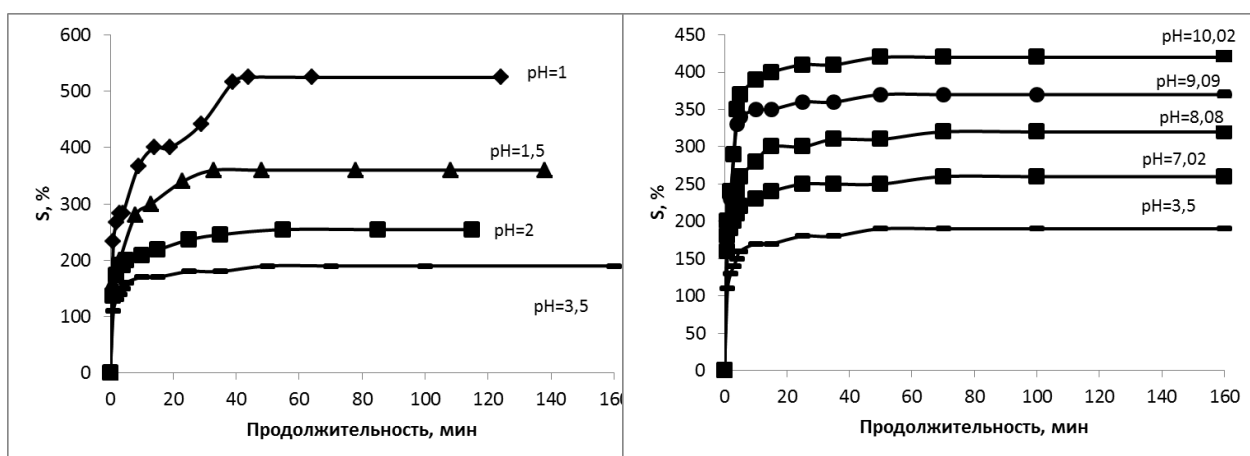


Рис.3.12. Зависимость степени набухания гидрогеля КП от продолжительности процесса при различной кислотности раствора.

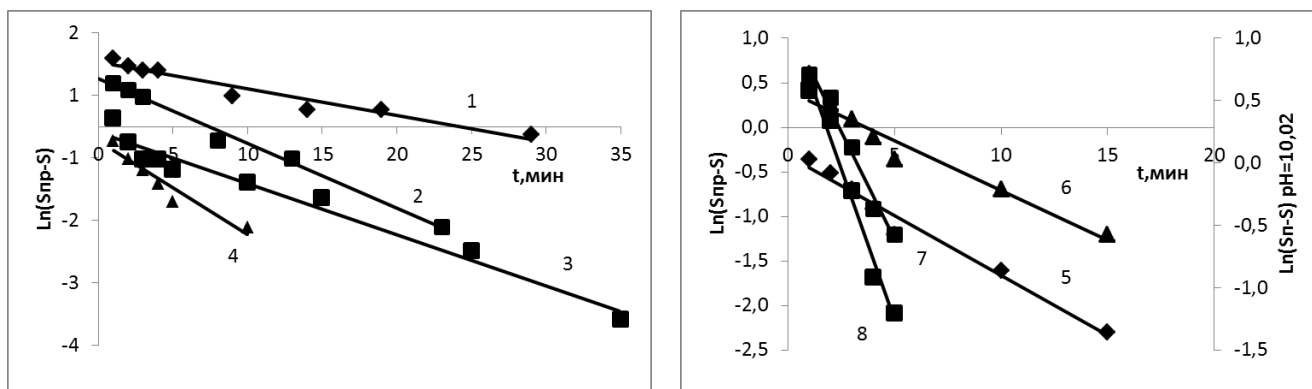


Рис.3.13. Кинетика набухания гидрогеля КП в начальной области процесса при различной кислотности раствора. pH=: 1.0 (1), 1.5 (2), 2.0 (3), 3.5 (4), 7.02 (5), 8.08 (6), 9.09 (7) и 10.02 (8).

Корреляционные уравнения и величина достоверности аппроксимации (R^2), описывающие начальную кинетику набухания гидрогеля КП при различной кислотности раствора

| pH | Уравнение корреляции | R^2 | $k_{\text{наб}}$ |
|-------|--|--------|------------------|
| 1.00 | $\text{Ln}(S_{\text{пр}} - S) = -0.0425t + 1.0248$ | 0.9438 | 0.043 |
| 1.50 | $\text{Ln}(S_{\text{пр}} - S) = -0.1036t + 0.7646$ | 0.9916 | 0.104 |
| 2.00 | $\text{Ln}(S_{\text{пр}} - S) = -0.0819t - 0.0894$ | 0.9684 | 0.082 |
| 3.50 | $\text{Ln}(S_{\text{пр}} - S) = -0.1498t - 0.2351$ | 0.9215 | 0.150 |
| 7.02 | $\text{Ln}(S_{\text{пр}} - S) = -0.1346t - 0.3154$ | 0.9755 | 0.135 |
| 8.08 | $\text{Ln}(S_{\text{пр}} - S) = -0.1113t + 0.4082$ | 0.9642 | 0.111 |
| 9.09 | $\text{Ln}(S_{\text{пр}} - S) = -0.4836t + 1.1671$ | 0.9767 | 0.484 |
| 10.02 | $\text{Ln}(S_{\text{пр}} - S) = -0.4836t + 1.1671$ | 0.9767 | 0.484 |

На рис. 3.12 видно, что набухание гидрогеля в воде при различных значениях pH происходит очень быстро, достигая почти своего предельного значения в течение 20 минут. Наименьшее значение предельного набухания гидрогеля КП наблюдается в нейтральной области, а максимальное – в щелочной. Начальная область кинетики набухания достаточно хорошо описывается уравнением первого порядка (рис. 3.13), что видно по данным достоверности аппроксимации прямых линий (R^2), которые, за исключением значения pH 1.0 и 3.5, во всех случаях составляют величины более 0.95 (табл. 3.4).

На рис. 3.14 представлены значения $k_{\text{наб}}$, рассчитанные по соответствующим уравнениям кинетики набухания, в зависимости от pH раствора. При обсуждении водопоглощающих способностей гидрогелей КП следует особое внимание обратить на структуру исходного полисахарида, наличие или отсутствие сетчатой структуры, природу соответствующих узлов, наличие ковалентных, ионных или водородных связей. Известно [157], что исходный протопектин представляет собой сетчатый полимер, где узлы пространственной сетки образованы связями ионов кальция с карбоксильными группами остатков галактуроновой кислоты.

Кроме этого в стабилизации сетчатой структуры могут участвовать водородные связи, в особенности в нейтральной области рН. Именно этим, а также значением рК пектиновых веществ, равным приблизительно четырём [158], по-видимому, обуславливается низкое значение предельного набухания ($S_{пр}$) гидрогелей в этом интервале рН (рис. 3.15).

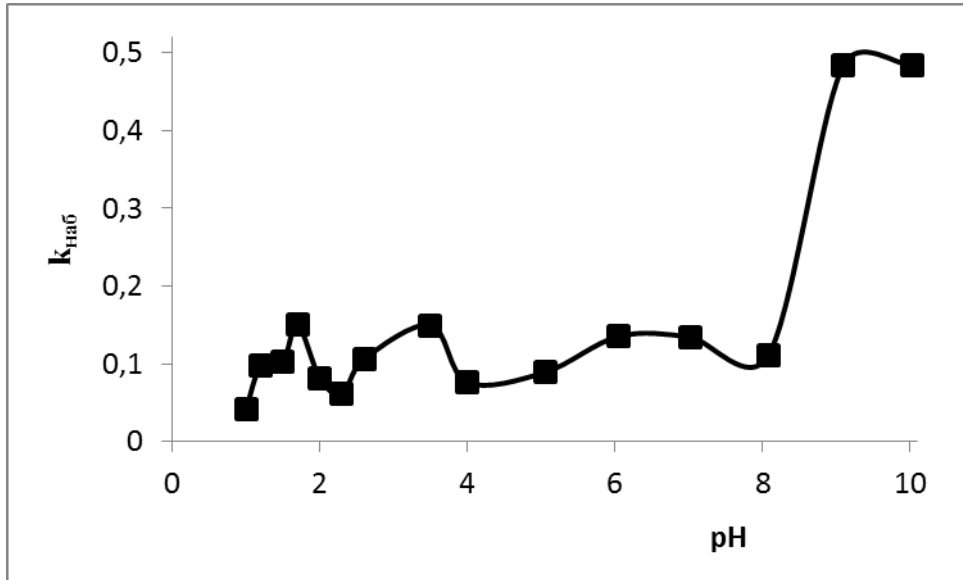


Рисунок 3.14 – Значение $k_{наб}$ для гидрогеля КП в зависимости от рН раствора.

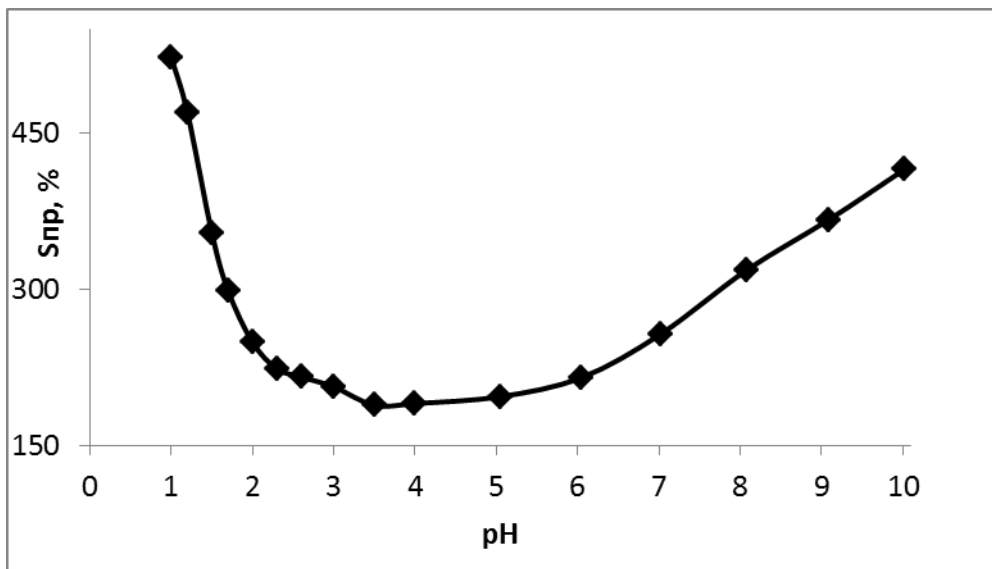


Рисунок 3.15 – Зависимость предельного набухания ($S_{пр}$) гидрогеля КП от рН раствора.

В низкой области рН под действием кислоты может происходить частичное извлечение ионов кальция, что приводит к снижению эффективности сшивки и возрастанию степени набухания. В щелочной области рН может происходить омыление сложноэфирной группы остатков галактуроновой кислоты. Оба процесса приводят к возрастанию числа карбоксильных групп в цепи полимера и влияют на степень их диссоциации. Снижение числа узлов сетки и взаимное отталкивание ионогенных групп естественно приводят к дальнейшему возрастанию степени набухания гидрогеля. Последующему увеличению степени набухания способствует также разрыв межмакромолекулярных водородных связей под действием отмеченных процессов. Суммарное воздействие этих процессов наблюдается в эксперименте в виде резкого возрастания удельной скорости (рис. 3.14) и дополнительного набухания гидрогеля (рис. 3.15), выражающегося в проявлении его максимальной водопоглощающей способности в щелочной области рН.

На основе вышепредставленных экспериментальных результатов можно заключить, что гидрогель пектиновых веществ, в первом приближении состоит из нерастворимых ($MГ_n$) и растворимых ($MГ_p$). В первом случае сетчатая структура образована межмакромолекулярными связями ионов кальция с карбоксильными группами остатков галактуроновой кислоты, описываемыми моделью, подобной структуре «яичной коробки» [157]. Термодинамическая устойчивость второй составляющей МГ обусловлена, по-видимому, сетчатостью, образованной межмолекулярными водородными связями. Действительно, как видно на рисунке 3.16, при многократной экстракции или промывании проточной водой удаётся разделить исходный гидрогель на фракции $MГ_n$ и $MГ_p$ при соотношении компонентов примерно 1:1 (рис. 3.16).

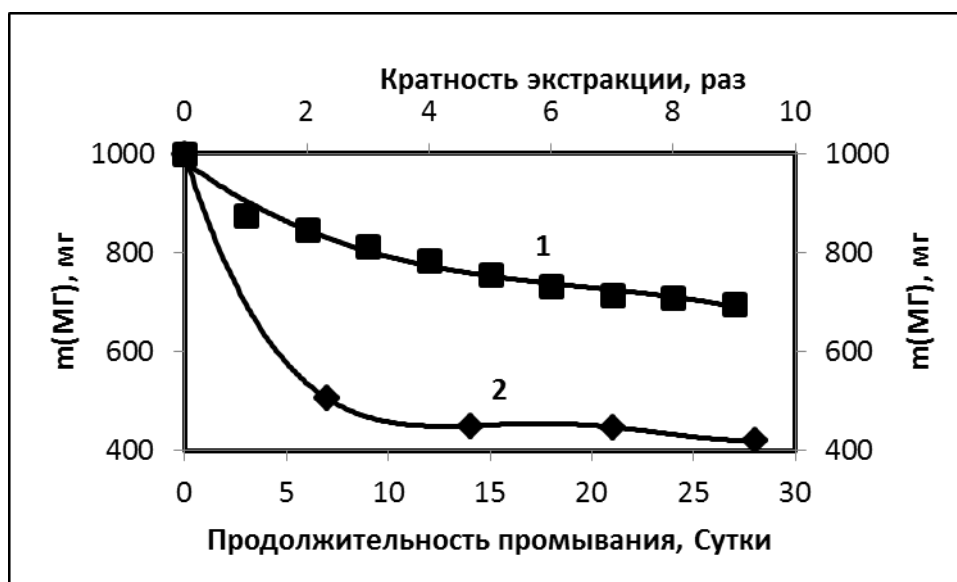


Рисунок 3.16 – Изменение массы микрогеля при многократной экстракции (1) и непрерывном промывании проточной водой (2).

То, что ионы кальция играют существенную роль в формировании узлов трёхмерной сетки и, в свою очередь, их количество определяет набухающую способность гидрогеля, прямо следует из данных экспериментов при варьировании содержания сшивающего агента. На рис. 3.17 приводится график изменения набухаемости пектиновых гидрогелей при титровании раствором динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (Трилона Б.), из которого видно, что по мере удаления ионов кальция из МГ, его набухаемость резко возрастает, достигая предельного значения при соотношении компонентов, близком к единице, т.е. в области минимальной сшивки или при отсутствии узлов посредством ионов кальция. Однако, несмотря на полное отсутствие узлов, образованных ионами кальция и фактическое превращение трёхмерной сетки в линейную структуру, полного растворения компонентов при данной концентрации может не произойти. Это может быть фазовым разделением из-за высокого значения молекулярной массы макромолекул и наличия межмакромолекулярных водородных и гидрофобных связей.

