

На правах рукописи

ШАМСАРА ОМИД МОХАМАДАЛИ

**Физико-химические свойства эмульсионных
микрокапсул, стабилизированных комплексами
лактоглобулинов с различными пектинами**

02.00.04 – Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval. Below the signature, the date '21/1/2014' is written.

Душанбе – 2014

Работа выполнена в лаборатории «Химия высокомолекулярных соединений» Института химии им. В.И. Никитина Академии наук Республики Таджикистан

Научный руководитель: **Мухидинов Зайниддин Камарович**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Рахимова Мубаширхон**
доктор химических наук, доцент
кафедры физической и коллоидной химии Таджикского национального университета, г. Душанбе;

Тошов Азамджон Фозилович
кандидат химических наук, доцент
кафедры общей и неорганической химии Таджикского государственного педагогического университета имени Садриддина Айни.

Ведущая организация: Таджикский государственный медицинский университет имени Абуали ибн Сино, кафедра биоорганической, физической и коллоидной химии

Защита диссертации состоится « 25 » февраля 2015 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета ДМ 047.003.02 при Институте химии им. В.И. Никитина АН РТ по адресу: 734063, Душанбе, ул. Айни, 299/2. e-mail: *gulchera@list.ru*

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института химии им. В.И. Никитина Академии наук Республики Таджикистан по адресу: 734063, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2 и на сайте Института химии им В.И. Никитина АН Республики Таджикистан www/chemistry.tj

Автореферат разослан: « _____ » _____

2015 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук**



Касымова Г.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы и степень разработанности темы исследования

Микро- и наноэмульсионное инкапсулирование - интенсивно развивающаяся область нанотехнологии, связанная с получением монодисперсных нанокапсул биологически активных веществ. Использование биоразлагаемых полимеров: глобулярных белков и пектиновых полисахаридов (ПП) для получения оболочки микро- и нанокапсул, обеспечивает контролируемую по времени и локализации доставку активных веществ. Вместе с тем многие вопросы микроэмульсионного инкапсулирования остаются до настоящего времени недостаточно изученными.

Микроэмульсионное капсулирование представляет собой совокупность ряда межфазных явлений, связанных с микроэмульгированием биоактивных веществ, адсорбцией и образованием межфазных слоев полимеров на границе раздела фаз масло/вода, достижением агрегационной устойчивости полученных микро- и нанокапсул.

Более того, такие композиционные материалы, полученные из пищевых биополимеров (белки и полисахариды), находят широкую область использования в пищевых, фармацевтических и профилактических продуктах. Биополимерные системы нашли применение при инкапсулировании, защите и доставке биоактивных компонентов, таких как микроэлементы, пептиды, белки, ферменты, лекарственные вещества, липиды и диетические волокна.

Следовательно, создание высококонцентрированных эмульсионных систем, необходимых для производства на их основе функциональных пищевых продуктов, систем доставки лекарственных веществ (СДЛ) и пищевых ингредиентов (СДПИ), является актуальной проблемой современной науки на стыке физической и коллоидной химии, биотехнологии и фармацевтики.

Цель и задачи работы. Целью данной работы является разработка комплексного подхода к получению высокоустойчивых концентрированных эмульсионных микрокапсул, стабилизированных комплексами лактоглобулинов с высоко- (ВМ-) и низкометилованными (НМ-) пектинами различного происхождения, изучение их устойчивости, адсорбционных и десорбционных свойств по отношению к модельному ЛВ для создания СДЛ и СДПИ.

Для достижения данной цели были решены **следующие задачи:**

- определены условия микроэмульгирования водных растворов лактоглобулинов молочной сыворотки и различных пектинов;
- выявлен интервал соотношения биополимеров для получения устойчивых к агрегации эмульсионных микрокапсул;
- изучены адсорбционные свойства эмульсионных микрочастиц по отношению к модельному ЛВ - пироксикаму (РХ);
- изучено влияние различных параметров на степень формирования устойчивого вторичного слоя различными пектинами;
- исследованы кинетические параметры высвобождения адсорбированных ЛВ из эмульсионных микрокапсул;
- разработаны эмульсионные микрокапсулы с высоким захватом ЛВ, стабильные в условиях желудка;
- изучены кинетические параметры высвобождения ЛВ в условиях, моделирующих среду кишечника.

Научная новизна работы. В настоящей работе показана возможность регулирования коллоидно-химическими свойствами межфазных адсорбционных слоев комплексов лактоглобулинов, изолированных из молочной сыворотки (β -LgC), с ВМ- и НМ-пектинами путем варьирования соотношений биополимеров, ионной силы и рН растворов в процессе приготовления эмульсионных микрокапсул.

Впервые оптимизирован диапазон молярных соотношений β -LgC с различными пектинами, в котором наблюдается высокая устойчивость эмульсионных микрокапсул к коалесценции и агрегации, максимальный захват ЛВ и его высвобождение в условиях, моделирующих кишечник.

Установлено, что основной движущей силой для адсорбции ПП на каплях первичной эмульсии является электростатическое взаимодействие между заряженными группами на биополимерах. Степень адсорбции ПП на заряженной поверхности масло/протеин также зависит от их конформационных свойств, соотношения белок/ПП и условий среды (рН и ионной силы).

Впервые изучено взаимодействие НМ - пектинов с β -LgC с образованием нерастворимых комплексов на поверхности раздела

фаз масло-вода первичной эмульсии. Найдены оптимальные условия получения устойчивых эмульсий с высоким процентом насыщения ЛВ.

