

УДК 678.554

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ НА МОРФОЛОГИЮ МИКРОЧАСТИЦ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ВНУТРЕННЕГО ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЯ**П.Ю. Стадольникова, Б.Б. Тихонов, А.И. Сидоров, М.Г. Сульман***ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия»*

Среди всех известных полимерных микрочастиц именно альгинатные микросферы являются одними из наиболее широко распространенных систем для инкапсуляции различных биологически активных веществ и иммобилизации ферментов и клеток благодаря их небольшому размеру и эффективным характеристикам носителя, таким как дешевизна, биосовместимость, направленность на специфические связывающие сайты, высвобождение инкапсулированного препарата заданным образом, нетоксичность и биоразлагаемость в пределах приемлемого периода времени [1, 2]. Термин «альгинатные микросферы» часто используется в литературе как синоним для обозначения альгинатных микрогелей, микрокапсул, микрочастиц или микрошариков [1]. Микросферы имеют сферическую форму частиц в размерном диапазоне от 1 до 1000 мкм [2].

Для получения микросфер с желаемыми параметрами необходим выбор нужного, хорошо продуманного метода синтеза. Ряд параметров синтеза (концентрация альгината, масляная фаза, поверхностно-активное вещество, концентрации сшивающего агента и время сшивки, скорость перемешивания, морфология частиц, свойства и эффективность инкапсуляции) оказывает влияние на физические, химические и биологические свойства альгинатных микрочастиц. Альгинатные микросферы получают с помощью трех основных способов: распылительной сушки, экструзии и метода эмульгирования / гелеобразования. Техника эмульгирования / гелеобразования позволяет изготавливать микросферы в микромасштабе, при этом размер частиц может быть менее 100 мкм, имеет при этом низкую стоимость и относительно простое экспериментальное оборудование. Обычно метод включает в себя два этапа: образование стабильных полимерных капель в эмульсионной системе вода-в-масле и последующее затвердевание (гелеобразование) этих капель. Согласно этому методу, гелеобразование происходит, когда раствор альгината взаимодействует с ионами сшивающего агента. Существует два типа гелеобразования: внутреннее и внешнее [2]. Метод внутреннего гелеобразования позволяет формировать частицы в субмиллиметровом диапазоне размеров, что снижает ограничения массопереноса с возможностью получения таких бусин в промышленном масштабе (м³/ч) [3]. Реакционная среда при использовании метода внутреннего гелеобразования для получения альгинатных микрочастиц содержит, кроме альгината натрия, масло, нерастворимый кальциевый комплекс, поверхностно-активное вещество и органическую кислоту. Внутреннее гелеобразование (желирование диспергированных в масляной фазе альгинатных капель) может быть инициировано высвобождением катионов кальция из нерастворимого комплекса (соли кальция, такой как карбонат) посредством понижения pH с использованием органической кислоты (чаще всего ледяной уксусной). Контролируя условия, при которых происходит образование водно-масляной дисперсии, размер микрошариков можно регулировать [4, 5].

Концентрация альгината считается наиболее важным фактором, влияющим на характеристики альгинатных микросфер, такие как морфология и размер частиц. Увеличение концентрации альгината приводит к увеличению вязкости альгинатного раствора, что увеличивает межфазное натяжение между каплями альгината и масляной фазой. Следовательно, должны образовываться более крупные микросферы [2]. В рамках данной работы будет рассмотрено влияние именно этого фактора на размер и морфологию микрочастиц, получаемых методом внутреннего гелеобразования.

Материалы и методы. Альгинатные микросферы были получены с помощью модифицированного метода внутреннего гелеобразования раствора альгината натрия, превращенного в эмульсию в растительном масле [3, 5]. Нерастворимый в воде карбонат кальция равномерно распределяется в растворе альгината натрия, после чего добавляется растительное масло, содержащее поверхностно-активное вещество, и полученная смесь интенсивно перемешивается для образования водно-масляной эмульсии. Гелеобразование начинается с добавления органической кислоты, таким образом, сдвиг pH в диапазон низких значений провоцирует высвобождение ионов кальция из нерастворимой его соли. Кальций-альгинатные шарики формируются в процессе контактирования ионов Ca²⁺ и альгината посредством образования ионного комплекса. Полученные микросферы осаждаются из масляной фазы раствором хлорида кальция.