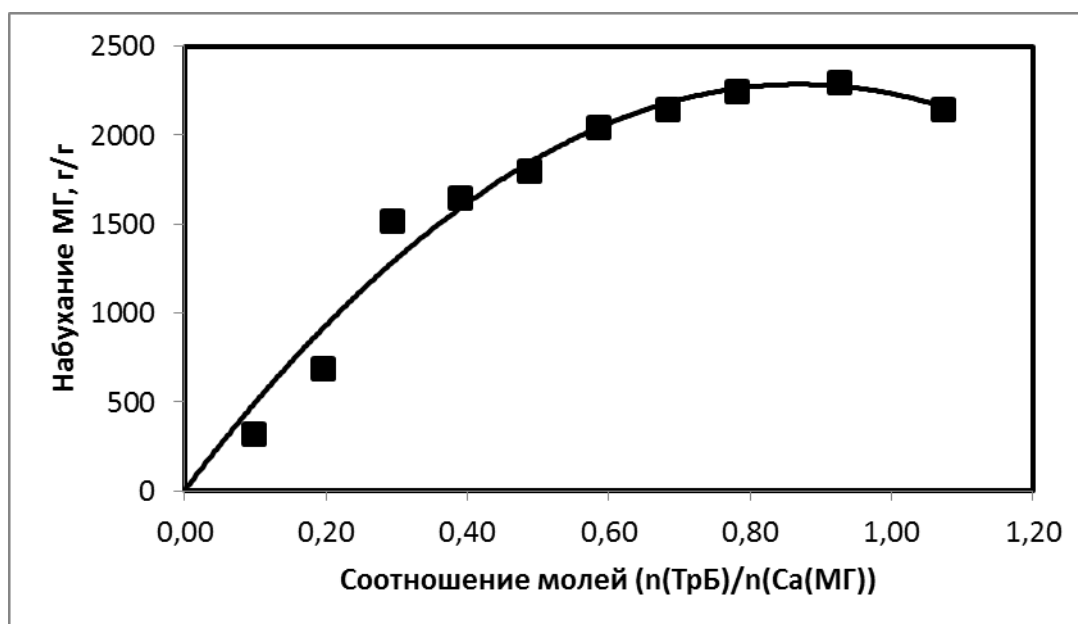


Рисунок 3.17 – Зависимость набухаемости МГ КП от соотношения молей Трилона Б и ионов кальция

3.3 Переход гидрогель-раствор в водной системе пектиновых полисахаридов корзинки подсолнечника

Характерной особенностью гидролиз-экстракции в динамическом режиме [155] по сравнению со статическим [159] является то, что одновременно с процессом кислотного гидролиза происходит фракционирование компонентов распада протопектина растительного сырья. Перераспределение выходов продуктов распада ПП вызывает вопрос о взаимосвязи процесса гелеобразования пектиновых полисахаридов, условно названных микрогелем с их молекулярной массой. В связи с этим целью настоящей части работы явилось изучение процесса перехода гидрогеля в раствор и построение соответствующих фазовых диаграмм.

В данной работе в качестве сырья использовались корзинки подсолнечника. Гидролиз-экстракцию проводили при постоянной температуре 85°C, pH=1.2 и скорости потока 6 мл/мин. Были выделены четыре фракции гидрогеля (табл.3.5). Из данных таблицы 3.5 следует, что фракции МГ в потоке гидролизующего раствора выделяются во фракциях 100-250 мл. Пектиновые вещества содержится во всех фракциях, причём уменьшение выхода МГ приводит к росту

концентрации ПВ во фракциях, что связано, как уже отмечались нами ранее [160] с последовательностью реакции распада ПП.

Таблица 3.5

Выход фракций МГ, ПВ и содержание в них остатков ГК

| Объем выхода, мл | Выход МГ, % | ГК, % | Выход ПВ, % | ГК, % |
|---------------------|-------------|-------|-------------|-------|
| 50 | 0 | 0 | 0.25 | 40.8 |
| 100 | 1.70 | 64.2 | 0.35 | 56.4 |
| 150 | 8.50 | 82.2 | 0.40 | 63.6 |
| 200 | 4.50 | 70.8 | 2.20 | 72.0 |
| 250 | 1.00 | 67.2 | 2.90 | 76.2 |
| 300 | 0 | 0 | 3.10 | 74.4 |
| 350 | 0 | 0 | 3.30 | 68.4 |
| 400 | 0 | 0 | 3.50 | 60.6 |
| сумма | 15.7 | | 16.0 | |

Среднемассовая (M_w), среднечисленная (M_n) молекулярная масса (MM), z -среднее MM (M_z) и показатель полидисперсности (M_w/M_n) были определены методом высокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [161]. Образцы пектиновых полисахаридов растворяли в 0.05M $NaNO_3$ до концентрации 1 или 2 мг/мл, центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин, отделяя агрегированную фракцию, и фильтровали через мембранный фильтр (0.45 мкм, Millipore Millex-HN). Раствор в количестве 0.1-0.2 мл автоматически вводили в хроматограф. Скорость потока элюента – 0.8 мл/мин. Система доставки растворителя состояла из двухканального вакуумного дегазатора, насоса высокого давления (Waters 1515 Isocratic Pump) и автоинжектора (717 Plus Auto Injector, Waters). Для разделения пектиновых полисахаридов использовали две колонки, содержащие PL-Aquagel OH40 и PL-Aquagel OH60. MM образцов определяли одновременно с помощью программного обеспечения ASTRA 5.3.4.13 (Wyatt Technology) и Breez (Waters). Значения для M_w были получены на ВЭЖХ с использованием универсальной калибровки. ВЭЖХ колонки калибровали с использованием молекулярных стандартов Пуллулана (Showa Denko K.K., Japan).

В таблице 3.6 представлены молекулярно-массовые характеристики фракций МГ. Как видно, третья фракция, отличающаяся максимальным содержанием звеньев галактуроновой кислоты и значением степени этерификации, характеризуется также максимальной молекулярной массой и значением M_z .

Таблица 3.6

Молекулярно-массовые характеристики фракций микрогеля

| № фракции | M_w , kD | M_w/M_n | M_z , kD | Корреляционные уравнения | R^2 |
|-----------|------------|-----------|------------|---|--------|
| 2 | 84800 | 21,3 | 469000 | $T_c = -0,0041C^3 + 0,0279C^2 + 2,8993C + 16,634$ | 0,9985 |
| 3 | 112000 | 16,8 | 679000 | $T_c = 0,0003C^3 - 0,159C^2 + 5,2858C + 14,92$ | 0,9956 |
| 4 | 69600 | 11,0 | 213000 | $T_c = -0,0046C^3 + 0,0066C^2 + 3,7183C + 15,164$ | 0,9956 |
| 5 | 93500 | 7,0 | 341000 | $T_c = -0,0043C^3 + 0,0528C^2 + 2,3393C + 17,58$ | 0,9983 |

В связи со значительным возрастанием выхода МГ в динамическом режиме гидролиз-экстракции естественным является вопрос о структуре макромолекул и его молекулярных параметрах. Эти физико-химические величины, как правило, измеряются в разбавленном растворе, что является стимулом для изучения растворимости МГ в воде при различной температуре и концентрации раствора.

Предварительное определение температуры фазового перехода на свежевыделенных фракциях МГ показаны в таблице 3.7. Из этих данных видно, что температура фазового перехода МГ в выбранной области рН и сопоставимых концентрациях слабо зависит от кислотности раствора. Для обнаружения максимального значения температуры фазового перехода в системе МГ-раствор для различных фракций были определены значения T_c при различных концентрациях МГ в растворе (рис.3.18).

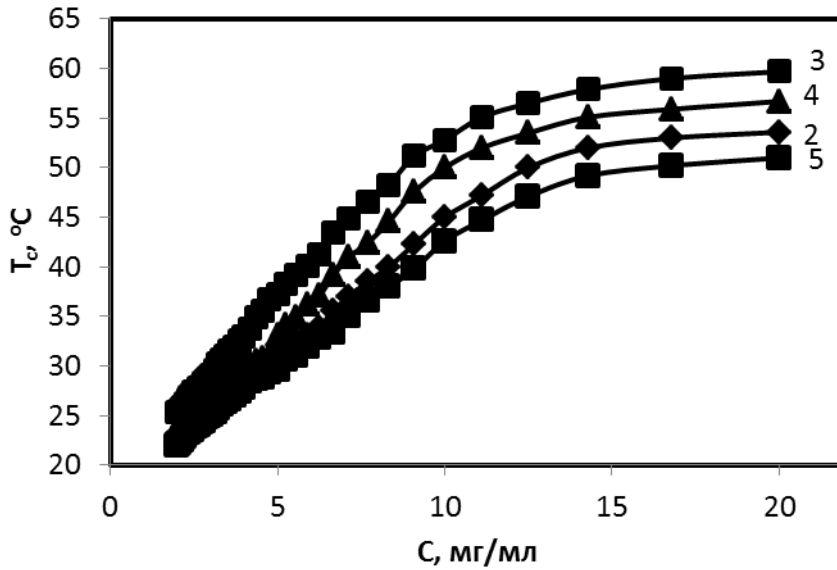


Рисунок 3.18 - Зависимость температуры фазового перехода от концентрации МГ. Цифры на рисунке соответствуют номерам фракций.

Таблица 3.7

Температура перехода гель-раствор для фракций МГ, полученных в потоке гидролизующего раствора

| № фракции | Объем фракции, мл | Температура перехода, t, °C | | | | | | | |
|-----------|-------------------|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| | | МГ | P-p | МГ | P-p | МГ | P-p | CP3 | CPOTK |
| pH=1.2 | | | | | | | | | |
| 2 | 100 | 40.2 | 40.5 | 40.2 | 40.4 | 40.3 | 40.4 | 40.3 | 0.1 |
| 3 | 150 | 65.8 | 66.0 | 65.9 | 66.0 | 65.8 | 66.0 | 65.9 | 0.1 |
| 4 | 200 | 60.2 | 60.4 | 60.2 | 60.5 | 60.2 | 60.4 | 60.3 | 0.1 |
| 5 | 250 | 46.8 | 47.0 | 46.9 | 47.1 | 46.8 | 47.0 | 46.9 | 0.1 |
| pH=3.5 | | | | | | | | | |
| 2 | 100 | 35.8 | 35.9 | 35.8 | 36.0 | 35.7 | 35.9 | 35.9 | 2.0 |
| 3 | 150 | 64.3 | 64.5 | 64.4 | 64.6 | 64.3 | 64.6 | 64.5 | 0.7 |
| 4 | 200 | 57.3 | 57.6 | 57.4 | 57.6 | 57.4 | 57.5 | 57.5 | 1.3 |
| 5 | 250 | 45.2 | 45.5 | 45.3 | 45.5 | 45.2 | 45.4 | 45.4 | 0.7 |

На рисунке 3.18 видно, что для всех фракций хотя наблюдается схожая зависимость температуры перехода гель – раствор, точка максимума T_c , даже при значительно высокой концентрации не проявляется. В связи с этим нами была проведена экстраполяция соответствующих кривых в области более высокой концентрации путём подбора соответствующих уравнений корреляции (рисунок

3.19). Для этих фракций определены значения молекулярных масс и подобраны корреляционные уравнения, связывающие температуру фазового перехода (T_c) с концентрацией МГ в растворе. На рисунке 3.19 приводятся экспериментальные данные зависимости T_c от концентрации МГ в области максимума и линии, построенные на основании соответствующих корреляционных уравнений.

На основании данных рисунка 3.19 графически были рассчитаны максимальные значения T_c , т.е. критические значения ($T_{кр}$) температуры фазового перехода для каждой фракции, используя которые на основании уравнения Флори

$$1/T_{кр} = 1/\theta + (1/(\psi_1 \cdot \theta)) \cdot (1/2p + 1/p^2),$$

где,

ψ_1 –энтропийная составляющая энергии взаимодействия (полимер-растворитель) Гиббса;

p – степень полимеризации;

был рассчитан θ –температуры раствора МГ в воде.

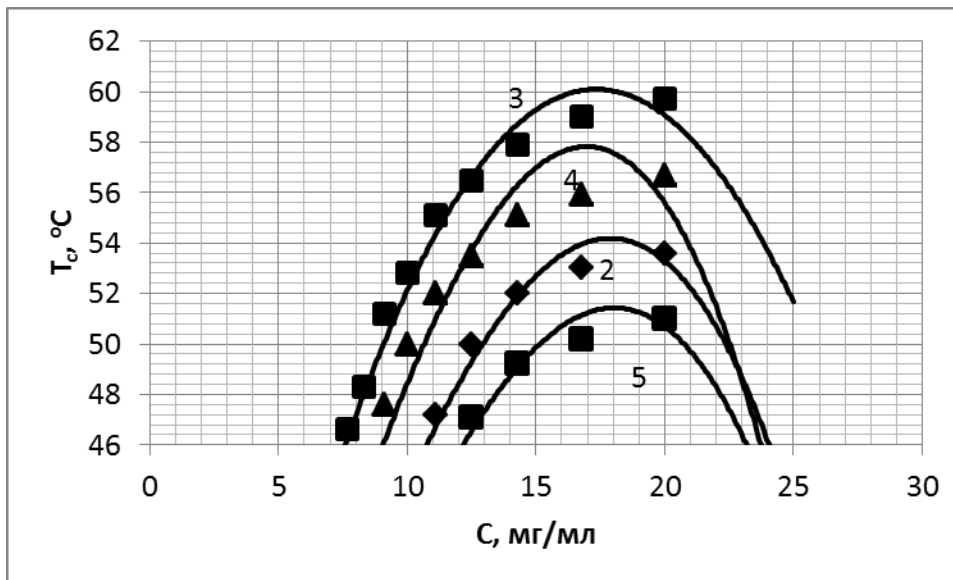


Рисунок 3.19 - Определение критического значения температуры (T_k) фазового перехода экстраполяцией корреляционными уравнениями. Цифры на рисунке соответствуют номерам фракций.

Из графика, представленного на рисунке 3.20, следует, что экспериментальные данные достаточно хорошо укладываются в прямолинейную зависимость $1/T_{кр} = -0,1455(1/2p+1/p^2) + 3,2435$ при коэффициенте корреляции $R^2 = 0,9739$. Поскольку физический смысл величины p является числом остатков мономерных звеньев в цепочке полимера, расчёт молекулярных масс повторяющихся единиц требует некоторого разъяснения. В составе макромолекул пектинового полисахарида в основном имелись остатки ГК и нейтральных сахаров, усреднённые значения которых по данным многочисленных опытов составляли 80.4:19.6.

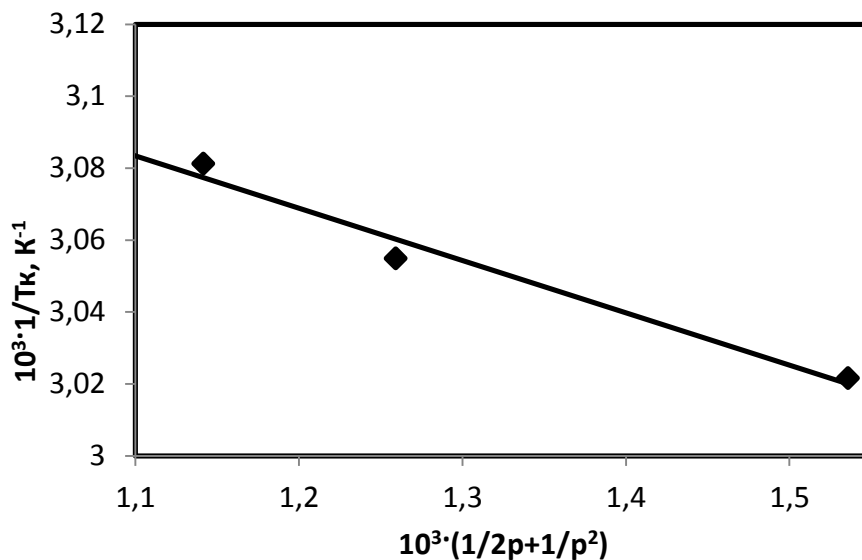


Рисунок 3.20 - Зависимость критической температуры растворения ($T_{кр}$) МГ от параметра $(1/2p+1/p^2)$.

Учитывая эти результаты, по значениям массы остатков ГК и шести нейтральных сахаров [160], имеющихся в составе МГ была рассчитана молекулярная масса повторяющихся единиц цепи и равная 212.5. Этот результат, наряду с данными ММ фракций, был использован для расчёта величины p и последующего построения взаимосвязи величин $1/T_{кр}$ и $(1/2p+1/p^2)$ (рис. 3.19). На основании этих данных найдена θ -температура (T_θ) растворов ПВ равная 35,2 °С.