Изучена кинетика высвобождения РХ из эмульсионных систем в опытах *in vitro*. Рассчитаны кинетические константы модельного уравнения для сферических микрочастиц в системе β -LgC/НМЯ пектин в широком интервале соотношений. Установлено, что в процессе высвобождения ЛВ из эмульсионных СДЛ основную роль играют как диффузия ЛВ, так и релаксация полимерного матрикса на вторичном слое.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Разработаны фундаментальные основы создания новых эмульсионных систем для применения в фармацевтической и пищевой промышленности. Найдены оптимальные условия для получения устойчивых эмульсий посредством формирования прочного слоя на поверхности протеин-масло-вода. Показано, что среди изученных пектинов, яблочные пектины, включающие электростатические и гидрофобные участки, являются привлекательными для стабилизации вторичного слоя эмульсии в системе белок/пектин.

Предложен простой микроскопический метод контроля количества и размера частиц микрокапсул с использованием компьютерной программы Motic Image Advanced 3.2.

Разработаны новые системы микроносителей ЛВ в виде эмульсионных микрочастиц, демонстрирующие высвобождение модельного ЛВ по механизму кинетики реакции нулевого порядка, который применяется в транспорте ЛВ и ПИ с контролируемым высвобождением в определенных участках желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

Полученные в настоящей работе физико-химические константы пополняют справочные материалы для СДЛ в виде эмульсионных микроносителей и могут быть использованы в учебных процессах.

На защиту выносятся положения, сформулированные в выводах.

Объектами исследования данной работы являются эмульсионные микрокапсулы на основе лактоглобулинов молочной сыворотки и пектинов различного происхождения.

Методология и методы исследования. Для получения эмульсионных микрокапсул применяли способ формирования

эмульсии масло в воде (М/В), основанный на адсорбции ионного эмульгатора лактоглобулина на первом слое и противоположно заряженного полиэлектролита - пектина на втором слое. Для характеристики устойчивости микрокапсулы суспендировали в воде и определяли количество частиц и их размеры на микроскопе Motic type 102 M (Motic Instrument INC, Canada) с использованием компьютерной программы Motic Image Advanced 3.2. Размер частиц представлен в виде объёмно-веса среднего диаметра d_{43} . Кинетику высвобождения модельного ЛВ определяли путем измерения экстинкции растворов при 355 нм на спектрофотометре UV 1 Thermo Spectronic, UK (Индия) в аппарате, моделирующем ЖКТ. Для оценки кинетических параметров использовали эмпирическую модель высвобождения ЛВ, разработанную Хопфенбергом (Hopfenberg).

Достоверность полученных результатов работы обеспечена использованием современного оборудования с программным обеспечением и статистическим анализом при проведении экспериментов, согласованностью выводов, полученных с помощью различных методов исследования и с положениями физической химии.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались, международной конференции «Актуальные вопросы физики и химии полимеров», посвященной 80-летию проф. И.Я. Калонтарова (27 декабря 2013, Душанбе), 12-ой международной конференции по гидроколлоидам (International Hydrocolloids Conference «Functional hydrocolloids: The key to human health», 5-9 мая 2014, Тайпей, Тайвань), на коллоквиуме лаборатории химии ВМС и расширенном заседании ученого совета Института химии АН РТ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах входящих в перечень ВАК РФ, 2 тезиса докладов на международной и республиканской научных конференциях.

Личный вклад автора. Вклад автора состоит в подготовке и проведении экспериментов, обработке экспериментальных данных и анализе полученных результатов.

Объём и структура работы. Диссертация представляет собой рукопись, изложенную на 99 страницах компьютерного набора, состоит из введения и 3 глав, посвященных обзору литературы, экспериментальной части, результатам исследований и

их обсуждению, выводам. Работа иллюстрирована 17 рисунками, 8 таблицами и 1 схемой. Список использованной литературы включает 166 наименований.

Соответствие диссертации паспорту специальности.

Диссертационная работа по своим целям, задачам, содержанию, научной новизне и методам исследования соответствует п. 3 «Определение термодинамических процессов на поверхности, установление закономерности адсорбции на границе раздела фаз и формирования активных центров на таких поверхностях» и п. 7 «Макрокинетика, механизм сложных химических процессов, ...» паспорта специальности 02.00.04 – физическая химия.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 (литературный обзор) представлен развернутый анализ публикаций по теме диссертации. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что в последние годы широкую популярность приобрел способ микро- и нанокапсулирования ЛВ в эмульсионные системы масло в воде (М/В) или наоборот (В/М), способствующий улучшению терапевтической эффективности и уменьшению ряда побочных эффектов биологически активных компонентов ЛВ. В этом аспекте значительное внимание оказывают природным полимерам, в частности пектинам и лактоглобулинам молочной сыворотки, благодаря их полиионной структуре, биосовместимости и способности к образованию гелей.

Глава 2 - экспериментальная часть, описаны объекты исследования, методы анализа исходных биополимеров, методы получения эмульсионных микрокапсул и их характеристики.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ФОРМИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОКАПСУЛ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ ВЫСОКОМЕТИЛИРОВАННЫХ (ВМ) ПЕКТИНОВ И КОНЦЕНТРАТА БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ

3.1.1. Микрокапсулы на основе ВМ- яблочного пектина и концентрата лактоглобулинов (LgC)

Первоначально эмульсионные микрокапсулы были приготовлены на основе комплексобразования высокометилированного яблочного пектина (ВМЯ) с концентратом лактоглобулина в системе эмульсии масло/вода (O/W). В качестве

ЛВ был использован нестероидный противовоспалительный препарат - пироксикам (РХ).

Для характеристики устойчивости микрокапсулы суспендированы в воде на гомогенизаторе при 9000 об/мин. Количество частиц и их размеры определяли на микроскопе Motic type 102 M (Motic Instrument INC, Canada) с использованием компьютерной программы Motic Image Advanced 3.2. Размер частиц представлял собой объёмно-весовой средний диаметр d_{43} . Все измерения были выполнены на двух свежеприготовленных образцах, результаты представлены как средневывычисленные. Характеристика микрокапсул: стабильность эмульсионных частиц (объём эмульсии) и степень инкапсулирования ЛВ для системы β -LgC/ВМЯ приведена в таблице 1.

