

Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

На правах рукописи

**Седякина Наталья Евгеньевна**

**Получение и исследование свойств  
хитозановых микросфер  
как систем контролируемой  
доставки инсулина**

02.00.11 – Коллоидная химия

диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук,  
профессор Г.В. Авраменко

МОСКВА – 2015

<b>Введение</b> .....	5
<b>1. Литературный обзор</b> .....	8
1.1. Общая характеристика систем контролируемой доставки ЛВ на основе биоразлагаемых полимеров .....	8
1.2. Хитозановые микросферы как системы контролируемой доставки инсулина в желудочно-кишечный тракт.....	11
1.2.1. Требования к системам пероральной доставки инсулина	11
1.2.2. Хитозан .....	14
1.2.3. Разработка хитозановых микросфер как потенциальных систем контролируемой доставки инсулина в ЖКТ .....	17
1.2.3.1. Методы получения хитозановых микросфер....	17
1.2.3.2. Контролируемое высвобождение инсулина из хитозановых микросфер .....	23
1.3. Повышение агрегативной устойчивости эмульсий, используемых для получения систем доставки ЛВ .....	29
1.3.1. Факторы агрегативной устойчивости эмульсий.....	30
1.3.2. Стабилизация эмульсий с помощью поверхностно-активных веществ .....	36
1.3.3. Стабилизация эмульсий с помощью полимеров .....	45
1.4. Выводы из литературного обзора .....	49
<b>2. Экспериментальная часть</b> .....	51
2.1. Характеристики исходных веществ.....	51
2.2. Методики исследования.....	54
2.2.1. Измерение межфазного натяжения.....	54
2.2.2. Методика получения эмульсий вода/парафиновое масло.....	56
2.2.3. Оценка стабильности эмульсий.....	57
2.2.4. Методика фазовых исследований .....	57
2.2.5. Реологические исследования.....	58
2.2.6. Определение рН-пределов растворимости хитозана .....	60

2.2.7. Исследование взаимодействия хитозана с лимонной кислотой .....	61
2.2.8. Получение хитозановых микросфер.....	63
2.2.9. Микроскопические исследования.....	64
2.2.10. Включение инсулина в микросферы и определение эффективности включения .....	66
2.2.11. Исследование высвобождения инсулина из микросфер <i>in vitro</i> .....	66
2.2.12. Деградация микросфер в фосфатно-солевом буфере.....	67
2.2.13. Набухание микросфер в фосфатно-солевом буфере.....	67
2.2.14. ИК-спектроскопия .....	68
<b>3. Результаты эксперимента и их обсуждение.....</b>	<b>69</b>
3.1. Поверхностные свойства ПАВ и полимера.....	69
3.1.1. Поверхностные свойства ПАВ ряда полиглицерил полирицинолеатов.....	69
3.1.2. Адсорбция полимера на границе раздела фаз вода/масло.....	77
3.2. Исследование взаимодействия хитозана с лимонной кислотой ...	82
3.3. Исследование свойств обратных эмульсий вода/парафиновое масло.....	93
3.3.1. Процессы, протекающие в эмульсиях.....	93
3.3.2. Выбор соотношения водной и масляной фаз для получения обратных эмульсий.....	95
3.3.3. Влияние концентрации ПАВ на свойства обратных эмульсий.....	106
3.3.4. Влияние концентрации полимера на свойства обратных эмульсий.....	119
3.3.5. Введение лимонной кислоты в эмульсии, содержащие полимер.....	125

