



УДК 664.3.032:544.773.32

© 2011

Академік НАН України **А. А. Долінський, Н. О. Шаркова,
Л. Ю. Авдєєва, О. Ю. Чуніхін**

Дослідження властивостей фосфоліпідних наноструктур, отриманих з використанням ефекту дискретно-імпульсного введення енергії

Наведено результати досліджень впливу деяких тепломасообмінних та гідротермічних параметрів на властивості фосфоліпідних наноструктур, одержаних в результаті використання ефекту дискретно-імпульсного введення енергії.

Розвиток сучасних науки і промисловості неможливий без використання нанотехнологій, наноматеріалів, наноструктур. Вони відкривають широкі перспективи при створенні сучасних матеріалів з принципово новими корисними характеристиками, дозволяють регулювати і контролювати процеси на рівні атомів. За рахунок нанорозміру в матеріалах проявляються нові унікальні хімічні і фізичні властивості — каталітичні, механічні, транспортні та ін. За останні десятиріччя вченим вдалося створити декілька сотень наноструктур, що розрізняються за складом, формою, агрегатним станом, галузями застосування, кількістю атомів тощо [1, 2].

Одним з напрямків розвитку сучасних нанотехнологій є використання фосфоліпідних наноструктур. Способам їх одержання і використання присвячена велика кількість наукових робіт в біології та медицині [3]. Значний інтерес становить їх застосування в харчовій промисловості для збільшення ефективності дії біологічно активних речовин через можливість її транспортування безпосередньо в клітини організмів. Широке використання наноструктур з фосфоліпідів стримується відсутністю промислових технологій їх отримання, тому розробка надійних методів створення наноструктур для організації їх промислового виробництва є одним з актуальних напрямків сучасних досліджень.

Фосфоліпіди відносяться до неіоногенних поверхнево-активних речовин, які у рідкокристалічному стані самоорганізуються у замкнені везикулярні наноструктури, утворюючи подвійний шар (мембрану), що є термодинамічно вигідно і відповідає найменшому значенню енергії Гіббса порівняно з іншими можливими варіантами орієнтування молекули [4, 5].

Залежно від складу і способу отримання у воді фосфоліпіди утворюють великі багатошарові (діаметром від 0,5 до 10 мкм), великі одношарові (діаметром від 150 до 500 нм), малі одношарові (діаметром від 25 до 100 нм) везикули або міцели (діаметром від 3 до 6 нм) [3, 6, 7].

Існуючі на даний час методи одержання фосфоліпідних нановезикул являють собою складні багатоетапні процеси, особливістю яких є неможливість їх відтворення у промислових умовах або висока енергоємність [7]. Інститут технічної теплофізики НАН України запропонував спосіб одержання таких структур за рахунок ефекту дискретно-імпульсного введення енергії шляхом використання роторно-пульсаційних апаратів, які відрізняються високою якістю диспергування і технологічною ефективністю при одночасному зниженні енерговитрат і матеріаломісткості.

Ефективність використання роторно-пульсаційних апаратів порівняно з клапанними гомогенізаторами високого тиску при диспергуванні суспензій фосфоліпідів підтверджена результатами наших досліджень [8, 9].

Для вивчення механізму утворення наноструктур необхідно проведення комплексних досліджень гідродинамічних і масообмінних процесів утворення окремих часток, структур і систем в цілому. Основними характеристиками фосфоліпідних наноструктур є їх розмір і об'єм захвату. Нами був досліджений вплив екстрагентів різної полярності на діаметр фосфоліпідних наноструктур, утворених в результаті дисипативного стану гетерогенної системи за рахунок дискретно-імпульсного введення енергії в роторно-пульсаційних апаратах. Дослідження процесу диспергування проводились при температурі 40 °С на проточному роторно-пульсаційному апараті циліндричного типу з коаксимальним набором з двох статорів і одного ротора із зазорами між ними 0,2 мм. Число обертів ротора — 50 с⁻¹, продуктивність — 800 кг/год. Для досліджень використовувався сухий знежирений фосфоліпідний комплекс “Лецитин соєвий “Solec F” виробництва фірми “Solae Europe” (ЄС) із загальним вмістом фосфоліпідів 97%. Як полярний і неполярний екстрагенти використовувалися, відповідно, вода і хлороформ.