Таблица 1

**Характеристика эмульсионных микрокапсул
 β -LgC/ВМЯ, полученных в водной среде**

Весовое соотношение β -LgC/ВМЯ, г/г	Молярное соотношение β -LgC/ВМЯ	Объём эмульсии через день, мл	Количество инкапсулированного РХ, %
5:1	36.0	3.1	51.1
3:1	21.7	3.2	60.0
2:1	14.5	4.5	16.6
1:1	7.2	1.1	42.0
1:2	3.6	4.1	54.5
1:3	2.4	3.2	55.0
1:5	1.5	2.2	67.1

Данные, представленные в табл.1, указывают на то, что объёмы полученных эмульсий при всех соотношениях β -LgC/ВМЯ вначале составляли 27-31 мл, на следующий день объёмы снижались, достигая стабильного состояния, а через день образовывался компактный кремовидный слой (1.1-4.5 мл). Однако, несмотря на кремообразование, эмульсионные системы обладали высокой способностью задерживать ЛВ.

Следовательно, способ приготовления вторичной эмульсии был изменен путем увеличения ионной силы для предотвращения полиэлектролитного набухания пектиновых цепей. Все эмульсионные микрокапсулы были приготовленные при рН ниже изоэлектрической точки (ИТ) β -LgC. В результате полученная эмульсия оказалась более

устойчивой, что зависело от способа получения и продолжительности хранения (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика микрокапсул, полученных в среде 0.1 М NaCl

Способ приготовления	Весовое соотношение β -LgC/ВМЯ, г/г	Соотношение β -LgC/ВМЯ, моль/моль	Объем эмульсии на следующий день, мл	Количество внедрённого РХ, %
I	1:5	5	18.6	44.0
	1:3	13	18.9	63.4
	3:1	22	23.6	51.4
	5:1	44	19.2	53.9
	10:1	72	15.0	67.7
II	1:5	5	19.8	45.5
	1:3	13	21.4	58.6
	3:1	22	23.0	55.1
	5:1	44	20.2	46.1
	10:1	72	18.0	66.7
III	1:5	5	18.6	40.7
	1:3	13	23.0	50.7
	3:1	22	24.0	35.3
	5:1	44	17.0	56.2
	10:1	72	17.2	74.0

Объём эмульсии β -LgC/ВМЯ при соотношении 3:1, соответствующем 22 молям β -LgC по отношению к пектину, вызвал значительное увеличение устойчивости к кремообразованию. Объём эмульсии β -LgC/ВМЯ при соотношении 3:1 увеличился более чем в 7 раз, а при соотношении β -LgC/ВМЯ 5:1 более чем в 4 раза по сравнению с эмульсиями, приготовленными в водной среде. На рис.1 представлена зависимость количества микрочастиц в 1 мл эмульсии и их среднего объёмно-весового диаметра (d_{43}) от соотношения биополимеров в эмульсионной системе β -LgC/ВМЯ, измеренных на второй день.

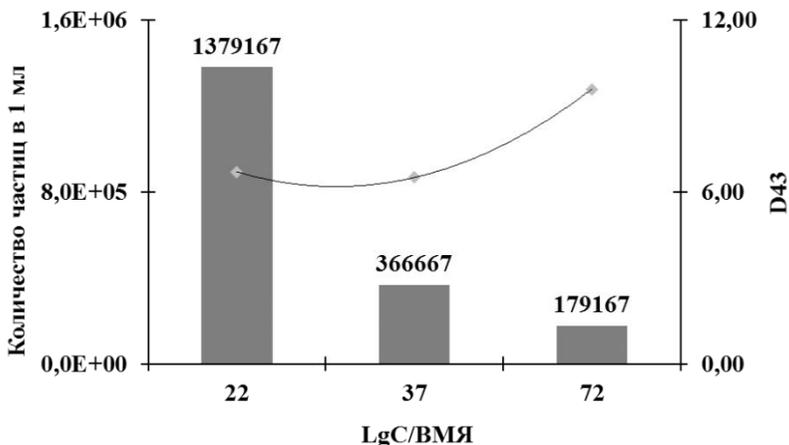


Рисунок 1 - Зависимость количества микрочастиц в 1 мл эмульсии (колонки) и их среднего объёмно-весаого диаметра (d_{43} —линия) от соотношения биополимеров в эмульсионной системе β -LgC/ВМЯ.

Большее количество частиц было обнаружено в системе β -LgC/ВМЯ-пектин при молярном соотношении 22.

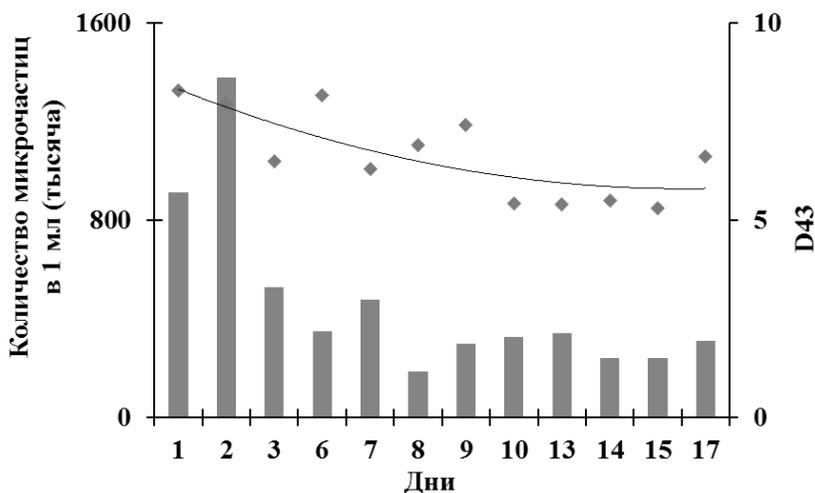


Рисунок 2 - Изменение количества частиц в 1 мл и их среднего диаметра (d_{43}) от времени хранения эмульсии с соотношением β -LgC/ВМЯ 22.