3.4. Характеристики хитозановых микросфер.....	129
3.4.1. Размеры и морфология частиц.....	130
3.4.2. Включение белка в микросферы.....	141
3.4.3. Высвобождение инсулина из микросфер <i>in vitro</i> .....	147
<b>4. Выводы.....</b>	<b>155</b>
<b>5. Список сокращений .....</b>	<b>157</b>
<b>6. Список литературы .....</b>	<b>158</b>
<b>7. Приложение .....</b>	<b>178</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Разработка систем пероральной доставки инсулина вызывает повышенный интерес исследователей в связи с возможностью отказа от инъекционной формы введения, имеющей ряд недостатков, таких как болезненные ощущения пациента и риск инфицирования. К системам пероральной доставки лекарственных веществ (ЛВ) предъявляют ряд требований. Прежде всего, это устойчивость к действию ферментов желудочно-кишечного тракта и изменению рН среды, а также возможность регулировать время высвобождения инсулина. В качестве систем доставки ЛВ могут быть использованы различные носители на основе биоразлагаемых полимеров, позволяющие защитить включенное вещество и обеспечить его контролируемое высвобождение. К ним относят наносферы, микрочастицы, микросферы, микрокапсулы. Хитозан – биосовместимый, биodeградируемый, мукоадгезивный полимер и благодаря этим свойствам является одним из перспективных природных биополимеров для создания систем доставки протеинов и пептидных лекарств. Хитозановые микросферы, предназначенные для включения в них водорастворимых биологически активных веществ (БАВ), получают введением полимера в водную фазу в процессе приготовления обратных эмульсий вода – парафиновое масло, стабилизированных эмульгаторами II рода. Адсорбционные свойства используемых поверхностно-активных веществ (ПАВ) и полимера на границе фаз вода/масло оказывают значительное влияние на агрегативную устойчивость и дисперсность таких эмульсий, и, следовательно, на конечные характеристики микросфер. Определение поверхностных свойств и установление закономерностей адсорбции ПАВ и полимера межфазной границе, изучение взаимосвязи состава и свойств исходных эмульсий, влияния на их агрегативную устойчивость природы и концентраций ПАВ и полимера, а также соотношения компонентов в исходной системе, позволяет осуществить выбор оптимальных условий для получения лекарственных форм с заданными свойствами.

**Цель работы** заключалась в разработке коллоидно-химических основ получения хитозановых микросфер, предназначенных для контролируемой доставки инсулина.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- исследовать влияние неионогенных ПАВ на межфазное натяжение на границе «водный раствор уксусной кислоты – парафиновое масло»;
- определить адсорбционную способность хитозана и систем полимер – ПАВ на межфазной границе;
- определить границы области существования эмульсии в зависимости от состава и температуры системы;
- изучить влияние адсорбционной способности исследуемых ПАВ и хитозана на дисперсность и агрегативную устойчивость полученных на их основе эмульсий и характеристики хитозановых микросфер;
- получить гелевые микросферы заданной дисперсности, способные удерживать инсулин и обеспечивать его пролонгированное высвобождение.
- исследовать влияние плотности сшивки хитозанового геля на сорбционную емкость микросфер и кинетику высвобождения инсулина.

**Научная новизна.** Определены значения критических концентраций мицеллообразования и минимального межфазного натяжения ПАВ ряда полиглицерил полирицинолеатов (ПГПР) на границе воды и масла, рассчитаны параметры адсорбционного слоя. На основании рассчитанных значений параметра взаимодействия ПАВ для формирования смешанного монослоя на границе раздела вода – масло  $\beta^\sigma$  сделан вывод о наличии межмолекулярного притяжения в адсорбционном слое у смесей полиглицерил-6-полирицинолеата и полиоксиэтилен(20)сорбитан моноолеата (Твин 80). Получены изотермы

межфазного натяжения смешанных систем хитозан – ПАВ. Определены области существования эмульсий, стабилизированных ПГПР. Установлена взаимосвязь между адсорбционной способностью исследуемых ПАВ и хитозана с коллоидно-химическими характеристиками исходных эмульсий и свойствами конечных хитозановых микросфер.

