

АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ ТАДЖИКИСТАН

Институт химии имени В.И. Никитина

На правах рукописи

Шамсара Омид Мохамдали

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭМУЛЬСИОННЫХ МИКРОКАПСУЛ,
СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ КОМПЛЕКСАМИ ЛАКТОГЛОБУЛИНОВ С
РАЗЛИЧНЫМИ ПЕКТИНАМИ**

02.00.04 –физическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор

Муҳидинов З. К.

ДУШАНБЕ – 2014

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	11
1.1. <i>БИОПОЛИМЕРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ И ЛАКТОГЛОБУЛИНОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ</i>	<i>11</i>
1.1.1. <i>Пектиновые полисахариды</i>	<i>11</i>
1.1.2. <i>Лактоглобулины из молочной сыворотки, получение и характеристика</i>	<i>13</i>
1.1.3. <i>Комплексы протеин – полисахарид в гелях и на поверхности раздела фаз.....</i>	<i>14</i>
1.1.4. <i>Взаимодействие белков с пектиновыми полисахаридами.....</i>	<i>17</i>
1.1.5. <i>Взаимодействие лактоглобулинов с пектиновыми полисахаридами.....</i>	<i>20</i>
1.2. <i>ФОРМИРОВАНИЕ И СТАБИЛИЗАЦИЯ ЭМУЛЬСИОННЫХ МИКРОКАПСУЛ</i>	<i>24</i>
1.3. <i>ФОРМИРОВАНИЕ ЭМУЛЬСИОННЫХ МИКРОЧАСТИЦ В СИСТЕМЕ МАСЛО/ВОДА</i>	<i>26</i>
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	31
2.1. <i>ХАРАКТЕРИСТИКА ИСХОДНЫХ ВЕЩЕСТВ.....</i>	<i>31</i>
2.2. <i>МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ, ОЧИСТКИ И АНАЛИЗА ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ</i>	<i>31</i>
2.2.1. <i>Выделение пектина из растительного сырья.....</i>	<i>31</i>
2.2.2. <i>Очистка пектиновых веществ</i>	<i>32</i>
2.3. <i>КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ</i>	<i>32</i>
2.3.1. <i>Модифицированный титриметрический метод</i>	<i>32</i>
2.3.2. <i>Фотометрическое определение метоксильных групп</i>	<i>33</i>
2.3.3. <i>Определение уроновых кислот мета-гидрокси дифенильным методом</i>	<i>34</i>
2.3.4. <i>Определение молекулярного веса пектина</i>	<i>35</i>
2.4. <i>ВЫДЕЛЕНИЕ В-ЛАКТОГЛОБУЛИНА ИЗ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ И МЕТОДЫ АНАЛИЗА...36</i>	<i>36</i>
2.4.1. <i>Определение белка методом Седмака.....</i>	<i>37</i>
2.4.2. <i>Определение белков методом капиллярного электрофореза</i>	<i>38</i>
2.4.3. <i>Разделение белков молочной сыворотки методом гель-электрофореза.....</i>	<i>39</i>
2.5. <i>ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСХОДНЫХ РАСТВОРОВ</i>	<i>39</i>
2.5.1. <i>Приготовление раствора пектинов.....</i>	<i>39</i>

2.5.2. Приготовление раствора концентрата сывороточных белков (LgC)	40
2.5.3. Приготовление буферных растворов	40
2.6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ МИКРОКАПСУЛ В ЭМУЛЬСИОННОЙ СИСТЕМЕ МАСЛО В ВОДЕ (М/В).....	40
2.6.1. Оценка стабильности эмульсии.....	41
2.7. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ МОДЕЛЬНОГО ЛВ ИЗ СДЛ В ОПЫТАХ IN VITRO.....	42
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	43
3.1. ФОРМИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОКАПСУЛ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ ВЫСОКОМЕТИЛИРОВАННЫХ (ВМ) ПЕКТИНОВ И КОНЦЕНТРАТА БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ.....	43
3.1.1. Микрокапсулы на основе ВМ- яблочного пектина и LgC.....	43
3.1.2. Микрокапсулы на основе ВМ- цитрусового пектина и LgC.....	52
3.2. ФОРМИРОВАНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОКАПСУЛ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ НИЗКОМЕТИЛИРОВАННЫХ (НМ) ПЕКТИНОВ И КОНЦЕНТРАТА БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ.....	56
3.3. ПОЛУЧЕНИЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ЭМУЛЬСИОННЫХ МИКРОКАПСУЛ LgC/ПЕКТИН.....	66
3.4. КИНЕТИКА ВЫХОДА ПИРОКСИКАМА ИЗ ЭМУЛЬСИОННЫХ МИКРОКАПСУЛ НА ОСНОВЕ КОНЦЕНТРАТА ЛАКТОГЛОБУЛИНОВ И ЯБЛОЧНОГО ПЕКТИНА В ОПЫТАХ IN VITRO	72
3.5. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛВ ИЗ СДЛ В ФОРМЕ ЭМУЛЬСИОННЫХ МИКРОКАПСУЛ.....	75
ВЫВОДЫ.....	81
ЛИТЕРАТУРА.....	83

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВМ - высокометилированный;

ВМЦ - ВМ цитрусовый;

ВМП - ВМ подсолнечный;

ВМЯ - ВМ яблочный;

ГК - галактуроновая кислота;

КЭ - капиллярный электрофорез;

КБМС - концентрат белков молочной сыворотки;

ЛВ - лекарственные вещества;

ЛФ - лекарственная форма;

МС - молочная сыворотка;

МЭКХ - мицеллярная электрокинетическая хроматография;

M_w - молекулярный вес;

НМ - низкометилированный;

НМЦ - НМ цитрусовый;

НМП - НМ подсолнечный;

НМЯ - НМ-яблочный;

ПП - пектиновые полисахариды;

РХ - пироксикам;

СДЛ - система доставки лекарств;

СЭ - степень этерификации;

pK_a - кажущаяся константа ионизации;

pH_c - pH образования комплекса;

pH_ϕ - pH фазового разделения;

ЭЖХ - эксклюзионная жидкостная хроматография;

LgC - концентрат лактоглобулинов.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Создание супермолекулярных структур нанометровых размеров является одной из важнейших задач современной физической химии биополимеров. Известно, что полимерные полиэлектролиты способны формировать самоорганизующиеся наноструктуры за счет наличия в их цепи гидрофобных и гидрофильных фрагментов. Варьируя химическое строение макромолекул, природу и распределение функциональных групп, путём изменения условий внешней среды (рН, ионная сила, температура и др.) удастся эффективно управлять процессом молекулярной сборки, добиваясь получения сложных регулярных микро - и наноструктур различного строения. Эти знания могут быть успешно использованы при создании биосовместимых и функциональных материалов обладающих полезными свойствами.

Микро - и наноэмульсионное инкапсулирование - интенсивно развивающаяся область нанотехнологии, связанная с получением монодисперсных нанокапсул биологически активных веществ. Использование биоразлагаемых полимеров: глобулярных белков и ПП для получения оболочки микро- и нанокапсул, обеспечивает контролируемую по времени и локализации доставку активных веществ. Вместе с тем, многие вопросы микроэмульсионного капсулирования 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 (М/В), достижением агрегативной 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.

Целью данной работы является разработка комплексного подхода к получению высокоустойчивых концентрированных эмульсионных микрокапсул, стабилизированных комплексами лактоглобулина с высоко - (ВМ-) и низкометилированными (НМ-) пектинами различного происхождения, изучение их устойчивости, адсорбционных и десорбционных свойства 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 способности 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 кишечника.

Научная новизна

- Показана возможность регулирования коллоидно-химических свойств межфазных адсорбционных слоев комплексов лактоглобулинов изолированных из молочной сыворотки (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 LgC с различными пектинами, в которых наблюдается высокая устойчивость эмульсионных микрокапсул к коалесценции и агрегации, а также максимальный захват и высвобождение ЛВ в условиях моделирующих кишечника.
- Установлено, что основной движущей силой для адсорбции ПП на каплях первичной эмульсии - масло/протеин является электростатическое взаимодействие между заряженными группами биополимеров. Показано, что 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).
- Получены устойчивые эмульсионные микрокапсулы с ВМ-пектинами. Показано, что увеличение фракции белка в системе с яблочным ВМ-пектином не влияет на количество инкапсулированного ЛВ по сравнению с цитрусовым ВМ-пектином.
- Впервые изучено взаимодействие НМ - пектинов с LgC с образованием нерастворимых комплексов, имеющие низкий показатель эмульсионной активности. Найдены оптимальные условия получения устойчивых

эмульсий с высоким процентом насыщения ЛВ путем регулирования ионной силы и молекулярной массы для НМЯ-пектина.

- Показано, что получение стабильной эмульсии с высокой степенью инкапсулирования ЛВ, зависит от типа пектина, плотности заряда, молекулярной массы, условий среды (рН и ионной силы раствора), соотношения биополимеров и их агрегирующей способности.
- 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 ЛВ из эмульсионных СДЛ основную роль играют как диффузия ЛВ, так и эрозия полимерного матрикса на вторичном слое.

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 для контроля количества и размера частиц микрокапсул с использованием компьютерной программы Motic Image Advanced 3.2. Найдены оптимальные условия получения стабильных микрокапсул в эмульсионной системе М/В при различных соотношениях LgC/пектин, с минимальными размерами и максимальным количеством частиц в единице объёма, эффективно захватывающие ЛВ.

Разработаны новые системы - эмульсионные микроносители ЛВ в виде микрочастиц способные высвобождать ЛВ по механизму 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.

Достоверность полученных результатов работы обеспечена использованием современного оборудования с программным обеспечением и статистическим анализом при проведении экспериментов, согласованностью выводов, полученных различными методами исследования, между собой и с положениями физической химии.

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

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

Вклад автора состоит в подготовке и проведении эксперимента, обработке экспериментальных данных и анализе полученных результатов, подготовка научных статей.

Основные положения, выносимые на защиту

- Способ получения устойчивых эмульсионных микрокапсул на основе яблочных пектинов, обладающих высокой емкостью по отношению

модельного ЛВ – пироксикама и способных высвободить ЛВ в условиях моделирующих кишечник по кинетике реакции нулевого порядка.

- Метод оценки устойчивости микрокапсул: размер и максимальное количество частиц в единице объёма с использованием компьютерной программы Motic Image Advanced 3.2.
- Данные по взаимодействию НМ - пектинов с LgC; механизмы удержания модельного лекарства – пироксикама и условия высвобождения его из эмульсионных микрокапсул в условиях моделирующих ЖКТ.
- Кинетические параметры высвобождения РХ из эмульсионных систем LgC/НМЯ пектин в опытах *in vitro* с применением модельного уравнения для сферических микрочастиц.

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, объемом 99 страницы, состоит из введения и 3 глав, посвященных обзору литературы, экспериментальной части, результатам исследований и их обсуждению, выводам. Иллюстрирована 17 рисунками, 8 таблицами и 1 схемой. Список использованной литературы включает 166 наименований.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. *БИОПОЛИМЕРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ И ЛАКТОГЛОБУЛИНОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ*

Полисахарид-протеиновые комплексы входят в состав биологических систем (т.е. в организации живых клеток), пищевых и фармацевтических продуктов нового поколения, они образуют основу для получения функциональной пищи [1-5]. Поэтому, понимание механизмов, вовлечённых в данную систему, откроет путь к созданию весьма полезных продуктов для человечества.

Основная задача, возникающая при производстве таких продуктов, заключается в разработке путей получения комплексов (однофазных и двухфазных) с заданным и регулируемым составом, структурой, механическими и другими физико-химическими свойствами. Полисахариды и белки, как основные биополимеры клеточной стенки растений, согласно современным представлениям, участвуют в обеспечении узнавания и взаимодействия клеток, рецепторных свойств, защиты от инфекций.

В настоящее время достигнуты большие и принципиально важные успехи, особенно в выяснении основных черт химического строения, физико-химических свойств и биологической активности этих биополимеров. Тем не менее, ещё многие вопросы предстоит решить для того, чтобы осознанно и целенаправленно использовать этот обширный класс природных соединений как многофункциональную пищу для нужд человечества [1–20].

1.1.1. *Пектиновые полисахариды*

III самые сложные по структуре и формированию биополимеры клеточной стенки растений, включающие различные полимерные цепи из гомогалактуронана (HG), рамногалактуронана 1 (RG I), рамногалактуронана 2 (RG II),

арабиногалактанов (AG), арабинана (AR) и ряда других полисахаридов, связанных между собой и с другими полимерами клеточных стенок растений [21–27]. Они играют важную роль в росте и развитии растений, морфогенезе, защите и адгезии клеток, связывании ионов, гидратации и развитии плода [22,23]. В то же время, вне клетки после их выделения, они незаменимы в жизнедеятельности человека. ПП можно представить в виде щеток, включающих коллекцию многообразных стилей, образованных из ворсинок, вовлеченных в формирование средней пластики клеточных стенок растений [24]. Природная разновидность этих стилей создает многообразие структур и свойств полисахаридов после их экстракции из растений. До недавнего времени было принято, что HG и RG цепи составляют основную цепь ПП (рис. 1А). Однако была затем предложена альтернативная структура ПП, в которой HG представлена как длинная боковая цепь RGI (рис. 1В) [24] и [29].

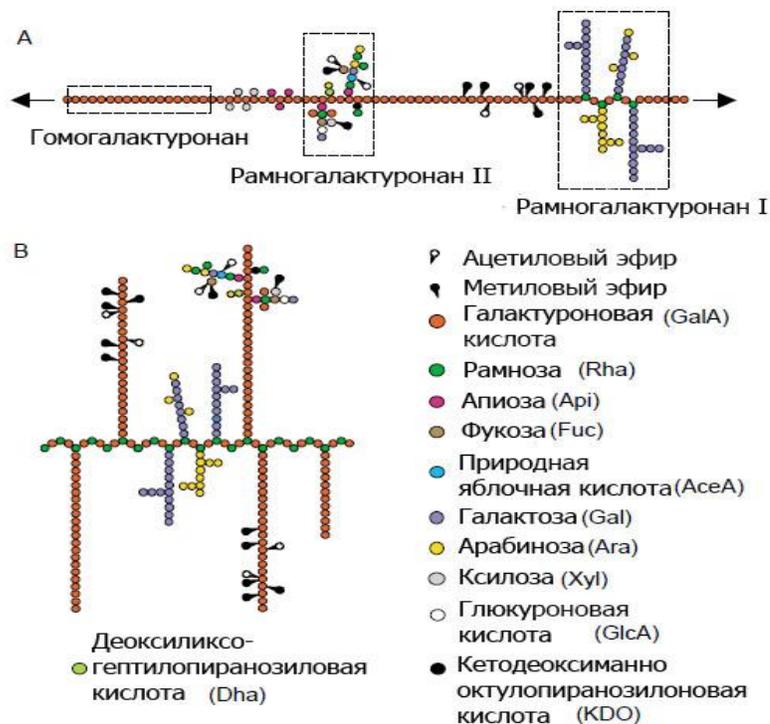


Рисунок 1 - Предполагаемая (А) схематическая структура пектиновых полисахаридов, связанных между собой: гомогалактуронан (HG), рамногалактуронан I (RG-I), рамногалактуронан II (RG-II) и альтернативная (В), предложенная авторами.

Недавние исследования с использованием высокочувствительных изображений на уровне атома, атомно-силовой микроскопии [25–27] показали, что экстрагированные ПП в растворе находятся в виде агрегированных молекул даже в разбавленных растворах. В некоторых источниках они находятся в пектин-протеиновых комплексах, что уменьшает степень их агрегации [27].

Основными источниками получения пектина являются фруктовые выжимки, корзинки подсолнечника и свекловичный жом. Наибольшее количество пектина находится в кожуре, ламелях и сердцевине фруктов. Пектиновые вещества, полученные из различных растительных источников, отличаются по структуре, молекулярной массе и молекулярно-массовым распределением [28–31].

Пектины, биополимеры из возобновляемых источников растительного сырья, являются основой для создания носителей лекарственных веществ, так как они устойчивы к действию ферментов верхней части желудочно-кишечного тракта и, попадая в толстую кишку, специфически распадаются на полезные для микрофлоры вещества – короткоцепные жирные кислоты [20].

1.1.2. Лактоглобулины из молочной сыворотки, получение и характеристика

Главными белками коровьего молока являются α -, β -, и κ -казеины, β - и α -лактоальбумины, сывороточный альбумин, тяжелые- и легкие фракции иммуноглобулины (Ig). Сывороточные белки содержат β -Lg, α -Lg, иммуноглобулины, альбумин, лактоферрин, лактопероксидазу, лизоцим, и только в подсырной сыворотке – гликомакропептид [32–34]. В кисломолочных продуктах (йогурт, йогурт пробиотик и др.) и детского питания, концентрат лактоглобулинов используется как структурирующая добавка. β -лактоглобулины обладают свойством образовывать комплексы и гели с другими биополимерами, что является превосходным качеством при их использовании. α -Lg применяется как добавка к детскому питанию [35]. β -лактоглобулин коровьего молока представляет собой небольшую молекулу из 162 аминокислотных остатков с

молекулярным весом 18,4 КД. В физиологических условиях он преимущественно находится в виде димера, но диссоциирует при снижении рН ниже 3, и в этих условиях остается довольно стабильным [36].

Существуют различные методы выделения β -Lg с применением ионообменной хроматографии [37,38] и ультрафильтрации [33,39]. Для характеристики компонентного состава концентрата лактоглобулинов, выделяемых этими методами, в последнее время широко используется метод капиллярного электрофореза [40].

В нашей лаборатории разработан селективный метод выделения лактоглобулинов из концентрата молочной сыворотки (МС) Душанбинского молочного комбината «Саодат» с применением ультрафильтрации [41]. Этим методом можно отделить казеин и альбумины МС от лактоглобулинов. Метод включает следующие стадии: подкисление сыворотки до рН=4.0, центрифугирование, ультрафильтрацию горячей сыворотки на мембране PS/50 (Spectrum Lab. США) или УПМ-П (Владипор, Россия). Концентрат лактоглобулина (LgC), выделенного из молочной сыворотки по этой методике [41], содержал: 37.35 % β -LgA, 52,9 % β -LgB и 9.7 % α -LgA (обозначенный как LgC).

1.1.3. Комплексы протеин – полисахарид в гелях и на поверхности раздела фаз

При переходе в гелеобразное состояние, в потоке частиц дисперсной фазы, образуются белковые микроволокна. В зависимости от объемной доли дисперсной фазы можно получать как короткие волокна, так и волокна бесконечной длины. В последнем случае гелеобразованию предшествует коалесценция деформированных дисперсных частиц. Такой процесс назван «безфильерным прядением» [42]. При невысоких степенях деформации могут быть получены гранулированные продукты с различной степенью анизодиаметрии (т.е. отклонение формы частиц от сферической) гранул.

Если в гелеобразное состояние в потоке переходит дисперсионная среда, то возникают гели, наполненные жидкими цилиндрами, ориентированными в направлении потока, так называемые «гели капиллярной структуры». Прочность таких гелей в поперечном направлении ориентации капилляров намного выше, чем в продольном, причем степень анизотропии прочности возрастает с увеличением скорости сдвига [43]. При высоких степенях наполнения непрерывная фаза представляет собой профилированные волокна. Наконец, возможен переход обеих фаз деформированной двухфазной жидкой системы в гелеобразное состояние. Таким путем получают анизотропные по механическим свойствам гели, наполненные волокнами, ориентированными в направлении деформации.

Особое внимание уделяется способности биополимеров или их комплексов к эмульгированию и стабилизации пищевых продуктах [44-53]. Белки, полисахариды и их комплексы в этом аспекте с успехом могут заменить многие синтетические полимеры в современных, изысканных продуктах. Белки являются природными полимерными поверхностно-активными веществами. Полисахариды, часто их называют гидроколлоидами, повышают вязкость среды, образуют гели и играют важную роль в стабилизации пищевых и фармацевтических продуктов. При этом протеин-полисахаридные композиты находят применение в формировании и производстве современных пищевых и фармацевтических продуктов [44–50].

Как утверждает Дикенсон [3,7,51], лучший способ адсорбировать гидроколлоид на межповерхности фаз - связать их с белками. Белки являются поверхностно-активными веществами, состоящими из гибких гидрофобных и гидрофильных остатков, преимущественно адсорбирующихся на межповерхности и могут замещать гидроколлоид на поверхности раздела фаз. Гидроколлоиды, чаще термодинамически несовместимые с адсорбированным белком [52-55], могут быть распределены на границе, при условии если они взаимодействуют с

белком на поверхности. Их распределение на границе будет зависеть и от характера взаимодействий. Сильные химические связи между ними приводят к иному распределению на поверхности.

Ряд патентов [56,57] посвящен комплексообразованию протеина с полисахаридами для стабилизации эмульсии. Запатентован процесс получения нерастворимых комплексов желатин-алгината и желатин-алгинат-диметилцеллюлозой при рН выше изоэлектрической точки желатина (4.7) для стабилизации эмульсии [56]. Показано [57], что растворимые комплексы сывороточных белков и карбоксиметилцеллюлозы также могут стабилизировать эмульсию.

Толстогузов с соавторами [58] изучали поверхностную активность бычьего сывороточного альбумина (БСА) с декстраном при стабилизации эмульсии н-декан/вода, путем оценки объемов сосуществующих фаз, полученных после разделения центрифугированием (50 мин при 23 000g). Полное разделение фаз наблюдалось в эмульсии, приготовленной с 0.2 мас % БСА. В комплексах БСА-декстран (рН 6.0, концентрация биополимера 0.3 мас %), лишь 40 % декана отделялось центрифугированием. Так как эмульгирующие свойства комплексов сильно зависели от рН и ионной силы среды, авторы пришли к выводу, что процесс стабилизации эмульсии электростатический. Даже когда оба биополимера имели отрицательный заряд при рН 7.0 (соотношение БСА/декстран сульфата, 1:3 по весу), образовывались растворимые комплексы с участием локальных электростатических взаимодействий анионного полимера с высоким зарядом и положительно заряженных участков глобулярных белков. Вязко-эластичные измерения, также подтвердили образование комплекса БСА и декстран сульфата на поверхности раздела фаз.

Аналогичный синергетический эффект комплекса протеин-полисахарид при стабилизации эмульсии, был продемонстрирован в системе эмульсии м/в с комплексом казеина и кислым полисахаридом [59]. Комплексы, образованные с

участием ковалентных связей, также проявляли способность к стабилизации эмульсии [60]. Эмульсии олеиновая кислота/вода, приготовленные с конъюгатом из ковалентно связанных В-Lg и карбоксиметил декстрана сохраняли стабильную эмульсию при нагревании до 80 °С. Большое внимание, в последнее время, отводится влиянию высокого давления на способность глобулярных белков стабилизировать эмульсии [52,61–67]. Внутримолекулярные гидрофобные и электростатические взаимодействия глобулярных белков с третичной и четвертичной структурой нарушаются при высоком давлении, что является важным с практической точки зрения. Как и при тепловой денатурации, молекулярные изменения могут приводить к агрегации и гелеобразованию белков при соответствующих условиях. Было исследовано действие высокого давления на различные полисахариды и только в пектинах обнаружены значительные изменения реологических и физико-химических свойств [52,68–70].