В результате средний диаметр частиц увеличился от 6.7 мкм до 9.6 мкм, в то время как общее количество частиц в объеме 1 мл резко снизилось от 1 млн. 379 до 366667 и 179167, соответственно для LgC/ВМЯ при молярных соотношениях 37 и 72.

На рис. 2 в качестве примера показано количество частиц и их объемно-весовой средний диаметр для эмульсии β -LgC/ВМЯ 22 при хранении в течение 18 дней. Как видно, эмульсия при низком соотношении компонентов (3:1) изначально обладает более высоким количеством микрокапсул (1.4 млн. частиц) с наименьшим диаметром, которое уменьшается при хранении до 300-400 тыс. в 1 мл эмульсии. В процессе хранения эмульсии наблюдается полимодальное распределение частиц, которое на 13-18 день вновь переходит в мономодальное.

Это доказывает, что частицы эмульсии при своем движении, сближаясь до определенного расстояния, объединяются, а затем, под действием электростатического отталкивания одноименных зарядов, разрушаются. С увеличением фракции белка от 5 до 10 молекул на моль пектина происходит уменьшение объема эмульсии и, следовательно, образуется меньшее количество частиц. Избыток белковых молекул, взаимодействуя с пектиновой цепью на поверхности микрокапсулы, приводит к уменьшению количества частиц и увеличению среднего диаметра при хранении. Однако данный процесс не приводит к уменьшению насыщения лекарством для этих эмульсионных систем. Устойчивость эмульсии в данном случае вследствие добавления соли натрия, вероятно, усилила эффективность длины пектиновой цепи путем уменьшения полиэлектролитного набухания полимерных цепей и образования плотного центра покрытой поверхности.

3.1.2. Микрокапсулы на основе ВМ - цитрусового пектина и LgC

Ряд микрокапсул были получены с применением перого способа, отличающегося исходным весовым соотношением пектина и сывороточного белка молока (табл. 3). Полученная в результате эмульсия оказалась более устойчивой при продолжительном хранении (табл. 3). Данные в таблице указывают на то, что объем полученной эмульсии для всех соотношений β -LgC/ВМЦ, составлявший 19-25 мл вначале, на следующий день снижается до стабильного объема.

Таблица 3

Характеристика микрокапсул на основе β -LgC /ВМЦ

Шифр микрокапсул	Весовое соотношение β -LgC/ВМЦ, г/г	Молярное соотношение β -LgC/ВМЦ, М/М	Объём эмульсии (капсул) через день, мл	Количество пироксикама в микрокапсулах, %
ВМЦ 04	3:1	12	25.4	47.19
ВМЦ 05	5:1	20	21.6	62.74
ВМЦ 06	10:1	40	19.0	64.13

Из таблицы видно, что объём эмульсии β -LgC/ВМЦ при соотношении 3:1, соответствующий 12 молям β -LgC по отношению к ВМЦ, вызвал значительное увеличение устойчивости к кремообразованию. Объём эмульсии β -LgC/ВМЦ увеличился более чем в 2 раза по сравнению с эмульсиями, приготовленными в водной среде, а количество внедрившегося ЛВ увеличилось более чем в 6-8 раз.

В эмульсионной системе с цитрусовым пектином (рис. 3) характер изменения количества микрочастиц и их средний диаметр в зависимости от соотношения β -LgC/ВМЦ несколько другие: кривая увеличения количества частиц проходит через максимум, при этом в точке максимума, равной 54, формируются частицы с минимальным диаметром (5.3 мкм).

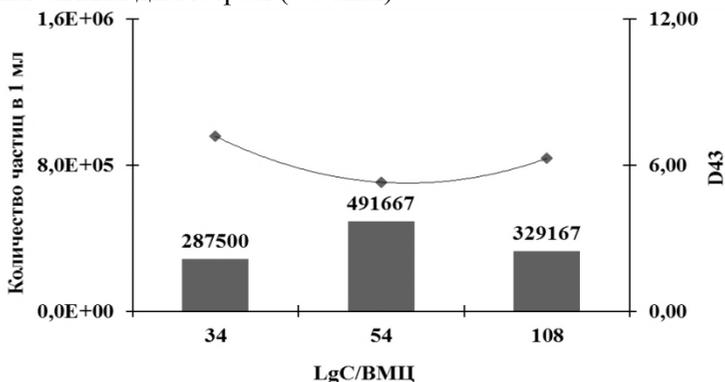


Рисунок 3 - Зависимость количества микрочастиц в 1 мл эмульсии и их среднего объёмно-весового диаметра от соотношения биополимеров в мульсионной системе β -LgC/ВМЦ.

В отличие от эмульсионной системы с ВМ-яблочным пектином, число частиц в системе β -LgC/ВМЦ при молярном соотношении 54 достигло 491 667, что в три раза меньше числа частиц с ВМ-яблочным пектином при мольном соотношении 22. Формирование относительно крупных частиц с ВМ-яблочным пектином, возможно, связано со структурой ВМЯ, имеющим разветвленную цепь, и плотностью заряда, способного захватывать большое количество ЛВ липидными каплями.

