

2015-98

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

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, профессор 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: «23» января 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Касимова 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 раствора).

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 объемно-веса среднего диаметра d_{43} . Кинетику высвобождения модельного ЛВ определяли путем измерения экстинкции растворов при 355 нм на спектрофотометре UV 1 Thermo Spectronic, UK 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.

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.

Объем и структура работы. Диссертация представляет собой рукопись, изложенную на 100 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** приводится актуальность данной диссертационной работы, обоснована его новизна, показана практическая и фундаментальная значимость выносимых на защиту результатов.

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 характеристика. Микрокапсулы получали двухстадийной процедурой: первичную эмульсию - гомогенизацией исходных растворов на высокоскоростном гомогенизаторе IKA T-25 (ULTRA TURRAX, IKA-WERKE GMBH & CO.KG, Germany). Размер частиц и количество микрокапсул в объеме 1мл эмульсии измеряли на цифровом биологическом микроскопе Motic type 102 M (Motic Instrument INC, Canada), количество частиц и их размеры определяли на микроскопе с использованием компьютерной программы Motic Image Advanced 3.2. Исследования кинетики процесса высвобождения РХ проводили в условиях моделирующих среду желудка и среду кишечника. Количество высвободившегося лекарства определяли спектрофотометрически по калибровочному графику (на спектрофотометре UV 1 Thermo Spectronic, UK) при 355 нм.

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 (М/В). В качестве ЛВ был использован нестероидный противовоспалительный препарат - широксикам (РХ).

Таблица 1

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

Весовое соотношение β - LgC/ВМЯ, г/г	Молярное соотношение β - LgC/ВМЯ	Объем 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

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 объемно-весовой средний диаметр d_{43} . Все измерения были выполнены на двух свежеприготовленных образцах, результаты представлены как средневзвешенные. Характеристика микрокапсул: стабильность эмульсионных частиц (объем эмульсии) и степень инкапсулирования ЛВ для системы β -LgC/ВМЯ приведена в таблице 1.

Данные, представленные в табл.1, указывают на то, что объемы полученных эмульсий при всех соотношениях β -LgC/ВМЯ вначале составляли 27-31 мл, на следующий день объемы 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.

Таблица 2

Характеристика микрокапсул, полученных в среде 0.1 M NaCl

Способ приготовления	Весовое соотношение β -LgC/ВМЯ, г/г	Соотношение β -LgC/ВМЯ, моль/моль	Объем эмульсии на следующий день, мл	Количество внедренного 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

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

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

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-веса диаметра (d_{43}) от соотношения биополимеров в эмульсионной системе β -LgC/ВМЯ, измеренных на второй день.

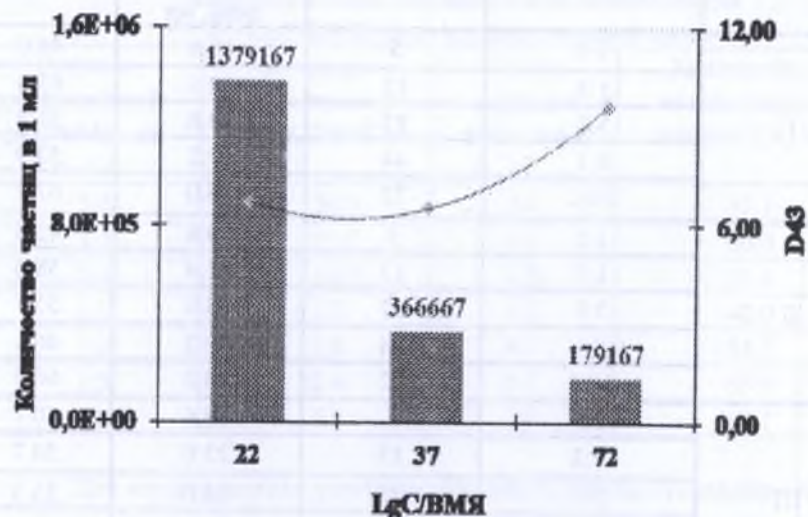


Рисунок 1 - Зависимость количества микрочастиц в 1 мл эмульсии (колонки) и их среднего объёмно-веса диаметра (d_{43} —линия) от соотношения биополимеров в эмульсионной системе β -LgC/ВМЯ.