1.1.4. Взаимодействие белков с пектиновыми полисахаридами

Между протеинами и анионными полисахаридами существует взаимное притяжение, если данные компоненты являются энергетически совместимыми. Протеины, взаимодействующие с пектинами, могут разделяться на два класса, характеризующиеся «специфичными» и «неспецифичными» участками связывания. Данные комплексы или коацерваты, применяются во многих областях пищевой и фармацевтической промышленности, включая заменители жиров, концентрирование белков, микроинкапсулирование ЛВ и иммобилизацию энзимов [1,44,55,71–75].

Природа протеин-полисахаридных комплексов находится под действием энтропийных факторов, таких как структура и молекулярный вес биополимеров и энтальпийных факторов, которые регулируются соотношением протеин/полисахарид, природой и плотностью зарядов на биополимерах. рН и ионная сила также существенно влияют на электростатическое взаимодействие

[76]. В работе [77] отмечается, что комплексы β -Lg с пектином обладают медленной кинетикой связывания, что подтверждает существование двухстадийного процесса комплексообразования - перехода от молекулярного в агрегированное состояние. Первая стадия соответствует образованию растворимых комплексов – интраполимеров между молекулами. Вторая, включает агрегирование - интраполимерных комплексов с образованием нерастворимых комплексов - межполимеров (теория Тайнака) [77,78].

Ряд работ посвящены изучению взаимодействия пектина с белками [75,79–84]. Семенова с соавторами [82] показали, что при взаимодействии глобулярных протеинов с полисахаридами, обладающими различной конформацией, величины поперечных вторых вириальных коэффициентов (A_{23}) могут быть близкими. В случае с пектином и глобулином обнаружена большая разница между теоретическими и экспериментальными значениями A_{23} , указывающая на то, что данная область, занятая молекулами пектина, является абсолютно неприемлемой для глобулярного протеина в водной среде. Однако молекулы пектина могут иметь конформацию от упругого клубка до жесткого цилиндра, в зависимости от степени этерификации карбоксильных групп (СЭ), ионизации карбоксильных групп и разветвления цепи [84].

Взаимодействие между полисахаридами и белками влияет на стабильность и структуру продуктов [85]. К примеру, кислые молочные напитки стабилизированные пектинами, предотвращают самоосаждение белка при хранении продуктов [86–88]. Эмульсионные системы могут быть стабилизированы [4,16] или дестабилизированы [89] путем добавления полисахаридов. Стабильность пены может быть контролируема влиянием полисахарид-белковых взаимодействий [8,90,91].

В системе белок-полисахарид, как правило, полисахарид несет отрицательный заряд, а заряд белка изменяется в зависимости от рН раствора. Макромолекулы со-растворимы, когда обе отрицательно заряжены [75,92–94].

Растворимые комплексы образуются, когда белок связывается с полисахаридом, образуя комплекс, на котором заряд имеет тот же знак, как и на полисахариде. Растворимый комплекс стабилизируется электростатическим отталкиванием [8,95]. Это может произойти уже в щелочной области ИЭТ белка, благодаря положительно заряженным областям белковой макромолекулы [93], либо путём регулирования заряда в системе белок – полисахарид [96]. Разделение фаз происходит, когда заряд на комплексе белок- полисахарид нейтрален.

Отсутствие электростатического отталкивания между комплексами позволяет им агрегировать в результате макроскопического разделения фаз [92,93,96,97]. pH_c является определяющей границей между биополимерами и их комплексами в растворимом состоянии. Начало образования комплекса контролируется взаимодействием одной молекулы белка и одной последовательностью полимерных сегментов и, следовательно, независимо от соотношении белка и полисахарида [92,98]. С увеличением ионной силы раствора pH_c смещается в сторону меньших значений pH , в связи с экранированием электростатического притяжения [92,94,99,100]. Для некоторых комбинаций белка и полиэлектролита, с повышением ионной силы раствора pH_c также может проходить через максимум, в зависимости от баланса между силами притяжения и отталкивания [99]. pH_f является переходной границей между растворимым и нерастворимым комплексом, при котором происходит разделение фаз, и зависит от соотношения белка и полисахарида и ионной силы раствора [92,101,102]. Разделение фаз связано с нейтрализацией заряда на поверхности белок - полисахаридный комплекс, это означает, что изменение соотношения белка и полисахарида влияет на значение pH_f : когда ионная сила раствора увеличивается, pH_f уменьшается [92,94,102]. Изучению белково-полисахаридных конъюгатов, полученных реакцией Майяра, на основе перегруппировки Амадори, посвящены много исследований [103–105].

В тоже время, продукты реакции Майяра, как было показано в работах [104,105], подавляют процесс окисления в различных продуктах питания, однако антиоксидантную активность, в основном, проявляли модельные системы: аминокислота-сахар и редко белок-сахарные системы. В этом плане необходимы дальнейшие исследования по созданию таких конъюгатов, которые способны проявлять антиоксидантную активность для образования барьера, препятствующего проникновению окислителей и других соединений, ухудшающих химическую стабильность функциональных компонентов пищи.

Доказательство в поддержку о значительном различии в межфазной структуре, созданной двумя процессами адсорбции, было получено спектроскопическим и рефлективным методами [106].

Таким образом, принимая во внимание гидродинамическое поведение различных пектиновых макромолекул, можно создать условия для взаимодействия с глобулярными протеинами, путем регулирования электростатических сил, включая рН и ионную силу раствора.

1.1.5. Взаимодействие лактоглобулинов с пектиновыми полисахаридами

Тургеон, с соавторами [76], использовали метод потенциометрического титрования для изучения процесса образования растворимых комплексов с различным соотношением β -лактоглобулина (В-Lg) с НМ- и ВМ-пектинами. Полученные комплексы титровали 0,01н соляной кислотой в интервале рН 4.5 - 7. Природу связи определили взаимодействием на комплексы хлорида натрия и мочевины при разных температурах. Степень превращения комплекса определили фильтрацией смеси растворов В-Lg с пектинами через мембрану, пропускающей вещества с молекулярной массой 10 KDa. Мембраны с соответствующим размером пор использовались для извлечения несвязанного белка в растворе. Результат проводимых исследований показал, что количество связанного В-Lg было больше в смеси с НМ-пектином, чем с ВМ-пектином. В результате при рН

4,5 в дистиллированной воде при соотношении В-Lg /пектин 4:1 были получены 96 % комплекса β -Lg/НМП и 78 % комплекс В-Lg/ВМП.

Было показано [76,80], что комплексообразование β -Lg с НМ- и ВМ-пектинами при рН 4,0 в растворе 5мМ фосфата натрия происходит согласно теории Тайнаки в две стадии. На первой стадии на одну молекулу НМ-пектина приходится восемь молекул β -Lg, а на одну молекулу ВМ-пектина 6 β -Lg, во втором процессе стехиометрия комплексов равнялась 16 и 15 β -Lg на молекулу пектина соответственно. На первой стадии образуются растворимые интраполимерные комплексы, а на второй - интраполимерные комплексы агрегируют с образованием интерполимерных комплексов. Количество β -Lg (18 КД), связанное с каждой молекулой пектина (94.3 КД) при рН 4.0, весьма высокое относительно соотношения молекулярных массы данных биополимеров. При тех же условиях, методом капиллярного электрофореза, те же авторы [80] выявили, что при образовании интерполимерных комплексов стехиометрия соответствует 21 и 13 молекул β -Lg на одну макромолекулу НМ- и ВМ пектинов соответственно. Это несоответствие авторы объясняют поляризующим эффектом электрического поля при использовании метода КЭ в изучении процесса комплексообразования между β -Lg и пектином [80], который способствовал диссоциации комплексов и позволил снизить, до некоторой степени, вклад водородных связей в комплексе.

С применением метода ультрафильтрации, с использованием дестабилизирующих агентов, авторы [76] показали, что взаимодействие между β -Lg и пектином происходит посредством ионных и водородных связей, поскольку гидрофобные взаимодействия были несущественными.

Определение количественных параметров связывания в системе биополимеров представляет трудную задачу из-за их одинаковых полиэлектролитических свойств. Согласно литературным данным, анионные полисахариды, как пектинаты, альгинаты и карбоксиметиллюлоза, могут

группироваться с полужесткими цепями биополимеров, которые формируют водонепроницаемый случайный (статистический) клубок (биополимера) в водной среде со значениями сегмента $K_{hup} \sim 150 \text{ \AA}$ [90], $\sim 335 \text{ \AA}$ [85] и $\sim 340 \text{ \AA}$ [81]. Глобулярные протеины представлены в водной среде в форме твердых шаров [82]. Средний гидродинамический радиус для β -Lg мономера около 28 \AA и для димера 34 \AA , были найдены при помощи динамического светового рассеяния [83]. Поскольку для мономера, димера и тримера альбумина средний гидродинамический радиус составлял 43 \AA , молекулы альбумина представляли большие супер молекулярные агрегаты с средним радиусом 1309 \AA .

Показано [80], что измерения термодинамических параметров, таких как, константа связывания, энтальпия, энтропия и стехиометрия связывания необходимы для представления точной оценки условий связывания между пектинами и β -Lg. В связи с этим, было проведено несколько количественных исследований взаимодействия β -Lg с пектинами.

В исследованиях посвященных формированию комплексов β -лактоглобулина с пектинами показано [85–110], что суммарный заряд на пектиновых цепочках меняется в зависимости от СЭ и распределения метилированных карбоксильных групп. Распределение метоксильных групп в пектинах может быть блочным (БР) или хаотичным (ХР). Варьирование плотности локального заряда в пектиновых цепях, что не удается для синтетических полимеров, имеет ключевое значение в образовании комплекса между противоположно заряженными полимерами.

ПП выделяют из растительных материалов кислотной экстракцией. Полученные таким методом ПП имеют структуру, в которой преобладают α 1,4-связанные остатки D-галактуроновой кислоты [111]. ПП характеризуются, кроме содержания ГК, ещё двумя параметрами: степенью метил-этерификации (СЭ) карбоксильных групп и распределением метоксильных групп по цепи ПП. Распределение метильных эфиров может быть блочным (БР) и исследуется

гидролизом пектина с эндополигалактуроназой из *Kluyveromyces fragiles* [112]. Высокое значение БР означает, что метоксильные группы распределены по блокам в цепи ПП, низкое значение означает случайное распределение (СР).

НМ-пектины - полимеры с высоким суммарным зарядом и высокой плотностью локального заряда. ВМ-пектины как ВМБР и ВМСР имеют слабый суммарный заряд и обладают высокими и низкими плотностями локального заряда цепи, соответственно.

Глан и Ролин [113] обнаружили, что кальций чувствительный ВМ-пектин (пектин, который образует гель в присутствии ионов кальция, имеет высокую степень БР), способен стабилизировать кисло-молочные напитки, в то время как аналогичный ВМ-пектин с СР метоксильными группами не имеет способности их стабилизировать.

В работе [114], методами динамического рассеяния света (DLS) и потенциометрическим титрованием определены pH_C (рН, при котором образуются растворимые комплексы β -Lg с пектином) и pH_f (рН, при которой происходит разделение фаз) в зависимости от ионной силы раствора. Показано, что pH_C уменьшается с увеличением ионной силы раствора для всех пектинов. Этот параметр был использован в теоретической модели, в которой показано, что значение плотности локального заряда пектина играет важное значение для контроля процесса образования комплекса. При увеличении ионной силы раствора, для НМ-пектина, величина pH_f проходит через максимум из-за экранирования одинаково заряженных групп между молекулами β -Lg, связанных с НМ-пектином, в то время как электростатические взаимодействия между биополимерами были подавлены при более высокой ионной силе.

Потенциометрическое титрование в изученных гомо-молекулярных растворах биополимеров и их смесях позволяет регулировать заряд в комплексах β -Lg с пектинами: в интервале рН 5.5-5.0 (pK_a) функциональные группы β -Lg

ионизируются и появляются положительно заряженные молекулы β -Lg; при pH 4.5-3.5, близкие к значениям pKa карбоксильных групп пектина, формируется отрицательный заряд на цепи пектина.

Пектины с высокой плотностью заряда образуют комплексы с β -Lg при более высокой ионной силе раствора, чем пектины с низкой плотностью локального заряда. Такой пектин предпочтителен в пищевых системах, где желательно образование электростатического комплекса между белком и пектином [114].

Таким образом, на основе анализа приведенных данных можно констатировать, что характер взаимодействия биополимеров в растворах в основном вызван электростатическими силами и в меньшей степени водородными связями. Взаимодействие белков с пектинами можно разделить на два класса характеризующиеся «специфичными» и «неспецифичными» участками связывания. Исследование взаимодействия пектинов с β -Lg дает представление о механизме, в основе которого лежит стабилизирующее действие ПП, так как они являются одними из основных функциональных ингредиентов многих пищевых систем, состоящих из пены и эмульсии.

1.2. ФОРМИРОВАНИЕ И СТАБИЛИЗАЦИЯ ЭМУЛЬСИОННЫХ МИКРОКАПСУЛ

Традиционные эмульсии масло в воде (М/В) относятся к термодинамически нестабильным системам, для их получения необходимо внесение в систему дополнительной энергии [115,116]. Для стабилизации эмульсий используются поверхностно-активные вещества, полимерные молекулы, твердые частицы, которые, адсорбируясь на границе раздела фаз либо снижают межфазное натяжение, либо создают структурно-механический барьер [18-20,115], препятствующий коалесценции капель внутренней фазы. Такие эмульсии могут быть кинетически стабильными, в них протекают относительно медленные

процессы уменьшающие межфазную поверхность. В некоторых случаях устойчивость таких эмульсий может составлять несколько лет.

Процессами, протекающими в эмульсиях и приводящими к их расслаиванию на составляющие фазы, являются: коагуляция или флокуляция, седиментация, оствальдово созревание, коалесценция.

Создание высококонцентрированных эмульсионных систем, необходимых для производства на их основе разнообразных пищевых продуктов, одна из актуальных проблем современной коллоидной химии. Обычно для стабилизации таких эмульсий используются высокомолекулярные ПАВ - белки, в том числе альбумины, причем, достаточно часто, они применяются в смеси с низкомолекулярными ПАВ.

В ряду показателей характерных и важных для высококонцентрированных эмульсий, является их устойчивость и реологические свойства, которые определяют не только технологические параметры процессов, связанные с получением, хранением, транспортировкой и применением эмульсий, но и качество эмульсионных продуктов.

Микроэмульсионное инкапсулирование это совокупность ряда межфазных явлений, связанных с микроэмульгированием биоактивных веществ, адсорбцией и образованием межфазных слоев полимеров на границе раздела фаз жидкость/жидкость, агрегативной устойчивостью полученных нанокапсул [1-4,6-15,44,116-118].

Микроэмульсионное инкапсулирование - интенсивно развивающаяся область нанотехнологии, связанная с получением монодисперсных нанокапсул биологически активных веществ. Использование биodeградируемых полимеров для получения оболочки нанокапсул, обеспечивает контролируемую по времени и локализации доставку активных веществ [2-4,15,117,118]. Вместе с тем, до настоящего времени, многие вопросы, связанные с микроэмульсионным инкапсулированием остаются нераскрытыми.

Таким образом, для получения высокостабильных концентрированных эмульсий с высокой удельной межфазной поверхностью, необходимо установить закономерности и механизм протекания оствальдова созревания в таких дисперсных системах, провести исследование процессов формирования, адсорбции активного ингредиента, создать эмульсионные микрокапсулы как носители ЛВ со структурированной дисперсионной средой, способные длительное время доставлять ЛВ в нужную область желудочно-кишечного тракта [11,13,15,20].

1.3. ФОРМИРОВАНИЕ ЭМУЛЬСИОННЫХ МИКРОЧАСТИЦ В СИСТЕМЕ МАСЛО/ВОДА

Способность глобулярных белков образовывать комплексы с полисахаридами на поверхности раздела фаз масло-вода-воздух, можно использовать для улучшения функциональных свойств коллоидных систем, таких как суспензии, эмульсии или пены. В частности, эмульсии, стабилизированные белком чувствительны к условиям окружающей среды (рН, ионная сила раствора), будет иметь тенденцию к флокуляции при значениях рН, близких к изоэлектрической точке (ИТ) адсорбированных белков, и когда ионная сила превышает определенные значения.

Белково-полисахаридные конъюгаты, как было показано, улучшают эмульгирующую способность и устойчивость частиц против флокуляции, опалесценции, расслаиванию и растворению [55,119,120]. Эти свойства конъюгатов делают их подходящими материалами для эмульгирования и стабилизации функциональных компонентов в пищевых продуктах, поскольку адсорбированные гидроколлоиды играют важную роль в эмульсии масло в воде, как структурообразующие загустители и желейные агенты, которые обычно применяются для замедления или предотвращения расслаивания продукта, путем изменения реологических свойств непрерывной фазы [103,121].

Обычно, в стабильных эмульсиях м/в, флокуляцию капель предотвращают адсорбированные белки, из-за относительно сильного электростатического отталкивания между заряженными частицами в случае, когда рН среды находится близко или выше ИТ белка. Эмульсии, полученные на основе менее поверхностно-активных полисахаридов, таких как пектин, гуммиарабик и модифицированный крахмал, более устойчивы к изменениям рН, ионной силы раствора и высоким температурам, чем эмульсии, стабилизированные с помощью белков [3]. Это связано с тем, что межфазная полисахаридная мембрана более пористая и образует объемную поверхность, чем те, которые формируются с участием глобулярных белков, за счёт увеличения стерического отталкивания и снижения Ван-дер-Ваальсового притяжения между капельками масла [23,17].

При рН, близкой к изоэлектрической точке (ИТ) или выше, слабые обратимые комплексы, как правило, формируются между белками и анионными полисахаридами, так как в данных условиях белки несут почти нулевой или отрицательный суммарный заряд. В противоположность этому, сильные электростатические комплексы между белками и полисахаридами формируются при рН ниже изоэлектрической точки. Тип взаимодействия белков с полисахаридами влияет на межфазные реологические характеристики обеих дисперсных систем на поверхности раздела воздух/вода (В/В) и м/в в пищевых продуктах, таких как дисперсии и эмульсии [122].

Тем не менее, на практике, при производстве стабильных эмульсий, с целью повышения их эффективности, полисахаридов, применяемых в качестве поверхностно-активных веществ за счет гидрофобных остатков, должно быть значительно больше, чем белков.

В последнее время для получения эмульсий с хорошей устойчивости к внешним воздействиям используют сочетание положительно заряженных белков и отрицательно заряженных полисахаридов с формированием белково-полисахаридного комплекса как эмульгатора. В результате многослойные

эмульсии, состоящие из капелек масла покрываются белково-полисахаридным комплексом на границе раздела фаз [6,23]. Большой интерес представляет целевое использование синергического эффекта в результате взаимодействия белков и полисахаридов в формировании и стабилизации пищевых систем, таких как эмульсии и пены [7–12,14].

Полисахариды, увеличивают физическую стабильность дисперсных систем как с помощью электростатического и/или стерического эффектов, повышая вязкость в водной фазе, так и по изменению межфазных реологических свойств [2,3,15]. Недавно обнаружено [122], что прочность белково-полисахаридных комплексов через нековалентное связывание существенно зависит от рН и/или ионной силы водной фазы.

Предложен метод для получения стабильных эмульсий, который заключается в последовательной адсорбции белка и полисахарида по технологии так называемой «слой за слоем» (последовательной адсорбции белков и полисахаридов на поверхности раздела фаз) [54]. В данном случае показано, что независимо от типа компонентов на границе раздела м/в могут формироваться би-или многослойные эмульсии, проявляющие высокую физическую и окислительную стабильность, чем обычные эмульсии в жидком состоянии [4,5,13,16,17,123]. Также имеются данные по использованию чистого В-Lg и различных пектинов для получения самоорганизующихся двойных слоев вокруг масляных капель эмульсии, с высокой физической стабильностью [4,5,13,16-19,124–127] и устойчивые к окислению [18].

Большое внимание привлекают комплексы коацерватов пектина с β -Lg. В частности, было показано, что существует зависимость свойств поверхности слоев β -Lg и пектинов от последовательности адсорбции двух биополимеров на поверхности раздела воздух-вода или масло-вода. Рисунок 2 отображает схематическую диаграмму некоторых структур поверхности для нейтральных или отрицательно заряженных комплексов на поверхности раздела жидкости, в

зависимости от того, адсорбируются биополимеры одновременно или последовательно. Непосредственная соадсорбция комплексов β -Lg/пектин на поверхности раздела, предположительно, ведет к образованию одинаково смешанных слоев (состояние II и III). Сравнительно для комплексной адсорбции на ранее сформированном монослое протеина (состояние I), предполагаемая структура скорее напоминает бислой с укупоркой во вторичном слое зависящим от того, заряжен комплекс отрицательно (состояние IV) или нейтрален (состояние V) [54].

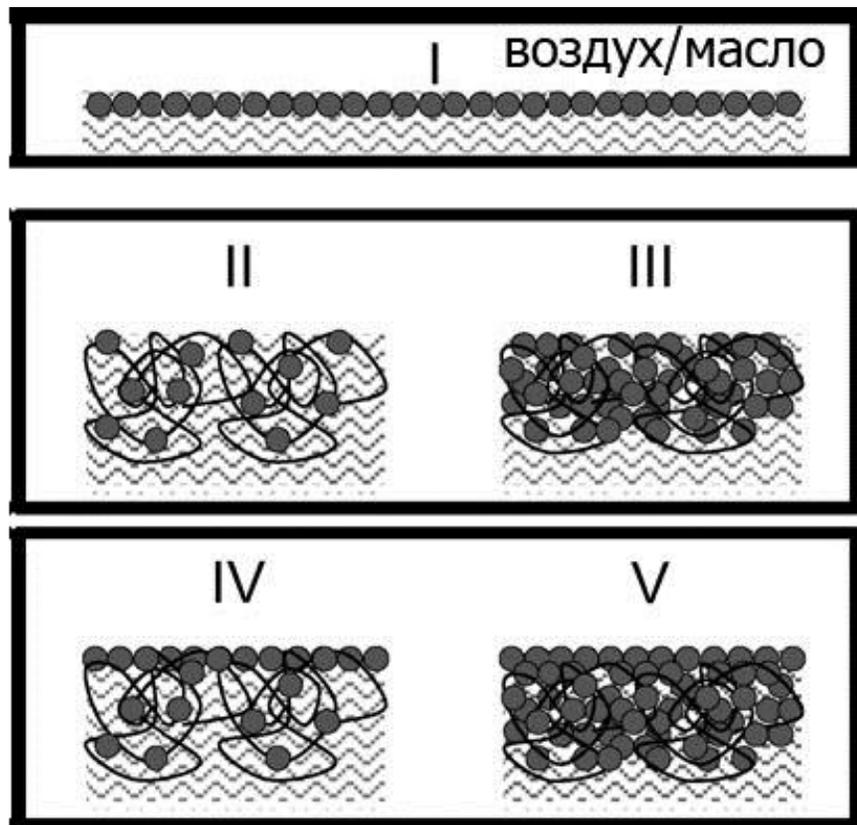


Рисунок 2 - Схематическое изображение биополимерных слоев на поверхности раздела воздух-вода или масло-вода: (I) монослой из глобулярного протеина; (II) смешанного слоя из одновременной адсорбции протеина и полисахарида (заряженные комплексы); (III) смешанный слой из одновременной адсорбции (нейтральные комплексы); (IV) адсорбция заряженного комплекса на протеиновом слое; (V) адсорбция нейтрального комплекса на протеиновом слое.