В присутствии противоионов натрия все исследуемые эмульсии были устойчивыми с высокой степенью инкапсулирования ЛВ. Стабильная эмульсия, содержащая большое количество частиц с меньшим средним диаметром (d_{43}), наблюдалась в системе β -LgC/ВМЯ с относительно низким соотношением по сравнению с ВМ-цитрусовым пектином.

С увеличением фракции белка в системе происходит уменьшение объёма эмульсии и, следовательно, образование меньшего количества частиц. С увеличением доли протеина молекулы белка взаимодействуют с пектиновой цепью на поверхности микрокапсул, что приводит к уменьшению количества частиц и увеличению среднего диаметра при хранении. Однако данный процесс не влияет на степень насыщения лекарством эмульсионных систем β -LgC/ВМЯ 22 и β -LgC/ВМЦ 54.

Это подтверждает тот факт, что с увеличением доли белка все масляные капли покрываются глобулами лактоглобулинов и в дальнейшем стабилизируются пектином, что препятствует прилипанию частиц и диффузии лекарства из них. Однако оптимальное соотношение, при котором достигается максимальное количество частиц в единице объёма с минимальными размерами, формируется при соотношении β -LgC/ВМЦ около 20. Увеличение фракции белка выше этой точки приводит к уменьшению поверхности заряда на вторичном слое и нарушению стабильности эмульсии. Наблюдение за полученными таким способом системами доставки - эмульсиями в течение месяца показало их высокую устойчивость.

Таким образом, в данной части работы представлены результаты по разработке процесса формирования микрокапсул на основе комплексообразования ВМ пектинов с различной структурой, полученных из яблок и citrusовых, с концентратом β -LgC на поверхности эмульсионных частиц М/В, способных эффективно захватывать ЛВ. Найдены оптимальные условия для

получения устойчивых эмульсий посредством изменения ионной силы системы, способной повышать эффективность длины пектиновой цепи и образовывать прочный слой на поверхности М/В. Показано, что увеличение фракции белка в системе с яблочным ВМ-пектином не влияет на количество инкапсулированного ЛВ по сравнению с цитрусовым ВМ-пектином, способным захватывать большее количество ЛВ, однако в обоих случаях происходит уменьшение объема эмульсий и количества частиц. Разработанные системы доставки ЛВ в виде эмульсионных микрочастиц продемонстрировали способность эффективно захватывать ЛВ, что представляется важным при создании систем доставки инъекционных и аэрозольных ЛВ.

3.2. ФОРМИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОКАПСУЛ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ НИЗКОМЕТИЛИРОВАННЫХ (НМ) ПЕКТИНОВ И КОНЦЕНРАТА БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ

Эмульгирующие свойства низкометилованных (НМ) пектинов недостаточно изучены, хотя имеются данные об их способности формировать прочный комплекс с белками на поверхности раздела масло/вода, стабилизируя эмульсию. Микрокапсулы с НМ-пектинами также получали методом двухстадийного формирования в эмульсии масло в воде в присутствии противоионов натрия. Все эксперименты проводили дважды, в некоторых случаях трижды, с использованием свежеприготовленных эмульсий; результаты представлены как средне-стандартно вычисленные.

Полученные эмульсии исследованных пектинов оказались более устойчивыми при продолжительном хранении (табл. 4). Как и следовало ожидать, объем эмульсии β -LgC/НМП с увеличением доли протеина постепенно увеличивался и принимал максимальное значение (24.2 мл) при достижении мольного соотношения биополимеров 13. В данных условиях объемы эмульсии увеличились более чем в 7 раз по сравнению с эмульсиями, приготовленными в водной среде. В отличие от эмульсионных микрокапсул, полученных на основе ВМ-пектинов, устойчивость и захват ЛВ зависел от соотношения биополимеров. Количество адсорбированного ЛВ постепенно увеличивалось с возрастанием доли одного из биополимеров в эмульсионной среде. Увеличение количества пектина и протеина в системе привело к

кремообразованию эмульсии, в большей степени с увеличением мольной доли пектина и в меньшей с увеличением протеина.

Таблица 4

Характеристика микрокапсул в системе LgC/НМЦ и LgC/НМП, полученных при оптимальных соотношениях биополимеров в среде 0.1 М NaCl, рН=4-5

Тип пектина	Весовое соотношение биополимеров, г/г	Молярное соотношение биополимеров, моль/моль	Объемы эмульсии на второй день, мл	Содержание пироксикама в микрокапсулах, %
НМЦ	3:1	12	25.4	47.19
НМЦ	5:1	20	21.6	62.74
НМЦ	10:1	40	19.0	64.13
НМП	3:1	13	24.2	32.0
НМП	5:1	20	21.0	40.9

Если микрокапсулы с высокой стабильностью формировались при мольном соотношении β -LgC/НМП 13, то степень захвата ЛВ была больше у микрокапсул при мольном соотношении β -LgC/НМП 40. Высокая степень захвата ЛВ была также у микрокапсул с преобладающей долей пектина, который формировал плотный слой крема.

В табл. 5 представлена характеристика эмульсионных микрокапсул, полученных на основе комплексообразования НМ-яблочного пектина с β -LgC. В отличие от микрокапсул НМП и НМЦ, стабильные микрокапсулы с высоким захватом ЛВ формировались в системе НМЯ в широком диапазоне соотношений биополимеров β -LgC/НМЯ (от 5 до 88), при этом степень адсорбции ЛВ оставалась высокой, с максимальным значением 69.0 при мольном соотношении β -LgC/НМП 18.

Таблица 5

Характеристика микрокапсул в системе LgC/НМЯ, полученных в среде 0.1 М NaCl, рН=4.5

Весовое соотношение биополимеров, г/г	Молярное соотношение биополимеров, моль/моль	Объемы эмульсии на второй день, мл	Содержание пироксикама в микрокапсулах, %
1:2	5	22.4	58.5
2:1	18	21.0	69.0
5:1	44	17.6	64.0
10:1	88	16.6	52.7

Количество частиц в 1 мл и средний размер частиц (D_{43}) для эмульсионных микрокапсул β -LgC/НМП были небольшими.