**Практическая значимость.** Установленные закономерности адсорбции полиглицерил полирицинолеатов, хитозана и смесей полимер – ПАВ на границе раздела «уксусная кислота – парафиновое масло», а также коллоидно-химические характеристики эмульсий на их основе, позволяют направленно контролировать размеры хитозановых микросфер, плотность сшивки полимерной матрицы, эффективность включения в них инсулина и скорость выделения БАВ. На основе эмульсий вода – парафиновое масло, стабилизированных ПГПР, получены хитозановые микросферы с размерами 2-4 мкм, способные обеспечивать эффективность включения инсулина до 80% и его высвобождение от 80 до 100% в течение 24 часов. Полученные результаты могут быть использованы для разработки систем пероральной доставки инсулина.

## 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Общая характеристика систем контролируемой доставки ЛВ на основе биоразлагаемых полимеров

К разрабатываемым в настоящее время системам доставки лекарственных веществ на основе биodeградируемых полимеров можно отнести микрокапсулы и микросферы, наночастицы, нанокапсулы, наногели, полимерные мицеллы, дендримеры [1-7]. Активный ингредиент в них включают с помощью инкапсулирования, сорбции или присоединяют ковалентной связью [8 – 10]. Диапазоны средних размеров перечисленных полимерных носителей приведены в таблице 1.1 [8, 11].

**Таблица 1.1.** Системы доставки лекарственных веществ.

<b>Система доставки ЛВ</b>	<b>Размеры, нм</b>
Микрокапсулы	200 – 100000
Микросферы	200 – 30000
Наночастицы	100 – 500
Нанокапсулы	100 – 300
Наногели	50 – 250
Полимерные мицеллы	20 – 150
Дендримеры	5 – 10

Использование систем контролируемой доставки при введении лекарственного вещества в организм человека могло бы защитить ЛВ от биодеструкции под воздействием окружающей среды, обеспечить его направленный транспорт, регулировать скорость высвобождения и помочь в преодолении таких недостатков существующих способов введения традиционных лекарственных форм, как:

1. Необходимость использовать завышенные дозы препарата (в 1-2 раза превышающие требуемые), вследствие того, что ЛВ может достигать



биологические мишени в меньшем количестве, чем необходимая терапевтическая концентрация.

2. Взаимодействие лекарственного вещества в организме не только с необходимыми биомишенями, но и с иными биообъектами, что зачастую приводит к побочным эффектам.

3. Необходимость частого приема ЛВ из-за отсутствия способа поддерживать его требуемую терапевтическую концентрацию в организме в течение длительного времени.

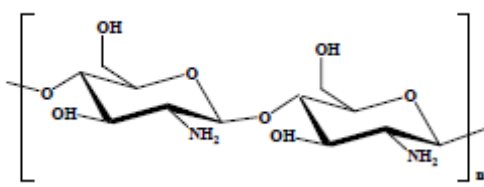
4. Недостаточная биосовместимость или биодоступность ЛВ [12].

Высвобождение ЛВ из полимерных частиц в организме происходит путем диффузии и/или десорбции, которым способствует набухание полимерной матрицы, ее эрозия и деградация [8]. Во многом скорость высвобождения активного вещества определяется характеристиками полимера. Так, например, варьирование типа и соотношения мономеров в полилактид-со-гликолиде позволяет регулировать скорость биодеструкции ПЛГА, поскольку скорость гидролиза полигликолида выше, чем у полилактида [13-15]. Это, в свою очередь, оказывает влияние на скорость и степень деградации носителей ЛВ в организме и кинетику высвобождения ЛВ. С целью получения транспортных носителей ЛВ используют полимеры как природного (альбумин, хитозан, альгиновая кислота, гиалуроновая кислота, декстран [16-20]), так и синтетического происхождения (например, полилактид, полилактид-со-гликолид, поли-ε-капролактон, полиметакрилаты, полицианакрилаты, полиангидриды, полифосфазены, полифосфоэфиры, поли(ортоэфиры) [21-32]). Формулы некоторых из них приведены на рис. 1.1 и 1.2.