В лаборатории химии высокомолекулярных соединений (ВМС) Института химии АН Республики Таджикистан проведены исследования процесса получения микрокапсул на основе данных по изучению комплексообразования различных НМ-пектинов с концентратом лактоглобулина в системе масло/вода [128–130]. Показано, что на процесс образования устойчивых эмульсий и степень насыщения их лекарственным веществом влияют природа биополимеров, их соотношение, молекулярная масса пектина, рН и ионная сила раствора. Устойчивость эмульсии, вследствие одновременного увеличения ионной силы раствора и рН среды, повысилась, вероятно, за счет эффективной длины пектиновой цепи, путем уменьшения полиэлектролитного набухания полимера, и образования плотного центра покрытой поверхности. Однако, полное экранирование избытка отрицательных зарядов на поверхности вторичной эмульсии приводило к флокуляции (прилипанию) частиц.

Комплекс коацерватов пектина с β -Lg методом последовательной адсорбции двух биополимеров на поверхности раздела воздух-вода или масло-вода, путем манипулирования свойства пектиновых полисахаридов: структуры и молекулярного веса пектина, плотностью заряда на поверхности полиэлектролитов, был сформирован в устойчивую полимерную матрицу вокруг масляных микрочастиц в эмульсии для эффективного захватывата лекарственных и пищевых ингредиентов.

Таким образом, вышеприведенные данные свидетельствуют о широкой области применения эмульсионных микрокапсул в фармацевтической и пищевой промышленности, и указывают на необходимость исследования физико-химических основ формирования эмульсионных микрочастиц, взаимосвязи устойчивости эмульсии, степени адсорбции активного ингредиента от таких факторов как природа биополимеров, способность наслаивания поверхности масляных частиц, химических и электростатических эффектов на поверхности раздела фаз М/В или В/М.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. ХАРАКТЕРИСТИКА ИСХОДНЫХ ВЕЩЕСТВ

Растворители, использованные в работе, очищали по общепринятым методикам. Неорганические соли, кислоты, щелочи применяли марки «х.ч» производства «Sigma», США.

Для исследований брали низкометилированные коммерческие пектины из цитрусовых: НМ-31 (GENU 12CG-CP Kelco, USA), степень этерификации (СЭ) 31 %, содержание галактуроновой кислоты (ГК) - 69.0 %, Mw 308 KD; НМ-9 и низкометилированный (GENU L/200-CP Kelco) СЭ 9 %, ГК 69.6 %, Mw 466 KD CP Kelco, USA).

Также были использованы пектины, выделенные по запатентованному методу быстрого гидролиза из местного растительного сырья [131,132]: высокометилированный (ВМ) яблочный (Муминобадский р-н Таджикистана, НМ-АМ): СЭ 52 %, ГК 68 %, Mw 134 KD и низкомолекулярный яблочный (НМ) пектин (Шахринауский р-н Таджикистана, НМ-ЯПШ): ДЕ 40,3 %, ГК 58.3 %, Mw 112.7 KD. НМ-пектин, экстрагировали из корзинки подсолнечника (КП 120-5-2М) [132]: СЭ 35.5 %, ГК 82.0 %, Mw 72.6 КД. Выделение, очистка и характеристика пектинов проводились согласно запатентованному способу [133].

2.2. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ, ОЧИСТКИ И АНАЛИЗА ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

2.2.1. Выделение пектина из растительного сырья

А. Лабораторный (традиционный) метод [134]. Гидролиз – экстракцию корзинок подсолнечника проводили в течение 60 минут, при температуре 85 °С, гидромодуле 1:20 и непрерывном перемешивании, используя в качестве экстрагента раствор соляной кислоты рН=1.2. Полученный экстракт отделяли от остатков клеточной стенки и разделяли на три фракции, условно названные: микрогель (МГ), пектиновые вещества (ПВ) и олигосахариды (ОС).

В. Метод быстрой гидролиз - экстракции пектина в автоклаве под давлением за короткий промежуток времени [131,132]. Набухшие выжимки или корзинки

подсолнечника помещали в автоклав, добавляли раствор соляной кислоты $pH=2,0$ в соотношении 1:20 и проводили гидролиз при $T=120^{\circ}C$ и $P=1,5At$ в течение 3-10 мин. Давление в автоклаве автоматически контролируется паровым генератором (МВА – 20D, США). Дальнейшее выделение фракций проводили по методу [133,134].

2.2.2. Очистка пектиновых веществ

Очистка этанолом. ПВ обрабатывали смесью 70% C_2H_5OH , концентрированной HCl и воды в соотношении 14: 3.6 : 2.4 в течение 24 часов при комнатной температуре. Затем промывали последовательно: 70 % спиртом до отрицательной реакции на Cl^{-} - ионы, 96 % этанолом, ацетоном и высушивали при температуре $40-60^{\circ}C$.

Для удаления микрогеля, 0.5 %-й раствор пектина центрифугировали при 7.100 g в течение 1.5 ч, или ультрацентрифугировали при 60 000g в течение 1 ч.

Низкомолекулярные фракции ПВ отделяли с помощью ультрафильтрационной мембраны УПМ-100 на лабораторной ячейке при давлении 0.16 Мпа [134]. Лиофильно высушенный препарат пектина использовали для анализа.

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

2.3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

2.3.1. Модифицированный титриметрический метод

Определение свободных карбоксильных групп. Навеску (около 0.1 г) высушенного образца смачивали 96 %-ным этанолом (5 мл), добавляли 100 мл H_2O и перемешивали на магнитной мешалке до полного растворения (1.5-2.0 ч)

[135]. Затем аликвоту (10-20 мл) титровали 0.01 н раствором гидроксида натрия потенциометрически до $\text{pH} = 7.5$. Содержание свободных гидроксильных групп (K_c) в процентах рассчитывали по формуле:

$$K_c = \frac{N_{\text{NOH}} \cdot V_{\text{NOH}} \cdot 0,0045}{0,1q} \cdot 100 \quad (2.3.1.1)$$

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 5 мл 0.1 н раствора гидроксида натрия, плотно закрывали и оставляли на 2 ч при 20-40 °С для полного омыления [136]. Избыток щелочи оттитровывали 0.1 н раствором HCl потенциометрически до резкого скачка pH. Параллельно проводили холостой опыт. Содержание этерифицированных карбоксильных групп ($K_э$) в процентах рассчитывали по формуле:

$$K_э = N_{\text{HCl}} \cdot \frac{(V_{\text{HCl}}^1 - V_{\text{HCl}}^{11}) \cdot 0,0045}{0,1q} \cdot 100 \quad (2.3.1.2)$$

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, содержащаяся в аликвоте, г.

2.3.2. Фотометрическое определение метоксильных групп

10 мг пектина растворяли в 8 мл 0.1 н NaOH при комнатной температуре. Через 30 мин к щелочному раствору приливали 2 мл 2 н H_2SO_4 , $\text{pH} > 4.0$. К 1 мл фильтрата приливали 1 мл $3 \cdot 10^{-2}$ М KMnO_4 в 4.4 М H_3PO_4 , смесь оставляли на 20 мин, затем приливали 0,5 мл свежеприготовленного 0.15 М водного раствора

Na₂SO₃. К 1 мл обесцвеченного раствора добавляли 0,5 мл раствора хромотроповой кислоты (30 мг/мл) и 3.5 мл H₂SO₄ (82–96%), охлажденной до 0°C. Смесь выдерживали в кипящей водяной бане 10 мин, охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность при максимуме поглощения (570 нм) относительно нулевого раствора [137].

Содержание метоксильных групп (CH₃O) в массовых процентах вычисляли по формуле:

$$\text{CH}_3\text{O} = \frac{D \cdot 100}{1,03 \cdot K \cdot l \cdot C_1} \quad (2.3.2.1)$$

где D- оптическая плотность раствора при 570 нм;

l- толщина поглощающего слоя;

K- условный коэффициент поглощения, равный 6.1 мл·мг⁻¹·см⁻¹;

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

1.03- отношение молекулярных масс M(CH₃OH)/ M(CH₃O).

2.3.3. Определение уроновых кислот мета-гидрокси дифенильным методом

Использовали 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. Готовили серию растворов для построения калибровочной кривой: 25 %, 50 %, 75 %, 100 %.

В пробирку помещали 0,4 мл раствора, добавляли 40 мкл 4 молярного раствора сульфаминовой кислоты. Пробирки закрывали и перемешивали. Далее, помещали в сосуд с водой и льдом и осторожно приливали 2.5 мл раствора тетрабората в серной кислоте. Пробирки встряхивали в охлажденной смеси и нагревали 15 мин. в кипящей водяной бане. Затем, пробирки охлаждали в сосуде с водой и льдом в течение 1 – 1.5 ч, добавляли 80 мкл 0.5 % - го раствора метагидроксибифенила и оставляли на 3 мин. и перемешивали до появления

окраски. Оптическую плотность измеряли при 525нм (окраска стабильна в течение 13 мин.) [138]. Содержание ГК вычисляли по формуле:

$$X = a \cdot V_2 \cdot V \cdot 100 / H \cdot V_3 \cdot V_1 \cdot 1000000 \quad (2.3.3.1)$$

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

H – масса навески, г;

V – объем экстракта, полученного из навески, мл;

V_1 – объем, взятый для разведения, мл;

V_2 - объем, полученный после разведения, мл;

V_3 - объем пробы, взятой для реакции, мл;

100 – коэффициент перевода в проценты.

Построение калибровочной кривой ГК (м – гидроксид дифенильный 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 были приготовлены растворы: 20%, 40%, 60%, 85%. Дальнейшие исследования проводились по методу 2. На основании полученных данных строили калибровочную кривую ГК.

2.3.4. Определение молекулярного веса пектина

Молекулярный вес (M_w) пектина определяли методом эксклюзионной жидкостной хроматографии (ЭЖХ) [33,35]. В зависимости от вязкости раствора пектина, высушенный образец растворяли в 0,05М NaNO_3 до конечной концентрации 1 или 2 мг/мл, центрифугировали при - 20000g в течение 20 минут, для отделения агрегированной фракции, и фильтровали через мембранный фильтр (0.45 мкм, MilliporeMillex – HN). Количество пробы (0.1 – 0.2 мл) и скорость

потока элюента (0,8 мл/мин) задавались с помощью программы Breez (Waters). Система доставки растворителя состоит из двухканального вакуумного дегазатора, насоса высокого давления (Waters 1515 IsocraticPump), и автоинжектора (717 PlusAutoInjector, Waters). Для разделения пектиновых полисахаридов использовали две колонки, содержащие PL-AquagelOH40 и PL-AquagelOH60. Молекулярную массу пектинов определяли с использованием программного обеспечения ASTRA 5.3.4.13 (WyattTechnology). Значения Mw были получены на ЭЖХ с использованием универсальной калибровки. ЭЖХ колонки калибровали с использованием молекулярных стандартов Пуллулана (Showa Denko К.К., Japan) [35].

2.4. ВЫДЕЛЕНИЕ β -ЛАКТОГЛОБУЛИНА ИЗ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ И МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Сывороточный белок молока β -лактоглобулин (β -LgC) был выделен из молочной сыворотки Душанбинского молочного комбината Республики Таджикистан. Метод включает следующие стадии: подкисление сыворотки до pH 4.0, центрифугирование, ультрафильтрацию горячей сыворотки на мембране, способной пропускать вещества с молекулярным весом ≤ 50 KD, для удаления остатков казеина и альбумина в ретенанте, с последующей диа-ультрафильтрацией на мембране, пропускающей вещества с молекулярным весом ≤ 10 KD, и выделение концентрата β -LgC в ретенанте. Контроль содержания LgC, осуществляли методом капиллярного электрофореза (КЭ) на приборе 3DAgilentHPCEG1600AX, с использованием компьютерной программы AgilentChemStation Software B.02.01 SR2 [139].

Полученный концентрат охлаждали до 5 °С, для удаления примесей, содержащихся в молочной сыворотке, в частности казеина и минеральных солей, и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 минут. Далее [139], методом ультрафильтрации, проводили деминерализацию для удаления растворимых

минеральных солей и лактозы. Ультрафильтрация проводилась в два этапа при $p=1.4$ атм.: на первом этапе молочную сыворотку (МС) пропустили через мембрану диаметром 0,2 мкм [139], на втором МС концентрировали на мембране УАМ 175А°. Концентрацию белков определили методом Седмака по калибровочному графику. Для проведения ионообменной хроматографии, брали колонку вместимостью 450 мл, заполняли 300 мл амберлита ИРА-400 (в набухшем виде) и регенерировали 0.1 н раствором NaOH. Промыли колонку дистиллированной водой до нейтральной среды и пропустили 1 л молочной сыворотки ($C=1,02$ мг/мл). Затем колонку промывали дистиллированной водой, элюировали 1М раствором NaCl, со скоростью 6 мл/мин и отбирали элюат по 10 мл и определили концентрацию белка. По окончании колонку регенерировали фосфатным буфером ($pH=7$), промыли дистиллированной водой и регенерировали 0.1 н раствором NaOH с целью вторичного использования. Полученные фракции ставили на диализ и контролировали чистоту β -LgC методом гель-электрофореза.

2.4.1. Определение белка методом Седмака

Количественное содержание белков концентрата β -лактоглобулина, выделенного из молочной сыворотки [41], анализировали методом Седмака [140]. 1.5 мл раствора препарата, содержащего 0.010-0.0150 мг испытуемого белка, помещали в пробирку, прибавляли 1.5 мл раствора Кумасси ярко-голубого G-250, перемешивали и оставляли при комнатной температуре в течение от 5 мин до 3 ч. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при двух длинах волн: 620 и 465 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения [139] использовали раствор без препарата и красителя Кумасси ярко-голубого G - 250. Калибровочный график строили в пределах концентраций от 0.005 до 0.150 мг стандартного образца белка [139] при оптической плотности 620 и 465 нм.

2.4.2. Определение белков методом капиллярного электрофореза

Метод мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) объединяет электрофорез и хроматографию. МЭКХ получил наиболее широкое распространение среди других вариантов капиллярного электрофореза, в первую очередь, за счет способности разделять как ионогенные, так и незаряженные компоненты проб [139].

Разделение белков проводили на [139] капиллярном электрофорезе (3DAgilent HPCE G1600AX, фирмы AgilentTechnologies, США) с использованием капилляра с полимерным покрытием, химически инертным. Концентрация образца 1 мг/мл в 25 %-ном фосфатном буфере. Рабочий буфер-200 мМ фосфат натрия, рН 2.0, 0.1 % додецилсульфат натрия (ДДСН). Образец растворяли в соотношении 1:3 в 1 % ДДСН, 5 % 2-меркаптоэтаноле, 2.5 мМ трис-глицине (рН 8.9), 10 % глицерине и кипятили в течение 5 мин; напряжение 10 кV постоянный, обратная полярность (к аноду) [139]. На рис. 3 наблюдается четкое разделение белков МС.

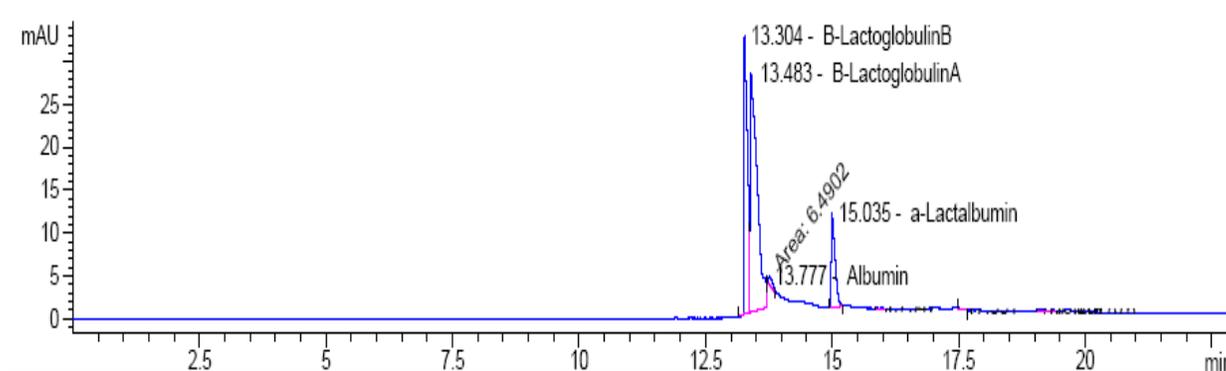


Рисунок 3 - Электрофореграмма концентрата Ig, выделенного из МС.

Условие электрофореза: температура кассеты 22.0 °C; напряжение – 26.5 KV; ток – 7.3 μ A; ввод пробы гидродинамический 50 мбар/2 сек; детектирование – УФ с диодоматричным детектором (ДМД) при длине волны 200 нм.

2.4.3. Разделение белков молочной сыворотки методом гель-электрофореза

Для анализа белкового состава молочной сыворотки одним из достаточно информативных методов является электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Качественный состав белков сыворотки изучали методом вертикального электрофореза в градиентном ПААГ (4-14 %), содержащем SDS - Na при pH 8.3. Используемая мини электрофоретическая система фирмы SIGMA дает существенно лучшие результаты и позволяет идентифицировать большое количество белковых фракций сыворотки, включая минорные компоненты, оценивать общую картину белкового спектра и определить молекулярные массы белков. Молекулярные массы белков определяли по [141] калибровочному графику, построенному по подвижности белков – стандартов фирмы SIGMA.

Для электрофоретического разделения белков молочной сыворотки использовали 14 % разделяющий и 4 % концентрирующий гели. В качестве электродного буфера использовали 0.025 М трис-глициновый буфер (pH 8.3). Образцы растворяли в буфере содержащем 0.44 М Трис-ОН, 0,1% мМЕДТА, 10 % SDS-Na и 20 % β -меркаптоэтанола. Электрофорез проводили при напряжении 120 В в течении 16-20 часов. Гель окрашивали в 0.25 % растворе Кумасси G-250, фон отмывали водой от избытка красителя и высушивали между слоями целлофана [141].

2.5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСХОДНЫХ РАСТВОРОВ

2.5.1. Приготовление раствора пектинов

На аналитических весах взвешивали точную навеску пектина, добавляли несколько капель этилового спирта для удаления пузырьков воздуха из полимера, затем добавляли небольшое количество дистиллированной воды или буферный раствор, перемешивая на магнитной мешалке при нагревании до 40⁰ С в течение 2 ч. Затем, доводили объем раствора водой до 50 мл и перемешивали до полного растворения пектина.

Полученный раствор центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 мин, осадок отделяли и высушивали при 60-70⁰ С в сушильном шкафу, взвешивали и рассчитывали концентрацию раствора по разнице взятой навески и массы осадка.

2.5.2. Приготовление раствора концентрата сывороточных белков (LgC)

На аналитических весах взвешивали 0.20 гр. белка (LgC), затем добавляли небольшое количество дистиллированной воды (20 мл), перемешивали на магнитной мешалке в течение 1 часа. Затем доводили объем дистиллированной водой до 50 мл и перемешивали до полного растворения белка. Раствор центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 мин, осадок отделяли и высушивали при 60⁰С в сушильном шкафу. Вес осадка рассчитывали по разнице взятой навески и массы полученного осадка.

2.5.3. Приготовление буферных растворов

Буферные растворы: солянокислый (рН=1.5) и фосфатный (рН=6.4) были приготовлены согласно справочнику по аналитической химии [142].

2.6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ МИКРОКАПСУЛ В ЭМУЛЬСИОННОЙ СИСТЕМЕ МАСЛО В ВОДЕ (М/В)

Микрокапсулы получали двухстадийной процедурой: первичную эмульсию - гомогенизацией 4 мл подсолнечного масла с 10 мл 0.2 % модельного ЛВ пироксикама (РХ) в этаноле и соответствующим количеством водного раствора катионактивного эмульгатора – 2 % LgC при перемешивании в течение 15 мин. при 1- 2000 об/мин. и температуре 60⁰С на высокоскоростном гомогенизаторе ИКА Т-25 (ULTRA TURRAX, ИКА-WERKE GMBH & CO.KG, Germany). Затем, в полученную эмульсию, не прекращая перемешивания, медленно добавляли соответствующий объём водного раствора противоположно заряженного пектина, который, адсорбируясь на поверхности липидных капель, образует вторичную

эмульсию. Перемешивание продолжали ещё в течении 20 мин, полученную эмульсию промывали дистиллированной водой для удаления несвязанного ЛВ.

2.6.1. Оценка стабильности эмульсии

Эмульсии хранили в стеклянных градуированных пробирках, разделенных на две группы. Первую группу оставляли при комнатной температуре (22-25 °С), вторую - выдерживали в холодильнике при 4 °С. Стабильность эмульсии в обеих группах исследовали через день и в течение месяца путем расчета процента кремообразования.

Размер частиц и количество микрокапсул в объеме 1мл эмульсии ежедневно измеряли на цифровом биологическом микроскопе Motic type 102 M (Motic Instrument INC, Canada), после стократного разбавления. Количество частиц и их размеры определяли на микроскопе с использованием компьютерной программы Motic Image Advanced 3.2.

Эмульсии хранили при комнатной температуре в течение 24 часов, затем проводили оценку устойчивости по объему, количеству микрокапсул в 1мл, размеру и распределению частиц микроскопическим методом. Все измерения были выполнены на двух свежеприготовленных образцах, результаты представлены как средневычисленные.

Размер частиц представлял собой объемно-весовой средний диаметр d_{43} , который рассчитывали по формуле:

$$d_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (2.6.1.1)$$

где n_i количество эмульсионных частиц с диаметром d_i . Согласно данному уравнению и объему кремообразования, следует отметить, что минимальное значение размера частиц при хранении эмульсии и постоянном объеме является показателем стабильности эмульсии.

2.7. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ МОДЕЛЬНОГО ЛВ ИЗ СДЛ В ОПЫТАХ IN VITRO

Для исследования кинетики процесса были приготовлены буферы, моделирующие среду желудка (HCl/ KCl 0.2 М, рН 1.2) и среду кишечника (0.2 М фосфатный буфер, рН 6.4). Высушенные комплексы в количествах 50 мг заливали 50 мл буфера рН 1.2 и рН 6.4 в пробирках с притёртыми пробками. Пробы помещали в термостат при 37 °С и через определённые промежутки времени измеряли на спектрофотометре UV 1 Thermo Spectronic, UK (Индия) экстинкцию растворов при 355 нм. Количество высвободившегося лекарства определяли по калибровочному графику, построенному по стандартному РХ. Общее количество вовлеченного лекарства в гидрогелевые комплексы M_0 и высвобожденное по времени M_t соответствовало объему на грамм комплексов.

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 LgC

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что в последние годы широкую популярность приобрел способ микро - и нанокапсулирования лекарственных веществ (ЛВ) [2-5, 11-20, 57–59, 77–79, 90,103, 107, 108, 126–130], особенно методом эмульсии 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 из молочной сыворотки, благодаря их полиионной структуре, биосовместимости и способности к образованию гелей [11, 13, 15, 128–130].