Функцію розподілу розміру наночасток досліджували на лазерному фотон-кореляційному спектрометрі “ZetaSizer-3” Malvern Instrument, Великобританія, обладнаного He-Ne лазером ЛГН-111 ($P = 25$ мВт, $\lambda = 633$ нм). Даний прилад дозволяє визначити коефіцієнт дифузії дисперсних частинок в рідині шляхом аналізу характерного часу флуктуації інтенсивності розсіяного світла. Розмір частинок розраховували за формулою Стокса–Ейнштейна, яка пов'язує розмір частинок з їх коефіцієнтом дифузії і в'язкістю рідини. Отримана автокореляційна функція (АКФ) оброблялася за допомогою стандартних (ліцензійних) комп'ютерних програм (PCS-Size mode v 1.61). Результати досліджень наведені на рис. 1, звідки випливає, що природа екстрагенту, використаного для розчинення, а також концентрація матеріалу значно впливають на розмір частинок, отриманих в результаті диспергування. При однаковій температурі проведення процесу, залежно від концентрації фосфоліпідної суспензії та використаного екстрагенту, диспергування першого і другого зразка дозволило одержати структури із середнім діаметром відповідно від 510 до 630 нм і від 72 до 379 нм. Найменший діаметр для обох зразків досягався при 5%-ній концентрації водної суспензії фосфоліпідів. Послідовне використання неполярного і полярного розчинника дозволило значно знизити розмір утворених наноструктур. Таку поведінку системи при диспергуванні можна пояснити впливом на складну гетерогенну систему термодинамічних факторів. При диспергуванні фосфоліпідів у водному середовищі відбувається процес самоорганізації багатомолекулярних агрегатів різної структурної організації частинок. При послідовному ви-

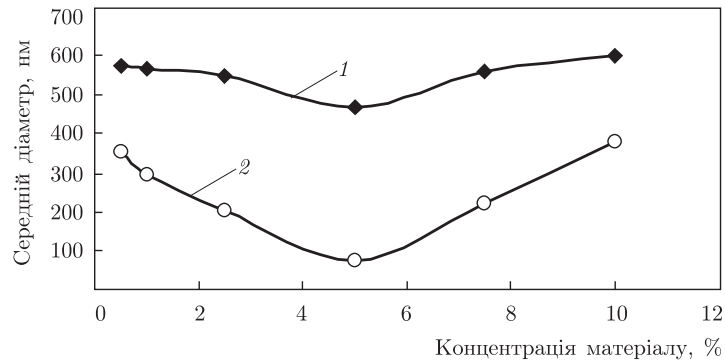


Рис. 1. Залежність середнього діаметра ліпосомних наночастинок від концентрації матеріалу, отриманого з використанням в якості екстрагенту: 1 — води; 2 — хлороформу і води

користанні в якості екстрагенту неполярного (хлороформу) і полярного (вода) розчинника самоорганізація структури фосфоліпідів проходить декілька разів, кожен раз із зменшенням радіуса частинки, що відповідає зниженню енергії поверхневого натягу. В результаті реалізації цього способу в дослідному зразку із 5%-ною концентрацією нам вдалося досягти середній діаметр структур 72 нм, причому він характеризувався значною однорідністю дисперсії і велика частина везикул (89,5%) мала діаметр 28 нм, що відповідає малим одношаровим везикулам.

Розмір фосфоліпідних наночастинок важливий з точки зору їх подальшого використання. У випадках, коли частинки використовують для транспорту мікроорганізмів, наприклад вакцин, необхідні великі везикули. Однак більш застосовуваними є малі везикули з діаметром до 100 нм. Це пов'язано з тим, що вони є більш стійкими при зберіганні, не так швидко видаляються ретикуло-ендотеліальною системою і мають властивість для більш ефективного транспорту біологічно активних речовин.

Наноструктури, які утворюють фосфоліпідні у рідкокристалічному стані, мають сферичну везикулярну форму з однією або декількома мембранних оболонок. Це пов'язано з амфіфільною природою фосфоліпідів. Гідратовані полярні групи, обернені в бік водної фази, утворюють гідрофільну оболонку, що екранує вуглеводневі (вуглецеві) неполярні ланцюги від контакту з водою. Товщина мембрани залежить від складу фосфоліпідів і фазового стану [3, 5, 6]. За рахунок утворення зовнішньої оболонки питома вільна поверхнева енергія утвореної структури знижується до значень менших, ніж цей же показник для середовища, причому термодинамічно вигідним є утворення сферичної форми структур. Нами були проведені дослідження з визначення характеристик внутрішнього об'єму везикул, отриманих в результаті диспергування в роторно-пульсаційному апараті. Були використані дослідні зразки з 5%-ною концентрацією фосфоліпідів у воді та ті, що були попередньо розчинені в хлороформі. Процент включення речовини всередину фосфоліпідних везикул визначали методом флуоресцентної спектроскопії [10] на спектрофлуориметрі Hitachi IOS (Японія) із хвилею збудження $\lambda = 276$ нм та хвилею випромінювання $\lambda = 545$ нм, ширина щілин 5 нм. Як маркер використовували флуоресцентний комплекс тербій — дипіколінова кислота (Tb/DPA). Суть методу полягає у порівнянні початкового рівня флуоресценції водного розчину нановезикул з маркером та рівня флуоресценції водного розчину нановезикул з маркером, що увійшов всередину. Маркер, що не був включений у везикули, руйнували за допомогою динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової ки-

Таблиця 1. Основні характеристики фосфоліпідних нановезикул

Зразок	Середній діаметр, нм	Відсоток включення, %	Питомий об'єм речовини, що захоплюється всередину нановезикул, мг/г
1	510	60	12
2	72	8,6	1,75

слоти (ЕДТА). Відсоток включення флуоресцентного маркера (N) розраховували за формулою:

$$N = \frac{C_2}{C_1} \cdot 100,$$

де C_2 — відносні одиниці флуоресценції вихідного водного розчину нановезикул з маркером; C_1 — відносні одиниці флуоресценції вихідного водного розчину нановезикул з маркером, що увійшов у їх внутрішній об'єм.