3.4 Некоторые аспекты практического использования компонентов распада протопектина корзинки подсолнечника

Говоря о возможности практического использования компонентов выделенных из различных растительных источников пектиновых полисахаридов следует, прежде всего, сосредоточиться на трёх главных продуктах распада протопектинов. Водорастворимый компонент - пектиновые вещества, главным образом из фруктовых источников, как следует из литературных данных и результатов наших исследований [162], широко используется в пищевой отрасли промышленности в качестве желирующих агентов. Поэтому в этом разделе основное внимание будет уделено возможностям практического использования двух компонентов распада ПП, а именно МГ и ОС.

Одной из перспективных областей применения микрогеля, по-видимому, является медицина, т.к. МГ является эффективным энтеросорбентом. Необходимо отметить, что широкое применение эфферентных методов в медицине, в частности сорбционных методов детоксикации организма, позволяет решить две важные задачи: идентификация токсических продуктов и создание специфических сорбентов для их изоляции. Например, известно, что при печёночной патологии и механической желтухе в биологической жидкости организма и в желудочно-кишечном тракте значительно возрастает концентрация билирубина и возникает необходимость его удаления путём гемо- и энтеросорбции. Известно, что билирубин, являющийся продуктом распада гемоглобина, из-за плохой растворимости в плазме крови находится в комплексе с сывороточным альбумином человека (САЧ) [145,163]. Эти комплексы образуют основную массу непрямого или свободного билирубина и обладают наибольшей токсичностью. Непрямой билирубин в печёночной клетке соединяется с глюкуроновой кислотой, образуя моно- или диглюкурониды. Эти соединения представляют собой так называемый прямой билирубин. Он растворим в воде и частично проходит через почечный фильтр. При дальнейшем увеличении концентрации билирубина в плазме крови и исчерпывании мест связывания альбумина свободный билирубин диффундирует через клеточные мембраны,

попадая при этом в ткани организма и оказывая разрушающее действие на клетки. Исходя из этого, естественно стремление многих авторов к разработке сорбентов, способных вывести из организма избыточный билирубин. Однако, несмотря на чрезвычайно высокую эффективность многих сорбентов в модельных условиях, их сорбционная активность значительно падает в реальных ситуациях [164,165], поскольку комплексы билирубина с САЧ обладают принципиально другими физико-химическими свойствами.

Существующие в настоящее время сорбенты для удаления билирубина из организма условно можно разделить на три группы. К первой группе относятся активированные угли и различные их модификации. Характерной особенностью этих сорбентов является низкая сорбционная ёмкость по отношению билирубину и неспецифичность действия. Ко второй группе можно отнести сорбенты, полученные на основе синтетических полимеров. Основную массу этих сорбентов составляют сетчатые полимеры, главным образом аниониты. Поэтому основные сорбционные характеристики билирубина были получены на высокосшитых ионообменных сорбентах различной пористости [166]. Наконец, к последней группе гемосорбентов для билирубина можно отнести селективные сорбенты в прямом смысле этого слова.

Несмотря на ряд оригинальных разработок и наличие разновидностей сорбентов, которые в определённой степени могут решить проблему извлечения билирубина из биологических жидкостей, поставленная задача всё ещё далека от своего решения. Поэтому постановка исследования по выявлению сорбентов для связывания билирубина с использованием сильно набухающих гидрогелевых материалов на основе высоконабухающих пектиновых полисахаридов может внести определённый вклад в решение поставленной задачи.

Сорбция билирубина пектиновыми полисахаридами КП в опытах *in vitro* проводились с использованием водонабухающих (МГ) и водорастворимых (ПВ) пектиновые полисахаридов, полученных методом гидролиз-экстракции в динамическом режиме из необработанных (КП) и предварительно обработанных раствором хлорида натрия корзинок подсолнечника (КП обр.). Пектиновые

полисахариды инкубировали в ёмкости с раствором билирубина (50 мкмоль/л) в течение 1-360 мин. при температуре 23-25°C и pH 5,6 [167]. Остаточное количество билирубина определяли спектрофотометрическим методом. Максимальное значение сорбционной ёмкости для определённого полисахарида, полученное в ходе исследования, принимали за 100%, а количество связанного билирубина для каждой продолжительности инкубации выражали в процентах от максимальной сорбционной ёмкости. Установлено, что за 20 минут инкубации водорастворимые полисахариды КП связали до 80 и более от максимально возможного количества билирубина. Для водонабухающих полисахаридов данное значение достигается через 45-60 мин. инкубации (рис. 3.21).

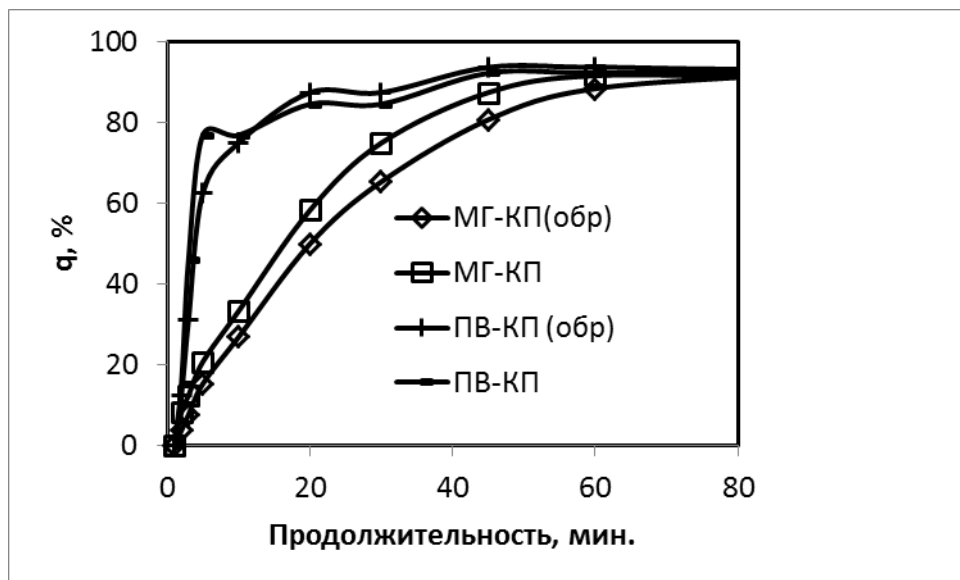


Рисунок 3.21 - Кинетика связывания билирубина пектиновыми полисахаридами.

В целом, все исследованные образцы сорбируют максимально возможное количество билирубина за 120 минут контакта с сорбатом, что составляет минимальную продолжительность, необходимую для достижения максимальной сорбционной ёмкости. В связи с этим, изучение зависимости величины сорбционной ёмкости от равновесной концентрации билирубина проводили при инкубационном периоде 120 мин. Концентрацию сорбата варьировали от 10 до 100 мкмоль/л.

Изотермы сорбции, построенные на основании полученных данных, представлены на рисунке 3.22. Установлено, что максимальной сорбционной способностью по отношению к билирубину обладают водонабухающие пектиновые полисахариды на основе корзинок подсолнечника [165]. Полученные положительные экспериментальные данные по сорбции билирубина в опытах *in vitro* дали возможность более подробно изучить сорбционную активность пектиновых полисахаридов в опытах *in vivo* на лабораторных животных. Результаты этих исследований подробно приведены в соответствующем акте медицинского испытания пектиновых полисахаридов (см. Приложение).

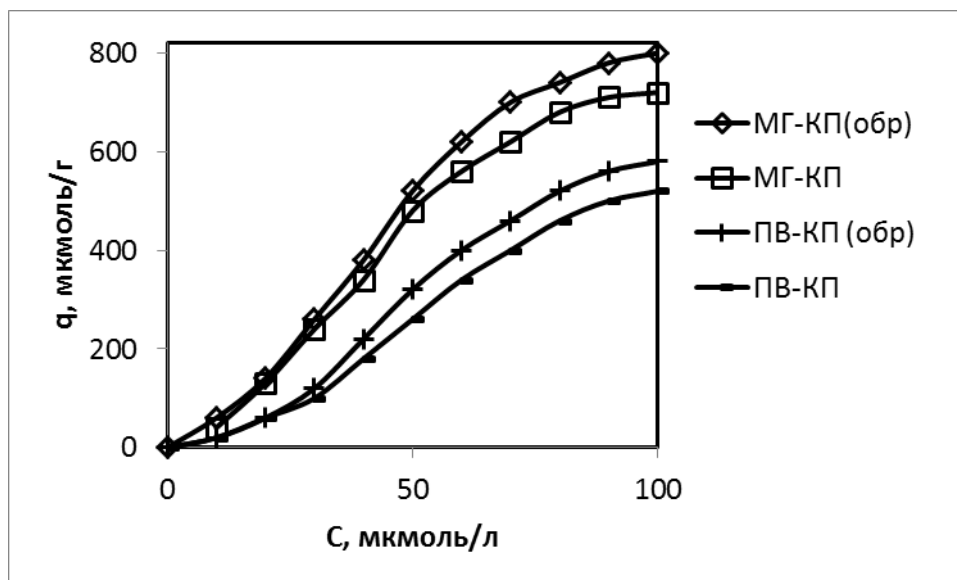


Рисунок 3.22 - Изотермы связывания билирубина пектиновыми полисахаридами.

Важно отметить, что, исследованные образцы пектиновых полисахаридов обладают сорбционными свойствами по отношению к билирубину и могут применяться в комплексной терапии заболеваний печени. Кроме того в этом документе отмечается, что, водонабухающие и водорастворимые пектиновые полисахариды корзинок подсолнечника обладают выраженными дозозависимыми гепатопротекторными лечебными эффектами при экспериментальной тетрахлорметановой интоксикации. При этом наибольшая лечебная эффективность наблюдается после использования полисахаридов в максимальной

дозе [165]. Полученные данные демонстрируют, что введение и пектиновых веществ, и микрогеля корзинки подсолнечника способствует увеличению резистентности печени к действию токсических факторов, в частности, четырёххлористого углерода. При этом гепатопротекторное действие водонабухающих полисахаридов значительно выше водорастворимых.

3.5. Алкопротекторное действие олигосахаридов

Острая алкогольная интоксикация является причиной ряда медицинских и социальных проблем. Согласно экспертным оценкам, ежегодно только на территории Российской Федерации, алкоголь является прямой или косвенной причиной полумиллиона смертей [168]. Одним из путей профилактики последствий и уменьшения проявлений алкогольной интоксикации, является использование функциональных пищевых добавок, способных снизить содержание экзогенного этанола, замедляя эвакуацию содержимого желудка или увеличивая эффективность первичного метаболизма спирта в желудочно-кишечном тракте [169,170]. В связи с этим, целью настоящей части исследования было изучение алкопротекторного действия олигосахаридов (ОС), под которым подразумевается способность вещества, вводимого в состав алкогольного напитка, устранять или ослаблять токсическое действие этилового спирта.

Олигосахариды представляют собой смесь остатков звеньев галактурановой кислоты и нейтральных сахаров: рамнозы, арабинозы, глюкозы, маннозы, галактозы. ОС обладают выраженной биологической активностью и комплексом функциональных свойств. Исследованию структуры, свойств и разработке методов получения олигосахаридов посвящены работы ряда авторов. Установлено, что благодаря небольшому размеру молекул ОС, их способности образовывать комплексы, в том числе и с экзогенными альдегидами, кетонами и другими компонентами сивушных масел, и выводить их из организма через почки, олигосахариды являются перспективной добавкой, способной уменьшить проявления острой алкогольной интоксикации [171-173].

Олигосахариды остаются в больших количествах после получения пектина. Для работы использовался раствор ОС с концентрацией 12,65 мг/мл, который вносили в этиловый спирт в необходимой концентрации, после чего спирт доводили водой до концентрации 30% об. Исследованные концентрации в соотношении ОС: этанол : вода: 10:30:60 (Раствор 1), 40:30:30 (Раствор 2), 60:30:10 (Раствор 3).

Методика исследования базировалась на основе положений и представлений, разработанных и сформулированных в НИИ наркологии Министерства здравоохранения Российской Федерации [174,175].

Полученные результаты отражены в «Акт антиалкогольной активности яблочного олигосахарида», представленного в «Приложение».

Полученные результаты показывают, что 10%-ная добавка олигосахаридов практически вдвое ускоряет выход мышей из состояния алкогольного опьянения и снижает тяжесть алкогольной интоксикации с 37.7 до 29.2 баллов. Увеличение концентрации ОС закономерно увеличивает динамику выхода животных из состояния алкогольного опьянения и снижает тяжесть интоксикации. Олигосахариды обладают выраженной способностью дозозависимо ослаблять острое токсическое (наркотическое) действие этилового спирта у мышей.

ВЫВОДЫ

1. Изучена взаимосвязь распределения выхода и моносахаридного состава компонентов распада протопектина (ПП) корзинки подсолнечника (КП) - микрогеля (МГ), пектиновых веществ (ПВ) и олигосахаридов (ОС) - в условиях статики и динамики - от рН, ионной силы и скорости потока гидролизующего раствора, позволяющего оптимизировать молекулярные параметры и практически важные свойства целевых продуктов реакции.
2. Проведено сравнительное исследование изменения выходов и моносахаридного состава продуктов гидролиз-экстракции КП в условиях статики (СР) и динамики (ДР), в области рН от 1.05 до 5.6, концентрации раствора NaCl от 0 до 3 моль/л. Показано, что наибольший выход всех компонентов – МГ, ПВ и ОС наблюдается в области рН от 1.05 до 2, а с ростом концентрации NaCl выход МГ снижается, при симбатном возрастании выхода ПВ. В условиях ДР, наряду с увеличением выхода МГ и ПВ, значительно возрастает содержание уронидных составляющих, достигая величин более 80%, что значительно улучшает качество пектиновых полисахаридов.
3. Продемонстрировано, что при скорости потока гидролизующего раствора в условиях ДР от 3 до 6 мл/мин происходит пропорциональное возрастание содержания всех компонентов реакций распада ПП – МГ, ПВ и ОС. При этом содержание основных компонентов МГ и ПВ очень близки между собой, а суммарное содержание этих продуктов в зависимости от скорости потока достигает от 20 до 30 процентов, что значительно больше, чем выход пектиновых полисахаридов при других условиях реакции в статическом режиме.
4. Проведено разделение микрогеля на растворимые и нерастворимые фракции в различных областях рН и продолжительности набухания. Показано, что в нейтральной области рН в основном происходит набухание гидрогеля, в кислой области – параллельные реакции набухания и экстракции ионов кальция из матрицы гидрогеля, а в щелочной области – набухание и деэтерификация. Рассчитаны значения постоянного набухания в зависимости от рН и сделан вывод о природе узлов трехмерной сетки.

5. Установлено, что в динамическом режиме гидролиз-экстракции ПП КП не только возрастает выход МГ, но и происходит их разделение по молекулярной массе. Определена концентрационная зависимость температуры фазового перехода (T_c) МГ в раствор, подобраны соответствующие корреляционные уравнения, позволяющие определить критическое значение температуры (T_k) фазового перехода. По данным T_k и молекулярной массы соответствующих фракции, с использованием уравнения Флори произведён расчёт θ – температуры раствора пектиновых полисахаридов в воде и энтропийной составляющей энергии взаимодействия (полимер-растворитель) Гиббса.