Исследование механизма взаимодействия белков и полисахаридов на поверхности масляных частиц открывает возможность для разработки новых ингредиентов и межфазных структур для применения в пищевой и фармацевтической промышленности. Предложенный многослойный способ формирования эмульсии масло в воде (М/В), основанный на адсорбции ионного эмульгатора (например, белков) на первом слое и противоположно заряженных полиэлектролитов на втором слое (например, полисахаридов) [7, 16], может быть использован для создания микро - и наноразмерных средств доставки лекарств и питательных веществ в организм. Такая система способна защитить лиофильные и протеиновые лекарственные вещества (ЛВ) от ферментативного расщепления в процессе пищеварения.

В этом аспекте способность высокометилированного (ВМ) пектина образовывать растворимый комплекс с белками на поверхности эмульсионных частиц М/В посредством гидрофобных взаимодействий, явилось основой при

создании СДЛ в виде нано - и микрокапсул [110, 128, 143–145], для их широкого применения при создании инъекционных и аэрозольных форм ЛВ.

Целью данной части работы было изучение процесса формирования микрокапсул на основе комплексообразования ВМ-пектинов различной структуры, полученных из яблок и цитрусовых с концентратом лактоглобулина в системе эмульсии М/В, способные эффективно захватывать ЛВ.

Первые микрокапсулы были приготовлены на основе комплексообразования высокометилированного яблочного пектина (ВМЯ) с концентратом лактоглобулина в системе эмульсии М/В. Яблочный пектин получали методом экстракции и определяли: содержание галактуроновой кислоты (ГК, 68%) , степень этерификации карбоксильной группы (СЭ, 52%) и молекулярную массу (M_w 131 КД) [35]. Концентрат β -лактоглобулина (β -LgC), выделенного из молочной сыворотки [41], содержал: 37.35 % β -LgA, 52.9 % β -LgB и 9.7 % α -LgA. В качестве лекарственного препарата был использован нестероидный противовоспалительный препарат - пироксикам (PX).

Микрокапсулы получали двустадийной процедурой как описано в главе 2 (2.6). Количество инкапсулированного PX определяли на УФ-спектрофотометре при 335 нм.

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 средневывесленные. Характеристика микрокапсул: стабильность эмульсионных частиц (объём эмульсии) и степень инкапсулирования ЛВ для системы β -LgC /ВМЯ приведена в табл. 3.1.1.1.

Таблица 3.1.1.1

**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. 3.1.1.1 указывают на то, что объёмы полученных эмульсий при всех соотношениях β -LgC/ВМЯ вначале составляли 27-31 мл, на следующий день 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.

Основной движущей силой для адсорбции полимера на каплях первичной эмульсии является электростатическое взаимодействие между заряженными группами на полимерах и противоположно заряженными группами на коллоидных частицах [21–23, 9–11]. Степень адсорбции полимера на заряженной поверхности зависит от свойств полимера и условий среды (температуры, рН и типа ионов) [10]. Из этого следует, что в условиях вышеупомянутых экспериментов, образование устойчивых эмульсионных частиц является довольно сложным процессом. Различие в способности пектиновой цепочки образовывать эффективный вторичный слой на протеиновых молекулах вокруг масляной капли зависит от молекулярной массы и структуры [146] пектинов [12].

Исходя из этого, мы модифицировали способ приготовления вторичной эмульсии путем растворения пектинов в растворе 0.1 М NaCl, для увеличения ионной силы, а также для предотвращения полиэлектролитного набухания пектиновых цепей. Получение микрокапсул также проводилось тремя различными способами. В первом - первичная эмульсия была приготовлена путем гомогенизации 4 мл подсолнечного масла с 10 мл 0.2 % РХ в этаноле и различным количеством водного раствора эмульгатора, содержащего 2 % LgC при 1- 2000 об/мин в течение 15 мин., при температуре 60 °С.

Во втором способе первичная эмульсия была приготовлена путем гомогенизации подсолнечного масла с лекарством при 1- 2000 об/мин в течение 15 мин., при температуре 60 °С. Затем, в полученную эмульсию, не прекращая перемешивания, медленно добавляли смесь LgC с пектинами и продолжали перемешивание в течение еще 20 мин.

В последнем способе первичная эмульсия была приготовлена путем гомогенизации масла с 0.2 % раствором пектина и лекарством, затем в тех же условиях к смеси добавили 0.3 % раствор LgC при 1- 2000 об/мин в течение 15 мин., при температуре 60°С. Все эмульсионные микрокапсулы были приготовлены при рН ниже изоэлектрической точки β -Lg. Полученные, в результате, эмульсии оказались устойчивыми при продолжительном хранении. Результаты экспериментов приведены в табл. 3.1.1.2.

Из таблицы видно, что объем эмульсии β -LgC/ВМЯ в зависимости от соотношения биополимеров проявляют экстремальный характер при всех способах и практически не зависят от способа приготовления. Видно, что объем эмульсии LgC/ВМЯ при соотношении 3:1, соответствующем 22 молям LgC по отношению к пектину, вызвало значительное увеличение устойчивости к кремообразованию. Объем эмульсии LgC/ВМЯ при соотношении 3:1 увеличился более чем в 7 раз, а при соотношении LgC/ВМЯ 5:1 более чем в 4 раза по сравнению с эмульсиями, приготовленными в водной среде.

Таблица 3.1.1.2

Характеристика микрокапсул, полученных в среде 0,1 М NaCl

Способ приготовления	Весовое соотношение LgC/ВМЯ, г/г	Соотношение 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

Устойчивость эмульсии в данных случаях, вследствие добавления соли натрия, вероятно, усилило эффективность длины пектиновой цепи, путем уменьшения полиэлектролитного набухания полимерных цепей, и образования плотного центра покрытой поверхности. Также, присутствие натриевых противоионов в системе может привести к экранированию чистого заряда, предотвращающего образование коацерватов между пектином на поверхности

эмульсионных частиц и свободным полимером. Однако, полное экранирование избытка отрицательных зарядов на поверхности вторичной эмульсии приводит к флокуляции (прилипанию) частиц.

Размер частиц эмульсий контролировали с использованием микроскопа и анализировали с помощью компьютерной программы Motic Image Advanced 3.2. Показано, что размеры частиц хорошо согласуются между теоретическими расчётами и экспериментальными данными. Размеры частиц представляли как объемно-весовой средний диаметр- d_{43} . Все измерения были выполнены на двух свежеприготовленных образцах, а результаты были изложены в качестве средних и стандартных отклонений.

Для того чтобы прояснить влияние структуры пектина и соотношения LgC/пектин на устойчивость кремообразования, были рассчитаны количество и размер частиц в эмульсиях.

На рис. 3.1.1.1 представлено микроскопическое изображение 1 мл эмульсии

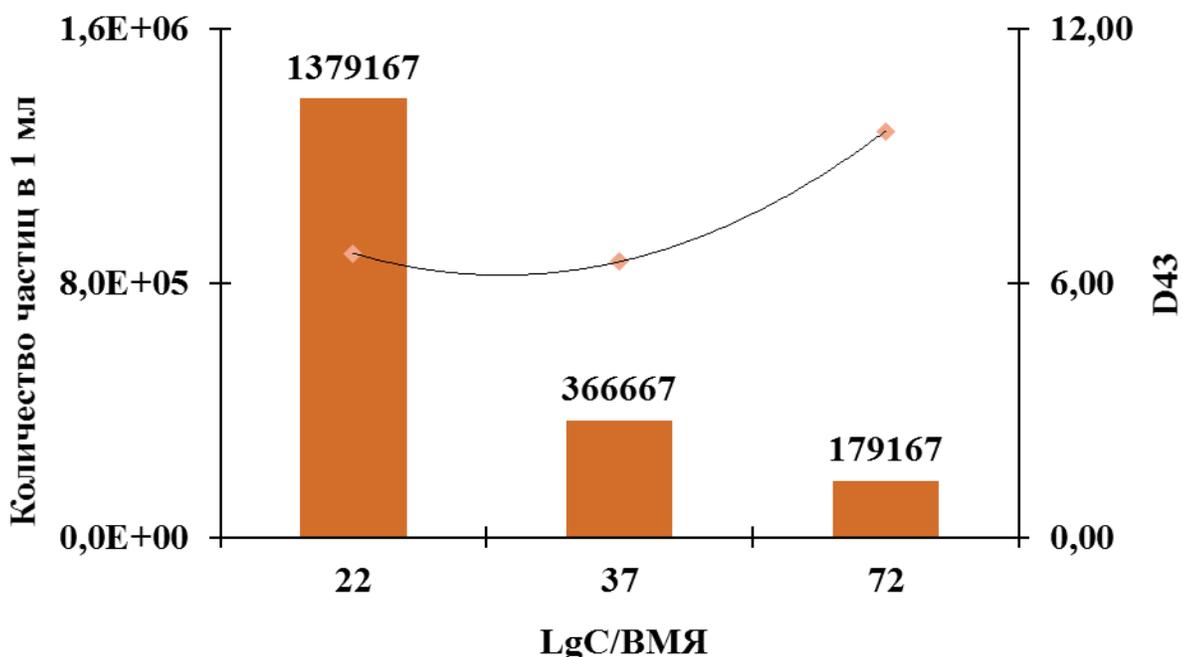


Рисунок 3.1.1.1 - Зависимость количества микрочастиц в 1 мл эмульсии и их средний объёмно-весаового диаметр (d_{43}) от соотношения биополимеров в эмульсионной системе β -LgC/ВМЯ.

LgC/ВМЯ, а на рис. 3.1.1.2 -3.1.1.4 количество частиц в 1 мл эмульсии, измеренное на второй день. Больше количество частиц было обнаружено в системе β -LgC/ВМЯ-пектин при молярном соотношении 22. Увеличение фракции протеина привело к заметному уменьшению количества частиц и увеличению их среднего диаметра. 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. 3.1.1.2 -3.1.1.4 показаны кривые количества частиц и их объемно-весового среднего диаметра для эмульсии β -LgC/ВМЯ при хранении в течение 18 дней.

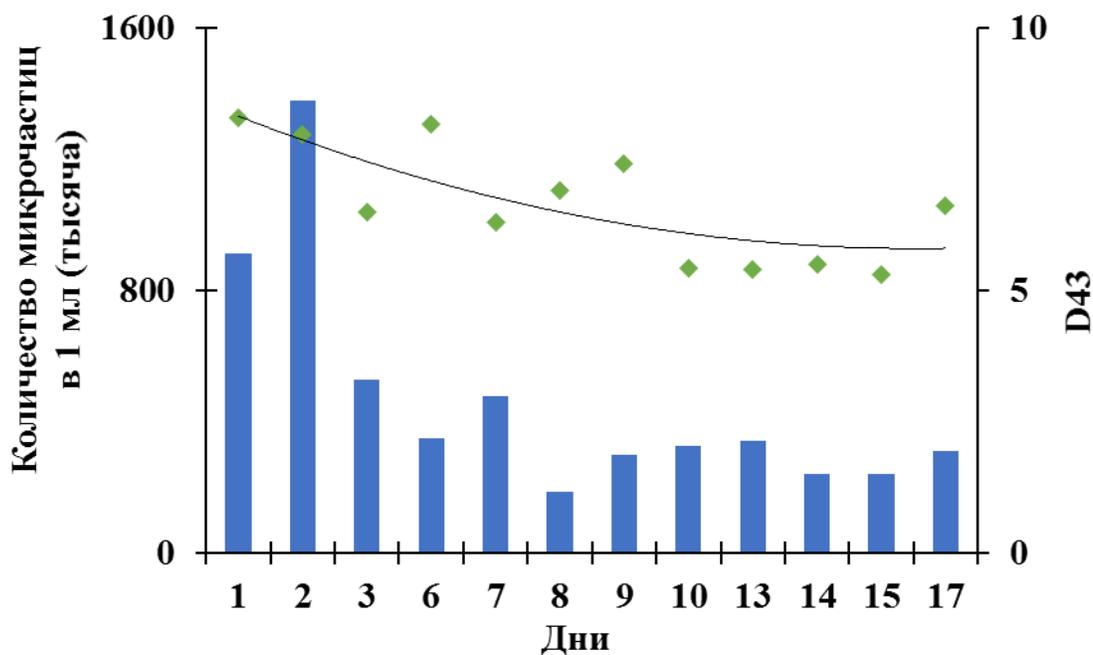


Рисунок 3.1.1.2 - Изменение количества частиц микрокапсул в 1 мл и средний диаметр (d_{43}) от времени хранения при соотношении LgC/ВМЯ 22 в первом способе: колонки - размер частиц; линия - d_{43} .

Видно, что полученная эмульсия при низком соотношении (3:1) изначально обладает более высоким количеством микрокапсул (1.4 млн. частиц), которое

уменьшается при хранении до 300-400 тыс. в 1 мл эмульсии с меньшим диаметром. В процессе хранения эмульсии наблюдается полимодальное распределение частиц, на 13-18 день вновь переходящее в мономодальное.

Это доказывает, что частицы эмульсии при своем движении могут объединяться при сближении до определенного расстояния, а затем, под действием электростатического отталкивания одноименных зарядов разрушаются. С увеличением фракции белка от 5 до 10 молекул на вес пектина происходит уменьшение объема эмульсии и, следовательно, образуется меньшее количество частиц. Так как избыток белковых молекул взаимодействует с пектиновой цепью на поверхности микрокапсулы, это приводит к уменьшению количества частиц и увеличению среднего диаметра при хранении.

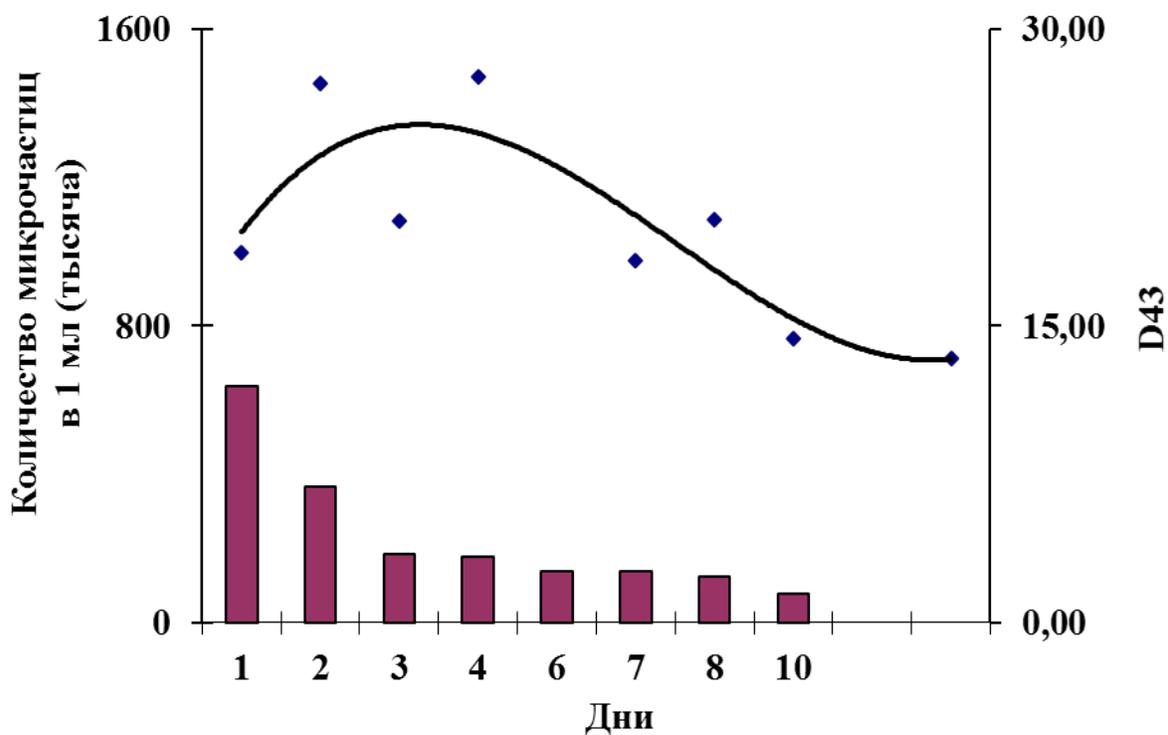


Рисунок 3.1.1.3 - Изменение количества частиц микрокапсул в 1 мл и среднего диаметра (d_{43}) от времени хранения при соотношении LgC/ВМЯ 44 в первом способе: колонки - размер частиц; линия - d_{43} .

Однако данный процесс не приводит к уменьшению насыщения лекарством для последних двух эмульсионных систем. Устойчивость эмульсии в данных случаях, вследствие добавления соли натрия, вероятно, усилило эффективность длины пектиновой цепи путем уменьшения полиэлектролитного набухания полимерных цепей и образования плотного центра покрытой поверхности.

М/В эмульсии пектина и сывороточного белка молока в начальных экспериментах, в отсутствие противоионов натрия, указали на то, что сильное электростатическое взаимодействие происходит при рН ниже изоэлектрической точки протеина. Данное взаимодействие приводит к увеличению нерастворимых комплексов в системе с ВМЯ пектином, что в свою очередь приводит к низкому показателю эмульсионной активности.

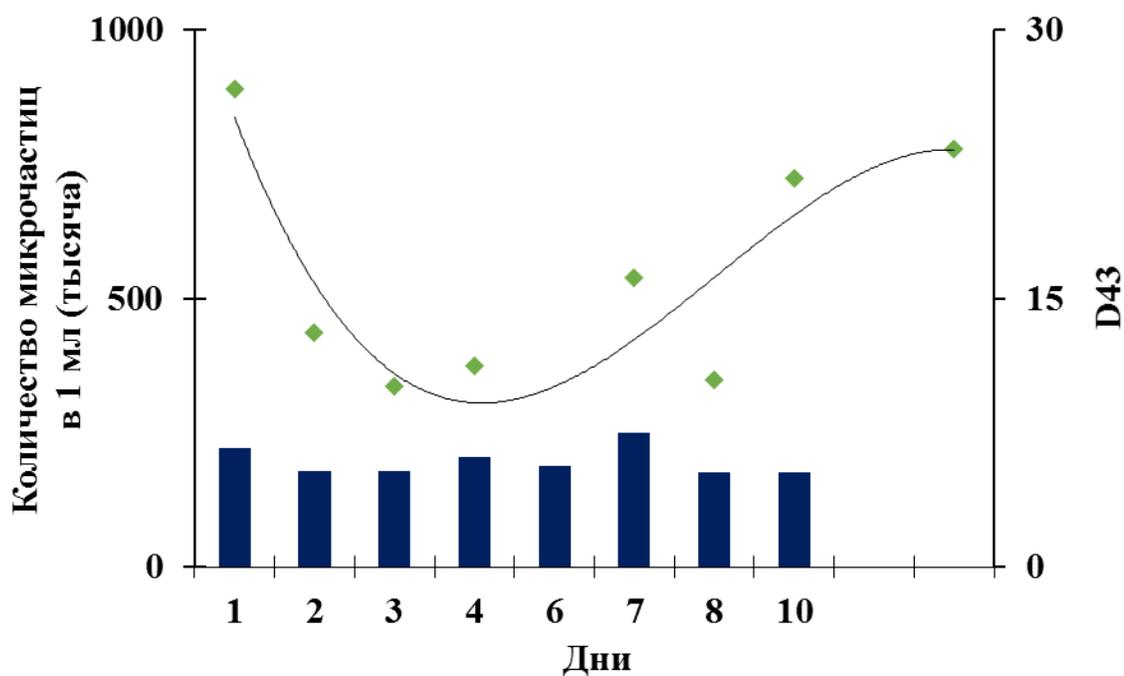


Рисунок 3.1.1.4 - Изменение количества частиц микрокапсул в 1 мл и их средний диаметр (d_{43}) от времени хранения при соотношении LgC/ВМЯ 72 в первом способе: колонки - размер частиц; линия - d_{43} .

В то время как в присутствии натриевых противоионов, все исследуемые эмульсии были устойчивыми, и наблюдался высокий процент насыщения

лекарством. Стабильная эмульсионная система, содержащая большое количество частиц с небольшим средним диаметром (d_{43}), наблюдалась в системе LgC/ВМЦ с относительно низким соотношением.

3.1.2. Микрокапсулы на основе ВМ- цитрусового пектина и LgC

Микрокапсулы на основе ВМ- цитрусового пектина, полученного методом быстрой экстракции (АК-120-10-2,0-0,05) с содержанием: ГК 62.0, СЭ 31.0, Mw 96.4KD [132] с концентратом лактоглобулина (β - LgC), выделенного из молочной сыворотки, были использованы для инкапсулирования модельного лекарства РХ.

Ряд микрокапсул был получен первым способом и отличался исходным весовым соотношением пектина и сывороточного белка молока (табл. 3.1.2.1).

Как видно из данных табл. 3.1.2.1 полученные эмульсии оказались более устойчивыми при продолжительном хранении. Эмульсии были приготовлены при рН выше изоэлектрической точки β -Lg (рН 5.2). Все эксперименты были проведены трижды с использованием свежеприготовленных эмульсий и результаты представлены как средние и стандартные вычисленные (табл. 3.1.2.1).

Таблица 3.1.2.1

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

Объемы полученной эмульсии при всех соотношениях β -LgC/ВМЦ, составлявшие 19-25 мл вначале, на следующий день снижались до стабильного состояния.

Объем эмульсии LgC/ВМЦ при соотношении 3:1, соответствующему 9 молям β -LgC по отношению к ВМЦ, вызвало 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 РХ увеличилось более, чем в 6-8 раз.

Для характеристики устойчивости микрокапсулы суспендированы в воде на гомогенизаторе при 9000 об/мин. Количество микрочастиц и их размеры были определены на микроскопе Motic type 102 М с помощью программы Motic Image Advanced 3.2. На рис. 3.1.2.1 представлен график распределения частиц для эмульсионных систем с соотношением белок/ пектин.

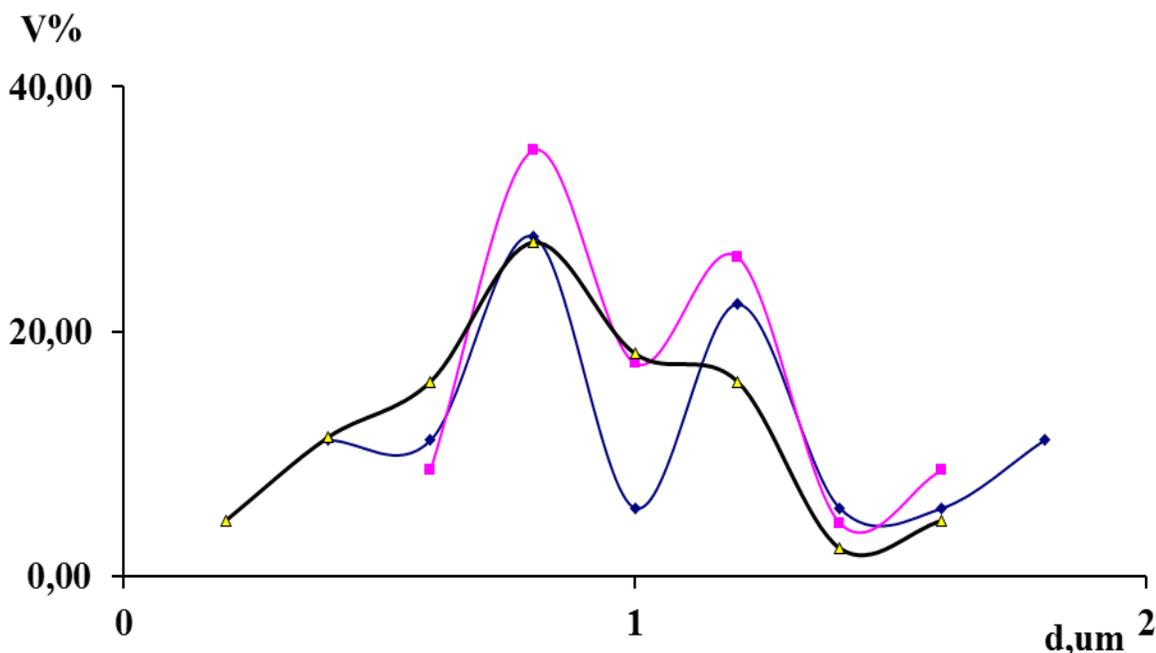


Рисунок 3.1.2.1 - Кривые распределения микрочастиц в эмульсионной системе LgC/ВМЦ с соотношениями: 12(♦); 20 (■); 40 (▲).