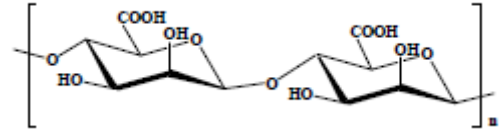
Полимерные носители как системы доставки ЛВ получают с помощью физических, физико-химических и химических методов. Так, к физическим методам получения *микрокапсул* относят методы, которые основаны на механическом нанесении оболочек на частицы лекарственного вещества: дражирование, диспергирование в системе жидкость-жидкость, напыление в

псевдооживленном слое, центрифужное микрокапсулирование, экструзия и метод конденсации паров.

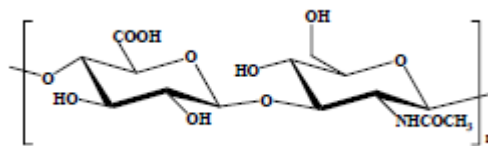
### Полимеры природного происхождения



Хитозан



Альгиновая кислота

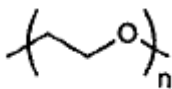


Гиалуроновая кислота

Рисунок 1.1. Некоторые природные полимеры, используемые для получения систем доставки ЛВ.

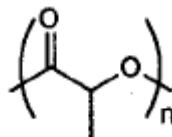
### Полимеры синтетического происхождения

(PEG)



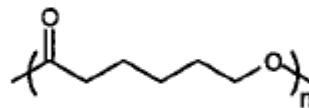
Полиэтиленгликоль

(PLA)



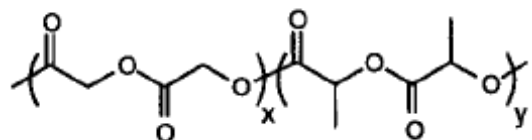
Полилактид

(PCL)



Поли-ε-капролактон

(PLGA)



Полилактид-со-гликолид

Рисунок 1.2. Некоторые синтетические полимеры, используемые для получения систем доставки ЛВ.

К физико-химическим методам относят: осаждение нерастворителем, образование новой фазы при изменении температуры, упаривание летучего растворителя, отверждение расплавов в жидких средах, экстракционное замещение, высушивание распылением, физическую адсорбцию, электростатический метод. В основе химических методов лежат реакции полимеризации и поликонденсации на границе раздела двух несмешивающихся жидкостей [10, 33].

*Микросферы* на основе биоразлагаемых полимеров получают путем отверждения капель раствора полимера, либо полимера и ЛВ. Отверждение может быть осуществлено с помощью таких процессов, как ионотропное гелеобразование, сшивка полимера с образованием ковалентной связи, коацервация или высушивание распылением [34-37].

Полимерные *наночастицы* получают с помощью методов эмульгирования, либо осаждения. НЧ могут быть получены также с помощью полимеризации соответствующих мономеров, к примеру, когда в качестве полимера используют полиакрилаты [8].

## **1.2. Хитозановые микросферы как системы контролируемой доставки инсулина в желудочно-кишечный тракт**

### **1.2.1. Требования к системам пероральной доставки инсулина**

Инсулин – гормон, который секретируется  $\beta$ -клетками панкреатических островков поджелудочной железы. Он включает в себя две полипептидные цепочки, соединенные дисульфидными мостиками, одна из которых содержит 21 аминокислоту, другая – 30 аминокислот (рис. 1.3).

Инсулин выполняет в организме ряд важных функций [38]:

- 1) Стимулирует транспорт глюкозы через мембраны в клетки, снижает содержание глюкозы в крови;
- 2) Стимулирует синтез гликогена, активирует процессы гликолиза, подавляет глюконеогенез. Стимулирует процессы синтеза белка в клетках.

- 3) Стимулирует синтез информационной РНК, активирует в печени синтез аминокислот.
- 4) Способствует поглощению глюкозы из крови жировой тканью.
- 5) Влияет на обмен липидов, стимулируя синтез триглицеридов и свободных жирных кислот из глюкозы, подавляя распад жиров.
- 6) В скелетных мышцах и в мышце сердца усиливает окисление глюкозы до углекислоты и воды.
- 7) Снижает содержание калия и фосфора в крови.