6. Пектиновые полисахариды в виде МГ и ПВ, в условиях *in vitro* и *in vivo* испытаны в качестве нетоксичных и высокоэффективных сорбентов, при связывании билирубина и ионов тяжёлых металлов, а олигосахариды для ослабления токсического действия этилового спирта у экспериментальных животных.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|-------|--|
| M_w | Молекулярная масса |
| ГК | Галактуроновая кислота |
| ДР | Динамический режим гидролиза |
| КП | Корзинка подсолнечника |
| Кс | Количество свободных карбоксильных групп |
| Кэ | Количество этерифицированных карбоксильных групп |
| МГ | Микрогель |
| ММ | Молекулярная масса |
| ММР | Молекулярная масса распределения |
| НС | Нейтральные сахара |
| ОС | Олигосахариды |
| ПВ | Пектиновые вещества |
| ПП | Протопектин |
| СР | Статический режим гидролиза |
| СРЗ | Среднее значение |
| СРОТК | Величина среднего отклонения |
| СЭ | Степень этерификации |
| ЭАВ | Электроактивированная вода |
| ЭЖХ | Эксклюзионная жидкостная хроматография |
| ЭХА | Электрохимическая активация |

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Папков, С.П. Студнеобразное состояние полимеров / С.П. Папков. // М.: Химия, 1974. - 256 с.
2. Nijenhuis, K. Thermoreversible Networks / K. te Nijenhuis. // Adv. Polym. Sci. – 1997. – V. 130. – P. 1-235.
3. Лозинский, И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения / И. Лозинский. // Успехи химии. – 2002. – Т. 71, № 6. – С. 559-585.
4. Хмельницкий, С.И., Перспективы использования суперпористых гидрогелей и их композиций на основе поливинилового спирта в новых медицинских технологиях / С.И. Хмельницкий, Д.Е. Лесовой // Новости медицины и фармации. – 2008. №3. с.234.
5. Гросберг, А.Ю. Физика в мире полимеров. / А.Ю. Гросберг, А.Р. Хохлов, О.Е. Филиппова // Высокомолекулярные соединения. – 2000. – Т.42, № 12. – С. 2328-2352.
6. Воюцкий, С.С. Курс коллоидной химии. / С.С. Воюцкий // 2-е изд., перераб. и доп. М.: Химия, 1976. 512 с.
7. Hennink, W.E. Novel crosslinking methods to design hydrogels. / W.E. Hennink, van C.F. Nostrum // Advanced Drug Delivery Reviews. 2002. Vol. 54. P. 13-36.
8. Валуев, И.Л. Исследование свойств гидрогелей на основе сополимеров 2-гидроксиэтилметакрилата / И.Л. Валуев, В.К. Кудряшов, И. В. Обыденнова, Г.А. Сытов // Вестник Моск. ун-та. 2003. Т. 44, № 2. С. 149-152.
9. Picot, D.R. Polymer Gels and Networks / Ed. by Y.Osada, A.R. Khokhlov. N.Y.: Marcel Dekker Inc. 2001. P.47-65.
10. Дубровский, С.А. Упругость гидрогелей, получаемых фотополимеризацией макрономеров / С.А. Дубровский, Л.А. Харитоновна // Высокомолек. соед. 2004. Т.45, № 9. С. 1505-1510.
11. Якимцова, Л.Б. Высвобождение лекарственных веществ из гидрогелевых пленок на основе сополимеров акриламида / Л.Б. Якимцова, Е.С. Попко. // Свиридовские чтения: сборник статей. – Минск, 2012. – Вып. 8. – С. 243-252.
12. Nalampang, K. Design and preparation of AMPS-based hydrogels for biomedical use as wound dressings / K. Nalampang, N. Suebsanit, C. Witthayaprapakorn, and R. Molloy. // Chiang Mai Journal of Science. – 2007. – V. 34, N 2. – P. 183-189.
13. Пименов, В.Г. Низкоплотные микрочаеистые полимерные аэрогели на основе ацетата целлюлозы / В.Г. Пименов, Е.Е. Шевелева, А.М. Сахаров // Материалы V Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров». Архангельск, 2013. С. 255-256.
14. Philippova, O.E. Responsive Polymer Gels / O.E. Philippova // Polymer Sci. 2000. V. 42, N 2. P. 208-228.
15. Комаров, П.М. Процессы самоорганизации и гелеобразования в водном растворе L-цистеина и нитрата серебра / П.М. Комаров, И.В. Михайлов, В.Г. Алексеев, С.Д. Хижняк, П.М. Пахомов // Ж. структурной химии. 2012. Т. 52, N 5. С. 1006-1023.

16. Il'ina, A.V. Effect of physicochemical parameters on the formation of chitosan-based gels / A.V. Il'ina, V.P. Varlamov // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2004. N 6. P. 599-602.
17. Osada, Ed. by Y. Polymer Gels and Networks / Ed. by Y. Osada, A. R. Khokhlov. N.Y.: M. Dekker Inc. 2001. 400 p.
18. Роговина, Л.З. Влияние условий синтеза на строение гидрофобно модифицированных полиакриламидов и реологию их растворов и гелей / Л.З. Роговина // *Высокомолек. соед.* 2004. Т. 46, № 4. С. 644.
19. Пахомов, П.М. Структурные перестройки при гель-формовании высокопрочных полимерных волокон / П.М. Пахомов // *Физика твердого тела*. 2005. Т. 47. № 6. С. 994-999.
20. Кудина, Е.Ф. Исследование физико-механических свойств органосиликатных / Е.Ф. Кудина, Г.Г. Печерский, Н.С. Полещук // *Вестник национальной академии наук Белоруссии*. 2011. № 2. С. 18-22.
21. Davankov, V.A. Unusual mobility of hypercrosslinked polystyrene networks: swelling and dilatometric studies / V.A. Davankov, A.V. Pastukhov, M.P. Tsyurupa // *J. Polym. Sci.* 2000. Vol. 38. P. 1553-1563.
22. Филиппова, О.Е. «Умные» полимерные гидрогели. / О.Е. Филиппова // *Природа. Серия Химия*. 2005. № 8. С. 11-17.
23. Хохлов, А.Р. Восприимчивые гели / А.Р. Хохлов. // *Соросовский образовательный журнал*. – 1998. – № 11. – С. 138-142.
24. Митюк, Д.Ю. Исследование процесса связывания ионов поливалентных металлов полимерными лигандами./ Митюк Д.Ю., Муравлев Д.А., Шибаев А.В., Филиппова О.Е.// *Труды Российского государственного университета нефти и газа им. И.М. Губкина*. 2015. № 3. С. 108-117.
25. Sircar, S. The effect of divalent vs. monovalent ions on the swelling of Mucin-like polyelectrolyte gels: Governing equations and equilibrium analysis / S. Sircar, J.P. Keener, A.L. Fogelson // *J. Chem. Phys.* 2013. N 138. 16 P.
26. Sing Ch.E. Effect of Ion–Ion Correlations on Polyelectrolyte Gel Collapse and Reentrant Swelling / Ch.E. Sing, J.W. Zwanikken, M.O. Cruz // *Macromolecules*. 2013. Vol. 46 P. 5053-5065.
27. Мочалова, А.Е. Термо- и pH-чувствительные гели на основе хитозана, полученные с использованием диазида терефталевой кислоты / А.Е. Мочалова, А.В. Будруев, А.В. Олейник, Л.А. Смирнова // *Перспективные материалы*. 2009. № 5. С. 61-65.
28. Ельяшевич, Г. К. Процессы набухания сжатия гидрогелей полиакрилата натрия в средах с различными значениями pH / Г.К. Ельяшевич, Н.Г. Бельникевич, С.А. Веснеболоцкая // *Высокомолекулярные соединения*. 2009. Т. 51А, № 5. С. 809-812.
29. Тагер, А.А. Физикохимия полимеров. / А.А. Тагер // М.: Научный мир, 2007. 573 с.
30. Jiang, Z. Injectable hydrogel of poly(ϵ -caprolactone-coglycolide)-poly(ethyleneglycol) poly(ϵ -caprolactone-coglycolide) triblock copolymer aqueous

- solutions / Z. Jiang, Y. You, X. Deng, J. Hao // *Polymer*. 2007. Vol. 48. P. 4786–4792.
31. Роговина, Л.З. К определению понятия «полимерный гель» / Л.З. Роговина, В.Г. Васильев, Е.Е. Браудо // *Высокомолекулярные соединения*. - 2008. - Т. 50, №7. - С. 1397-1406.
 32. Loch, K.P. Ненасыщенные полиэфирные смолы / K.P. Loch // *Ungesattigte Polyesterharra (UR) – Kunststoffe*. - 1995. – Vol. 85, № 10.- P.1622-1630.
 33. Бениг, Г.В. Ненасыщенные полиэфирные: строение и свойства / Г.В. Бениг // Пер. с англ, Л. Н. Седова - М.:Химия, 1968. – 253с.
 34. Гафуров, Ю.М. Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана / Ю.М. Гафуров, В.А. Рассказов // *Материалы международной конференции*. М.: ВНИРО, 2008. – С. 153-155.
 35. Олтаржевская, Н.Д. Текстиль и материалы. Перевязочные материалы с пролонгированным лечебным действием / Н.Д. Олтаржевская, М.А. Коровина, Л.Б. Савилова. // *Российский химический журнал*. – 2002. – Т. 66, № 1. – С.133-141.
 36. Bergera, J. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications / J. Bergera, M. Reista, J. Mayera, O. Felb, N. Peppasc, R. Gurnyb. // *Europ. J. Pharm. and Biopharm.* – 2004. – N 57. P. 19-34.
 37. Шаблин, Д.В. Оценка эффективности лечения экспериментальных ожоговых ран при использовании пектиновых пленок с иммуномодулятором аминофталгидразидом [Электронный ресурс] / Д.В. Шаблин, С.Г. Павленко, А. А. Евглевский, А. А. Хуранов // *Современные проблемы*.
 38. Crescenzi, V. Synthesis and partial characterization of hydrogels obtained via glutaraldehyde crosslinked of acetylated chitosan and of hyaluronan derivatives / V. Crescenzi, A. Francescangeli, A. Taglienti, D. Capitani. // *Biomacromolecules*. – 2003. – N. P. 1045-1054.
 39. Efremenko, E. New enzymatic immobilized biocatalysts for detoxification of organophosphorus compounds / E. Efremenko, A. Peregudov, N. Kildeeva, P. Perminov, S. Varfolomeyev. // *Biocatalysis and Biotransformation*. – 2005. – V. 23 (2). – P. 103-108.
 40. Перминов, П.А., Структурообразование в растворах хитозана в присутствии сшивающего реагента при получении биологически активных полимерных материалов / П.А. Перминов, Н.Р. Кильдеева, Л.М. Тимофеева, И.А. Абронин, В.Г. Бабак, В.В. Никоноров. // *Известия высших учебных заведений химия и химическая технология. Научно-технический журнал*. – 2007. – Т. 50, № 3. – С. 53-56.
 41. Draget, K.I. Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight / K.I. Draget, G. Skjak-Braek, O. Smidsrod. // *Carbohydrate Polymers*. – 1994. – 25. – P. 31- 38.
 42. Хотимченко, Ю.С. Физико-химические свойства, физиологическая активность и применение альгинатов. полисахаридов бурых водорослей / Ю. С.

- Хотимченко, В. Ковалев, О. Савченко, О. Зиганшина // Биология моря. – 2001. – Т. 27, № 3. – С. 151-162.
43. Щипунов, Ю.А. Получение гелей альгината кальция методом электродиализа / Ю.А. Щипунов, И.В. Постнова, В.П. Гребень. // Журн. физ. хим. – 2000. – Т. 74, № 7. – С. 1298-1302.
 44. Pegoretti, A. Hydrolytic resistance of model poly (ether urethane ureas) and poly(ester urethane ureas) / A. Pegoretti, L. Fambri, A. Penati, J. Kolarik. // J. Appl. Polym. Sci. – 1998. – V.70 (3). – P. 577-586.
 45. Травинская, Т.В. Полиуретан-альгинатные водные смеси и гидрогели на их основе / Т.В. Травинская, К. Пападокостаки, Ю.В. Савельев, Н. Канелопoulos. // ISSN 1025-6415 Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2008. – № 8. – С. 144-148.
 46. Kshirsagar, N.A. Drug Delivery Systems. / N.A. Kshirsagar. // Indian Journal of Pharmacology. – 2000. – V. 32. – P. 54-61.
 47. Бочек, А.М. Перспективы использования полисахаридов разного происхождения и экологические проблемы, возникающие при их переработке / А.М. Бочек. // Химические волокна. – 2008. – № 3. – С. 18-22.
 48. Рабинович, И.М. Применение полимеров в медицине / И.М. Рабинович. – Л.: Медицина, 1972. – 198 с.
 49. Семчиков, Ю.Д. Высокомолекулярные соединения. / Ю.Д. Семчиков. – М.: ИЦ «Академия», 2003. – 368 с.
 50. Биосовместимые материалы: учебное пособие / Под ред. В.И. Севостьянова, М.П. Кирпичникова. – М.: Изд-во ООО «Медицинское информационное агентство», 2011. – 544 с.
 51. Береговых, В.В. Трансдермальные терапевтические системы доставки лекарственных средств / В.В. Береговых, Н.В. Пятигорская, Ю.А. Прудкевич, С.А. Кедик. // Вестник МИТХТ. – 2012. – Т. 7, № 5. – С. 17-22.
 52. Олтаржевская, Н.Д. Лечебные текстильные материалы «Колетекс» – эффективные многофункциональные депо-системы / Н.Д. Олтаржевская, Г.Е. Кричевский // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – № 3. – С. 42-50.
 53. Торнер, Р.В. Теоретические основы переработки полимеров / Р.В. Торнер. – М.: 1977. – 464 с.
 54. Кильдеева, Н.Р. Новый метод получения полимерных раневых покрытий / Н.Р. Кильдеева, Л.С. Гольбрайх, И.В. Решетов, С.Н. Наумкина // 3-й конгресс химиков-текстильщиков и колористов: сборник тезисов пленарных и стендовых докладов – 2000. – С. 67.
 55. Хитозан per os: от пищевой добавки к лекарственному средству. / Под ред. А.А. Риккардо Муццарелли. – Нижний Новгород: Изд-во «Вектор – ТиС», 2001. – 372 с.
 56. Большаков, И.Н. Инновационные аспекты применения хитозана в медицине / И.Н. Большаков // Рыбпром. – 2010. – № 2. – С. 42-47.
 57. Hafner, A. Development and in vitro characterization of chitosan-based microspheres for nasal delivery of promethazine / A. Hafner, J. Filipovi-Gri, D.