0,08 г. микрокристаллического порошка карбоната кальция CaCO_3 добавляется в 20 г. раствора альгината разной концентрации (1 %; 1,5 %; 2 %; 2,5 %; 3 %; 3,5 %) при постоянном перемешивании. Полученная суспензия диспергируется в 40 мл подсолнечного масла, содержащего Span 80 (2 % об.) и интенсивно перемешивается в течение 2 минут. После эмульгирования в смесь добавляется 30 мл подсолнечного масла, содержащего 2 % (об.) Span 80 и 0,2 мл ледяной уксусной кислоты. Интенсивное перемешивание продолжается в течение 10 минут. Далее в смесь добавляется 150 мл дистиллированной воды, перемешивание продолжается при умеренной интенсивности в течение 30 минут. Для отделения образовавшихся гелевых кальций-альгинатных шариков от масляной фазы добавляется 250 мл осаждающего раствора 0,05М хлорида кальция, содержащего 1 % (об.) Tween 80. Полученные микросферы осаждаются из масляной фазы, которая удаляется из системы путем последующей декантации. Далее осадок альгинатных микросфер промывается 0,05 М раствора хлорида кальция, содержащего 1 % (об.) Tween 80. Микрочастицы отмываются несколько раз водой до полного удаления следов масла, что контролируется наблюдением в оптический микроскоп. Полученные частицы наблюдаются в световом поле оптического микроскопа (Digital microscope Inskam-315 12MP 1000X). Размер микрочастиц и кластеров оценивался с помощью размерной сетки камеры Горяева (сторона малого квадрата $0,05 \pm 0,001$ мм, сторона большого квадрата $0,2 \pm 0,001$ мм).

Результаты и обсуждение. Морфология микросфер визуально оценивалась с помощью метода оптической микроскопии. Полученные в результате внутреннего гелеобразования кальций-альгинатные гелевые частицы после отделения от масляной эмульсии и промывки дистиллированной водой сгруппированы в отдельные кластеры, представляющие собой определенным образом скомпонованные микросферы внутри прозрачных оболочек, образованных сурфактантом Tween 80.

Внешние свойства кластеров кальций-альгинатных микросфер и масштабная сетка камеры Горяева представлены на рисунках 1–3. Средние размеры микрочастиц и их оболочек в видимом поле микроскопа приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Размеры частиц в видимом поле микроскопа при варьировании концентрации альгината натрия

Концентрация альгината, %	Средний диаметр микросфер, мкм	Средний диаметр оболочки, мкм
1 %	$12,23 \pm 1$	$58,15 \pm 1$
1,5 %	$14,47 \pm 1$	$84,78 \pm 1$
2 %	$14,98 \pm 1$	$129,28 \pm 1$
2,5 %	$15,31 \pm 1$	$164,85 \pm 1$
3 %	$8,68 \pm 1$	$178,034 \pm 1$
3,5 %	$9,38 \pm 1$	$312,31 \pm 1$

Концентрация альгината натрия 1 % приводит к образованию небольших кластеров, наблюдается преимущественное количество разрозненных и стремящихся к обособленности частиц (рисунок 1, а и б). В выбранном диапазоне концентраций полимера размер оболочек и средний диаметр микросфер являются минимальными именно при данной концентрации альгината натрия. При увеличении концентрации альгината до 1,5 %, наблюдаются малые и средние скопления четкой оформленной структуры, подобные друг другу (рисунок 1, в и г). Количество частиц внутри оболочек увеличивается, и в основном микросферы располагаются упорядоченно скученно, формируя кластеры характерного вида.