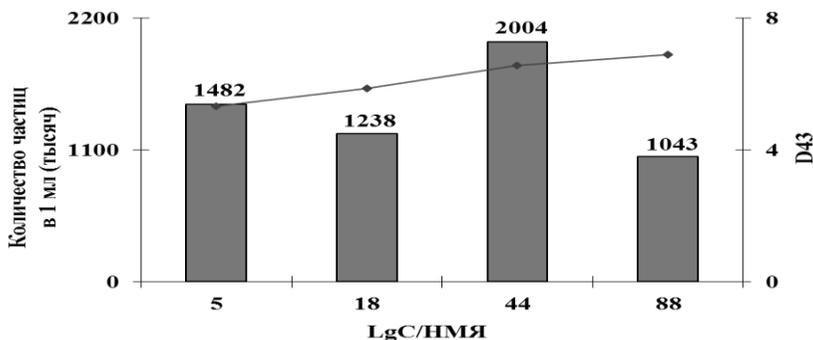


Рисунок 4 -Число частиц (N) в 1 мл (колонки) и их средний размер (D_{43}) в зависимости от соотношения β -LgC/НМЯ.

Относительно высокое количество частиц (363 000 ед.) в 1мл, имеющих небольшие размеры, формируется в системе β -LgC/НМП с соотношением 12; с возрастанием соотношения биополимеров количество частиц постепенно уменьшается. На рис.4. показана зависимость количества частиц в 1мл и их средний размер (D_{43} , мкм) от соотношения β -LgC/НМЯ.

Как видно, лучшие показатели среди изученных пектинов были у НМЯ-пектина. При всех исследованных соотношениях (от 5 до 88) количество микрочастиц в 1 мл было более миллиона, а наибольшее их количество при соотношении β -LgC/НМЯ - 44 моля.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами найдены оптимальные условия получения стабильных микрокапсул в эмульсионной системе масло/вода при различных соотношениях β -LgC/НМ-пектинов, с минимальным размером и максимальным количеством частиц в единице объема, эффективно захватывающих ЛВ.

3.3. КИНЕТИКА ВЫХОДА ПИРОКСИКАМА ИЗ ЭМУЛЬСИОННЫХ МИКРОКАПСУЛ НА ОСНОВЕ КОНЦЕНТРАТА ЛАКТОГЛОБУЛИНОВ И ЯБЛОЧНОГО ПЕКТИНА В ОПЫТАХ IN VITRO

В данной части работы представлены результаты кинетических исследований микрокапсул, полученных с использованием β -LgC и яблочного НМ- пектина.

На рис. 5 представлена зависимость адсорбции ЛВ от соотношения белок/пектин для разработанных эмульсионных микрокапсул с различными пектинами.

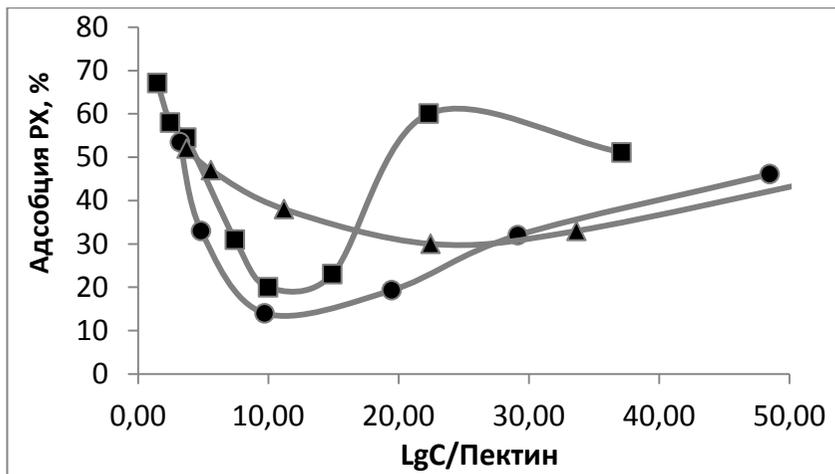


Рисунок 5 - Зависимость адсорбции модельного ЛВ (РХ) от соотношения LgC/ пектин для эмульсионных микрокапсул, полученных с различными пектинами: VM-яблочный (■); НМ-подсолнечный (●); VM-цитрусовый (▲).

Из приведенных кривых, иллюстрирующих зависимость степени адсорбции ЛВ от соотношения белок/пектин, видно, что количество адсорбированного РХ возрастает с увеличением доли одного из биополимеров и принимает минимальное значение при соотношении β -LgC/ВМЦ от 10 до 18 моль. Например, для яблочного пектина оптимальное соотношение, имеющее максимальный захват ЛВ, находится в пределах 20-30 моль β -LgC на моль пектина, что хорошо согласуется с результатами стабильности эмульсии. Для систем с НМ-цитрусовым пектином степень адсорбции РХ мало зависит от соотношения биополимеров.

Как было показано ранее, цитрусовый НМ-пектин формирует нестабильную эмульсию и также эта система не способна удерживать адсорбированное ЛВ. Только пектин, имеющий высокую плотность заряда и молекулярную массу, может образовывать прочный комплекс на поверхности масляных капель с

адсорбированным β -LgC, в результате происходит вытеснение гидрофобного компонента и агрегация частиц.

Было изучено влияние рН и ионной силы среды, в процессе формирования эмульсионных микрокапсул β -LgC/пектин, на степень захвата РХ. Показано, что степень адсорбции РХ прямолинейно уменьшается с увеличением рН и ионной силы растворов.