- Voinovich, I. Jalsenjak. // *Drug Develop. Industr. Pharm.* – 2007. – V. 33. – P. 427-436.
58. Усов, А.И. Альгиновые кислоты и альгинаты: методы анализа, определения состава и установления строения / А.И. Усов. // *Успехи химии.* – 1999. – 68 (11). – С. 1051-1061.
59. Оберюхтина, И.А. Физико-химическая характеристика структурообразования и фазовых состояний в водных растворах полисахаридов клеточной стенки бурых водорослей: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 05.21.03 / Оберюхтина Ирина Александровна. – М., 2003. – 20 с.
60. Щербаков, В.Г., Лобанов В.Г. и др. Биохимия растительного сырья / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов и под ред. В.Г. Щербакова. – М.: Колос, 1999. – с. 203.
61. Аверьянова, Е.В. Пектин. Получение и свойства / Е.В. Аверьянова, Р.Ю. Митрофанов. – Бийск: Изд-во Алт. гос. тех. ун-та, 2006. – 44 с.
62. Smistad, G. The potential of pectin as a stabilizer for liposomal drug delivery systems / G. Smistad, S. Boyum, S.J. Alund, A.B. Samuelsen, M. Hiorth // *Carbohydr Polym.* – 2012. – Т. 90, № 3. – С.1337-1344.
63. Ловкова, М.Я. Биосинтез и метаболизм алкалоидов в растениях. / М.Я. Ловкова // - М.: Наука, 1981. - 169с.
64. Донченко, Л.В. Свойства пектиновых веществ / Л.В. Донченко [и др.] - Киев: Знание, 1992. - 33 с.
65. Шелухина, Н.П. Пектиновые вещества, их некоторые свойства и производные. / Н.П. Шелухина, З.Д. Ашубаева, Г.Б. Аймухамедова // - Фрунзе: Илим, 1970. - 72 с.
66. Rosiak, J.M. Hydrogels and their medical applications / J.M. Rosiak, F. Yoshii // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms.* -1999. -Vol. 151. -№. 1. -P. 56-64.
67. Gulrez, S.K.H. Hydrogels: methods of preparation, characterisation and applications / S.K.H. Gulrez, G.O. Phillips, S.A.I. Assaf // in *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications*, Ed. A. Carpi. – Croatia: Rijeka, INTECH Open Access Publisher, 2011. – P. 117–150
68. Fishman, M.L. The structure of high-methoxyl sugar acid gels of citrus pectin as determined by AFM / M.L. Fishman, P.H. Cooke // *Carbohydrate Research.* – 2009. – Vol. 344. – № 14. – P. 1792–1797.
69. Grant, G. T. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model / G.T. Grant, E.R. Morris, D.A. Rees, P.J. Smith, D. Thom // *FEBS letters.* – 1973. – Vol. 32. – №. 1. – P. 195–198.
70. O'Brien, A. Gelation of high-methoxyl pectin by enzymatic de-esterification in the presence of calcium-ions: a preliminary evaluation / A.B. O'Brien, K. Philp, E.R. Morris // *Carbohydrate Research.* – 2009. – Vol. 344. – P. 1818–1823.
71. Nayar, V.T. Elastic and viscoelastic characterization of agar / V.T. Nayar, J. D. Weiland, C.S. Nelson, A.M. Hodge // *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials.* – 2012. – Vol. 7. – P. 60–68.

72. Dunstan, D.E. Structure and rheology of the κ -carrageenan locust bean gum gels / D.E. Dunstan, Y. Chen, M.L. Liao, R. Salvatore, D.V. Boger, M. Prica // *Food Hydrocolloids*. – 2001. – Vol. 15. – №. 4. – P. 475–484.
73. Herbert, E.G. Measuring the constitutive behavior of viscoelastic solids in the time and frequency domain using flat punch nanoindentation / E.G. Herbert, W.C. Oliver, A. Lumsdaine, G.M. Pharr // *Journal of Materials Research*. – 2009. – Vol. 24. – №. 03. – P. 626–637
74. Vithanage, C.R. Rheological and structural properties of high-methoxyl esterified, low-methoxyl amidated pectin gels / C.R. Vithanage, M.J. Grimson, P.R. Wills, P. Harrison, B.G. Smith // *Journal of Texture Studies*. – 2010. – Vol. 41. – P. 899–927.
75. Ngouemazong, E.D. Stiffness of Ca^{2+} -pectin gels: combined effect of degree and pattern of methyl esterification for various Ca^{2+} concentrations / E. D. Ngouemazong, R.P. Jolie, R. Cardinaels, A. Van Loey, P. Moldenaers, M. Hendrickx // *Carbohydrate Research*. – 2012. – V. 348. – P. 69-76.
76. Park, H. Biodegradable hydrogels for drug delivery / H. Park, K. Park, W.S.W. Shalaby // *Technomic Publishing Company, Lancaster, Pennsylvania, USA*. – 1993.
77. Cardenas, A. On the gelling behavior of “nopal” (*Opuntia ficusindica*) low methoxyl pectin / F.M. Goycoolea, M. Rinaudo // *Carbohydrate Polymers*. – 2008 – Vol. 73. – P. 212–222.
78. Deuel, H. Observations on pectic substances/ H., Deuel, J. Solms // *Advances in Chem, Series*, 1954. p.62-67.
79. Deuel, H. The gel-forming capacity of methyl polygalacturonate/ H.Deuel, G.Нибег, R. Leuenberg // *Helv. Chim. Acta*, 1950, 35, P.1226-1228.
80. Сапохснникова Е.В. Пектиновые вещества и пектолитические ферменты. - *Итоги науки, Биол. сер.*, 1971, 5, -138с.
81. Mc Cready, E.M. Pectin - a product of citrus maste. / E.M. Mc Cready, H.S. Owens // *Econ. Bot.*, 1954, 8, p.29-47.
82. Smith, G.J.B. Ester content and jelly pH influences on the grade of pectins/ G.J.B.Smith, E.F.Bryant // *J. Food Sci.*, 1968, 33, №3, p.262-264.
83. Phippen E.L., Gelation properties of partially acetylated pectin./ E.L.Phippen, Mc Cready, S.H.S Owen // *J. Am.. Chem. Soc*, 1950, 72, p.813-816.
84. Sookrie, A.E. Improvement in mechanical properties of cellulose acetate by means of controlled molecular length./ A.E.Sookrie, M. Harris // - *J. Research Natl. Bur. Standards*, 1943, 30, p.I-14.
85. Speiser, R. Effect of Molecular Association and Charge Distribution on the Gelation of Pectin./ R.Speiser, M.J.Copley, G.C Nutting // *J. Phys. Colloid. Chem.*, 1947, 51' P.II7-I35.
86. Hinton, C.L. The Setting Temperature of Pectin Jellies,/ C.L.Hinton // *J. Sci. Food Agr.*, 1950, I, p.300-307.
87. Harvey H.G. The Mechanism of Pectin Jelly Formation with Respect to pH conditions with Particular Reference to Setting Temperature Phenomena, - *J. Sci, Food. Agr.*, 1950, I, P.307--311.
88. Grover D.W. The Physical Chemistry of Pectin Jelly Formation. -*Ghem, and Industry*, 1952, № 12, p, 1216-1217.

89. Deuel, H. Pectic substances and pectic enzymes. / H. Deuel, E. Stutz, // -*Advan. Enzymol. and Related Subjects Biochem.*, 1958, 20, p.341-350.
90. Schneider, G.G. II constitution and Jelly formation, / G.G. Schneider, H Bock. // *Ber.*, 1938, 71 p, I353-I358.
91. Meyer K.H. High Polymers, - In: *Natural and Synthetic High Polymer*, N-I, Interscience Publ., 1942, -372 p.
92. Панков С.П., Студнеобразное состояние полимеров, -М: Химия, 1974, -255 с.
93. Роговина, Л.З. Природа студнеобразного состояния, структура и свойства студней полимеров. / Л.З.Роговина, Г.Л. Словимакий // - *Успехи химии*, 1971, 43 ВМС.6, С.1102-1135.
94. Heymann E. The sol-gel trasformation. / E. Heymann // - *Trans, farad. Soc*, 193, 32, p.462-473.
95. Joly M. Application of rheoturbidity to the measurement of infceractlori energies between particles in solution. - *J, Chem, Phys.*, 1962, p.249-258.
96. Labudzinska, A. Gelation of concentrated polymer solutions. I. Structural changes accompanying the isothermal gelation of polyacrylonitrile solutions. / A.Labudzinska, A.Wasiak, A. Ziabicki // -*J. Polym. Sci.*, 1967, C-16, pt 5, p.2855-2844.
97. Браудо Е.Е. Исследование свойств студней -делатины в связи с их использованием для приготовления искусственных продуктов питания. - Канд. дис, ИНЭОС АН СССР, М., 1971, -184 с.
98. Оболонкова, Е.С. Электронно-микроскопическое исследование структурообразования в растворах и студнях поливинилового спирта. / Е.С. Оболонкова, Л.З. Роговина, Е.М. Белавцева, Н.А. Дмитриева, Г.Л. Слонимский // *Коллоид, ж.*, 1974, 36, с.284-290.
99. Боброва, Л.Е. Светорассеяние в растворах и гелях желатины. / Л.Е.Боброва, В.Н. Измайлова, П.А. Ребиндер // - *Коллоид, ж.*, 1973, 35., с.887-892.
100. Френкель, С.Я. Поляризациино-оптический метод исследования структурных превращений в растворах и пленках. / С.Я.Френкель, Т.К.Волков, В.Г.Баранов, Л.Г. Шалтыко // - *ВМС*, 1965, 7, с.854-860.
101. Bettelheim, F. Physical chemistry of Acidic Polysaccharides. – In: *Biological Polyelectrolytes*, N-Y., Marcell Dekker, ed. A.Veis, 1970, p.I3I-209.
102. Fang Liu, Marek W. Urban. Recent advances and challenges in designing stimuli-responsive polymers, *Progress in Polymer Scince* 35.2010.3-23 p.
103. Lau ACW, Wu C. Thermalyy sensitive and biocompatible poly-(N-vinylcaprolactam):synthesis and characterization of high molar mass linear chains. *Macromolecules*.1999;32:581-4.
104. Makhayeva, E.E. Behavior of poly-(N-vinycaprolactam-co-metacrylic acid) macromolecules in aqueous solution: interplay between Coulombic and hydrophobic interaction. \ Makhayeva E.E., Tenhu H, Khokhlov A.R. \ \ *Makromolecules*. 2002;35:1870-6.
105. Maeda, Y Hydration and phase behavior of poly(N-vinylcaprolactam) and poly(N-vinylpyrrolidone) in water. \ Maeda Y, Nakamura T, Ikeda I. \ \ *Makromolecules*. 2002;35:217-22.

106. Gil, ES Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. \ Gil ES, Hudson SM. \ Prog Polym Sci 2004;29(12):1157-73.
107. Жуковский, В.А. Научное обоснование и разработка технологии волокнистых хирургических материалов со специальными свойствами: дис. ... д-ра техн. наук: 05.17.06/ Жуковский Валерий Анатольевич. – СПб., 2013. – 288 с.
108. Бойко, А.В. Направленная доставка лекарственных препаратов при лечении онкологических больных / А.В. Бойко, Л.И. Кoryтова, Н.Д. Олтаржевская. – М.: ИМК, 2013. – 194 с.
109. Qin, Y.M. Advanced wound dressings / Y.M. Qin // J. of the Textile Institute. – 2001. – V. 92. – № 1. – P. 127-138.
110. Опарин, С.В. Применение лекарственных желатиновых пленок в ЛОР-практике, стоматологии для лечения пародонтита / С.В. Опарин, С.А. Чемезов, В.А. Фурин и др. // Фундаментальные вопросы фармакологии. – 2003. – С. 66.
111. Парамонов, Б.А. Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана / Б.А. Парамонов, Л.Г. Карпухина, Д.Ю. Андреев и др. // Материалы 8 международной конференции. М.: ВНИРО, 2006. – С. 236-238.
112. Jeon, S.H. Swelling behavior of polyelectrolyte gels in the presence of salts / S.H. Jeon, E.E. Makhaeva, A.R. Khokhlov // Macromol. Chem. Phys. – 1998. – V. 199. – P. 2665-2670.
113. Thanh, Thi Minh Polyampholyte gels: swelling, collapse and interaction with ionic surfactants / Thi Minh Thanh, E.E. Makhaeva, A.R. Khokhlov // Polymer Gel and Network. – 1997. – V. 5. – P. 357-367.
114. Махеева, Е.Е. Амфифильные полимерные системы: переход клубок-глобула (коллапс) и абсорбционные свойства: дис. ... д-ра физ.-мат. наук: Е.Е. Махеева. – М., 2003. – 304 с.
115. Гудзь, О.В. Современные подходы к разработке нормативного документа на гели косметические на основе карбопола / О.В. Гудзь, О.А. Худайкулова, Е.И. Яковенко, И.К. Савкова // Провизор. 2000. № 12. С. 42-43.
116. Децина, А.Н. Теория мягких косметологических воздействий. Современная косметология / А.Н. Децина // Монография. Новосибирск: СО РАСХН, 2001. 505 с.
117. Самуйлова Л. В., Пучкова Т. В. Косметическая химия: учеб.издание. Ч.1: Ингредиенты. М.: Школа косметических химиков, 2005. 336 с.
118. Маклакова, А.А. Реологическое поведение гелей желатины с добавками анионного полисахарида / А.А. Маклакова, Ю.В. Кондратюк, Н.Г. Воронько, С.Р. Деркач // Известия КГТУ. 2012. Т. 25. С. 90-97.
119. Талабаева С.В., Кадникова И.А., Соколова В.М. Исследование параметров экстрагирования каррагинана в технологии получения каррагинанового гидрогеля / С.В. Талабаева, И.А. Кадникова, В.М. Соколова // Биотехнология. 2007. № 1. С. 75-80.
120. Большакова, Л.С. Влияние различных технологических факторов на реологические характеристики альгинатных гелей / Л.С. Большакова, Е.В.

- Литвинова, Н.Д. Жмурина, Е.И. Бурцева // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 6. С. 1-7.
121. Инагамов, С.Я. Поликомплексные гели на основе натрий карбоксиметилцеллюлозы – новые пролонгаторы лекарственных препаратов / С.Я. Инагамов, М.Ю. Мухамеджанова, Г.И. Мухаммедов // Химия растительного сырья. 2011. № 2. С. 51–56.
 122. Сысуев, Б.Б. Биофармацевтическая оценка мягких лекарственных форм на основе минерала бишофит / Б.Б. Сысуев // Современные наукоемкие технологии. 2004. № 1. С. 70-71.
 123. Donato L., Gamier C., Novates B., Doublier J.-L. Gelation of Bovine Serum Albumin in the Presence of Low-methoxyl Pectin: Effects of Na⁺ and Ca²⁺ on Rheology and Microstructure// Food Colloids: Interaction, Microstructure and Processing / Ed. Dickinson E. Cambridge: The Royal Soc. Of Chem., 2004. P. 48-58.
 124. Beaulieu M., Turgeon S., Doublier J.-L. Rheology, texture and microstructure of whey proteins/low methoxyl pectins mixed gels with added calcium I I Internat. Dairy J. 2001. V. 11. P. 961-967.
 125. Sareen, R. Meloxicam Carbopol-based gels: characterization and evaluation / R. Sareen, S. Kumar, G.D. Gupta // Curr. Drug. Deliv. 2011. V. 8, N 4. P. 407-415.
 126. Lomas, R.J. Effects of a per acetic acid disinfection protocol on the biocompatibility and biomechanical properties of human patellar tendon allografts / R.J. Lomas, L.M. Jennings, J. Fisher, J.N. Kearney // Cell Tissue Bank. 2004. N 5. P. 149-160.
 127. Abdullah, G.A. Carbopol and Ultrez 10 as viscosity modifiers of palm olein esters based nano-scaled emulsion containing ibuprofen / G.A. Abdullah, M.F. Abdulkarim, C. Mallikarjun, E.S. Mahdi, M. Basri, M.A. Sattar, A.M. Noor // Pak. J. Pharm. Sci. 2013. V. 934, 940.
 128. Махкамов, Х.К. Распад протопектина корзинки подсолнечника в потоке гидролизующего раствора. / Х.К. Махкамов // диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук Душанбе 2015 с 91.
 129. Мал. пат. ТЈ 290 Республика Таджикистан, МПК (2006), С 08 В 37/06, А 61 К 31/70, А 23 L 1/0524 Способ получения пектина из растительного сырья / Мухидинов З.К., Горшкова Р.М., Халикова С. [и др.]; заявитель и патентообладатель Мухидинов З.К. - № 0900307; заявл. 06.05.2009; опубл. 20.01.2010; бюл. 57 (1).
 130. Горшкова, Р.М. Статический и динамический режимы кислотного гидролиза протопектина корзинки подсолнечника / Р.М. Горшкова, З.К. Мухидинов, Х.К. Махкамов, С. Халикова, Д.Х. Халиков, Л.Ш. Лиу // Известия Академии наук Республики Таджикистан. Отделение физико-математических, химических, геологических и технических наук. 2010. № 3. С. 69-74.
 131. Горшкова, Р.М. Некоторые физико-химические параметры фракций протопектина корзинки подсолнечника, полученных в динамическом режиме / Р.М. Горшкова, М.Д. Исобаев - Душанбе, 2011 6 с. - Деп. в НПИЦентре 18.04.2011 г., № 11(1860).