Результати досліджень наведені в табл. 1.

Проведені дослідження довели наявність внутрішнього об'єму в наноструктурах, утворених з використанням дискретно-імпульсного введення енергії в результаті обробки в роторно-пульсаційному апараті, та встановили відсоток включення водорозчинних речовин всередину везикули. Великі одношарові везикулярні наноструктури із середнім діаметром 510 нм мають високий об'єм включення водорозчинних речовин всередину утвореної структури. Другий зразок представлений маленькими одношаровими везикулами і характеризуються значною однорідністю за розміром, але їх внутрішній об'єм значно зменшується порівняно з першим. Це пояснюється тим, що товщина утвореної мембрани є постійною (приблизно 4 нм) і внутрішній об'єм везикулярних наноструктур пропорційно залежить від їх діаметра.

Везикулярні фосфоліпідні наноструктури, отримані промисловим способом за рахунок дискретно-імпульсного введення енергії в роторно-пульсаційних апаратах, знайдуть широке застосування в харчовій промисловості для створення великого асортименту продуктів функціонального і лікувально-профілактичного призначення.

Таким чином, в результаті проведених досліджень тепломасообмінних процесів з'явилися нові дані про механізм утворення та властивості фосфоліпідних наноструктур, отриманих в результаті використання ефекту дискретно-імпульсного введення енергії в роторно-пульсаційних апаратах. В ході проведення робіт була досліджена кінетика утворення наноструктур залежно від зміни тепломасообмінних параметрів, встановлений вплив полярних і неполярних екстрагентів, підтверджена наявність внутрішнього об'єму везикул, одержаних запропонованим способом.

1. Ковальчук М. В. Нанотехнологии – фундамент новой наукоемкой экономики 21 века // Рос. нанотехнологии. – 2007. – 2, № 1–2. – С. 6–11.
2. Суздалев И. П. Нанотехнология: физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов. – Москва: КомКнига, 2006. – 592 с.
3. Nikhil O. Dhoot. Microencapsulation for therapeutic applications / PD Dissertation. – Philadelphia: Drexel, 2002. – 224 p.
4. Биофизика: Учеб. для студ. высш. учебн. заведений / Антонов В. Ф., Черныш А. М., Пасечник В. И. и др. – Москва: Гуманит. изд. центр “ВЛАДОС”, 1999. – 288 с.
5. Ланге К. Р. Поверхностно-активные вещества: синтез, свойства, анализ, применение / Под научн. ред. Л. П. Зайченко. – Ст.-Петербург: Профессия, 2004. – 240 с.

6. *Липосомы* в биологических системах / Пер. с англ. под ред. Г. Грегориадиса, А. Аллисона. – Москва: Медицина, 1983. – 384 с.
7. *Gregoriadis G.* Liposome technology. Vol. 2. – New York; London: The School of Pharmacy University of London, 2007. – 422 p.
8. Пат. 79703 UA. Спосіб одержання ліпосом / Долінський А. А., Шаркова Н. О., Жукотський Е. К., Авдеева Л. Ю. – Опубл. 10.07.2007. – Бюл. № 10.
9. *Авдеева Л. Ю.* Метод інтенсифікації процесу отримання ліпосомних наноструктур при дискретно-імпульсному введенні енергії // Промышл. теплотехника. – 2010. – **32**, № 3. – С. 87–91.
10. *Wilschut J., Duzgunes N., Fraley R., Papahadjopoulos D.* Studies on the mechanism of membrane fusion: kinetics of calcium ion induced fusion of phosphatidylserine vesicles followed by a new assay for mixing of aqueous vesicle contents // Biochemistry. – 1980. – **19**. – P. 6011–6021.

Інститут технічної теплофізики НАН України, Київ
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

Надійшло до редакції 06.07.2010

Academician of the NAS of Ukraine **A. A. Dolinskiy, N. O. Sharkova,**
L. Yu. Avdeyeva, O. Yu. Chunikhin

Studying the properties of phospholipid nanostructures obtained as a result of using the effect of discrete-pulsing introduction of energy

The experimental results on the influence of some heat mass exchange and hydrothermal parameters on the properties of phospholipid nanostructures obtained as a result of using the effect of discrete-pulsing introduction of energy are presented.