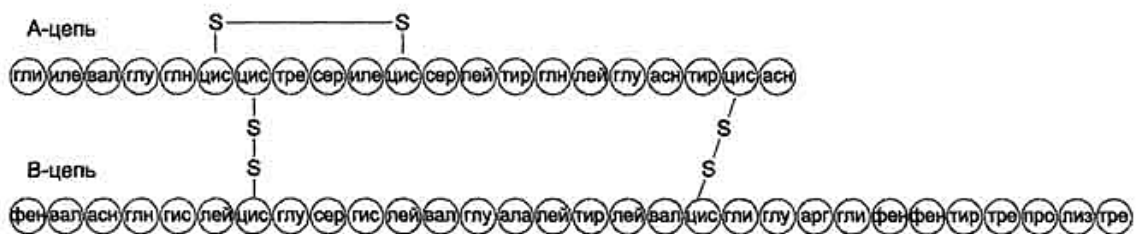


Рисунок 1.3. Структура молекулы инсулина человека [39].

Дефицит инсулина в организме, либо избыточная активность контринсулярных гормонов, являются причиной сахарного диабета – состояния хронической гипергликемии (повышенного содержания глюкозы в крови), вызванного панкреатической или внепанкреатической инсулиновой недостаточностью. Гипергликемия сопровождается глюкозурией и полиурией вызывающей обезвоживание организма, нарушением жирового и белкового обмена, гормональной регуляции. Образование в печени и накопление в организме кетонных тел при сахарном диабете вызывают интоксикацию и приводят к состоянию диабетической комы [40]. С целью снижения уровня глюкозы в крови, в зависимости от типа сахарного диабета, применяют препараты инсулина и пероральные сахаропонижающие средства. Однако инсулинотерапия может требоваться больным любого типа диабета на определенной стадии болезни [41]. В настоящий момент применяют препараты человеческого генно-инженерного инсулина, его полусинтетических аналогов и

препараты свиного инсулина, которые подразделяют по степени длительности действия на:

а) инсулины короткого действия (ИКД) (препараты инсулина с быстрым развитием максимального эффекта (через 1-4 ч) и кратковременным действием (4-8 ч));

б) инсулины среднего действия (ИСД) (препараты инсулина со средней скоростью развития максимального эффекта и среднего действия (18-24 ч));

в) инсулины длительного действия (ИДД) (препараты инсулина с медленным развитием максимального эффекта (через 12-18 ч) и длительным действием (24-40 ч));

г) комбинированные инсулины (смеси препаратов ИКД с препаратами ИСД) [42, 43].

Преимуществом препаратов инсулина пролонгированного действия является то, что они позволяют уменьшить частоту инъекций и обеспечить длительный эффект, однако они неприменимы при купировании диабетической комы. Также необходимо отметить, что вывести больного из гипогликемии, вызванной пролонгированными препаратами, сложнее, чем из гипогликемии, возникшей под влиянием препаратов инсулина короткого действия [44].

Препараты инсулина вводят в организм парентерально (подкожно, внутримышечно, внутривенно). Инъекционные формы введения имеют ряд недостатков, таких как болезненные ощущения пациента, риск инфицирования, аллергические реакции, кожные реакции, постинъекционная липоатрофия, либо гипертрофия жировой ткани в месте введения препарата [41, 44]. Пероральное введение инсулина могло бы устранить побочные эффекты, вызванные инъекциями, однако, такая форма введения затруднена вследствие гидролиза белка в желудочно-кишечном тракте под действием кислой среды желудка (рН 1,2 – 2) и ферментов ЖКТ (пепсина, трипсина, карбоксипептидаз и др.) [39]. Также необходимо отметить, что большие размеры макромолекул белков являются фактором, ограничивающим их всасывание в тонком кишечнике [45].