132. Constenlda, D. Effect of pomace drying on apple pectin / D. Constenlda, A. G. Ponge, J.E. Lozano // LWT - Food Science and Technology. – 2002. - V. 35. - № 3. - P. 216-221.
133. Patent, U.S. “Method for Improving the Permeate Flux of a Crossflow Membrane Filter,” / Pias S., Hargrove S.C., Talbert M. // U.S. Patent № 6,423,230. - 2002.
134. Афанасьев, С.П. Модификация тетраметрического анализа пектиновых веществ / С.П.Афанасьев, Э.П.Попова, Т.Н.Кацева, Е.П.Кухта, В.Я.Чирва // Химия природных соединений–1984. – № 4. – С. 428-431.
135. Филиппов, М. Фотометрическое определение метоксильных групп в пектиновых веществах / М.Филиппов, В.И.Кузьминов // Ж. аналитическая химия.–1971. –Т.26. –Вып.1. –С. 143-146.
136. Халиков, Д.Х. Влияние молекулярной массы на желирующие свойства пектина. / Д.Х. Халиков, А.Ш. Штанчаев, З.М. Мухиддинов // Аналитическое ультрацентрифугирование в химии и биологии: сб. тр. науч.-практич. конф. - Душанбе: «Дониш», 1987. - С. 140-145.
137. ГОСТ 29186-91 «Пектин. Технические условия» - М: Стандартиформ. - 1991. - 15 с.
138. Аймухамедова, Г.Б. Зависимость свойств пектиновых веществ от их метоксильной составляющей. / Г.Б. Аймухамедова, З.К. Каракаева, Н.П. Шелухина – Фрунзе: «Илим», 1990. - 91 с.
139. Патент Японии N 50-41641, кл. C 08 B 37/06, A 23 L 1/0524 Process for producing crude pectin through ion exchange / Graves, F. Appl. WO 94/22 920, IPC5 C08B37/06, C07H1/00. PCT/US 94/03500; 13.10.1994., publ., 1995.
140. Караколев, Г. Пектинови вещества. Химия, производства, приложение. / Г. Караколев, И. Огненов, М. Маринов // София: Державна из-во. «Наука и искусство», 1956. - 159 с.
141. Джонмуродов, А.С. Физико-химические и структурные особенности пектиновых полисахаридов из нетрадиционных сырьевых источников. / А.С. Джонмуродов // Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук Душанбе – 2016. 124 с.
142. Логинов, Н.Я. Аналитическая химия / Н.Я.Логинов, А.Г.Воскресенский, И.С. Солодкин. – М.: Просвещение. – 1975.–380с.
143. Пилипенко, А.В. Аналитическая химия. Учеб. пособие для хим. и хим.-технол. спец. вузов : в 2 томах / А.В. Пилипенко, И.Т. Пятницкий - М.: Химия, 1990. - 480 с.
144. Khon, R. Binding of divalent cations to oligomeric fragments of pectin / R. Khon // Carbohydrate Research. - 1987. - №160. - P. 343–353.
145. Фролов, Ю.Г. Поверхностные явления и дисперсные системы / Ю.Г. Фролов - М., 1982. - 400 с.
146. Горшкова, Р. М. Физико-химические и технологические основы получения продуктов распада протопектина растительного сырья. \ Р.М. Горшкова \ диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук Душанбе – 2016. 370 с.

147. Портяная, Н.И. Биохимические исследования в токсикологическом эксперименте. / Н.И. Портяная, Б.Г. Осипенко, П.А. Москадынова [и др.] - Иркутск: Изд-во ун-та, 1990. - 216 с.
148. Гацура, В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ / В. В. Гацура - М.: Медицина, 1974. - 100 с.
149. Гублер, Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. / Е.В. Гублер - Л.: Медицина, 1978. - 296 с.
150. Карпович, Н.С. Пектин: производство и применение. Карпович Н.С., Донченко Л.В. и др. - Киев: Урожай, 1989, 88 с.
151. Горшкова, Р.М. Влияние рН гидролизующего агента на выход и физико-химические параметры пектиновых полисахаридов различного сырья, полученных в статическом и динамическом режимах гидролиз-экстракции. \ Р.М.Горшкова, З.К.Мухидинов, Б.С. Ёрова. и др. \ \ Вестник Таджикского национального университета, 2015. №1/6(191), с.113-117.
152. Халиков Д.Х. Действие кислотности раствора и фонового электролита на выход и уранидные составляющие продуктов распада протопектина корзинки подсолнечника в потоке раствора / Д.Х. Халиков, Г.Н. Бободжонова, Р.М. Горшкова, Х.К. Махкамов // Доклады Академии наук Республики Таджикистан, 2017 г, Т. 60. № 5-6. С. 251-258.
153. Халиков, Д.Х. Влияние предварительной обработки корзинок подсолнечника на выход фракций протопектина. \ Д.Х.Халиков, Р.М.Горшкова, С.Халикова, З.К.Мухиддинов \ \ Доклады Академии наук Республики Таджикистан, 2008, т.50, №5, с.45-49.
154. Халиков, Д.Х. Некоторые характеристики продуктов распада протопектина подсолнечника. \ Д.Х. Халиков, З.К.Мухиддинов, М.Г. Асоев, Ф.Т. Абдусамиев \ \ Химия природных соединений, 1999, №5, с. 581-585.
155. Халиков, Д.Х. Влияние скорости потока на гидролиз-экстракцию корзинки подсолнечника в динамическом режиме. \ Д.Х.Халиков, Г.Н.Бободжонова, Р.М.Горшкова, Х.К.Махкамов \ \ Доклады Академии наук Республики Таджикистан, 2017, т.60, №3-4, с183-189.
156. Оводов, Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах. / Ю.С. Оводов // Биоорганическая химия, 2009, т.35, №3, с. 293-310.
157. Халиков, Д.Х. О набухаемости гидрогелей на основе пектиновых полисахаридов корзинки подсолнечника в воде / Д.Х. Халиков, Г.Н. Бободжонова, Р.М. Горшкова, Р.С. Мирзоева // Доклады академии наук РТ. 2017 г, том 60, №1-2, с.79-85.
158. Халиков, Д.Х. Ионное равновесие в водных растворах пектиновых веществ. \ Д.Х. Халиков, Ф.Н. Джураева, Р.М. Горшкова, З.К. Мухидинов \ \ ДАН РТ, 2011, т.54, № 3, с. 210-215.
159. Халиков Д.Х. О сорбционной активности пектиновых полисахаридов по отношению к ионам металлов / Д.Х.Халиков, Р.С.Мирзоева, Г.Н.Бободжонова, Р.М.Горшкова, С.Халикова, Х.Х.Авлоев // Доклады академии наук РТ. 2017 г.
160. Халиков, Д.Х. Распад протопектина корзинки подсолнечника как последовательная реакция, протекающая в потоке. \ Д.Х. Халиков, Р.М.

- Горшкова, Х.К. Махкамов, З.К. Мухидинов // Доклады Академии наук Республики Таджикистан. 2012. Т. 55. № 12. С. 975-980.
161. Молекулярная масса пектинов, полученных в автоклаве / З.К. Мухиддинов, М.Л. Fishman, Р.М. Горшкова [и др.] // Химический Журнал Казахстана - Специальный выпуск (21). - 2008 - С. 60-66.
162. Бободжонова, Г.Н. Перспективы применения пектиновых полисахаридов, полученных из отходов пищевой промышленности / Г.Н.Бободжонова, Р.М. Горшкова, З.К. Мухидинов, Д.Х. Халиков // Сборник статей Республиканской научно-практической конференции «Роль молодежи в решении важнейших проблем в процессе глобализации», Душанбе, 19-21 мая 2014 г., С.130-136.
163. Шаповаленко, Е.П. Физико-химическое исследование взаимодействия билирубина с сывороточным альбумином: Автореф.дисс. канд.хим.наук. - М.: МГУ, 1980. - 17 с.
164. Dunlop, E.H. Physico-chemical aspects of the removal of protein-bound substances by charcoal and other adsorbents of potential value in system of artificial liver support. P.1. Eqmilibrium properties\ E.H.Dunlop, R.D. Hughes, R. Williams // Med.bid.Engin. - 1978. – Vol. 16. - P.343-349.
165. Рахимов, И.Ф. Сорбционная активность пектиновых полисахаридов подсолнечника по отношению к билирубину (*in vivo*) / И.Ф. Рахимов, Р.М. Горшкова, З.К. Мухидинов, Г.Н. Бободжонова, М.Д. Халикова, А.Ю. Султонов, Г.В. Разыкова, Д.Х. Халиков // Доклады академии наук РТ. 2016г, том 59, №3-4, с.157-161.
166. Елинек, А.Ф. Извлечение токсических веществ кислотного типа из биологических жидкостей \ А.Ф. Елинек, В.Д. Горчаков, Ю.А. Лейкин // Всесоюзн.конф. по сорбционным методам детоксикации и иммунокоррекции в медицине: Тез. докл. - Харьков, 1982. - С. 292-293.
167. Хотимченко, Ю.С. Фармакология некрахмальных полисахаридов / Ю.С. Хотимченко, И.М. Ермак, А.Е. Бедняк, [и др.] // Вестник ДВО РАН. - 2005. - № 1. - С. 72-82.
168. Халтурина, Д.А. Алкогольная катастрофа и возможности государственной политики в преодолении алкогольной сверхсмертности в России / Д.А. Халтурина, А.В. Коротаев - М.: ЛЕНАНД, 2008. - 376 с.
169. Рожанец, В.В. Первичный метаболизм этанола в желудочно-кишечном тракте / В.В. Рожанец, В.П. Нужный // Вопросы наркологии. - 2007. - № 5-6. - С. 37-42.
170. Нужный, В.П. Влияние компонентов сивушного масла и эфиральдегидной фракции на острую токсичность и наркотическое действие этилового спирта / В.П. Нужный, Е.Б. Тезиков, И.В. Демешина [и др.] // Токсикол. Вестник. - 1999. - № 2. - С. 2-8.
171. Azuma, K. Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides / K. Azuma, T. Osaki, S. Minami [et all] // J. Funct. Biomater. - 2015. - Vol. 6. - P. 33-49.
172. Concha-Olmos, J. Enzymatic depolymerization of sugarbeet pulp: production and characterization of pectin and pectic-oligosaccharides as a potential source for

- functional carbohydrates / J. Concha-Olmos, M.E. Zuniga-Hansen // Chem. Eng. J. - 2012. - Vol. 192. - P. 29-36.
173. Cui, W. Low-molecular-weight fucoidan protects endothelial function and ameliorates basal hypertension in diabetic Goto-Kakizaki rats / W. Cui, Y. Zheng, Q. Zhang [et all.] // Lab. Invest. - 2014. - Vol. 94. - P. 382-393.
174. Нужный, В.П. Методологические аспекты оценки токсичности спиртосодержащих жидкостей и алкогольных напитков / В.П. Нужный // Токсикол. Вестник. - 1999. - № 4. - С. 2-9.
175. Нужный, В.П. Бюлл. Всесоюзн. научн. центра по безопасности биол. активных в-в. / В.П. Нужный, Е.Б. Тезиков, А.Е. Успенский // - 1991. -№ 2, С. 44-64.

ПРИЛОЖЕНИЕ

АКТ внедрения НИР

04.06.2014г.

ПАПО «ШАХРИНАВ»
735020, РТ, Шахринавский р-н,
пгт. Таджикистан, станция Чептура.
Тел.: (917) 75-05-50, 72-47-3

Настоящий акт составлен в том, что на базе ПАПО «Шахринав» по разработанному Институтом химии им. В.И.Никитина Академии наук Республики Таджикистан способу при гидролиз-экстракции 100 кг корзинок подсолнечника в динамическом режиме получена опытная партия подсолнечного пектина в количестве 27 кг.

Технологический регламент процесса получения:

- промывка сырья;
- набухание в растворе соляной кислоты;
- гидролиз-экстракция протопектина в течение 60 минут при температуре 85°C, скорости потока 6 мл/мин;
- отделение раствора-гидролизата;
- нейтрализация гидролизата до pH=3.5;
- отделение гидрогеля;
- осаждение водорастворимого пектина этанолом;
- высушивание пектина при 40°C.

От ПАПО «Шахринав»

Начальник завода
первичного
виноделия ПАПО
«Шахринав»

Галустян З.А.

Инженер-технолог
ПАПО «Шахринав»

Рахимов Ш.

Председатель ДХ
«Абдурахмон»

Абдурахманов М.Н.

От Института химии им. В.И.Никитина АН Республики Таджикистан

Зав. лабораторией
ВМС, д.х.н.,
профессор,

академик АН РТ

Халиков Д.Х.;

Ведущий научный
сотрудник
лаборатории ВМС,
к.х.н., доцент

Горшкова Р.М.

Научный
сотрудник ВМС

Бободжанова Г.Н.





«УТВЕРЖДАЮ»
 Директор Института
 химии им. В.И. Никитина
 А.Б.РТ д.х.н., профессор
 Мухидинов З.К.
 «23» сентября 2015 г.

А К Т

испытания гепатопротекторной способности пектиновых полисахаридов

Мы, нижеподписавшиеся: зав. лабораторией фармакологии Института химии АН РТ, д.м.н., профессор Рахимов И.Ф., гл.н.с., д.м.н. Хайдаров К.Х., вед.н.с., к.х.н. Назарова З. подтверждаем, что в лаборатории фармакологии Института химии АН РТ в период с 01 июня по 18 сентября 2015 года проведена токсикологическая экспертиза и исследование гепатопротекторного действия пектиновых полисахаридов (микрорелей и пектиновых веществ) подсолнечника, полученных в лаборатории Химии высокомолекулярных соединений Института химии им. В.И. Никитина Академии наук Республики Таджикистан. Исследование проведено на белых крысах с обеспечением им соответствующих условий содержания и кормления, согласно санитарным нормам.

Цель испытания – фармакологическое изучение на предмет гепатопротекторной способности пектиновых полисахаридов в условиях *in vivo* при поражении печени четыреххлористым углеродом.

Определение острой токсичности. Острая токсичность исследуемых микрорелей и пектиновых веществ была изучена на белых крысах при их внутреннем (пероральном) применении. (Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. М.Л. Беленький, 1963; Методологические рекомендации по токсико-экологической оценке лекарственных средств. Воронеж, 1998).

Для определения острой токсичности использовали клинически здоровых белых крыс в количестве 100 голов живой массы 150-200 г. Животные ранее не подвергались токсическому воздействию и содержались в одинаковых условиях. Изучаемые полисахариды применялись однократно орально в расчетных дозах: 10 % раствор от 2500 до 4000 мг/кг живой массы. Объем вводимого препарата не превышал 1 мл. Каждой опытной группе соответствовала контрольная, где мышам вводили стерильную питьевую воду в объеме, аналогичном дозе применяемого препарата для опытных животных.

Для введения растворов исследуемого соединения использовали инъекционный шприц с обрезанной и отшлифованной иглой с напоем в форме оливы. Крысам вводили препарат натошак после 12-часовой голодной выдержки, держа их в вертикальном положении. Корм животным задавали через 2-3 часа после введения препарата. Наблюдения за животными вели в течение 30 дней. В течение всего периода опыта учитывали клиническое состояние опытных и контрольных животных, поедаемость кормов, поведение, массу тела и сохранность. В середине (по 3 крысы) и в конце опыта (все животные) были убиты для проведения патологической оценки состояния внутренних органов.

В результате проведенных опытов установлено, что все исследованные образцы микрорелей и пектиновых веществ подсолнечника являются нетоксичными веществами. В ходе эксперимента не удалось установить ЛД₅₀ (минимальную летальную дозу) по Керберу, так как за весь период наблюдения в опытных и контрольных группах не погибла ни одна крыса (табл. 1, 2). Клинических признаков токсикоза у животных, получавших микрорель и пектиновые вещества не наблюдали.