Большее количество частиц было обнаружено в системе β -LgC/ВМЯ-пектин при молярном соотношении 22. В результате средний диаметр частиц увеличился от 6.7 мкм до 9.6 мкм, в то время как общее количество частиц в объёме 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 объёмно-веса 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

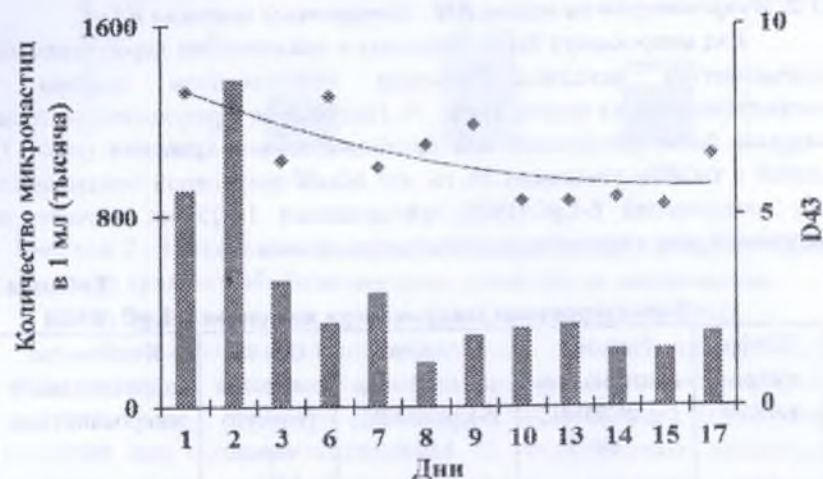


Рисунок 2 - Изменение количества частиц в 1 мл и их среднего диаметра (d_{43}) от времени хранения эмульсии с соотношением β -LgC/ВМЯ 22.

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 первого 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	Объем 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 объем эмульсии β -LgC/ВМЦ при соотношении 3:1, соответствующий 12 молям β -LgC по отношению к ВМЦ, вызвал значительное увеличение устойчивости к кремообразованию. Объем 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).

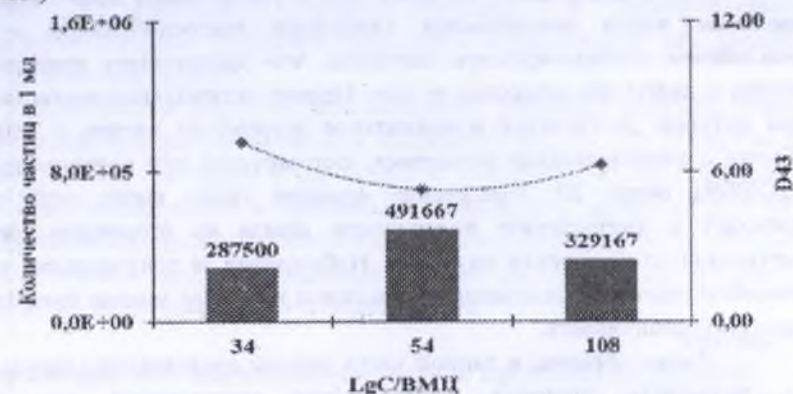


Рисунок 3 - Зависимость количества микрочастиц в 1 мл эмульсии и их среднего объёмно-весового диаметра от соотношения биополимеров в эмульсионной системе β -LgC/ВМЦ.

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 молярном 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 объема 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 объема 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 цитрусовых, 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 КОНЦЕНТРАТА 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.

Таблица 4

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

Тип пектина	Весовое соотношение биополимеров, г/г	Молярное соотношение биополимеров, моль/моль	Объемы эмульсии на второй день, мл	Содержание РХ 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

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.

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.

Таблица 5

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

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 молярном соотношении β -LgC/НМП 18.