Исходя из сказанного выше, можно сформулировать ряд требований, которым должны отвечать системы пероральной доставки инсулина:

- Сохранять стабильность гормона в среде желудка при низких значениях рН в течение как минимум двух часов (время переваривания пищи в желудке) и предотвращать контактирование белка с пепсином;
- Высвобождать белок в тонком кишечнике при рН 7,4 (в том участке желудочно-кишечного тракта, из которого происходит всасывание лекарственного вещества);
- Сохранять устойчивость белка к действию ферментов желудочно-кишечного тракта;
- Позволять регулировать время и кинетику высвобождения белка;
- Обладать мукоадгезивными свойствами, облегчать транспорт молекул инсулина через стенки кишечника.

### **1.2.2. Хитозан**

Хитозан – это катионный аминополисахарид природного происхождения, сополимер глюкозамина и N-ацетилглюкозамина, получение которого осуществляют путем частичного дезацетилирования хитина (рис. 1.4) [46, 47].

В отличие от многих коммерческих полисахаридов, таких как, целлюлоза, каррагинан, декстран, пектин, агар-агар, агароза, гепарин, альгиновая кислота, обладающих нейтральной или кислой природой, хитозан является высокоосновным биополимером. Благодаря наличию аминогрупп в своей структуре, он обладает рядом специфических характеристик. Хитозан способен действовать как хелатирующий агент, формировать пленки и, при взаимодействии с противоположно заряженными полимерами, образовывать полиэлектролитные комплексы [48].

В твердом состоянии хитозан представляет собой аморфно-кристаллический полимер, который может существовать в нескольких полиморфных модификациях [49]. Хитозан нерастворим при нейтральных и щелочных значениях рН, но образует водорастворимые соли в разбавленных

растворах органических и неорганических кислот, таких как хлороводородная, глутаминовая, молочная и уксусная кислоты [50]. Помимо pH и ионной силы, на растворимость хитозана значительное влияние оказывают степень деацетилирования полимера, его молекулярная масса, а также характер распределения N-ацетильных групп в макромолекуле [49].

Применение хитозана в медицине и фармацевтике обусловлено такими его свойствами, как способность к биодegradации, биосовместимость, отсутствие токсичности, мукоадгезия, способность оказывать иммуностимулирующее, антиоксидантное, антибактериальное, противовирусное, гепатопротекторное, антихолестатическое действие [46, 51, 52]. Хитозан применяют в тканевой инженерии, при обработке ожогов, для получения искусственных материалов,

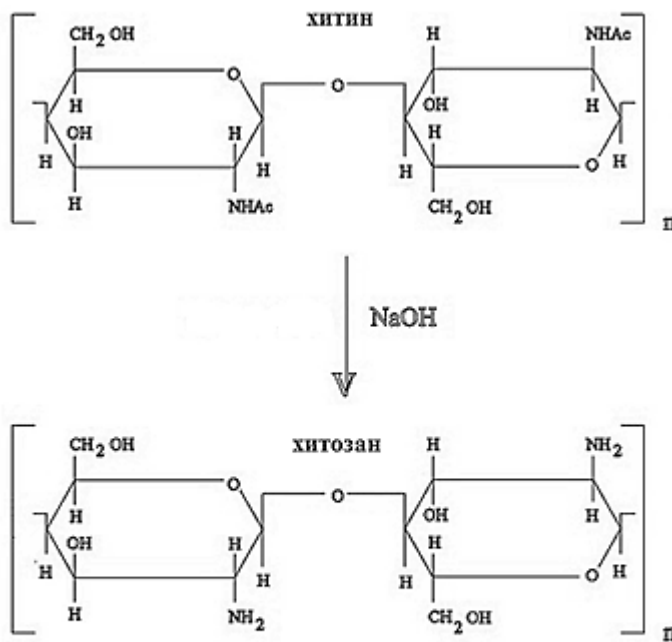


Рисунок 1.4. Получение хитозана путем деацетилирования хитина [47].