Полученные эмульсии, как видно из графика, проявляют бимодальное распределение частиц плавно переходящие в мономодальные с возрастанием фракции белка в системе. С возрастанием фракции белка наблюдается, почти в два раза, увеличение частиц с меньшим диаметром (рис. 3.1.2.1).

В эмульсионной системе с цитрусовым пектином (рис. 3.1.2.2) характер изменения количества микрочастиц и их средний диаметр в зависимости от соотношения LgC/ВМЦ несколько другой: увеличение количества частиц проходит через максимум, при этом в точке максимума, равной 54, формируются частицы с минимальным диаметром (5.3 мкм).

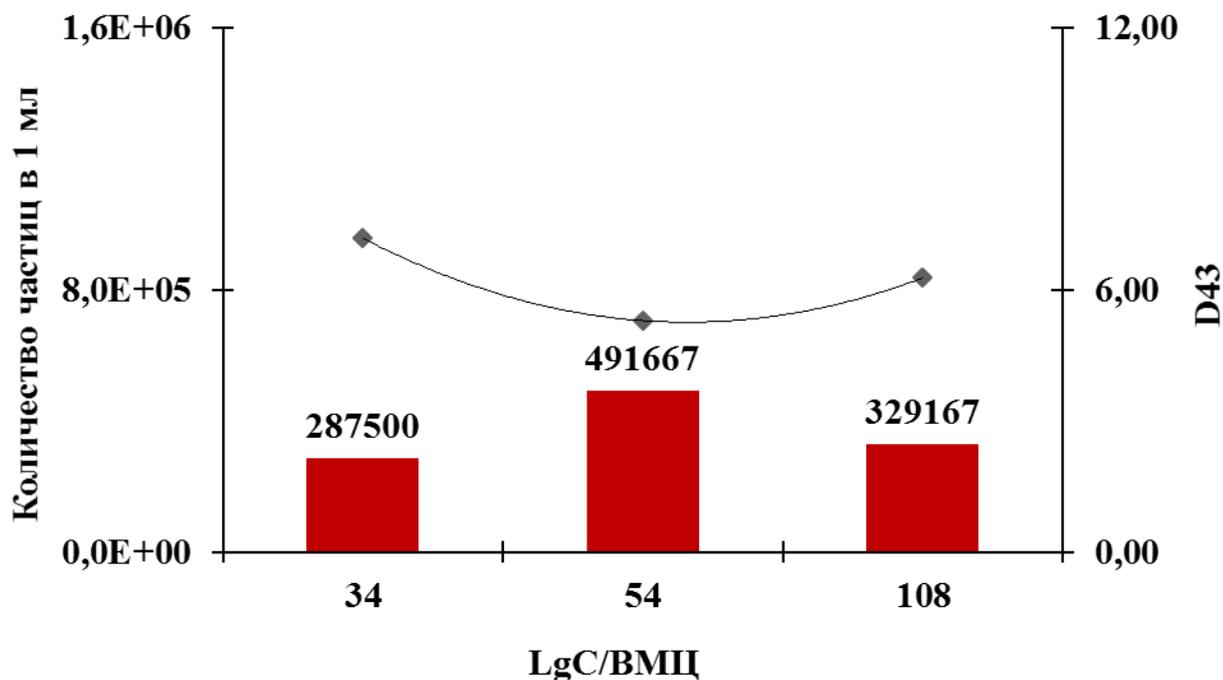


Рисунок 3.1.2.2 - Зависимость количества микрочастиц в 1 мл эмульсии и их средний объёмно-весовой диаметр от соотношения биополимеров в эмульсионной системе β -LgC/ВМЦ.

В отличие от эмульсионной системы с ВМ-яблочным пектином, число частиц в эмульсионной 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 как со структурой ВМЯ (разветвленность макромолекулы) и плотностью заряда, а также с большим захватом 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 с относительно низким соотношением LgC/ВМЯ по сравнению с системой LgC/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 LgC/ВМЯ 22 и β -LgC/ВМЦ 54. Устойчивость эмульсий 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.

Это подтверждает тот факт, что с увеличением доли белка все масляные капли покрываются глобулами лактоглобулина и затем стабилизируются пектином, что препятствует прилипанию частиц и диффузии лекарства. Однако, оптимальное соотношение, где достигается максимальное количество частиц в единице объёма с минимальными размерами, формируется при соотношении β -LgC/ВМЦ 20. Увеличение фракции белка выше этой точки приводит к уменьшению поверхности заряда на вторичном слое и нарушению стабильности эмульсии. Полученные таким способом системы доставки в виде эмульсии в течение месяца показали высокую устойчивость.

Таким образом, в данной работе изучен процесс формирования микрокапсул на основе комплексообразования ВМ пектинов с различной структурой, выделенные из яблок и цитрусовых, с концентратом LgC на поверхности эмульсионных частиц М/В, способных эффективно захватывать ЛВ. Найдены оптимальные условия для получения устойчивых эмульсий посредством изменения ионной силы системы, способной повысить эффективность длины пектиновой цепи и образовать 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 объёма эмульсий и количества частиц. В исследуемых экспериментальных условиях количество добавленного пектина было достаточно большим для обеспечения электростатического и стерического отталкивания пектина на поверхности раздела М/В. Условие для получения стабильной эмульсии с высоким захватом ЛВ зависит от структуры пектина, молекулярного веса, условий среды (рН и ионная сила раствора) и соотношения белок/пектин.

Разработанные системы доставки ЛВ в виде эмульсионных микрочастиц продемонстрировали способность эффективного их захватывания, 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

Известно, что высокометилованные (ВМ) пектины из яблок, цитруса [128,129,147] и сахарной свёклы [148] способны стабилизировать эмульсию М/В.

Эмульгирующие свойства низкометилованных (НМ) пектинов мало изучены, хотя имеются данные об их способности формировать прочный

комплекс с белками на поверхности раздела масло/вода [23, 55, 130], стабилизируя эмульсию. Следовательно, использование различных типов пектинов и белков для формирования комплекса на поверхности раздела фаз и стабильных частиц в дисперсионной среде, открывают широкие возможности для разработки новых безопасных носителей нутриентов и ЛВ, необходимых для пищевой и фармацевтической промышленности [147, 149].

Сравнительный анализ процесса формирования эмульсионных микрокапсул на основе ВМ-яблочного и цитрусового пектинов с концентратом лактоглобулинов молочной сыворотки [150] показал, что в зависимости от соотношения биополимеров они отличались объёмом, количеством микрочастиц и эффективностью захвата ЛВ в эмульсии, рН и ионной силы среды. Пектиновые цепочки, в зависимости от молекулярной массы и структуры, проявляли различную способность образовывать эффективный вторичный слой на протеиновых молекулах, адсорбированных вокруг масляной капли [146].

Целью данной части работы является получение стабильной эмульсии в дисперсионной среде М/В, на основе НМ-пектинов яблок, цитрусов и подсолнечника с концентратом белков молочной сыворотки, и исследование механизма формирования микрокапсул на их основе.

Объектом исследования являлись: НМ-пектины, полученные из яблочных выжимок на пилотной установке (ПАПО Шахринав, Республики Таджикистан), с содержанием ГК 58.6%, СЭ 38.0 % и Mw 119 КД (далее обозначенные как НМЯ); корзинок подсолнечника, полученных методом быстрого гидролиза [11], с содержанием ГК 82.0%, СЭ 35.5%, и Mw 72.6 КД (НМП); коммерческий цитрусовый пектин (LM-12CG, CP Kelco, Wilmington USA), с содержанием ГК 69.0 %, СЭ 31.0 %, Mw 212 КД (НМЦ). Концентрат LgC, выделенный из молочной сыворотки [46], содержал: 37.35% β -LgA, 52.9% β -LgB и 9.7% α -LgA (обозначенный как LgC). В качестве ЛВ был использован пироксикам (PX).

Микрокапсулы с НМ- пектинами также получали методом двухстадийного формирования в эмульсии масло в воде в присутствии противоионов натрия, как описано в работах [128–130, 149]. Эмульсии хранили при комнатной температуре в течение 24 часов, затем проводили оценку устойчивости по объему, количеству микрокапсул в 1мл, размеру и распределению частиц микроскопическим методом. 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 представлен объемно-весовым средним диаметром d_{43} . Все измерения были выполнены на двух свежеприготовленных образцах; результаты представлены как средне-вычисленные.

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. 3.2.1 и 3.2.2). Как и следовало ожидать, объем эмульсии 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 VM-пектинов, устойчивость и захват ЛВ зависела 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 3.2.1

Характеристика микрокапсул в системе LgC/НМП, полученных

в присутствии NaCl, pH=4-5

Весовое соотношение биополимеров, г/г	Молярное соотношение биополимеров, моль/моль	Объемы эмульсии на второй день, мл	Содержание пироксикама в микрокапсулах, %
1:3	1	6.0	53.0
1:2	2	4.2	33.2
1:1	4	8.5	19.3
2:1	8	13.2	24.4
3:1	13	24.2	32.0
5:1	20	21.0	40.9
10:1	40	17.6	50.3

Если микрокапсулы с высокой стабильностью формировались при молярном соотношении LgC/НМП 13, то степень захвата ЛВ была больше у микрокапсул при молярном соотношении LgC/НМП 40.

Таблица 3.2.2

**Характеристика микрокапсул в системе LgC/НМЦ, 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, %
3:1	12	25.4	47.19
5:1	20	21.6	62.74
10:1	40	19.0	64.13

Высокая степень захвата ЛВ была также у микрокапсул с преобладающей долей пектина, который формировал плотный слой крема.

Такой эффект наблюдался на примере микрокапсул, полученных на основе LgC/НМЦ при одинаковых соотношениях биополимеров (табл. 3.2.2).

Эмульсионные микрокапсулы НМЦ имели несколько высокий захват ЛВ по сравнению с НМП. Если с ростом доли протеинов в системе НМП от 13 до 40 моль увеличивалась адсорбция ЛВ от 32 до 50 %, то в системе НМЦ степень адсорбции ЛВ достигала 47.2 - 64.13 %. Увеличение доли пектина, в данной системе, привело к резкому спаду объема вторичной эмульсии. (Результаты этих исследований в данной работе не обсуждаются).

В табл. 3.2.3 представлена характеристика эмульсионных микрокапсул, полученных на основе комплексообразования НМ-яблочного пектина с LgC. Как видно, в отличие от микрокапсул НМП и НМЦ, стабильные микрокапсулы с высоким захватом ЛВ формировались в системе НМЯ в широком диапазоне соотношений биополимеров LgC/НМЯ (от 5 до 88), при этом степень адсорбции ЛВ оставалась высокой, с максимальным значением 69.0 при мольном соотношении LgC/НМП 18.

Таблица 3.2.3

**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

Для характеристики устойчивости, микрокапсулы суспендировали в воде на гомогенизаторе при 9000 об/мин. Количество микрочастиц и их размеры

определяли на микроскопе Motic type 102 M с помощью программы Motic Image Advanced 3.2, как описано ранее [128, 129].

На рис. 3.2.4 представлен график распределения частиц в изученных эмульсионных системах.

Как видно из рис.10, бимодальное распределение частиц с возрастанием соотношения КБМС/НМПП постепенно переходит в мономодальное. При соотношении биополимеров равном 30 наблюдаются две популяции микрочастиц. В точке максимумов средние размеры частиц составляют 5.5 и 7.5 мкм, причем доля второй популяции больше чем первой.

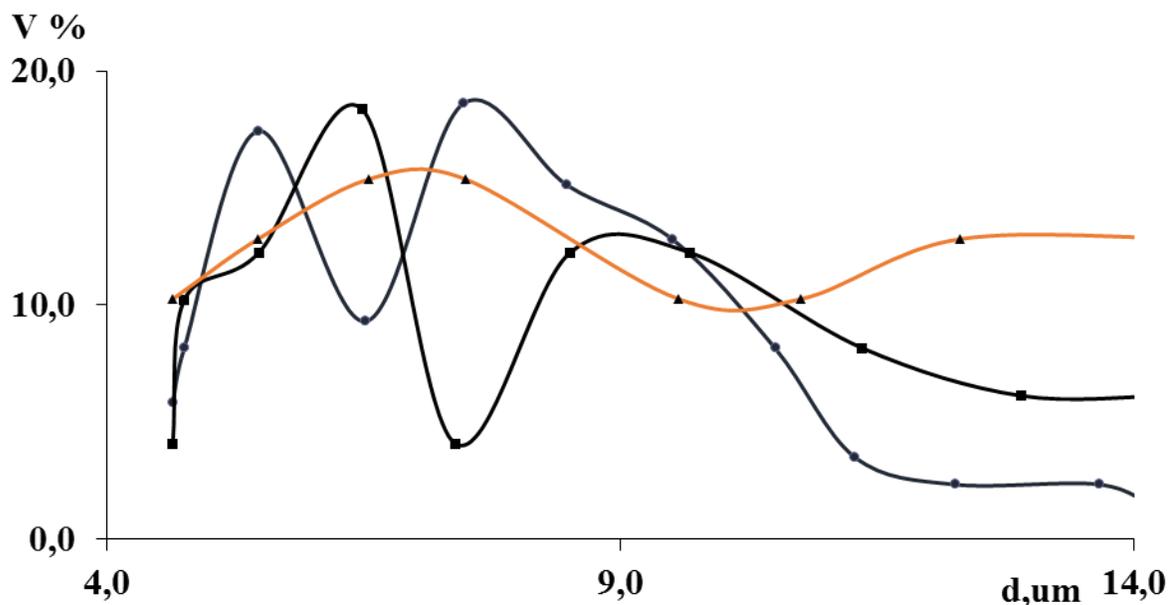


Рисунок 3.2.4 - Кривые распределения микрочастиц в эмульсионной системе лактоглобулин и НМ-подсолнечный пектин с соотношением ЛгС/НМПП: 18(●); 44 (■); 88 (▲).

При увеличении соотношения КБМС/НМПП размер частиц у обеих популяций несколько выше и составляет 6.5 и 9.0 мкм соответственно. А при максимально изученном соотношении биополимеров наблюдается одна популяция микрокапсул с максимальным средним размером 7.2 мкм.

На рис. 3.2.5 представлена зависимость количества частиц в 1 мл и средний размер частиц (D_{43}) для эмульсионных микрокапсул LgC/НМП.

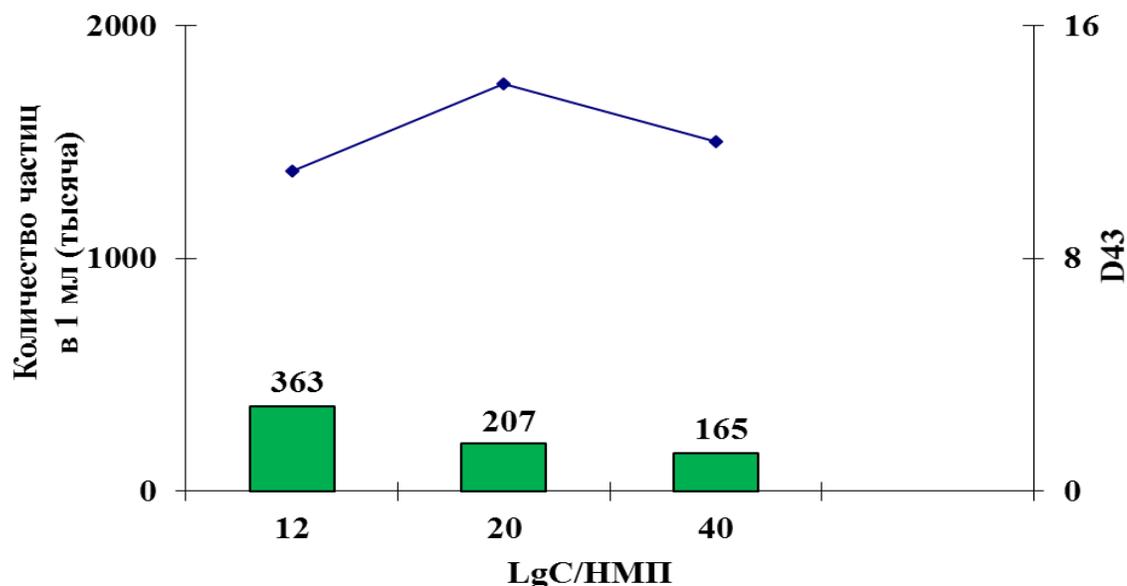


Рисунок 3.2.5 - Число частиц (N) в 1мл (колонки) и средний размер частиц (D_{43}) в зависимости от соотношения LgC/НМП.

Как видно из рис. 3.2.5, наибольшее количество частиц (363 000 ед.) в 1мл, имеющих небольшие размеры, формируется в системе LgC/НМП с соотношением 12, с возрастанием соотношения биополимеров количество частиц постепенно уменьшается.

Исследования [129] показали, что эмульсионные микрокапсулы, полученные в системе LgC/НМ-цитрусовый пектин при высоком содержании пектина, не стабильны, масляные капли, окруженные Lg, агрегируют при добавлении низкометилированного пектина с высоким зарядом цепи. С возрастанием фракции белка наблюдается увеличение частиц с меньшим диаметром. Максимальное количество частиц (497 830) в единице объема с минимальными размерами (5.3 мкм), наблюдается при соотношении LgC/НМЦ 20. Увеличение фракции белка выше этой точки, вероятно, приводит к компенсации заряда пектиновой цепи и уменьшению общего заряда на вторичном слое, вследствие чего нарушается стабильность эмульсии.

На рис. 3.2.6 показана зависимость количества частиц в 1 мл и их средний размер (D_{43} , мкм) от соотношения LgC/НМЯ.

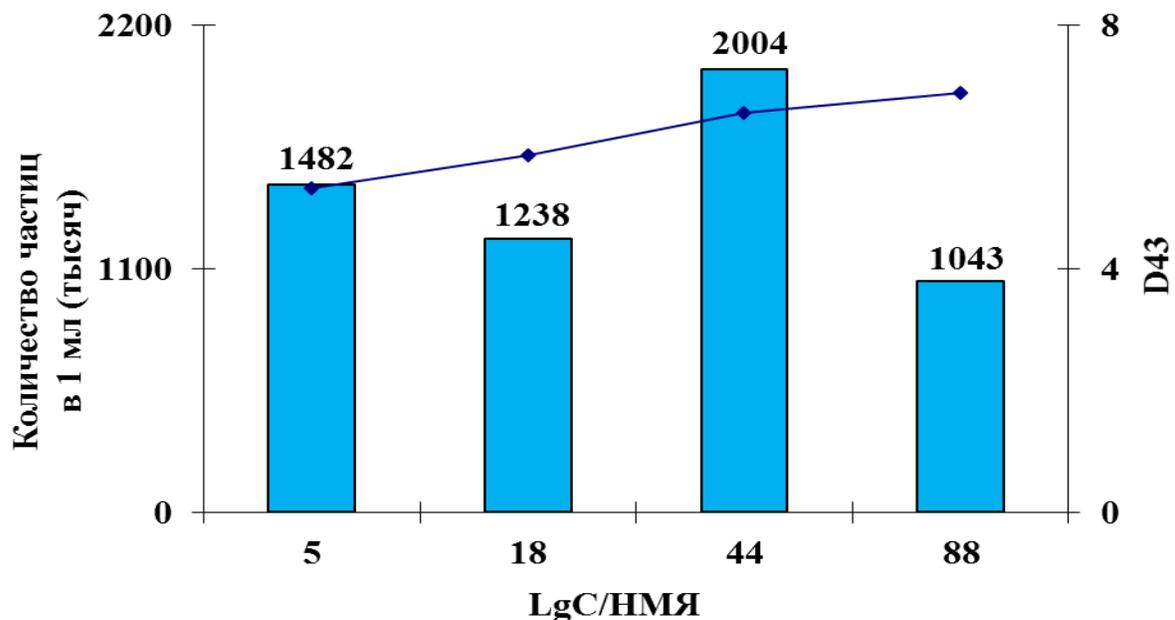


Рисунок 3.2.6 - Число частиц (N) в 1 мл (колонки) и их средний размер (D_{43}) в зависимости от соотношения LgC/НМЯ.

Как видно, из представленного рисунка лучшие результаты среди изученных пектинов были показаны для НМЯ-пектинов. При всех исследованных соотношениях (от 5 до 88) количество микрочастиц в 1 мл было более миллиона, наибольшее их количество было при соотношении LgC/НМЯ-44 моль.

Зависимость объемной доли и профили распределения микрочастиц от их размеры в эмульсионной системе лактоглобулин и НМ-яблочный пектин при соотношении LgC/НМЯ 44 в течение 10 дней приведена на рис. 3.2.7. Данный рисунок демонстрирует, что размеры частиц изменяются в пределах от 150 - 650 нанометров и стабилизируются в области 650 нм.