Дальнейший рост концентрации полимера приводит к росту диаметра микросфер и образуемых ими скоплений (рисунок 2). При концентрации альгината, начиная с 2,5 %, наблюдается появление пустых оболочечных структур. Присутствует очень плотная упаковка частиц внутри более крупных сфер и небольших оболочек, которые, в свою очередь, входят в состав более крупных скоплений (черные пятна на рисунке 2, в) и г) – следствие недостаточной разрешающей способности микроскопа). Распределение микросфер в кластерах становится все более неупорядоченным, скопления теряют свой характерный вид.

С увеличением концентрации альгината до 3–3,5 % кластеры становятся все менее компактными, увеличивается размер и плотность оболочек, происходит их деформация, а сгруппированные внутри них микросферы теряют упорядоченность упаковки и становятся неравномерно распределенными по площади оболочки (наблюдается тенденция к неупорядоченной скученности и неравномерному заполнению пространства частицами внутри скоплений) (рисунок 3).

Оболочки становятся настолько крупными, что захватывают более мелкие оболочки с частицами. Скопления представляют собой крупные частицы в окружении россыпи более мелких микросфер, т. е. частицы становятся все более неоднородными в размерном распределении. Средний диаметр микросфер, несмотря на увеличение максимального диаметра частиц, уменьшается, что может быть объяснено неравномерным распределением зерен карбоната кальция в растворе альгината повышенной вязкости и невозможностью равномерной гомогенизации такого раствора.

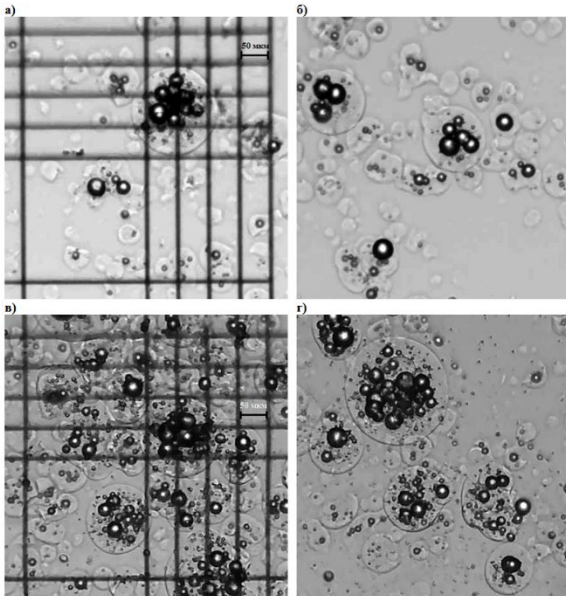


Рисунок 1 – Морфология микросфер при концентрации альгината 1 % (рисунки а и б) и 1,5 % (рисунки в и г)

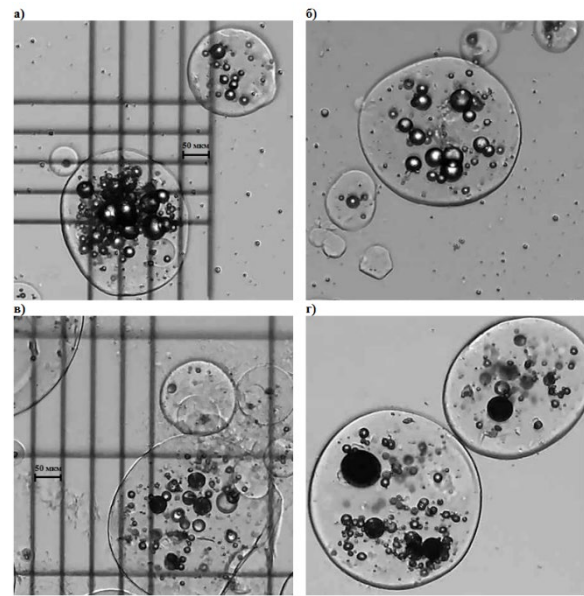


Рисунок 2 – Морфология микросфер при концентрации альгината 2 % (рисунки а и б) и 2,5 % (рисунки в и г)