Таблица 1

Результаты изучения острой токсичности образцов микрогеля корзинки
подсолнечника

| № п/п | Группа животных | Число живот. | Дозы, мг/кг | Выжило, голов | Пало, голов |
|-------|-----------------|--------------|-------------|---------------|-------------|
| 1 | опытная | 10 | 2500 | 10 | - |
| 2 | опытная | 10 | 2750 | 10 | - |
| 3 | опытная | 10 | 3000 | 10 | - |
| 4 | опытная | 10 | 3500 | 10 | - |
| 5 | контрольная | 10 | - | 10 | - |

Таблица 2

Результаты изучения острой токсичности образцов пектиновых веществ корзинки
подсолнечника

| № п/п | Группа животных | Число живот. | Дозы, мг/кг | Выжило, голов | Пало, голов |
|-------|-----------------|--------------|-------------|---------------|-------------|
| 1 | опытная | 10 | 2500 | 10 | - |
| 2 | опытная | 10 | 2750 | 10 | - |
| 3 | опытная | 10 | 3000 | 10 | - |
| 4 | опытная | 10 | 3500 | 10 | - |
| 5 | контрольная | 10 | - | 10 | - |

Общее состояние животных, их поведенческие реакции, физиологические характеристики и гематологические показатели не выходили за рамки нормы. При гистологических исследованиях внутренних органов не обнаружено повреждающего действия испытуемых образцов микрогелей и пектиновых полисахаридов подсолнечника на структуру тканей. Исследование тканей, взятых у крыс после окончания эксперимента, с помощью гистологических методов показали, что структура тканей и формы органов печени и селезенки сохранена. При этом отсутствовали признаки какой-либо патологии.

Определение хронической токсичности. Хроническую токсичность пектиновых полисахаридов корзинки подсолнечника изучали на белых крысах массой 150-200 г. Животные опытной группы (10 голов) получали исследуемые образцы микрогелей и пектиновых веществ подсолнечника из расчета 2000 мг/кг живой массы ежедневно в течение 25 суток. Вводимую дозу задавали в общем объеме 0,5 мл. Контрольным животным (10 голов) вводили внутрь эквивалентный объем питьевой воды. За крысами обеих групп вели ежедневные наблюдения. В конце опыта вскрывали подопытных животных с целью проведения патологоанатомического исследования. Через 10 дней от начала опыта и в конце периода наблюдения (25 дней) в каждой группе убиты по 3 крысы для визуального наблюдения состояния внутренних органов. Установлено, что микрогели и пектиновые вещества, вводимые внутрь, ежедневно, в выбранной дозе, не оказывают токсического действия на организм крыс. За весь период наблюдений у животных не отмечалось изменений общего состояния. При патологоанатомическом исследовании внутренних органов какие-либо отклонения от нормы не выявлены. Изучение тканей, взятых у крыс после окончания эксперимента, с помощью гистологических методов, показали, что структура тканей и формы органов печени и селезенки сохранена. При этом отсутствовали признаки патологических изменений.

Определение гепатопротекторной активности. Гепатопротекторное действие перорального применения микрогелей и пектиновых веществ подсолнечника было изучено на белых крысах при экспериментальном поражении печени четырёххлористым углеродом. (Сенцов В.Г., Данилова И.Г., Медведева С.Ю. и др. Влияние макрофагального звена иммунной системы на морфо-функциональное состояние печени на ранних этапах формирования токсического гепатита у крыс. – Вестник Уральской медицинской академической науки, 2009, Т.25, №2, с.300-302.).

Для определения гепатопротекторного действия микрогелей и пектиновых веществ подсолнечника использовали клинически здоровых белых крыс в количестве 48 голов живой массы 150-200 г. Животные ранее не подвергались токсическому воздействию и содержались в одинаковых условиях.

Контрольная группа животных получала стандартную диету на протяжении всего эксперимента. У животных опытной группы токсическое повреждение печени было вызвано 7-дневным введением в желудок с помощью зонда 10% раствора четырёххлористого углерода в оливковом масле (3 мл/кг) из расчета дозы 300 мг/кг. После этого части животных каждой группы был дан лёгкий эфирный наркоз и у них произведен забор крови. В полученных образцах крови определяли активность аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы, а также уровень общего и прямого билирубина.

В дальнейшем животные, получавшие четырёххлористый углерод, были разделены на семь равных групп. Группа CCl_4 получала стандартную диету. Трём группам животных ежедневно за 1 час до кормления через внутривентрикулярный зонд вводили суспензию пектиновых веществ, с содержанием сухого вещества, соответственно: 10, 50 и 250 мг/кг массы тела животного. Остальным трём группам животных вводили суспензию микрогеля по такой же схеме. Введение полисахаридов продолжали в течение трёх недель, после чего животных под лёгким эфирным наркозом декапитировали, производили забор крови, печень извлекали, промывали физиологическим раствором и взвешивали. В полученных образцах крови и ткани печени определили те же параметры, что и после первой части эксперимента.

Введение в течение 7 дней четырёххлористого углерода привело к достоверному изменению биохимических показателей состояния печени. Активность АЛТ в сыворотке крови возросла в 7,8 раз, АСТ - в 9,5 раз. Концентрация общего и прямого билирубина в сыворотке крови увеличилась в 4,4 и 3,8 раз соответственно, что указывает на развитие выраженного токсического поражения печени в ходе эксперимента (табл. 3).

Спустя три недели у животных, не получавших полисахариды, вышеуказанные показатели продолжали значительно отличаться от контрольных значений. Активность АЛТ в сыворотке крови была в 6,4 раз выше, чем в контрольной группе, АСТ - в 7 раз. Уровень общего билирубина был в 4,5 раза выше, а прямого - в 4,15. Исходя из полученных результатов, можно говорить об отсутствии самоизлечения у животных, которым был предварительно введён четырёххлористый углерод. У животных, получавших на протяжении трёх недель пектиновые полисахариды в различных дозах, показатели достоверно отличались от аналогичных у группы с CCl_4 .

Введение микрогеля и пектиновых веществ в дозе 10 мг/кг массы тела не привело к изменению биохимических показателей в сыворотке крови. Но увеличение дозы от 50 до 250 мг/кг привело к дозозависимому уменьшению активности АЛТ и АСТ, а также уровня общего и прямого билирубина.

Таблица 3

Эффект от введения пектиновых веществ и микрогеля корзинки подсолнечника на состояние печеночной ткани у крыс с токсическим поражением печени, индуцированным четыреххлористым углеродом

| Группа | АЛТ, Ед | АСТ, Ед | Общий билирубин, мкмоль/л | Прямой билирубин, мкмоль/л |
|------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 7 сутки | | | | |
| Контроль | 0,58±0,04 | 0,31±0,03 | 9,79±0,47 | 5,01±0,26 |
| ССL ₄ | 4,54±0,26* | 2,95±0,12* | 43,04±3,12* | 19,02±0,94* |
| 28 сутки | | | | |
| Контроль | 0,62±0,03 | 0,41±0,02 | 10,95±1,19 | 5,67±0,24 |
| ССL ₄ | 3,98±0,21* | 2,88±0,21* | 48,83±3,17* | 23,54±2,01* |
| ПВ-КП, 10 мг/кг | 3,98±0,39* | 2,03±0,17* | 41,11±3,12* | 20,12±1,94* |
| ПВ-КП, 50 мг/кг | 3,02±0,23* ^a | 1,89±0,19* ^a | 39,75±2,86* | 18,08±2,15* |
| ПВ-КП, 250 мг/кг | 1,85±0,18* ^c | 0,72±0,52* ^c | 18,03±2,05* ^c | 9,42±1,17* ^c |
| МГ-КП, 10 мг/кг | 3,89±0,24* | 3,01±0,15* | 37,51±2,41* | 24,02±1,31* |
| МГ-КП, 50 мг/кг | 2,08±0,12* ^a | 1,34±0,14* ^a | 29,74±2,92* ^a | 13,52±2,07* ^a |
| МГ-КП, 250 мг/кг | 1,21±0,11* ^a | 1,08±0,12* ^a | 15,68±2,03* ^a | 10,55±1,67* ^a |

Примечание: * - различие достоверно с группой контроль, P<0,001;

^a - различие достоверно с группой ССL₄, P<0,05;

^b - различие достоверно с группой ССL₄, P<0,01;

^c - различие достоверно с группой ССL₄, P<0,001; определенные посредством ANOVA теста с последующим проведением теста Tukey's.

ПВ-КП –пектиновые вещества корзинки подсолнечника;

МГ-КП микрогель корзинки подсолнечника.

Оценка профилактического гепатопротекторного эффекта. Профилактическое гепатопротекторное действие предварительного перорального введения микрогелей и пектиновых веществ подсолнечника было изучено на белых крысах при их экспериментальной интоксикации четыреххлористым углеродом. (Медведева С.Ю., Данилова И.Г., Гетте И.Ф. и др. Особенности регенераторных процессов в печени при токсическом воздействии ядов различной тропности на фоне модуляции активности макрофагов. – Омский научный Вестник, 2013, №1 (118), с.68-70.).

При изучении влияния предварительного введения микрогелей и пектиновых веществ подсолнечника на состояние печеночной ткани при экспериментальной интоксикации четыреххлористым углеродом у крыс использовали клинически здоровых белых крыс в количестве 48 голов живой массы 150-200 г. Животные ранее не подвергались токсическому воздействию и содержались в одинаковых условиях.

Белым крысам массой 150-180 г в течение трех недель вводили за 1 час до кормления внутривентрикулярно через зонд суспензию исследуемых микрогелей и водорастворимых пектиновых полисахаридов с содержанием сухого вещества 10, 50 и 250 мг/кг массы тела. Контрольная группа животных получала стандартную диету и за 1 час до кормления 1 мл дистиллированной воды. По окончании этой части эксперимента введение микрогелей и пектиновых веществ прекращали, части животных каждой из

групп был дан легкий эфирный наркоз и произведен забор артериальной крови. В полученных образцах крови определяли: активность аланинаминотрансферазы и аспаргатаминотрансферазы, а также уровень общего и непрямого билирубина.

В дальнейшем контрольные животные были разделены на две равные группы, одна из которых до окончания эксперимента получала только стандартную диету, а другой дополнительно вводили 10%-ный раствор четыреххлористого углерода в оливковом масле (3 мл/кг) из расчета дозы 300 мг/кг массы тела. Животным из групп, получавшим микрогели и пектиновые вещества, также вводили четыреххлористый углерод согласно указанной дозе. Спустя 7 дней введение четыреххлористого углерода прекращали и под легким эфирным наркозом производили забор артериальной крови. В образцах крови определяли биохимические показатели поврежденной печеночной ткани.

Трёхнедельное введение, как пектиновых веществ, так и микрогелей в дозе от 10, 50 и 250 мг/кг не приводило к достоверному изменению активности АЛТ и АСТ в сыворотке крови, а также содержания общего и прямого билирубина (табл. 4).

Таблица 4

Влияние предварительного введения микрогеля и пектиновых веществ корзинки подсолнечника на состояние печеночной ткани при экспериментальной интоксикации четыреххлористым углеродом у крыс

| Группа | АЛТ, Ед | АСТ, Ед | Общий билирубин, мкмоль/л | Прямой билирубин, мкмоль/л |
|------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 21 сутки | | | | |
| Контроль | 0,68±0,06 | 0,31±0,02 | 10,86±1,52 | 6,01±0,56 |
| ПВ-КП, 10 мг/кг | 0,62±0,05 | 0,29±0,04 | 12,08±1,12 | 5,99±0,49 |
| ПВ-КП, 50 мг/кг | 0,58±0,04 | 0,41±0,05 | 11,79±1,07 | 6,73±0,54 |
| ПВ-КП, 250 мг/кг | 0,66±0,05 | 0,42±0,06 | 12,95±1,25 | 5,95±0,72 |
| МГ-КП, 10 мг/кг | 0,81±0,07 | 0,37±0,03 | 11,88±1,17 | 8,06±0,53 |
| МГ-КП, 50 мг/кг | 0,69±0,06 | 0,41±0,05 | 12,12±1,09 | 7,84±0,55 |
| МГ-КП, 250 мг/кг | 0,80±0,05 | 0,43±0,04 | 11,98±1,19 | 6,55±0,51 |
| 28 сутки | | | | |
| Контроль | 0,65±0,11 | 0,34±0,06 | 11,01±1,23 | 5,72±0,83 |
| СCL ₄ | 4,18±0,21* | 2,87±0,18* | 41,68±3,65* | 18,89±1,66* |
| ПВ-КП, 10 мг/кг | 3,54±0,31* | 2,23±0,15* | 39,02±4,01* | 17,52±1,34* |
| ПВ-КП, 50 мг/кг | 2,87±0,25 ^b | 1,85±0,17 ^b | 32,12±2,97* | 14,67±1,29* |
| ПВ-КП, 250 мг/кг | 1,18±0,13 ^c | 1,07±0,09 ^c | 17,84±2,11 ^c | 10,07±0,54 ^c |
| МГ-КП, 10 мг/кг | 2,75±0,27* | 1,87±0,16* | 35,63±2,77* | 15,83±1,57* |
| МГ-КП, 50 мг/кг | 2,46±0,16 ^a | 1,54±0,18 ^a | 28,15±3,07* | 13,75±1,76* |
| МГ-КП, 250 мг/кг | 1,08±0,11 ^c | 0,74±0,10 ^b | 15,23±2,13 ^a | 7,86±1,12 ^a |

Примечание: * - различие достоверно с группой контроль;

^a - различие достоверно с группой ССL₄, P<0,05;

^b - различие достоверно с группой ССL₄, P<0,01;

^c - различие достоверно с группой ССL₄, P<0,001; определены посредством ANOVA теста с последующим проведением теста Tukey's.


У животных, которым предварительно до введения четыреххлористого углерода в течение трёх недель вводили исследуемые пектиновые полисахариды в дозах 50 и 250 мг/кг массы тела, указанные показатели достоверно отличались от группы, получавшей ССL₄. Активность АЛТ и АСТ и содержание общего и прямого билирубина достоверно уменьшились.

На основании проведенных исследований можно сделать заключение, что образцы микрогелей и пектиновых веществ подсолнечника, полученные в лаборатории Химии

высокомолекулярных соединений Института химии им. В.И. Никитина Академии наук Республики Таджикистан, являются нетоксичными и не оказывающими негативного влияния на организм лабораторных животных. Пектиновые вещества и микрогель, полученные из корзинки подсолнечника, обладают выраженными дозозависимыми гепатопротекторными лечебными эффектами при экспериментальной тетрахлорметановой интоксикации. При этом наибольшая лечебная эффективность наблюдается после использования пектиновых полисахаридов в максимальной дозе.

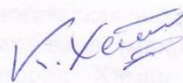
На основании полученных результатов можно рекомендовать микрогели и пектиновые вещества подсолнечника к проведению доклинических испытаний.

Зав. лабораторией фармакологии
института химии АН РТ, д.м.н., профессор



Рахимов И.Ф.

Главный научный сотрудник,
д.м.н., профессор, академик АН РТ



Хайдаров К.Х.

Ведущий научный сотрудник, к.х.н.



Назарова З.

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института

химии им. В.И. Никитина

АН РТ, д.х.н., профессор,

академик АН РТ

Халиков Д.Х.

«03» августа 2012 г.



А К Т

исследования антиалкогольной активности яблочных олигосахаридов

Мы, нижеподписавшиеся: зав. лабораторией фармакологии Института химии АН РТ, д.м.н., профессор, академик АН РТ Хайдаров К.Х., гл.н.с., д.м.н., профессор Рахимов И.Ф., вед.н.с. к.х.н. Назарова З. подтверждаем, что в лаборатории фармакологии Института химии АН РТ в период с 16 мая по 20 июля 2012 года проведено исследование по определению антиалкогольной активности яблочных олигосахаридов, полученных в лаборатории Химии высокомолекулярных соединений Института химии им. В.И. Никитина Академии наук Республики Таджикистан. Исследование проведено на белых мышах с обеспечением им соответствующих условий содержания и кормления, согласно санитарным нормам.