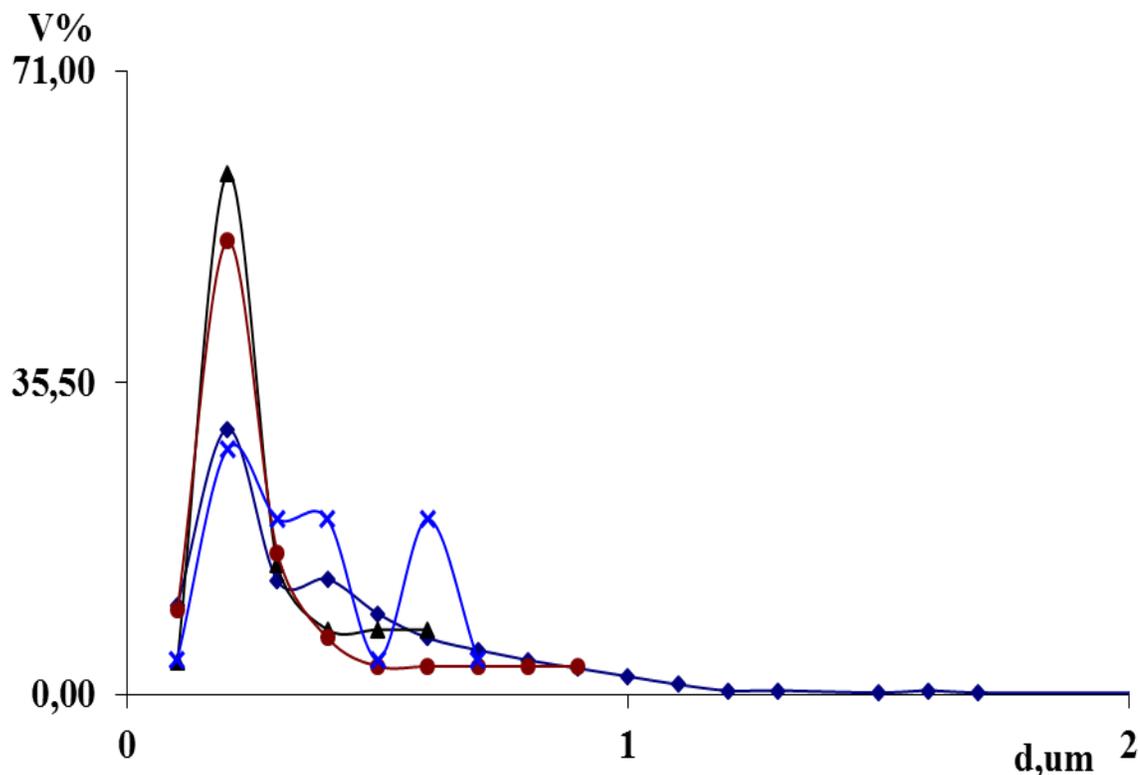


Рисунок 3.2.7 - Зависимость объемной доли и профили распределения микрочастиц от их размеров в эмульсионной системе лактоглобулин и НМ-яблочный пектин при соотношении LgC/НМП 44: на второй (■), 5 (▲), 7 (●) и на 10 (x) день.

Ранее [130], нами было показано, что наибольшее количество микрочастиц было также обнаружено для ВМ-пектинов из яблок: максимальное число частиц (1379167) с наименьшим диаметром (6.5 мкм) формировалось при молярном соотношении LgC/ВМЯ 22 только в узком интервале соотношений биополимеров.

В системе с ВМ-пектинами [150], эмульсии, вследствие добавления соли натрия, устойчивы за счет усиления эффективности длины пектиновой цепи, соответствующей поверхности микрокапсул, путем уменьшения полиэлектролитного набухания полимерных цепей и образования плотного центра покрытой поверхности. Однако в системе с НМ-пектинами, где плотность локального заряда высокая, требуется несколько большее количество

противоионов для частичного экранирования заряда, предотвращающего образование коацерватов между лактоглобулином, на поверхности масляных частиц и свободным пектином. В данном случае полное экранирование избытка отрицательных зарядов на поверхности вторичной эмульсии маловероятно.

Согласно авторам [118], физико-химические параметры пектина, в частности, степень метилэтерификации (СЭ) и степень распределения этих групп на пектиновой цепи (СР), определяют способность образования комплекса между пектином и белком. В данных исследованиях показано, что пектины с различными физико-химическими параметрами отличались по характеру процесса комплексообразования с β -Lg. ВМ-пектины имеющие одинаковую СЭ, но с разной СР: блочным (ВМБ) и случайным (ВМС) распределением метильных групп, отличались значением локальной плотности заряда, что в результате повлияло на способность образования комплекса между β -Lg и пектином при одних и тех же условиях и одинаковой ионной силе. Высокая плотность заряда ВМБ-пектинов, позволяет формировать комплексы при высокой ионной силе, по сравнению с ВМС пектинами, имеющими низкую локальную плотность заряда.

В этом аспекте НМ-пектины проявляют такую же способность как ВМБ-пектины - имеют высокую локальную плотность заряда и образуют комплексы с β -Lg, даже при высокой ионной силе растворов.

Кроме того, при добавлении достаточного количества пектина к вторичной эмульсии, предполагалось, что заряд образующихся частиц постепенно переходит от положительного к отрицательному, так могут быть получены кинетически устойчивые эмульсии, содержащие отрицательно заряженные (анионные) капли, как это показано для других типов эмульсионных систем [151,152]. Однако в нашем случае, с увеличением количества пектина такого эффекта не наблюдалось, поскольку увеличение концентрации пектина приводит к агрегации молекул НМП на поверхности слоя частиц, следовательно уменьшается количество частиц и увеличиваются их размеры.

При добавлении НМ-пектина с высокой плотностью заряда в системе происходит флокуляция микрочастиц, стабилизированных В-Lg, вследствие электростатического взаимодействия противоположно заряженных биополимеров и вытеснения ЛВ из микрочастиц в водную фазу. Высокомолекулярный НМ-пектин (в данном случае НМЦ) с длинной цепочкой в условиях низкого рН и ионной силы, находится в форме клубка [35] и не способен полностью покрыть эмульсионные частицы, содержащие РХ, и, адсорбируясь на их поверхности вызывает коагуляцию микрокапсул.

Хотя в эмульсионных НМП системах количество частиц с меньшим диаметром было значительно меньше, чем в системах с другими пектинами, однако в течение месяца они показали высокую устойчивость, вероятно, связанную с низким молекулярным весом пектина так же, как и для системы с НМЯ пектином.

Таким образом, в результате проведённых исследований нами найдены оптимальные условия получения стабильных микрокапсул в эмульсионной системе масло/вода при различных соотношениях LgC/НМ-пектин, с минимальным размером и максимальным количеством частиц в единице объёма, эффективно захватывающих ЛВ. Показано, что получение стабильной эмульсии с высокой степенью инкапсулирования ЛВ, зависит от типа пектина, плотности заряда, молекулярной массы, условий среды (рН и ионная сила раствора), соотношения биополимеров и их агрегирующей способности. Среди изученных пектинов, НМЯ пектин способен формировать стабильные эмульсии, эффективно захватывать ЛВ в широком диапазоне соотношений LgC/НМЯ.

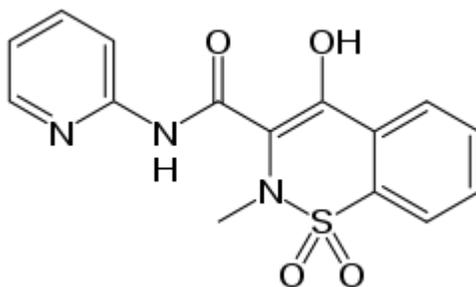
3.3. ПОЛУЧЕНИЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ЭМУЛЬСИОННЫХ МИКРОКАПСУЛ LgC/ПЕКТИН

Разработанные белок - полисахаридные комплексы в виде эмульсионных микрокапсул на основе различных пектинов и LgC, могут найти применение в

качестве биополимерного триггера для контролируемого высвобождения ЛВ или питательных веществ на определенной стадии процесса пищеварения, например, при изменении рН или доставки пищи из желудка в тонкий кишечник, где биополимерный комплекс может подвергаться разрушению ферментами. В реальных условиях пищеварительного тракта ситуация может значительно усложниться, где носитель ЛВ подвергается дополнительному взаимодействию со слюной, желудочным соком и различными видами межфазного взаимодействия с участием низкомолекулярных поверхностно-активных веществ (фосфолипиды, соли желчных кислот и т. д.). Поэтому, для применения СДЛ требуется детальное исследование всех процессов протекающих во время пищеварения.

Разработка СДЛ на основе белок-полисахаридного комплекса, как биосовместимых полимеров, в наноразмерных и макроскопических поверхностях и в дисперсных системах, будучи компонентами пищи, вероятно, в течение ближайших нескольких лет достигнет колоссальных успехов.

В данной части работы обсуждаются кинетические параметры адсорбции модельного ЛВ–пироксикама на разработанных СДЛ, в виде эмульсионных микрочастиц, и его высвобождение. Пироксикам (4-гидрокси-2-метил-N-(2-пиридирил)-2Н-1,2- бензотиазин-3-карбоксамид 1,1-диоксид) слабо растворим в спиртах и в водных щелочных растворах. Он проявляет слабокислотный характер за счет 4-гидрокси протона (pK_a 5,1) и слабо основного за счет пиридинового азота (pK_a 1.8). Он имеет следующую структуру:



На рис. 3.3.1 представлена зависимость адсорбции ЛВ от соотношения белок/пектин для разработанных эмульсионных микрокапсул с различными пектинами.

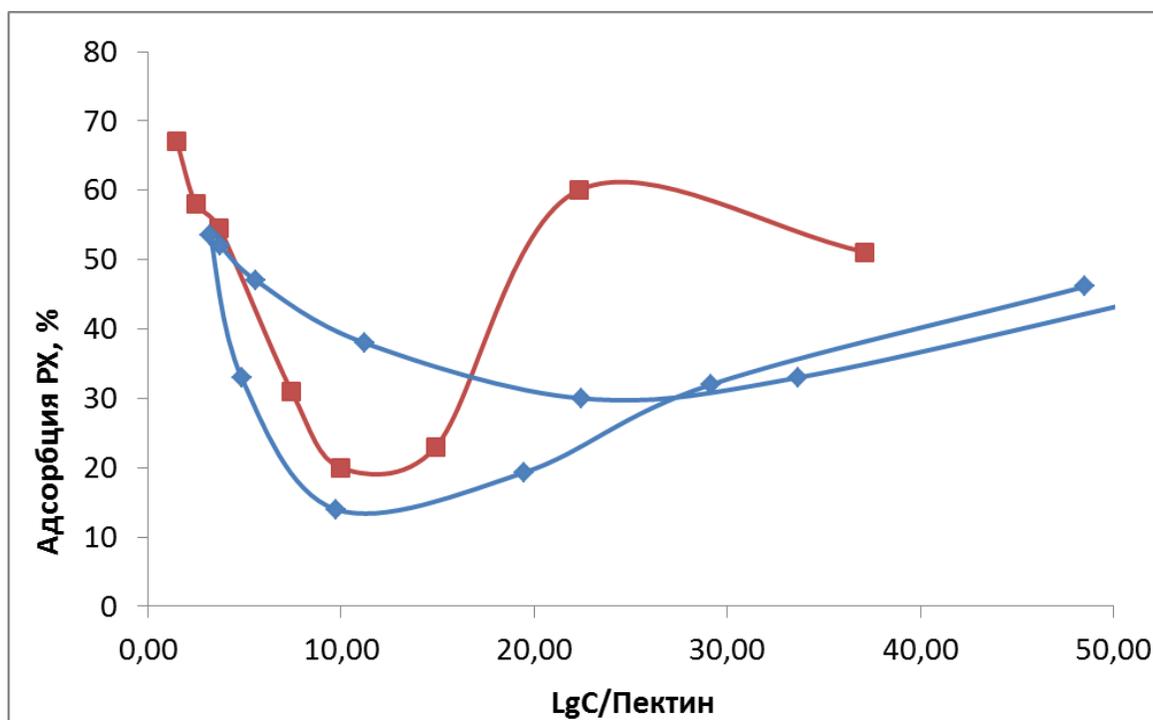


Рисунок 3.3.1 - Зависимость адсорбции модельного ЛВ (РХ) от соотношения LgC/ пектин для эмульсионных микрокапсул, полученных с различными пектинами: VM-яблочный (■), НМ-подсолнечный (●) и VM-цитрусовый (▲).

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 LgC/VMЦ от 10 до 18 моль. Например, для яблочного пектина оптимальное соотношение, имеющее максимальный захват ЛВ, находится в пределах 20-30 моль 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 адсорбированный ЛВ. Только пектин, имеющий высокие плотность заряда и молекулярную массу, может образовывать прочный комплекс на поверхности масляных капель с адсорбированным LgC, в результате происходит вытеснение гидрофобного компонента и агрегация частиц.

Было изучено влияние рН и ионной силы среды, в процессе формирования эмульсионных микрокапсул LgC/пектин, на степень захвата РХ. В качестве примера, на рис.3.3.2 приведен график зависимости степени захвата РХ микрокапсулами от рН среды.

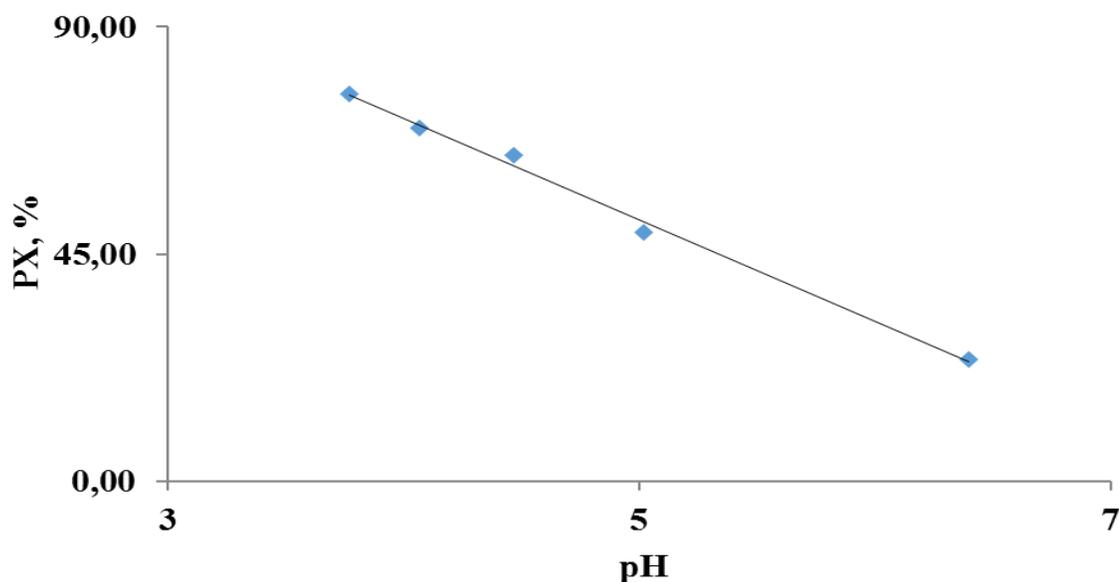


Рисунок 3.3.2 - Зависимость степени адсорбции ЛВ (РХ) от рН эмульсии в системе LgC/НМЯ.

Как видно из рис. 3.3.2 степень адсорбции РХ прямолинейно уменьшается с увеличением рН раствора. На первый взгляд уменьшение степень адсорбции РХ по прямой может быть за счет повышения растворимости, так и за счет электростатических взаимодействий с биополимерами. Оптимальная область значения рН, при котором были получены стабильные эмульсионные микрокапсулы находится в пределах 3.7 - 4.5.

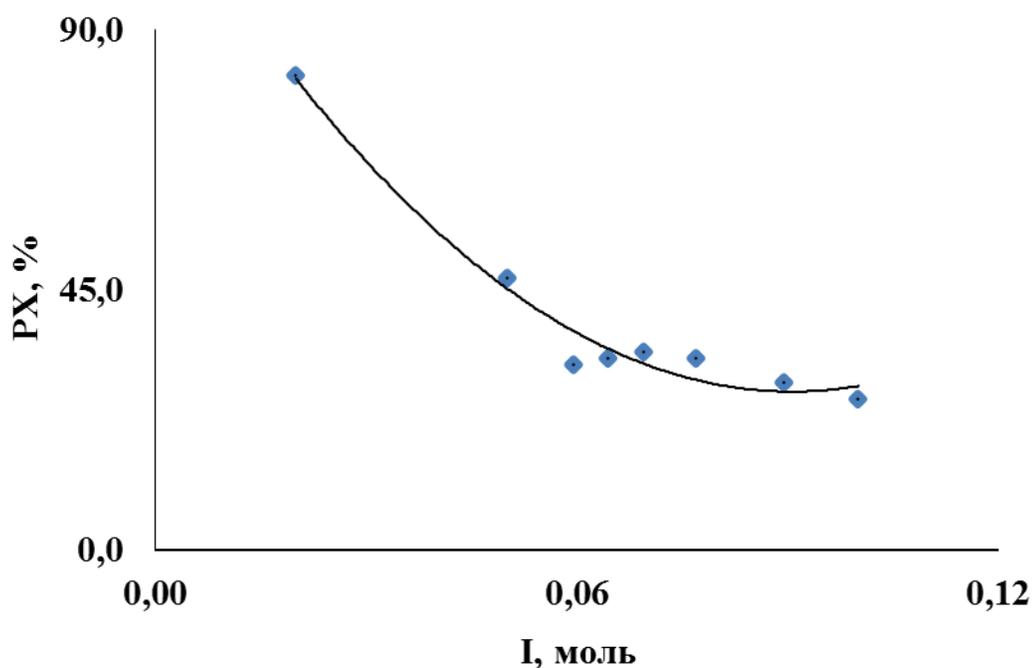


Рисунок 3.3.3 - Зависимость степени адсорбции ЛВ (PX) от ионной силы в процессе приготовления эмульсии в системе LgC/НМЯ.

Зависимость степени адсорбции ЛВ (PX) от ионной силы в процессе приготовления эмульсии представлена на рис. 3.3.3. С увеличением ионной силы степень адсорбции PX резко уменьшается от 20 до 60 мМолей. С возрастанием ионной силы среды происходит разрушение полиэлектролитного комплекса. Эмульсионные микрокапсулы на основе изученных биополимеров готовили в растворе с ионной силой равной 25 мМоль и рН 4.6-4.9.

Существует ряд объяснений поведению биополимерных полиэлектролитов при формировании эмульсионных систем. Во-первых, конформация молекул β -лактоглобулина в водных растворах при низких значениях рН позволяет адсорбироваться белковым глобулам на поверхности масла с образованием положительно заряженных капель. В этом случае при низкой концентрации пектина на поверхности протеин-капли масла, частично предотвращает проникновение ЛВ во внешний раствор.

Во другом случае, на вторичном слое при высокой концентрации пектина, где эмульсионные капли и молекулы пектина противоположно заряжены, следовательно, молекулы пектина электростатически притягиваются к поверхности капель. Избыток отрицательно заряженных карбоксильных групп (РК $\sim 3,2$) при рабочем рН 3,7-4,5, и частично ионизированных с ионами натрия, способствуют формированию стабильных капель, которые прочно формируют стабильных масляных капель, содержащих ЛВ.

При высоких значениях рН (5.0), где капельки эмульсии покрыты только нейтральной мембраной β -лактоглобулина, вполне возможно, что NaCl не может экранировать электростатические взаимодействия между каплями, что позволяет приблизиться им друг к другу, тем самым способствовать образованию дисульфидных связей внутри капли [153]. Это внутри-молекулярное электростатическое экранирование не дают пектиновым молекулам эффективно покрыть вторичную поверхность и предотвратить флокуляцию [3].

Увеличение рН выше изоэлектрической точки (ИТ) белка нарушает такую структуру, которая была показана с помощью ИК Фурье с использованием жидкостной кюветы с различной толщиной слоя (НПВО) и приставкой [154], при формировании многослойного покрытия с участием поли L-лизина (PLL) и глобулярных белков, приводящих к увеличению ионизации карбоксильных групп пектина, вследствие этого PLL вытеснят глобулярный белок, сокращая при этом вторичный слой. Дальнейшее добавление пектина способствовало увеличению количества растворимых комплексов и росту индекса эмульгирования.

Таким образом, 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. В отличие от всех изученных пектинов, яблочные пектины, обладающие как электростатическими, так и гидрофобными участками, являются привлекательными для стабилизации вторичного слоя эмульсии в системе белок/пектин. Для эффективного захвата ЛВ, кроме перечисленных факторов, важным параметром для формирования микрокапсул является выбор ионной силы среды.

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

Цель данной части работы заключалась в исследовании кинетики высвобождения ЛВ из разработанных нами систем доставки ЛВ, полученных на основе природных биополимеров, пектина и лактоглобулинов изолированных из молочной сыворотки, в условиях моделирующих желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), с учетом диффузии и ферментативного разложения. Для этого, были разработаны СДЛ в виде эмульсионных микрокапсул на основе комплексообразования LgC с различными пектинами на поверхности раздела М/В для транспорта мало растворимого ЛВ в кишечное пространство.

Далее приводятся результаты кинетических исследований для микрокапсул, полученных на основе LgC и яблочного НМ-пектина. На рис. 3.4.1 представлена зависимость кинетических кривых, выхода РХ (M_t/M_0) от времени для эмульсионных микрокапсул LgC/НМЯ в опытах *in vitro*. Кинетические кривые имеют линейный характер, выход РХ достигает устойчивого предела, зависящего от соотношения биополимеров, главным образом, для соотношения LgC/НМЯ 18 пектина.

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

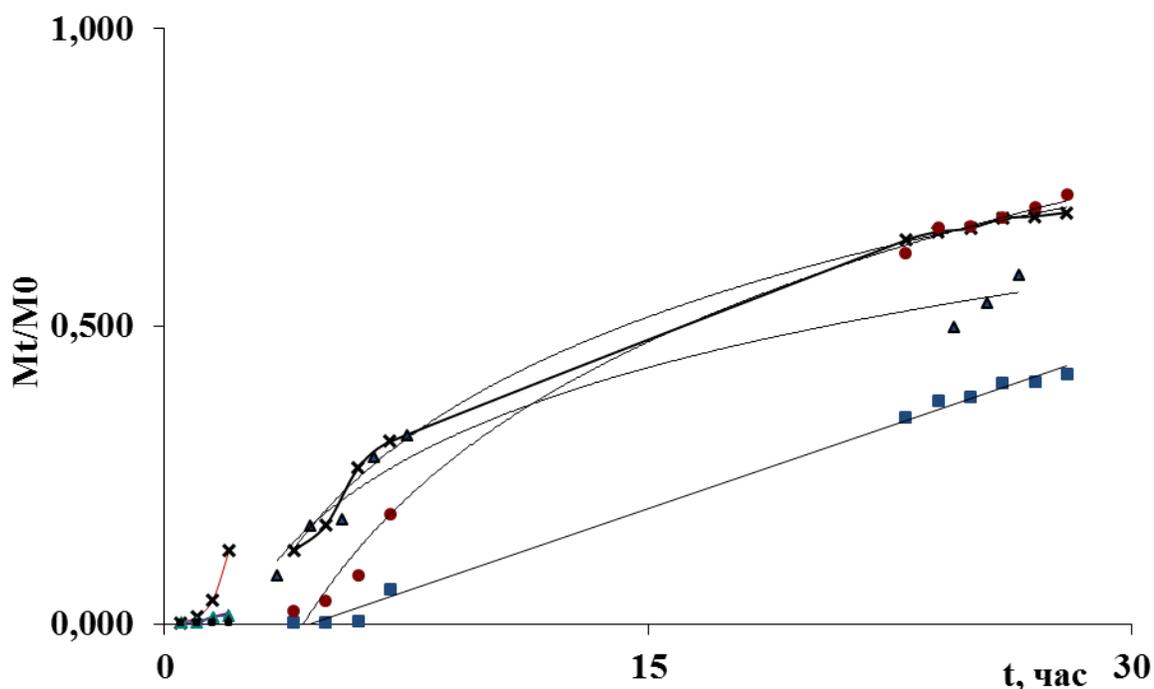


Рисунок 3.4.1 - Зависимость выхода РХ (M_t/M_0) от времени для эмульсионных микрокапсул при различных мольных соотношениях Lgc/НМЯ:

5.0(▲); 18.0(■); 44.0 (×) и 88.0(●).

принимают линейную форму (подчиняются кинетике реакции нулевого порядка) и в первом приближение описываются линейными уравнениями с коэффициентами корреляции более 0.97 (табл. 3.4.1).