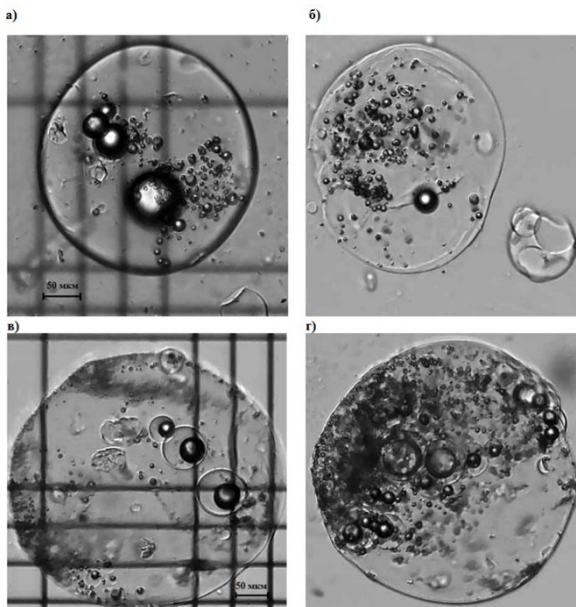


Рисунок 3 – Морфология микросфер при концентрации альгината 3 % (рисунки а и б) и 3,5 % (рисунки в и г)

Наблюдаемые изменения в структуре кластеров объясняются тем, что чем выше концентрация альгината, тем более вязкой становится дисперсия вода-в-масле, образуются более крупные альгинатные капли и, следовательно, в результате получаются более крупные микросферы, в свою очередь сбивающиеся в более крупные агрегаты. Также повышенная вязкость раствора приводит к технологическим трудностям, в частности, к невозможности достигнуть постоянства перемешивания, и, как следствие, к плохой гомогенизации эмульсии и худшему распределению карбоната кальция в растворе полимера в масляной эмульсии, что ведет к деформации капель полимера и неравномерному распределению частиц по размерам, а также к деформации оболочек. Таким образом, чем выше концентрация альгината, тем более вязкой становится дисперсия, которая образует более крупные альгинатные капли и, следовательно, более крупные микросферы.

Заключение. С помощью модифицированной методики внутреннего гелеобразования были получены альгинатные микросферы. Было проведено изучение влияния концентрации важного компонента синтеза – альгината натрия – на размер, форму и морфологию полученных частиц. Морфология, расположение, наличие и форма агрегатов визуально оценивались с помощью оптического микроскопа. Таким образом, оптимальной концентрацией альгината, позволяющей получать компактные правильно организованные структуры, однородные в своей массе, с четко прослеживающимися закономерностями и свойствами, является концентрация 1,5 %.

Литература

- Dhamecha N.T.T., Movsas R., Sano U., Menon J.U. Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: Past, present and future // *International Journal of Pharmaceutics*. 2019. Vol. 569. P. 1–13.
- Uyen D., Movsas R., Hamid Z.A.A., Tram N.X.T., Ahmad N.B. Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: a review // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. Vol. 153. P. 1035–1046.
- Poncellet D., Lencki R., Beaulieu C., Halle J.P., Neufeld R.J., Fournier A. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation: Methodology // *Appl. Microbiol. Biot.* 1992. Vol. 38. P. 39–45.
- Ahmed M.M., Abd El-Rasoul S., Auda S.H., Ibrahim M.A. Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium–sodium alginate microparticles // *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013. Vol. 21. P. 61–69.
- Wang X., Zhu K. – X., Zhou H. – M. Immobilization of Glucose Oxidase in Alginate-Chitosan Microcapsules // *International Journal of Molecular Sciences*. 2011. Vol. 12. P. 3042–3054.