Цель испытания – фармакологическое исследование на предмет антиалкогольной активности яблочных олигосахаридов в условиях *in vivo*.

Методы исследования.

Прежде чем исследовать антиалкогольную активность яблочных олигосахаридов, определяли их токсичность при однократном внутривентральном введении интактным животным (мышам). Изучение токсичности показало, что яблочные олигосахариды относятся к нетоксичным веществам. Установить ЛД₅₀ по Керберу не удалось, так как за весь период наблюдения в опытных и контрольных группах не погибло ни одно животное.

Антиалкогольная активность яблочных олигосахаридов была изучена на белых мышах при их алкоголизации (Нужный В.П. Методологические аспекты оценки токсичности спиртосодержащих жидкостей и алкогольных напитков. // Токсикол. вестник. -1999. - № 4. - С. 2-9; Нужный В.П., Тезиков Е.Б., Успенский А.Е. Моделирование постинтоксикационного алкогольного поражения сердца, исследование механизмов развития и принципов фармакологической коррекции. - Бюлл. Всесоюз. научн. центра по безопасности биол. активных в-в.-1991.-№2.- С. 44-64.).

Для исследования антиалкогольной активности яблочных олигосахаридов использовали клинически здоровых белых мышей в количестве 48 голов живой массы 18-26 г. Животные ранее не подвергались токсическому воздействию и содержались в одинаковых условиях.

Для исследования использовался раствор олигосахаридов с концентрацией 12,65 мг/мл, который вносили в этиловый спирт в необходимой концентрации, после чего спирт доводили водой до концентрации 30% об. Исследованные концентрации в соотношении ОС: этанол : вода: 10:30:60 (Раствор 1), 40:30:30 (Раствор 2), 60:30:10 (Раствор 3).

Мышей разбили на 4 группы:

1-я группа, получавшая 30% этанол без добавок в дозе 7мл/кг (контроль),

2-я – получавшая Раствор 1 (концентрация ОС 10%),

3-я группа – получавшая Раствор 2 (концентрация ОС 40%),

4-я группа – получавшая Раствор 3 (концентрация ОС 60%).

Животных содержали на обычном пищевом рационе, установленном в лаборатории фармакологии (для мышей весом 18-26 г), где они имели свободный доступ к воде. Указанные растворы использовали для введения подопытным животным в количестве 0,6

мл на каждую мышь. Контрольным животным вместо растворов олигосахаридов вводили эквивалентное количество 30% этанола.

Результаты исследования

Для оценки влияния олигосахаридов на латентный период и продолжительность вызываемого этанолом наркотического сна, мышам вводили внутривенно смесь олигосахаридов и этанола в указанных соотношениях. Мышам контрольной группы вводили равный объем смеси этанола и воды. Регистрировали латентный период наркотического сна (время от момента введения этанола до принятия животным бокового положения, с) и продолжительность наркотического сна (время пребывания в боковом положении, мин).

Как видно из приведенных данных (табл. 1), 10%-ная добавка ОС к этанолу приводит к увеличению латентного периода наркотического сна с 89 до 220 секунд. С увеличением концентрации ОС в растворе этанола, латентный период увеличивается до 885 и 1635 секунд для 40%-ного и 60%-ного растворов олигосахаридов соответственно. В то же время, продолжительность наркотического сна сокращается с 54 минут до 47, 35 и 29 минут для растворов ОС с концентрацией 10, 40 и 60% соответственно.

Таблица 1

Влияние добавки олигосахаридов на латентный период и продолжительность вызываемого этанолом наркотического сна у мышей

| Группы животных (n - количество мышей в группе) | Латентный период наркотического сна, с | Продолжительность наркотического сна, мин |
|---|--|---|
| Контроль (раствор этанола) (n 6) | 89±15 | 54±17 |
| Раствор 1 (ОС 10%) (n 6) | 220±26* | 47±18* |
| Раствор 2 (ОС 40%) (n 6) | 885±24* | 35±15* |
| Раствор 3 (ОС 60%) (n 6) | 1635±20* | 29±16* |

Примечание: * - $p < 0.05$ в сравнении с контролем

Для оценки влияния олигосахаридов на динамику наркотического действия этилового спирта, исследуемые растворы вводили подопытным животным по указанной выше методике. Состояние мышей оценивали в баллах по специальной верифицированной шкале каждый час на протяжении 10 часов с момента введения. Интегральную тяжесть алкогольной интоксикации оценивали по сумме баллов за весь период наблюдения. Установлено, что 10%-ная добавка олигосахаридов практически вдвое ускоряет выход мышей из состояния алкогольного опьянения и снижает тяжесть алкогольной интоксикации с 37,7 до 29,2 баллов (табл. 2). Увеличение концентрации олигосахаридов увеличивает динамику выхода животных из состояния алкогольного опьянения и снижает тяжесть интоксикации.

Таблица 2

Влияние добавки олигосахаридов на динамику наркотического действия этанола и тяжесть алкогольной интоксикации

| Время после введения этанола, часы | Контроль (р-р этанола) (n 6) | Раствор 1 (ОС 10%) (n 6) | Раствор 2 (ОС 40%) (n 6) | Раствор 3 (ОС 60%) (n 6) |
|------------------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 4,6±0,5 | 4,4±0,4 | 4,2±0,6 | 4,0±0,5 |
| 2 | 4,3±0,5 | 4,1±0,5 | 3,9±0,5 | 3,6±0,4 |

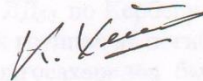
| | | | | |
|--------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| 3 | 4,2±0,4 | 4,0±0,4 | 3,5±0,4* | 3,2±0,4 |
| 4 | 4,1±0,4 | 3,9±0,2* | 3,1±0,3* | 2,3±0,3* |
| 5 | 4,0±0,3 | 3,5±0,3* | 2,8±0,3* | 1,9±0,2* |
| 6 | 3,8±0,2 | 2,9±0,3* | 2,2±0,2* | 1,5±0,3* |
| 7 | 3,6±0,3 | 2,2±0,2* | 1,5±0,3* | 1,0±0,3* |
| 8 | 3,3±0,2 | 1,9±0,3* | 1,2±0,4* | 0,7±0,2* |
| 9 | 3,0±0,5 | 1,4±0,7 | 0,8±0,5* | 0,5±0,6 |
| 10 | 2,8±0,4 | 0,9±0,6 | 0,4±0,5* | 0,2±0,7 |
| сумма баллов | 37,7±2,4 | 29,2±2,6* | 23,6±2,5* | 18,9±2,6* |

Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Таким образом, в результате проведенных фармакологических исследований установлено, что яблочные олигосахариды, полученные в лаборатории Химии высокомолекулярных соединений Института химии им. В.И. Никитина Академии наук Республики Таджикистан, обладают выраженной способностью дозозависимо ослаблять острое токсическое (наркотическое) действие этилового спирта у мышей. Увеличивает латентный период вызываемого этанолом наркотического сна и динамику выхода животных из состояния алкогольного опьянения, уменьшая продолжительность наркотического сна у мышей и снижая тяжесть интоксикации.

На основании вышеизложенного можно сделать заключение о перспективе применения олигосахаридов в качестве средства, снижающего токсические эффекты этилового спирта.

Зав. лабораторией фармакологии
института химии АН РТ, д.м.н., профессор,
академик АН РТ



Хайдаров К.Х.

Главный научный сотрудник,
д.м.н., профессор



Рахимов И.Ф.

Ведущий научный сотрудник, к.х.н.



Назарова З.



«УТВЕРЖДАЮ»
 Директор Института
 химии им. В.И. Никитина
 АН РТ, д.х.н., профессор
 Мухидинов З.К.
 «13» декабря 2015 г.

А К Т

ИСПЫТАНИЯ МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Мы, нижеподписавшиеся: зав. лабораторией фармакологии Института химии АН РТ, д.м.н., профессор Рахимов И.Ф., гл. н. с., д.м.н. Хайдаров К.Х., вед.н.с. к.х.н. Назарова З. подтверждаем, что в лаборатории фармакологии Института химии АН РТ в период с 31 августа по 27 ноября 2015 года проведено исследование по определению металлсвязывающей способности пектиновых полисахаридов: микрогелей и пектиновых веществ корзинки подсолнечника и яблочных выжимок, полученных в лаборатории Химии высокомолекулярных соединений Института химии им. В.И. Никитина Академии наук Республики Таджикистан. Исследование проведено на белых крысах с обеспечением им соответствующих условий содержания и кормления, согласно санитарным нормам.

Цель испытания – фармакологическое исследование на предмет металлсвязывающей способности микрогелей и водорастворимых пектиновых веществ в условиях *in vivo* на модели энтеральной свинцовой интоксикации.

Определение специфической активности.

Прежде чем исследовать металлсвязывающую активность пектиновых полисахаридов, определяли их токсичность при однократном внутрибрюшинном введении интактным животным (крысам). Изучение токсичности показало, что микрогели и пектиновые вещества корзинки подсолнечника и яблочных выжимок относятся к нетоксичным веществам. Установить ЛД₅₀ по Керберу не удалось, так как за весь период наблюдения в опытных и контрольных группах не погибла ни одна крыса.

Металлсвязывающая способность перорального применения микрогелей и водорастворимых пектиновых веществ была изучена на белых крысах при их энтеральной свинцовой интоксикации. (Способ моделирования хронической токсической нефропатии. Рег. номер. 2005109451/14 от 2006.10.27, авторы Датиева Л.Р., Дзугкоева Ф.С.).

Для определения металлсвязывающей способности использовали клинически здоровых белых крыс в количестве 96 голов живой массы 150-200 г. Животные ранее не подвергались токсическому воздействию и содержались в одинаковых условиях.

Первая группа - контрольная, получала обычную диету. Вторую группу составили животные, которым энтерально с помощью металлического зонда вводили ацетат свинца в дозе 50 г/кг массы тела один раз в сутки. Остальные животные входили в опытные группы, которым за 40-60 мин до введения ацетата свинца также энтерально вводили один из исследуемых пектиновых полисахаридов в виде раствора (для пектиновых веществ) или суспензии (для микрогеля) в дозах 0,1 г/кг или 0,5 г/кг массы тела. Продолжительность эксперимента составляла 18 дней для дозы 0,1 г/кг и 21 день при дозе 0,5 г/кг. По истечении этих сроков животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Навески органов массой около 500 мг высушивали в термостате при температуре 60-80°C в течение суток и определяли содержание свинца.

Установлено, что пероральное введение свинца в течение трех недель способствует быстрому накоплению ионов металла в печени, почках, печени и бедренной кости лабораторных животных. В случае, если одновременно с раствором свинца в организм лабораторных животных вводятся микрогели и пектиновые вещества корзинки подсолнечника, количество свинца, накапливаемого в указанных органах и бедренной кости достоверно уменьшается. Введение пектиновых веществ яблочных выжимок, также

как и лекарственных препаратов энтеросорбентов (Полифепан, активированный уголь), не изменяет уровень абсорбции свинца и его накопление во внутренних органах (табл. 1, 2).

Таблица 1

Содержание свинца в органах крыс, получавших одновременно ацетат свинца и пектиновые полисахариды (0,1 г/кг/сут) в течение 18 дней

| Группа животных | Концентрация свинца (мкг/г сухой массы) | | | |
|----------------------|---|-------------|-------------|-----------------|
| | Печень | Сердце | Почки | Бедренная кость |
| Контроль | 2,9 ± 1,2 | 7,5 ± 0,8 | 9,3 ± 0,6 | 32,6 ± 5,8 |
| Ацетат свинца | 11,8 ± 0,9 | 25,8 ± 1,7 | 58,4 ± 2,4 | 317,2 ± 9,2 |
| ПВ-КП (обр.) | 9,1 ± 1,6* | 17,1 ± 1,3* | 36,8 ± 3,1* | 301,8 ± 6,1 |
| МГ-КП (обр.) | 6,8 ± 1,2* | 14,6 ± 0,9* | 33,1 ± 2,1* | 212,5 ± 12,1* |
| МГ-КП | 7,3 ± 0,7* | 15,2 ± 1,5* | 34,6 ± 1,8* | 236,5 ± 9,8 |
| ПВ-Яв | 10,7 ± 1,6 | 24,3 ± 1,8 | 50,6 ± 3,2 | 298,4 ± 8,6 |
| Полифепан | 10,7 ± 0,8 | 22,7 ± 2,4 | 48,7 ± 2,7 | 304,5 ± 12,8 |
| Активированный уголь | 11,2 ± 0,9 | 23,6 ± 1,6 | 49,6 ± 1,8 | 306,2 ± 9,3 |

Примечание: здесь и далее данные представлены в виде $M \pm SEM$,

* - $P < 0,05$ в сравнении с группой «Ацетат свинца».

ПВ-КП (обр.) – водорастворимые пектиновые вещества, полученные из предварительно обработанных раствором хлорида натрия корзинок подсолнечника;

МГ-КП (обр.) – микрогель, полученный из предварительно обработанных раствором хлорида натрия корзинок подсолнечника;

МГ-КП – микрогель, полученный из необработанных корзинок подсолнечника;

ПВ-ЯВ – водорастворимые пектиновые вещества, полученные из яблочных выжимок.

Таблица 2

Содержание свинца в органах крыс, получавших одновременно ацетат свинца и пектиновые полисахариды (0,5 г/кг/сут) в течение 21 дня

| Группа животных | Концентрация свинца (мкг/г сухой массы) | | | |
|----------------------|---|-------------|-------------|-----------------|
| | Печень | Сердце | Почки | Бедренная кость |
| Контроль | 3,7 ± 0,5 | 9,7 ± 1,2 | 10,2 ± 2,9 | 37,4 ± 5,1 |
| Ацетат свинца | 13,1 ± 1,2 | 27,5 ± 1,6 | 63,5 ± 3,7 | 382,5 ± 8,7 |
| ПВ-КП (обр.) | 8,5 ± 1,4* | 15,8 ± 1,4* | 31,7 ± 1,5* | 183,1 ± 5,4* |
| МГ-КП (обр.) | 6,1 ± 1,1* | 10,3 ± 1,1* | 21,4 ± 1,6* | 125,1 ± 7,2* |
| МГ-КП | 6,7 ± 0,9* | 12,1 ± 1,5* | 25,3 ± 1,2* | 137,3 ± 11,5* |
| ПВ-Яв | 15,2 ± 1,5 | 25,2 ± 1,7 | 54,8 ± 3,1 | 297,3 ± 15,2 |
| Полифепан | 14,7 ± 1,3 | 26,1 ± 3,4 | 57,6 ± 2,9 | 328,8 ± 17,3 |
| Активированный уголь | 14,6 ± 1,1 | 26,8 ± 1,9 | 62,1 ± 3,4 | 363,7 ± 104 |

Примечание* - $P < 0,05$ в сравнении с группой «Ацетат свинца».

На основании проведенных исследований можно сделать заключение, что микрогель и пектиновые вещества корзинки подсолнечника, полученные в лаборатории Химии высокомолекулярных соединений Института химии им. В.И. Никитина Академии наук Республики Таджикистан, способны затормаживать абсорбцию свинца в кишечнике, что отражается в уменьшении количества депонированного свинца во внутренних органах. При испытании был обнаружен дозозависимый эффект при применении данных пектиновых полисахаридов.

На основании полученных результатов можно рекомендовать микрогели и пектиновые вещества подсолнечника к проведению доклинических испытаний.

Зав. лабораторией фармакологии
института химии АН РТ, д.м.н., профессор



Рахимов И.Ф.

Главный научный сотрудник,
д.м.н., профессор, академик АН РТ



Хайдаров К.Х.

Ведущий научный сотрудник, к.х.н.



Назарова З.