Кинетические кривые, за исключением кривых с соотношением Lgc/НМЯ 18, описываются логарифмическими уравнениями. Для микрокапсул Lgc/НМЯ при повышении соотношения компонентов от 5.0, 44.0, до 88.0 с увеличением фракции лактоглобулинов выход ЛВ из эмульсионных микрочастиц возрастает пропорционально коэффициентам 0.223, 0.2955 и 0.381, соответственно.

Несмотря на высокое содержание белка, микрокапсулы не подвергались воздействию фермента, присутствующего в составе исследуемой среды. Кинетические кривые в условиях кишечника, за исключением начального периода, имеют линейный характер в большом интервале времени (около 30 ч).

Таблица 3.4.1

**Линейные уравнения для кинетики выхода РХ из эмульсионных
микрокапсул LgC/НМЯ пектина**

Маркер линии	Соотношение Lgc/НМЯ	Тип уравнения	Коэффициент корреляции
(▲)	5.0	$M_t/M_o = 0.223 \ln t - 0,1716$	0.9718
(■)	18.0	$M_t/M_o = 0.0185t - 0,084$	0.9955
(×)	44.0	$M_t/M_o = 0.2955 \ln t - 0,2843$	0.9975
(●)	88.0	$M_t/M_o = 0.381 \ln t - 0,5555$	0.9940

Несмотря на высокое содержание белка, микрокапсулы не подвергались воздействию фермента, присутствующего в составе исследуемой среды. Кинетические кривые в условиях кишечника, за исключением начального периода, имеют линейный характер в большом интервале времени (около 30 ч). Микрокапсулы с соотношением LgC/НМЯ 88 проявляют начальный «взрывной» эффект переходящий в прямолинейный выход ЛВ. Во всех случаях за 24 ч инкубации, происходит постепенное разрушение полимерного покрытия, но с разной скоростью, что наблюдается на кинетических кривых выхода ЛВ.

Получение таких комплексов основывалось на идее создания целенаправленной системы доставки лекарственного средства, которая обеспечит целостность его в физиологической среде желудка и тонкой кишки. Механизм действия такой системы основан на том, что эмульсионные микрочастицы несущие ЛВ, стабилизированные комплексом белок-пектин, способны защитить ЛВ от воздействия кислой среды и ферментов верхней части ЖКТ. Многослойный LgC-пектиновый комплекс, в свою очередь, располагаясь на поверхности масляных микрочастиц, будет препятствовать набуханию пектинового слоя и быстрому высвобождению ЛВ. Предполагается, что такой биополимерный слой

разлагается в толстом кишечнике, откуда ЛВ поступает в кровяное русло. Однако, следует учитывать, что скорость высвобождения лекарства будет также зависеть от многих факторов, в том числе от типа пектина и пектин-протеинового комплекса, плотности упаковки полимерного слоя и структуры самих биополимеров, как было показано в наших предыдущих исследованиях [144,155,156].

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

Сложность количественного описания кинетики высвобождения ЛВ связана с необходимостью учета специфики состояния полимерной композиции, т.е. ее структуры и морфологии. Среди научных и патентных публикаций в последние годы появились работы, посвященные исследованию транспорта в терапевтических матрицах, полученных в виде сферических микрочастиц [157–162].

В технологии конструирования СДЛ уровень диффузии растворенного вещества важен для определения количества высвобожденного ЛВ или транспорта питательных веществ. Диффузия инкапсулированных ЛВ зависит от множества факторов, включая морфологию сети, состав и набухание полимеров, содержание воды, концентрацию растворенных веществ и др. В случае с микрокапсулами диффузия ЛВ также зависит и от толщины вторичного слоя, образующегося цепочками пектина [160–162]. Эти основополагающие факторы могут комбинироваться, вызывая химическое или физическое влияние, замедляющее диффузию растворенного вещества (схема 3.5.1).

Несмотря на важность оценки высвобождения ЛВ из недавно разработанных СДЛ в форме сферических микрочастиц, к настоящему времени математических моделей, описывающих высвобождение ЛВ из таких систем, не так много.

Основная причина, вероятно, состоит в полидисперсности эмульсионных микрочастиц [158–162].

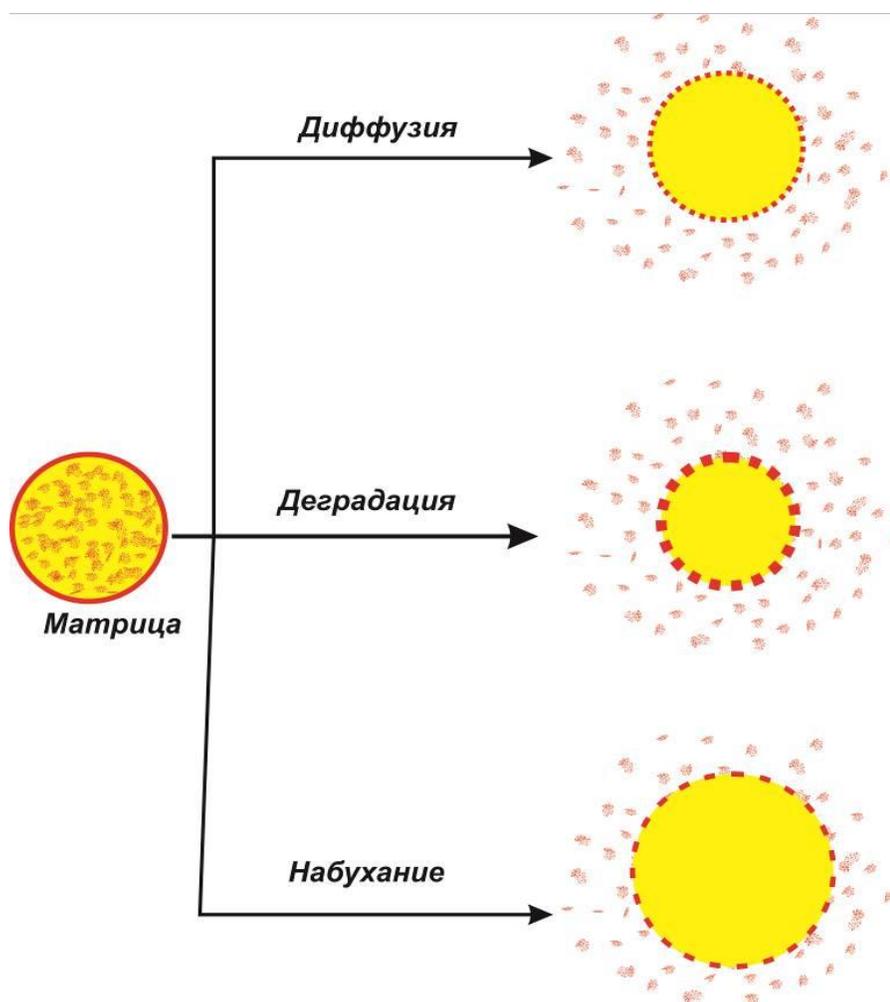


Схема 3.5.1 - Основные механизмы высвобождения ЛВ из полимерного матрикса

Несмотря на важность оценки высвобождения ЛВ из недавно разработанных СДЛ в форме сферических микрочастиц, к настоящему времени математических моделей, описывающих высвобождение ЛВ из таких систем, не так много. Основная причина, вероятно, состоит в полидисперсности эмульсионных микрочастиц [158–162].

Одно из преимуществ использования микрокапсул в том, что высвобождение активных ингредиентов можно контролировать во времени и условия среды. Множество механизмов высвобождения активного ингредиента было предложено для микрокапсул, в том числе через механизм диффузии, растворения, плавления и прессования. Кроме того, важно учитывать такие свойства, как проницаемость, температуру и механическую стабильность, и реактивность различных ингредиентов (например, pH и ионную силу), чтобы обеспечить эффективное высвобождение инкапсулированных веществ. Фазовые переходы, инкапсулирующие материалы, такие как стеклование, кристаллизация, и распад, также имеют важное значение, поскольку они определяют диффузию и выход летучих ингредиентов [160–162].

Для оценки количества высвобожденного ЛВ из разработанных СДЛ в форме эмульсионных микрокапсул LgC/НМЯ-пектина мы использовали эмпирическую модель высвобождения ЛВ, разработанную Хопфенбергом (Hopfenberg) [163], описывающую процесс высвобождения ЛВ через механизм эрозии полимерного слоя, при условии, что в целом релиз происходит в соответствии с уравнением нулевого порядка. Этот механизм является по существу комбинацией процессов растворения, релаксации полимерного матрикса и процессов эрозии / деградации на поверхности вторичного слоя. Таким образом, это эмпирическое уравнение соответствующим образом более подходящее для эмульсионных микрочастиц LgC/НМЯ-пектина, так как эта модель предполагает, что скорость высвобождения регулируется растворением и процессами деградации на поверхности микрочастиц. Аналогичная модель также была предложена Хиксон и Кровеллом [164]. Предполагается, что сокращение сферических микрокапсул пропорционально кубическому корню его объема. Для сферической геометрии частиц математическое уравнение записывается в виде:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_{\text{ero},0} t}{C_0 R} \right]^3 \quad (3.5.1)$$

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

Учитывая, что механизм высвобождения ЛВ зависит от структуры полимерной композиции, ее физического состояния, которые в свою очередь зависят от соотношения биополимеров, проводили оценку механизма диффузии ЛВ по уравнению Корсмейер-Ритгер-Пеппаса [165,166] :

$$M_t/M_\infty = k_I t^n \quad (3.5.2)$$

где k_I переменная константа, n константа характеризующая коэффициент диффузии и механизм транспорта ЛВ. Это уравнение используется для оценки совместного (парного) вклада диффузии, подчиняющегося закону Фика и высокоэластичной релаксации полимерной системы. При $n=0.5$ она диффузионная, при $n>0.5$ показывает аномальный транспорт, не подчиняющийся закону Фика, при $n=1.0$ и больше предполагает релаксационно-контролируемый транспорт, или так называемый «случай II» .

Значения параметров $k_{\text{ero},0}$, C_0 , R в уравнения (3.5.1) и k_I , n уравнения (3.5.2), полученные таким образом, для скорости высвобождения РХ из широкого ряда эмульсионных микрокапсул LgC/НМЯ-пектина, приводятся в табл. 3.5.1.

Анализируя механизм высвобождения, с использованием полученных результатов (рис. 3.3.1 и табл. 3.5.1), не принимая во внимание механизм транспорта РХ в желудке, можно сделать вывод, что десорбция РХ в условиях среды кишечника (рН 6.4) во всех изученных системах носит аномальный характер ($n>0.68$), не подчиняющийся закону Фика.

Таблица 3.5.1

Значения постоянных для скорости высвобождения РХ из широкого ряда эмульсионных микрокапсул LgC/НМЯ-пектина, полученные из уравнений (3.5.1) и (3.5.2)

LgC/НМЯ, моль/моль	РХ, %	Исходная конц. РХ C ₀ , мг/см ³	Радиус частиц, R, см	tgK ₀	(tgK ₀) ^{1/3}	Ke ₀ , 10 ³ мг/см ² мин	значение n из уравнения 2	
							pH 1.5	pH 6.4
88	75.28	0.419	0.00015	0.0011	0.103228	6.48	0.524	0.990
44	60.56	0.334	0.00017	0.0024	0.133887	7.61	0.930	1.290
18	66.04	0.287	0.00012	0.0018	0.121644	4.19	0.179	0.720
10	63.43	0.320	0.00017	0.0016	0.116961	6.36	0.620	0.680
5	40.76	0.219	0.0002	0.0019	0.123856	5.41	0.590	0.905

Параметры уравнения (3.5.1) и (3.5.2) получены из соответствующих графиков, логарифмической зависимости кумулятивного процента высвобождения РХ в зависимости от времени с коэффициентами достоверности $R^2 = 0,95-0,98$ для серии микрокапсул с различными степенями адсорбции РХ. Параметры для постоянной скорости высвобождения, $K_{ero}, 0$, полученные из уравнения (3.5.1) для системы LgC/НМЯ-пектин 18 в условиях кишечника были минимальными и составляли $4,9 \cdot 10^{-3}$ мг/см²мин, что характеризует количественный выход ЛВ в кишечном пространстве за минуту. Показатель механизма диффузии, найденный из уравнения (3.5.2), показывает, что во всех случаях диффузия РХ происходит за счет совместного вклада процессов диффузии ЛВ и эрозии вторичного слоя на поверхности эмульсионных микрокапсул. Это свидетельствует о том, что высвобождение ЛВ из разработанных СДЛ контролируется более чем одним процессом. Во всех случаях выход РХ подчиняется кинетики высвобождения нулевого порядка.

Таким образом, разработанные системы микроносителей на основе эмульсионных микрокапсул LgC/НМЯ-пектин продемонстрировали кинетику высвобождения исследуемого модельного ЛВ-пироксикама, соответствующую кинетики нулевого порядка, который может быть использован в транспорте ЛВ с контролируемым и его последующим медленным высвобождением. Скорость высвобождения лекарственного средства из данной системы является очень низкой, и может управляться путем выбора соотношения биополимеров для любого активного ингредиента. 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 [146].

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. 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 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.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tolstoguzov V. Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, foods, and beverages. // *Crit. Rev. Biotechnol.* - 2002. - vol. 22, - № 2. - P. 89–174.
2. Dickinson E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems // *Food Hydrocoll.* - 2003. - vol. 17, - № 1. - P. 25–39.
3. Dickinson E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers // *Food Hydrocoll.* - 2009. - vol. 23, - № 6. - P. 1473–1482.
4. Guzey D., Kim H.J., McClements D.J. Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by β -lactoglobulin–pectin membranes // *Food Hydrocoll.* - 2004. - vol. 18, - № 6. - P. 967–975.
5. Guzey D., McClements D.J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. // *Adv. Colloid Interface Sci.* - 2006. - vol. 128-130. - P. 227–248.
6. Dickinson E. et al. Effect of high-methoxy pectin on properties of casein-stabilized emulsions // *Food Hydrocoll.* - 1998. - vol. 12, - № 4. - P. 425–432.
7. Dickinson E. Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures // *Food Hydrocoll.* - 2011. - vol. 25, - № 8. - P. 1966–1983.
8. Ganzevles R.A. et al. Modulating surface rheology by electrostatic protein/polysaccharide interactions. // *Langmuir.* - 2006. - vol. 22, - № 24. - P. 10089–10096.
9. Liu L. et al. Dynamic surface pressure and dilatational viscoelasticity of sodium caseinate/xanthan gum mixtures at the oil–water interface // *Food Hydrocoll.* - 2011. - vol. 25, - № 5. - P. 921–927.
10. Lutz R. et al. Release of electrolytes from W/O/W double emulsions stabilized by a soluble complex of modified pectin and whey protein isolate. // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* - 2009. - vol. 74, - № 1. - P. 178–185.

11. Matalanis A., Jones O.G., McClements D.J. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds // *Food Hydrocoll.* - 2011. - vol. 25, - № 8. - P. 1865–1880.
12. McClements D.J. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. // *Biotechnol. Adv.* - 2006. - vol. 24, - № 6. - P. 621–625.
13. McClements D.J., Decker E.A., Weiss J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. // *J. Food Sci.* - 2007. - vol. 72, - № 8. - P. R109–24.
14. Murray B.S. et al. Stabilization of foams and emulsions by mixtures of surface active food-grade particles and proteins // *Food Hydrocoll.* - 2011. - vol. 25, - № 4. - P. 627–638.
15. Bouyer E. et al. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field // *Int. J. Pharm.* - 2012. - vol. 436, - № 1-2. - P. 359–378.
16. Guzey D., McClements D.J. Impact of electrostatic interactions on formation and stability of emulsions containing oil droplets coated by beta-lactoglobulin-pectin complexes. // *J. Agric. Food Chem.* - 2007. - vol. 55, - № 2. - P. 475–485.
17. Jourdain L.S. et al. Mixed layers of sodium caseinate + dextran sulfate: influence of order of addition to oil-water interface. // *Langmuir.* - 2009. - vol. 25, - № 17. - P. 10026–10037.
18. Katsuda M.S. et al. Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with beta-lactoglobulin and pectin. // *J. Agric. Food Chem.* - 2008. - vol. 56, - № 14. - P. 5926–5931.
19. Moreau L. et al. Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by beta-lactoglobulin-pectin membranes. // *J. Agric. Food Chem.* - 2003. - vol. 51, - № 22. - P. 6612–6617.
20. Мухидинов, З.К. Халиков Д.Х. Пектин - лечебно-профилактический продукт для здоровых и больных. - Душанбе: НПИЦентр, 2005. – 60 с.

21. Willats W.G., Knox J. - P., Mikkelsen J.D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel // *Trends Food Sci. Technol.* - 2006. - vol. 17, - № 3. - P. 97–104.
22. O'Neill, M.A. York W.S. The composition and structures of primary cell walls // *Plant Cell Wall*, - vol. 8 / ed. Rose J.K.C. - Boca Raton, FL: Blackwell, 2003. - P. 1–54.
23. Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. // *Curr. Opin. Plant Biol.* - 2008. - vol. 11, - № 3. - P. 266–277.
24. Vincken J.- - P. If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture // *Plant Physiol.* - 2003. - vol. 132, - № 4. - P. 1781–1789.
25. Fishman M.L. et al. Global structures of high methoxyl pectin from solution and in gels. // *Biomacromolecules.* - 2007. - vol. 8, - № 2. - P. 573–578.
26. Muhidinov Z.K. et al. Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of different pectins // *Polym. Sci. Ser. A.* - 2011. - vol. 52, - № 12. - P. 1257–1263.
27. Kirby A., Macdougall A., Morris V. Atomic force microscopy of tomato and sugar beet pectin molecules // *Carbohydr. Polym.* - 2008. - vol. 71, - № 4. - P. 640–647.
28. Мухидинов, З.К. Fisman, M.L. Горшкова, Р.М. Насриддинов, А.С. Халиков Д.Х. Молекулярная масса пектинов полученных в автоклаве // *Химический журнал Казахстана.* - 2008. - № 21. - С. 60–65.
29. Мухидинов, З.К. Fisman, M.L. Горшкова, Р.М. Насриддинов, А.С. Халиков Д.Х. Анализ ММР пектинов, полученных в автоклаве // *Химический журнал Казахстана.* - 2008. - № 21. - С. 83–87.
30. Muhidinov Z. et al. Physico-Chemical Characterization of Pectic Polysaccharides from Various Sources Obtained by Steam Assisted Flash Extraction (SAFE) // *Macromol. Symp.* - 2012. - vol. 317-318, - № 1. - P. 142–148.

31. Оводов Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах // Биоорганическая химия. - 2009. - т. 35, - № 3. - С. 293–310.
32. De Wit J.N. Developments in Dairy Chemistry-4 // Funct. Pro - p. whey proteins / ed. Fox P.F. - New York: Elsevier Applied Science, 1982. - P. 285–321.
33. Maas J.A.M., Tindemans G.W.E., Van D.V.F.L.M. Method for producing a whey protein concentrate enriched in beta-lactoglobulin and texture enhancer based thereupon for use in dairy products: - letter EP1613172A1 USA. Google Patents, - 2006.
34. Hambling, S. G.; McAlpine, A. S.; Sawyer L. β -Lactoglobulin // Adv. dairy Chem. Proteins / ed. Fox P.F. - London: Elsevier Applied Science, 1992. - P. 141–190.
35. Heine, W.E. Klein, P.D. Miyashita C. Method for Isolating Alpha-Lactalbumin from Whey: - letter WO 92/03468 USA. - 1992.
36. Uhrínová S. et al. Structural Changes Accompanying pH-Induced Dissociation of the β -Lactoglobulin Dimer // Biochemistry. - 2000. - vol. 39, - № 13. - P. 3565–3574.
37. Turhan K.N., Etzel M.R. Whey Protein Isolate and α -Lactalbumin Recovery from Lactic Acid Whey Using Cation-Exchange Chromatography // J. Food Sci. Blackwell Publishing Ltd, - 2004. - vol. 69, - № 2. - P. fep66–fep70.
38. Etzel, M.R. Helm, T.R. Vyas H.K. Methods and compositions involving whey protein isolates: - letter WO/ 2005/110112 USA. - 2005.
39. Зябрев А.Ф. Применение мембранных процессов при переработке молочного сырья. Мембранные системы «БИОКОН» // Переработка молока. - 2001. - т. 12. - С. 8–9.
40. Manso M.A. et al. Determination of vegetal proteins in milk powder by sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis: Interlaboratory study // J. AOAC Int. 481 NORTH FREDRICK AVE, STE 500, - GAITHERSBURG, MD 20877-2504 USA: AOAC INTERNATIONAL, 2002. - vol. 85, - № 5. - P. 1090–1095.

41. Мухидинов З.К., Джонмуродов А.С., Тешаев Х.И. и др. Концентрат лактоглобулинов из молочной сыворотки и методы их выделения // Журнал Здравоохранения Таджикистана. - 2009. - № 5. - С. 44–49.
42. Tolstoguzov V.B., Mzhel'sky A.I., Gulov V.Y. Deformation of emulsion droplets in flow // Colloid Polym. Sci. - 1974. - vol. 252, - № 2. - P. 124–132.
43. Antonov Y.A. et al. Liquid two-phase water—protein—polysaccharide systems and their processing into textured protein products // J. Texture Stud. - 1980. - vol. 11, - № 3. - P. 199–215.
44. McClements D.J. Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques. Second Edi. - Boca Raton, Florida: CRC Press, 2004. – 632 p.
45. Food Emulsifiers: Chemistry, Technology, Functional Properties and Applications, - volume 19 (Developments in Food Science) / ed. Charalambous G., Doxastakis G. - Amsterdam: Elsevier Science Publ., 1989. - № 19. - P. 570.
46. Krog N.J. Food emulsifiers and their chemical and physical properties // Food Emuls. / ed. Friberg S.E., Larsson K. - New York: Marcel Dekker Inc, 1997. - P. 141–188.
47. Calvo - P. et al. Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions // Colloid Polym. Sci. - 1997. - vol. 275, - № 1. - P. 46–53.
48. Garti N. What can nature offer from an emulsifier point of view: trends and progress? // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. - 1999. - vol. 152, - № 1-2. - P. 125–146.
49. McClements D.J. Gums and Stabilisers for the Food Industry 12 // Gums Stabilisers Food Ind. 12 / ed. Phillips G.O., Williams P.A. - Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2004. - P. 379–393.
50. Ganzevles R.A. et al. Chapter 13 Manipulation of Adsorption Behaviour at Liquid Interfaces by Changing Protein-Polysaccharide Electrostatic Interactions // Food

- Colloids Self-Assembly Mater. Sci. / ed. Dickinson E., Laser M.E. The Royal Society of Chemistry, - 2007. - P. 195–208.
51. Dickinson E. Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein–polysaccharide interactions // *Soft Matter*. - 2008. - vol. 4, - № 5. - P. 932.
 52. Galazka V.B., Dickinson E., Ledward D.A. Effect of high pressure on the emulsifying behaviour of β -lactoglobulin // *Food Hydrocoll.* - 1996. - vol. 10, - № 2. - P. 213–219.
 53. Dickinson E. The Role of Hydrocolloids in Stabilizing Particulate Dispersions and Emulsions // *Gums Stabilisers Food Ind.* / ed. Phillips G.O., Wedlock D.J., Williams P.A. - Oxford: IRL Press, 1988. - P. 249–263.
 54. Tolstoguzov V.B. Protein-Polysaccharide Interactions // *Food Proteins Their Appl.* / ed. Damodaran S., Paraf A. - New York: Marcel Dekker Inc, 1997. - P. 171–198.
 55. V.B. Tolstoguzov. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction // *Food Hydrocoll.* - 1991. - vol. 4, - № 6. - P. 429–468.
 56. Doublier J.-L. et al. Protein–polysaccharide interactions // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* - 2000. - vol. 5, - № 3-4. - P. 202–214.
 57. Grinberg V.Y., Tolstoguzov V.B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions // *Food Hydrocoll.* - 1997. - vol. 11, - № 2. - P. 145–158.
 58. Larichev N.A., Gurov A.N., Tolstoguzov V.B. Protein—polysaccharide complexes at the interphase. 1. Characteristics of decane/water emulsions stabilized by complexes of bovine serum albumin with dextran sulphate // *Colloids and Surfaces*. - 1983. - vol. 6, - № 1. - P. 27–34.
 59. Tokaev E.S. et al. Properties of oil/water emulsions stabilized by casein-acid polysaccharide mixtures // *Food / Nahrung*. - 1987. - vol. 31, - № 8. - P. 825–834.
 60. Dickinson E., Galazka V.B. Emulsion Stabilization by Protein-Polysaccharides Complexes // *Gums Stabilisers Food Ind.* / ed. Phillips G.O., Wedlock D.J., Williams P.A. - Oxford: IRL Press, 1992. - P. 351–361.