Таким образом, было показано, что для формирования стабильной эмульсии с высоким захватом ЛВ, ниже ИТ протеина, необходимо: во-первых, чтобы количество добавленного пектина было достаточно для эффективного формирования бислоя. Во-вторых, молекулярная масса пектина должна быть в пределах длины слоя из 20-30 молекул белка, способных эффективно покрывать вторичный слой эмульсии, и в-третьих, распределение плотности заряда на пектиновой цепи должно соответствовать концевым группам протеина.

Изучена зависимость выхода РХ (M_t/M_0) от времени для эмульсионных микрокапсул β -LgC/НМЯ в опытах *in vitro* (рис. 6). Кинетические кривые имеют линейный характер, и выход РХ достигает устойчивого предела, зависящего от соотношения биополимеров, в большей степени при соотношении LgC/НМЯ 18.

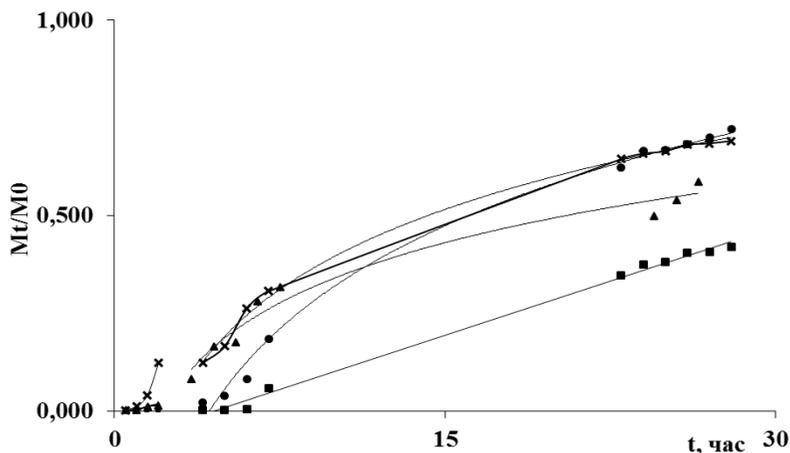


Рисунок 6 - Зависимость выхода РХ (M_t/M_0) от времени для эмульсионных микрокапсул при различных мольных соотношениях β -Lgc/НМЯ: 5.0(▲); 18.0(■); 44.0(×) и 88.0(●).

Начальная стадия кривых, когда выход ЛВ незначителен, демонстрирует выход РХ в условиях, моделирующих среду желудка (рН 1.5). При переходе в среду кишечника (рН 6.4), кинетические кривые выхода РХ из микрокапсул принимают линейную форму (подчиняются уравнению реакции нулевого порядка) и в первом приближении описываются линейными уравнениями с коэффициентами корреляции более 0.97 (табл. 5).

Кинетические кривые, за исключением кривых с соотношением β -LgC/НМЯ 18, описываются логарифмическими уравнениями. Для микрокапсул LgC/НМЯ с соотношениями 5.0, 44.0 и 88.0 с увеличением фракции лактоглобулинов выход ЛВ из эмульсионных микрочастиц возрастает пропорционально коэффициентам 0.223, 0.2955 и 0.381 соответственно.

3.4. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛВ ИЗ СДЛ В ФОРМЕ ЭМУЛЬСИОННЫХ МИКРОКАПСУЛ

Для оценки количества высвобожденного ЛВ из разработанных СДЛ в форме эмульсионных микрокапсул β -LgC/НМЯ-пектин была использована эмпирическая модель высвобождения ЛВ, разработанная Хопфенбергом (Hopfenberg), описывающая процесс высвобождения ЛВ по механизму эрозии полимерного слоя, при условии, что в целом релиз происходит в соответствии с уравнением реакции нулевого порядка. А также проводили оценку механизма диффузии ЛВ по уравнению Корсмейер-Ритгер-Пеппаса.

Для сферической геометрии частиц математическое уравнение записывается в виде:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_{\text{ero},0} t}{C_0 R} \right]^3 \quad (1)$$

где $k_{\text{ero},0}$ - константа скорости эрозии поверхности микрочастиц, C_0 начальная концентрация препарата внутри микрокапсул, и R - начальный радиус микрочастиц.

Механизм диффузии ЛВ по уравнению Корсмейер-Ритгер-Пеппаса :

$$M_t/M_\infty = k_1 t^n \quad (2)$$

где k_1 переменная константа, n константа характеризующая коэффициент диффузии и механизм транспорта ЛВ.

Значения параметров $k_{\text{ср}}, 0, C_0, R$ в уравнении (1) и k_1, n в уравнении (2), полученные, для скорости высвобождения РХ из широкого ряда эмульсионных микрокапсул β -LgC/НМЯ-пектина, приводятся в табл. 5.

Анализируя механизм высвобождения с использованием полученных результатов (рис. 5 и табл. 5), не принимая во внимание механизм транспорта РХ в желудке, можно сделать вывод, что десорбция РХ в условиях среды кишечника (рН 6.4) для всех изученных систем носит аномальный характер ($n > 0.68$), не подчиняющийся закону Фика.

Таким образом, разработанные системы микроносителей на основе эмульсионных микрокапсул β -LgC/НМЯ-пектина продемонстрировали кинетику высвобождения исследуемого модельного ЛВ, соответствующую уравнению реакции нулевого порядка, которая может быть использована в транспорте ЛВ с контролируемым и последующим медленным высвобождением. Лекарственные формы с непрерывным, равномерно продленным высвобождением более эффективны, чем формы с периодическим высвобождением, т.к. обеспечивают постоянную концентрацию ЛВ на терапевтическом уровне без выраженных экстремумов, не перегружают организм чрезмерно высокими концентрациями.