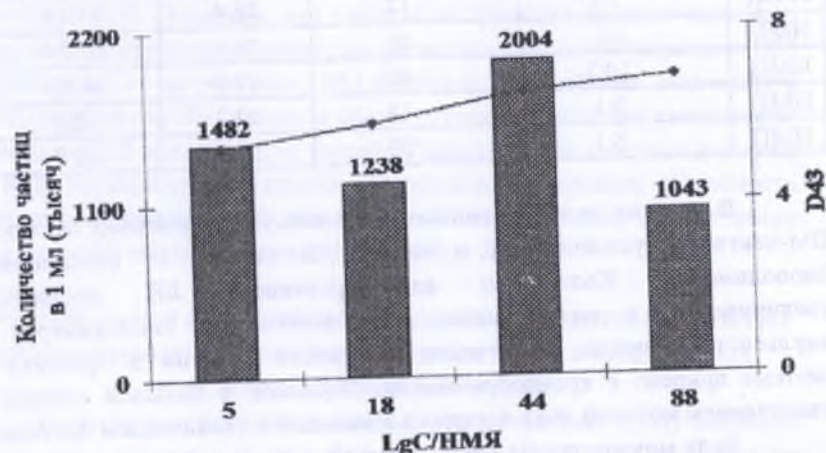


Рисунок 4 - Число частиц (N) в 1 мл (колонки) и их средний размер (D_{43}) в зависимости от соотношения β -LgC/НМЯ.

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

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.

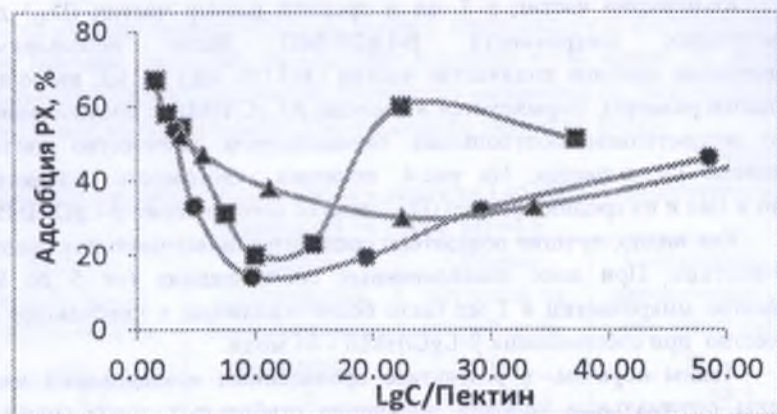


Рисунок 5 - Зависимость адсорбции модельного ЛВ (РХ) от соотношения LgC/ пектин для эмульсионных микрокапсул, полученных с различными пектинами: VM-яблочный (■); HM-подсолнечный (●); VM-цитрусовый (▲).

Как было показано ранее, цитрусовый HM-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 pH 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 pH 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/HMЯ 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/HMЯ 18.

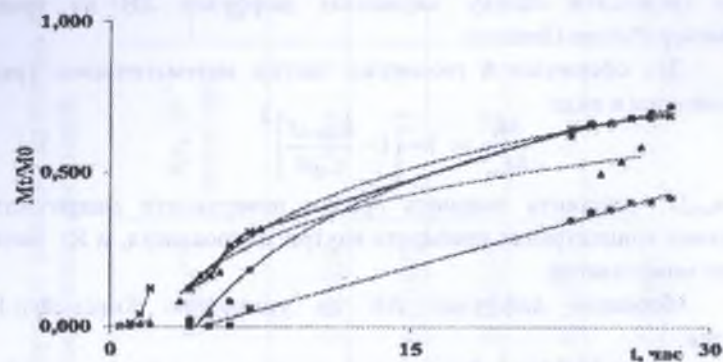


Рисунок 6 - Зависимость выхода РХ (M_t/M_0) от времени для эмульсионных микрокапсул при различных мольных соотношениях β -LgC/HMЯ: 5.0(▲); 18.0(■); 44.0(X) и 88.0(●).

Начальная стадия кривых, когда выход ЛВ незначителен, демонстрирует выход РХ в условиях, моделирующих среду желудка (pH 1.5). При переходе в среду кишечника (pH 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/HMЯ 18, описываются логарифмическими уравнениями. Для микрокапсул LgC/HMЯ с соотношениями 5.0, 44.0 и 88.0 с увеличением фракции лактоглобулинов выход ЛВ из эмульсионных микрокапсул 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/HMЯ-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 $k_{\text{ero},0}$, C_0 , R в уравнении (1) и k_1 , n 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	$(\text{tg} K_0)^{1/3}$	$K_0, 10^3$ мг/см ² мин	Значение n от уравнение 2	
						рН 1.5	рН 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