61. Dickinson E., Pawlowsky K. Effect of High-Pressure Treatment of Protein on the Rheology of Flocculated Emulsions Containing Protein and Polysaccharide // *J. Agric. Food Chem.* - 1996. - vol. 44, - № 10. - P. 2992–3000.
62. Galazka V., Dickinson E., Ledward D.. Emulsifying behaviour of 11S globulin *Vicia faba* in mixtures with sulphated polysaccharides: comparison of thermal and high-pressure treatments // *Food Hydrocoll.* - 1999. - vol. 13, - № 5. - P. 425–435.
63. Wang Y.F., Gao J.Y., Dubin P.L. Protein Separation via Polyelectrolyte Coacervation: Selectivity and Efficiency // *Biotechnol. Prog.* - 1996. - vol. 12, - № 3. - P. 356–362.
64. Masson P. Pressure denaturation of proteins // *High Press. Biotechnol.* / ed. Balny C. et al. Motrouge: Coloque INSERM/John Libbey Eurotext Lda, - 1992. - P. 89–99.
65. Silva J.L., Weber G. Pressure stability of proteins. // *Annu. Rev. Phys. Chem.* - 1993. - vol. 44. - P. 89–113.
66. Van Camp J., Huyghebaert A. High pressure-induced gel formation of a whey protein and haemoglobin protein concentrate // *LWT - Food Sci. Technol.* - 1995. - vol. 28, - № 1. - P. 111–117.
67. Funtenberger S., Dumay E., Cheftel J.C. Pressure-induced aggregation of β -lactoglobulin in pH 7.0 buffers // *LWT - Food Sci. Technol.* - 1995. - vol. 28, - № 4. - P. 410–418.
68. Gustin D. et al. Pectin gelification under HHP: Preparation and processing of solutions, analysis of gels obtained // *High Press. Res. Biosci. Biotechnol.* / ed. Heremans K. - Leuven: Leuven University Press, 1997. - P. 195–200.
69. Jegouic M. et al. Baric Oligomerization in α -Lactalbumin/ β -Lactoglobulin Mixtures // *J. Agric. Food Chem.* - 1997. - vol. 45, - № 1. - P. 19–22.
70. Suzuki T. High pressure effects on texture of the low methoxyl pectin gel // *High Press. Biosci. food Sci. Sym - p. Hayashi, R* / ed. Hayashi R. - Kyoto: San-Ei Suppan, 1993. - P. 205–209.

71. Kokufuta E. Functional immobilized biocatalysts // *Prog. Polym. Sci.* - 1992. - vol. 17, - № 4. - P. 647–697.
72. Serov A. V., Antonov Y.A., Tolstoguzov V.B. Isolation of lactic whey proteins in the form of complexes with apple pectin // *Food / Nahrung.* - 1985. - vol. 29, - № 1. - P. 19–30.
73. Liu L. et al. Pectin/zein beads for potential colon-specific drug delivery: synthesis and in vitro evaluation. // *Drug Deliv.* - 2006. - vol. 13, - № 6. - P. 417–423.
74. Muhidinov Z.K., Bobokalonov J., Teshaev K. Delivery System from biodegradable polymers for encapsulation of poor water soluble drugs // 4-th Int. Work. Spec. Polym. - Almaty, 2011. - P. 65.
75. Мухидинов З.К. и др. Пектин-зеиновые микросферы как носители лекарственных средств // *Химико-фармацевтический журнал.* - 2010. - т. 44, - № 10. - С. 20–24.
76. Girard M., Turgeon S.L., Gauthier S.F. Interbiopolymer complexing between β -lactoglobulin and low- and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration // *Food Hydrocoll.* - 2002. - vol. 16, - № 6. - P. 585–591.
77. Tainaka K. Study of Complex Coacervation in Low Concentration by Virial Expansion Method. I. Salt Free Systems // *J. Phys. Soc. Japan.* - 1979. - vol. 46, - № 6. - P. 1899–1906.
78. Tainaka K.-I. Effect of counterions on complex coacervation // *Biopolymers.* - 1980. - vol. 19, - № 7. - P. 1289–1298.
79. Zaleska H. Apple pectin complexes with whey protein isolate // *Food Hydrocoll.* - 2000. - vol. 14, - № 4. - P. 377–382.
80. Girard M., Turgeon S.L., Gauthier S.F. Quantification of the interactions between beta-lactoglobulin and pectin through capillary electrophoresis analysis. // *J. Agric. Food Chem.* - 2003. - vol. 51, - № 20. - P. 6043–6049.

81. Smidsrod O. Some Physical Properties of Alginates in Solution and in the Gel State. NTH NTNf's Inst. for Marin Biokjemi, 1973.-178 p.
82. Semenova M.G., Savilova L.B. The role of biopolymer structure in interactions between unlike biopolymers in aqueous medium // Food Hydrocoll. - 1998. - vol. 12, - № 1. - P. 65–75.
83. Podzimek S. Light Scattering, Size Exclusion Chromatography and Asymmetric Flow Field Flow Fractionation. - Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. - 372 p.
84. Round A.N. et al. Investigating the nature of branching in pectin by atomic force microscopy and carbohydrate analysis // Carbohydr. Res. - 2001. - vol. 331, - № 3. - P. 337–342.
85. De Kruif C., Tuinier R. Polysaccharide protein interactions // Food Hydrocoll. - 2001. - vol. 15, - № 4-6. - P. 555–563.
86. Glahn - P.-E. Hydrocolloid stabilization of protein suspensions at low pH // Prog. food Nutr. Sci. / ed. Phillips G.O., Wedlock D.J., Williams P.A. - Oxford: Pergamon Press, 1982. - P. 172–177.
87. Laurent M.A., Boulenguer P. Stabilization mechanism of acid dairy drinks (ADD) induced by pectin // Food Hydrocoll. - 2003. - vol. 17, - № 4. - P. 445–454.
88. Parker A., Boulenguer P., Kravtchenko T. Effect of the Addition of High Methoxy Pectin on the Rheology and Colloidal Stability of Acid Milk Drinks // Food Hydrocoll. SE 48 / ed. Nishinari K., Doi E. Springer US, - 1993. - P. 307–312.
89. Dickinson E., Pawlowsky K. Influence of κ -carrageenan on the properties of a protein-stabilized emulsion // Food Hydrocoll. 1998. - vol. 12, - № 4. - P. 417–423.
90. Nunes F.M., Coimbra M.A. Influence of polysaccharide composition in foam stability of espresso coffee // Carbohydr. Polym. 1998. - vol. 37, - № 3. - P. 283–285.

91. Schmitt C. et al. Effect of time on the interfacial and foaming properties of beta-lactoglobulin/acacia gum electrostatic complexes and coacervates at pH 4.2. // *Langmuir*. - 2005. - vol. 21, - № 17. - P. 7786–7795.
92. Mattison K.W., Brittain I.J., Dubin P.L. Protein-Polyelectrolyte Phase Boundaries // *Biotechnol. Prog.* - 1995. - vol. 11, - № 6. - P. 632–637.
93. Park J.M. et al. Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation // *Macromolecules*. 1992. - vol. 25, - № 1. - P. 290–295.
94. Weinbreck F. et al. Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. // *Biomacromolecules*. - 2003. - vol. 4, - № 2. - P. 293–303.
95. Kaibara K. et al. pH-Induced Coacervation in Complexes of Bovine Serum Albumin and Cationic Polyelectrolytes // *Biomacromolecules*. - 2000. - vol. 1, - № 1. - P. 100–107.
96. Da Silva F.L.B. et al. On the complexation of proteins and polyelectrolytes. // *J. Phys. Chem. B*. - 2006. - vol. 110, - № 9. - P. 4459–4464.
97. Xia J. et al. Electrophoretic and quasi-elastic light scattering of soluble protein-polyelectrolyte complexes // *J. Phys. Chem.* - 1993. - vol. 97, - № 17. - P. 4528–4534.
98. Weinbreck F. et al. Complexation of whey proteins with carrageenan. // *J. Agric. Food Chem.* - 2004. - vol. 52, - № 11. - P. 3550–3555.
99. Schmitt C. et al. Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* Taylor & Francis, 1998. - vol. 38, - № 8. - P. 689–753.
100. Seyrek E. et al. Ionic strength dependence of protein-polyelectrolyte interactions. // *Biomacromolecules*. - 2003. - vol. 4, - № 2. - P. 273–282.
101. Cooper C.L. et al. Polyelectrolyte–protein complexes // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* - 2005. - vol. 10, - № 1-2. - P. 52–78.

102. Wen Y., Dubin - P.L. Potentiometric Studies of the Interaction of Bovine Serum Albumin and Poly(dimethyldiallylammonium chloride) // *Macromolecules*. - 1997. - vol. 30, - № 25. - P. 7856–7861.
103. Islam A.M. et al. A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic // *Food Hydrocoll.* - 1997. - vol. 11, - № 4. - P. 493–505.
104. Drusch S. et al. Role of glycated caseinate in stabilisation of microencapsulated lipophilic functional ingredients // *Food Hydrocoll.* - 2009. - vol. 23, - № 3. - P. 942–948.
105. Jing H., Kitts D.. Chemical and biochemical properties of casein–sugar Maillard reaction products // *Food Chem. Toxicol.* - 2002. - vol. 40, - № 7. - P. 1007–1015.
106. Ganzevles R.A. et al. Structure of mixed beta-lactoglobulin/pectin adsorbed layers at air/water interfaces; a spectroscopy study. // *J. Colloid Interface Sci.* - 2008. - vol. 317, - № 1. - P. 137–147.
107. Мухидинов З.К. и др. Нерастворимые комплексы белков молочной сыворотки с различными пектинами // *ДАН РТ.* - 2008. - т. 51, - № 8. - С. 607–614.
108. Muhidinov Z.K. et al. Pectin- β -Lactoglobulin interaction in emulsion and gel for colon drug delivery system development // *EPNOE 2009, Polysaccharides as Source Adv. Mater.* - Turku/Abo, Finland, 2009. - P. 27.
109. Усманова С.Р. и др. Комплексы различных пектинов с белками молочной сыворотки при низких значениях рН методом турбидиметрии // *Вестник ТНУ. Спецвыпуск.* - 2011. - т. 6, - № 70. - С. 49–55.
110. Тешаев Х.И. и др. Взаимодействие низкометилованных пектинов с концентратом белков молочной сыворотки // *Вестник ВГУИТ.* - 2012. - т. 1, - № 51. - С. 158–164.
111. Voragen A.G.J. et al. Pectins // *Food Polysaccharides Their Appl.* / ed. Stephen A.M.- New York: Marcel Dekker, 1995. - P. 287–339.

112. Daas P.J.H. et al. Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endopolygalacturonase // *Carbohydr. Res.* - 1999. - vol. 318, - № 1-4. - P. 135–145.
113. Glahn P.E., Rolin C. Properties and food uses of pectin fractions // *Gums Stabilisers Food Ind.* - vol. 8 / ed. Phillips G.O., Williams P.A., Wedlock D.J. - Oxford: Oxford University Press, 1996. - P. 393–402.
114. Sperber B.L.H.M. et al. Influence of the overall charge and local charge density of pectin on the complex formation between pectin and β -lactoglobulin // *Food Hydrocoll.* - 2009. - vol. 23, - № 3. - P. 765–772.
115. *Emulsion Science and Technology* / ed. Tadros T.F. - Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. - 344 p.
116. Sherman P. *Emulsion science*,. - London: Academic Press, 1968. - 496 p.
117. Измайлова В.Н., Ребиндер Р.А. Структурообразование в белковых системах. -М.: Наука, 1974. - 267 с.
118. Williams R.A., Jia X. On-line measurement of aggregation and flocculation // *Hydrocolloids* / ed. Nishinari K. Elsevier, - 2000. - P. 19–28.
119. Dickinson E. “Emulsification and emulsion stabilization with protein–polysaccharide complexes” // *Gums Stabilisers Food Ind.* 14 / ed. Williams P.A., Phillips G.O. - Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008. - P. 221–232.
120. Morris G.A. et al. Investigation into the physical and chemical properties of sodium caseinate-maltodextrin glyco-conjugates // *Food Hydrocoll.* - 2004. - vol. 18, - № 6. - P. 1007–1014.
121. Akinshina A. et al. Interactions between adsorbed layers of alphaS1-casein with covalently bound side chains: a self-consistent field study. // *Biomacromolecules.* - 2008. - vol. 9, - № 11. - P. 3188–3200.
122. Rodríguez Patino J.M., Pilosof A.M.R. Protein–polysaccharide interactions at fluid interfaces // *Food Hydrocoll.* - 2011. - vol. 25, - № 8. - P. 1925–1937.

123. Klinkesorn U. et al. Increasing the oxidative stability of liquid and dried tuna oil-in-water emulsions with electrostatic layer-by-layer deposition technology. // *J. Agric. Food Chem.* - 2005. - vol. 53, - № 11. - P. 4561–4566.
124. Cho Y.-H., Decker E.A., McClements D.J. Competitive adsorption of mixed anionic polysaccharides at the surfaces of protein-coated lipid droplets. // *Langmuir*, 2009. - vol. 25, - № 5. - P. 2654–2660.
125. Akhtar M., Dickinson E. Whey protein–maltodextrin conjugates as emulsifying agents: An alternative to gum arabic // *Food Hydrocoll.* - 2007. - vol. 21, - № 4. - P. 607–616.
126. Einhorn-Stoll U. et al. Formation of milk protein–pectin conjugates with improved emulsifying properties by controlled dry heating // *Food Hydrocoll.* - 2005. - vol. 19, - № 2. - P. 329–340.
127. Ibanoglu E., Erçelebi E.A. Thermal denaturation and functional properties of egg proteins in the presence of hydrocolloid gums // *Food Chem.* - 2007. - vol. 101, - № 2. - P. 626–633.
128. Шарифова З.Б. и др. Характеристика микрокапсул, полученных на основе яблочного пектина и лактоглобулинов молочной сыворотки // *Известия АН РТ.* - 2009. - т. 2, - № 135. - С. 72–78.
129. Мухидинов З.К. и др. Микрокапсулы на основе цитрусовых пектинов и лактоглобулина молочной сыворотки // *Известия АН РТ.* - 2010. - т. 2, - № 139. - С. 68–73.
130. Шамсоро О. и др. Микрокапсулы на основе пектина подсолнечника и концентрата белков молочной сыворотки // *Известия АН РТ.* - 2012. - т. 2, - № 147. - С. 89–95.
131. Мухидинов З.К., Фишман М.Л., Лиу Л.Ш. Способ получения пектина из подсолнечника: - letter EP 016871 B1 USA. Таджикистан: Евразийская патентная организация, - 2012.

132. Мухидинов З.К. и др. Флеш способ экстракции пектина из растительного сырья: - letter TJ 563 USA. Таджикистан: НПЦ РТ, 2013. - С. 12.
133. Мухидинов З.К. Способ очистки пектинового гидролизата и получение пектинового геля: - letter TJ 197 USA. Таджикистан: НПЦ РТ, 1998. - С. 8.
134. Мухидинов З.К. Физико-химические аспекты получения и применения пектиновых полисахаридов: дис. док. хим. наук: - Душанбе, 2003. - 238 с.
135. Афанасьев С.П. и др. Модификация титриметрического метода анализа пектиновых веществ // Химия природных соединений. - 1984. - т. 4. - С. 428–431.
136. CP Kelco Control Methods D. Determination of degree of methyl esterification. 2001. - 3 p.
137. Филипов М., Кузминов В.И. Фотометрическое определение метоксилных групп в пектиновых веществах // Ж. аналитическая химия. - 1971. - т. 26, - № 1. - С. 143–146.
138. Filisetti-Cozzi T.M.C.C., Carpita N.C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars // Anal. Biochem. - 1991. - vol. 197, - № 1. - P. 157–162.
139. Бобокалонов Д.Т., Халикова М.Д., Джонмуродов А.С. Характеристика лактоглобулинов молочной сыворотки методом капиллярного электрофореза // Материалы 6 Нумановских чтений. - Душанбе, 2009. - С. 109–111.
140. Государственная фармакопея СССР. XI издание. Выпуск 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. 2-ое изд. - Москва: Медицина, 1990. - С. 30–32.
141. Мухидинов З.К. и др. Белки молочной сыворотки: анализ компонентного состава в полиакриламидном геле, выделение основных сывороточных белков // Известия АН РТ. - 2008. - т. 1, - № 130. - С. 52–72.
142. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. - Москва: Химия, 1965. - 390 с.

143. Muhidinov Z.K. et al. Development and characterization of different low methoxy pectin microcapsules by an emulsion-interface reaction technique. // *J. Microencapsul.* - 2004. - vol. 21, - № 7. - P. 729–741.
144. Мухидинов З.К. и др. Получение микрокапсул на основе яблочного пектина и β -лактоглобулина, содержащих рифампицин // *Химико-фармацевтический журнал.* - 2012. - т. 46, - № 5. - С. 70–73.
145. Tong L. et al. Engineering of concentrated emulsions as a drug carrier system for pharmaceutical application // *World J. Eng. Spec. issue.* - 2011. - P. 1123–1124.
146. Мухидинов З.К., Касымова Г.Ф., Усманова С.Р., и др. Получение микрокапсул на основе яблочного пектина и бета-лактоглобулина, содержащих рифампицин // *Химико-фармацевтический журнал.* - 2012. - № 5. - С. 46-49.
147. Jonsson M., Linse - P. Polyelectrolyte–macroion complexation. I. Effect of linear charge density, chain length, and macroion charge // *J. Chem. Phys.* - 2001. - vol. 115, - № 7. - P. 3406.
148. Littoz F., McClements D.J. Bio-mimetic approach to improving emulsion stability: Cross-linking adsorbed beet pectin layers using laccase // *Food Hydrocoll.* - 2008. - vol. 22, - № 7. - P. 1203–1211.
149. Chodanowski P., Stoll S. Polyelectrolyte adsorption on charged particles: Ionic concentration and particle size effects—A Monte Carlo approach // *J. Chem. Phys.* - 2001. - vol. 115, - № 10. - P. 4951–4960.
150. Шамсара О. и др. Формирование микрокапсул на основе высокометилированных пектинов и лактоглобулинов молочной сыворотки // *Известия АН РТ.* - 2013. - т. 2, - № 151. - С. 85–92.
151. Netz R.R., Joanny J.F. Complexation between a Semiflexible Polyelectrolyte and an Oppositely Charged Sphere // *Macromolecules.* - 1999. - vol. 32, - № 26. - P. 9026–9040.

152. Magdassi S., Bach U., Mumcuoglu K.Y. Formation of positively charged microcapsules based on chitosan-lecithin interactions. // *J. Microencapsul.* - 1997. - vol. 14, - № 2. - P. 189–195.
153. Kim H.J. et al. Emulsifying properties of bovine serum albumin-galactomannan conjugates. // *J. Agric. Food Chem.* - 2003. - vol. 51, - № 4. - P. 1049–1056.
154. Noel T.R. et al. The deposition and stability of pectin/protein and pectin/poly-L-lysine/protein multilayers // *Carbohydr. Polym.* - 2007. - vol. 70, - № 4. - P. 393–405.
155. Бобокалонов Д.Т. и др. Кинетика выхода пироксикама из зеин-пектиновых носителей в опытах *ex vivo* // *Химико-фармацевтический журнал.* - 2012. - т. 46, - № 6. - С. 98–101.
156. Бобокалонов Д.Т. и др. Кинетика высвобождения пироксикама из гидрогелей на основе низкометирированного цитрусового пектина и зеина // *Химико-фармацевтический журнал.* - 2012. - т. 46, - № 1. - С. 34–37.
157. Бобокалонов Д.Т. Фармакокинетика новых лекарственных форм пироксикама: дис. канд. биол. наук. – Душанбе, 2011. – 100 с.
158. Manca D., Rovaglio M. Modeling the controlled release of microencapsulated drugs: theory and experimental validation // *Chem. Eng. Sci.* - 2003. - vol. 58, - № 7. - P. 1337–1351.
159. Siepmann J., Faisant N., Benoit J.P. A new mathematical model quantifying drug release from bioerodible microparticles using Monte Carlo simulations. // *Pharm. Res.* - 2002. - vol. 19, - № 12. - P. 1885–1893.
160. Grassi M., Grassi G. Mathematical modelling and controlled drug delivery: matrix systems. // *Curr. Drug Deliv.* - 2005. - vol. 2, - № 1. - P. 97–116.
161. Reineccius G.A. Controlled release techniques in the food industry // *Encapsulation Control. Release Food Ingredients* / ed. Risch S.J., Reineccius G.A. - Washington, DC: American Chemical Society, 1995. - vol. 590. - P. 8–25.

162. Whorton Colleen. Factors Influencing - volatile Release from Encapsulation Matrices // Encapsulation Control. Release Food Ingredients / ed. Risch S.J., Reineccius G.A. - Washington, DC: American Chemical Society, 1995. - vol. 590. - P. 134–142.
163. Hopfenberg H.B. Controlled Release Polymeric Formulations / ed. Paul D.R., Harris F.W. - Washington, D. C.: American Chemical Society, 1976. - vol. 33. - P. 26–32.
164. Hixson A.W., Crowell J.H. Dependence of Reaction Velocity upon surface and Agitation // Ind. Eng. Chem., 1931. - vol. 23, - № 8. - P. 923–931.
165. Korsmeyer R.W., Von Meerwall E., Peppas N.A. Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. II. Verification of theoretical models // J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys. - 1986. - vol. 24, - № 2. - P. 409–434.
166. Ritger - P.L., Peppas N.A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs // J. Control. Release. - 1987. - vol. 5, - № 1. - P. 23–36.