Таблица 5

Значения постоянных скорости высвобождения РХ из широкого ряда эмульсионных микрокапсул LgC/НМЯ-пектина, полученные из кинетических уравнений

LgC/НМЯ, моль/моль	РХ, %	Исходная конц. РХ C ₀ , мг/см ³	Радиус частиц, R, см	(tgK ₀) ^{1/3}	Kе ₀ , 10 ³ мг/см ² мин	Value of n from eq.2	
						pH 1.5	pH 6.4
88	75.28	0.419	0.00015	0.103228	6.48	0.524	0.990
44	60.56	0.334	0.00017	0.133887	7.61	0.930	1.290
18	66.04	0.287	0.00012	0.121644	4.19	0.179	0.720
10	63.43	0.320	0.00017	0.116961	6.36	0.620	0.680
5	40.76	0.219	0.0002	0.123856	5.41	0.590	0.905

ВЫВОДЫ

1. Впервые разработаны и охарактеризованы эмульсионные микрокапсулы на основе комплексобразования ряда высоко- и низкометилованных пектинов с концентратом лактоглобулинов молочной сыворотки в системе масло/вода для инкапсулирования ЛВ и ПИ.
2. Показано, что основной движущей силой для адсорбции пектиновых полисахаридов на каплях первичной эмульсии - масло/протеин является электростатическое взаимодействие между заряженными группами на биополимерах. Степень адсорбции полимера на заряженной поверхности зависит от структуры пектина и условий среды (рН и ионной силы раствора).
3. Впервые изучено взаимодействие НМ-пектинов с концентратом лактоглобулинов с образованием нерастворимых комплексов, имеющих низкий показатель эмульсионной активности. Найдены оптимальные условия получения устойчивых эмульсий с НМ-яблочным пектином с высоким процентом насыщения ЛВ путем регулирования рН, ионной силы раствора и молекулярной массы.
4. Предложен простой микроскопический метод для контроля количества и размера частиц микрокапсул с использованием компьютерной программы Motic Image Advanced 3.2. Найдены оптимальные условия получения стабильных микрокапсул с минимальным размером и максимальным количеством частиц в единице объёма, эффективно захватывающих ЛВ.
5. Показано, что среди изученных пектинов яблочные пектины являются более привлекательными для стабилизации вторичного слоя эмульсии в системе белок/пектин.
6. Изучена кинетика высвобождения РХ из эмульсионных систем в опытах *in vitro*. Рассчитаны кинетические константы модельного уравнения для сферических микрочастиц в системе с LgC/НМЯ пектином в широком интервале соотношений. Установлено, что в процессе высвобождения модельного ЛВ из эмульсионных СДЛ основную роль играют как диффузия ЛВ, так и эрозия полимерного матрикса на вторичном слое.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Шамсара О.** Микрокапсулы на основе пектина подсолнечника и концентрата белков молочной сыворотки / **О. Шамсара**, Х.И. Тешаев, З.К. Мухидинов и др. // Изв. АН РТ. Отд. физ.-мат., хим., геол. и техн. н. -2012. -№2 (147). -С. 89-95.
2. Тешаев Х.И. Взаимодействие низкометилированных пектинов с концентратом белков молочной сыворотки/ Тешаев Х.И., Усманова С.Р., **Шамсара О.** и др. // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. - 2012. -№1 (51). -С. 158-164.
3. **Шамсара О.** Формирование микрокапсул на основе высокометилированных пектинов и лактоглобулинов молочной сыворотки / **О. Шамсара**, З.К. Мухидинов, Д.Т. Бобокалонов и др. // Изв. АН РТ. Отд. физ.-мат., хим., геол. и техн. н. -2013. - №2 (151). -С.85-92.
4. Мухидинов З.К. Кинетика высвобождения пироксикама из эмульсионных микрочастиц низкометилированных пектинов и концентрата лактоглобулинов молочной сыворотки / Мухидинов З.К., Бобокалонова М.Р., Рахимов И.Ф., **Шамсара О.**, Бобокалонов Д.Т., Лиу Л.Ш. // Известия АН РТ. Отд. Физ.-мат., хим., геол. и техн. н. - 2013. -№1(150). –С. 89-98.
5. Мухидинов З.К. Эмульсионные микрокапсулы-потенциальные носители труднорастворимых лекарственных препаратов / Мухидинов З.К., Гоибова З.В., Бобокалонов Д.Т., Касымова Г.Ф., **Шамсара О.**, Усманова С.Р., Шарифова З.Б., Халиков Д.Х. // Материалы конференции «Актуальные вопросы физики и химии полимеров», посвященной 80-летию проф. И.Я. Калонтарова: Материалы 10 Нумановских чтений. - Душанбе 2013. – С. 154-174.
6. **Шамсара О.** Микрокапсулы на основе низкометилированных пектинов и концентрата белков молочной сыворотки / **О. Шамсара**, З.К. Мухидинов, Д.Т. Бобокалонов, С.Р. Усманова, Л.Ш. Лиу // ДАН РТ. -2014. -№ 1 (57). -С. 44-50.
7. Muhidinov Z.K. Microparticles coating through interfacial complexes of biopolymers in emulsion for delivery of drug and nutrients / Z.K. Muhidinov, **O. Shamsara**, J.T. Bobokalonov et al. // 12-th International Hydrocolloids Conference “Functional hydrocolloids: The key to human health”. – Taipei, Taiwan, 2014.

Сдано в печать 17.12.2014 г. Разрешено в печать 19.12.2014 г.
Формат 60x84 1/16. Гарнитура Литературная. Объем 1,5 п. л.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Тираж 100 экз.
Заказ № 03/14.

Издательство *«Истеъдод»*.
734025, г. Душанбе, проспект Рудаки, 36.
Тел.: 221-95-43. E-mail: istedod2010@mail.ru