способных временно замещать кожную ткань, в офтальмологии и для создания систем доставки лекарственных веществ [53]. Различные виды транспортных носителей фармацевтических препаратов на основе хитозана, разрабатываемые в настоящее время, приведены в таблице 1.2 [46, 48].

Хитозановые микросферы являются перспективными системами контролируемой доставки инсулина в ЖКТ благодаря вышеперечисленным свойствам полимера-носителя, прежде всего таким, как биосовместимость, биодegradация, отсутствие токсичности, мукоадгезия. Мукоадгезивные свойства имеют большое значение в случае пероральной доставки ЛВ, поскольку повышают эффективность всасывания препарата.

**Таблица 1.2.** Виды транспортных носителей фармацевтических препаратов на основе хитозана.

<b>Тип системы доставки ЛВ на основе хитозана</b>	<b>ЛВ</b>
Таблетки	ибупрофен [54], дилтиазем [55], теофиллин [56]
Капсулы	лактоферрин [57]
Микросферы/микрочастицы	офлоксацин [58], рифампицин [59], инсулин [60]
Наночастицы	дорзоламид [61], алпразолам [62]
Пленки	пропранолола гидрохлорид [63]
Гель	тинидазол, теофиллин [64]

Наличие мукоадгезивных свойств у хитозана может быть связано, прежде всего, с межмолекулярными силами притяжения, возникающими в результате электростатического взаимодействия между положительно заряженными макромолекулами хитозана и отрицательно заряженной поверхностью слизистой ткани тонкого кишечника [65 – 69].

Преимуществом хитозановых микросфер как систем доставки ЛВ является также возможность получить желаемый профиль высвобождения препарата посредством использования различных соотношений препарат – полимер и изменения молекулярной массы полимера в процессе получения носителя ЛВ. Являясь небольшими по размеру, микросферы имеют большое соотношение поверхность – объем, и могут быть использованы для контролируемого высвобождения нерастворимых лекарственных препаратов [65].

Наличие аминогрупп в макромолекуле хитозана предоставляет возможность получать его полиэлектролитные комплексы с рядом полимеров, имеющих в своем составе карбоксильные и сульфогруппы, а также осуществлять сшивку хитозана с низкомолекулярными сшивающими агентами



с образованием ковалентной, либо ионной связи. Варьирование условий, при которых происходит сшивка или образование ПЭК, позволяет регулировать прочность полимерной матрицы микросфер и скорость ее разрушения в среде желудка и тонкого кишечника, что в свою очередь оказывает непосредственное влияние на кинетику высвобождения БАВ.

### **1.2.3. Разработка хитозановых микросфер как потенциальных систем контролируемой доставки инсулина в ЖКТ**

#### **1.2.3.1. Методы получения хитозановых микросфер**

В основе получения хитозановых микросфер лежат процессы формирования капель раствора хитозана и их отверждения.

По типу отверждения капель методы получения хитозановых микросфер можно разделить на: ионотропное гелеобразование, коацервацию, сшивание с образованием ковалентной связи и распылительную сушку.

##### ***Ионотропное гелеобразование***

В методе ионотропного гелеобразования формирование гелевых микросфер происходит в результате электростатического взаимодействия протонированных аминных групп хитозана с отрицательно заряженными ионами. В качестве сшивающего агента в этом случае используют триполифосфат [70-72], гидроксиды [70, 73], молибдаты [74] и т.д. Преимуществами данного метода являются простота исполнения и мягкие условия, не требующие, например, проведения процесса при повышенной температуре или введения в систему глутарового альдегида, что могло бы отрицательно сказаться на устойчивости включаемого в микросферы белка [75].

##### ***Коацервация***

Получение микросфер методом коацервации заключается в диспергировании белка в растворе полимера и уменьшении растворимости

последнего, вызываемого добавлением в систему третьего компонента [75]. Возникновение в водном растворе полиэлектролита капель, обогащенных растворенным полимерным веществом, и их слияние (коалесценция) приводит к разделению системы на два равновесных жидких слоя: с низкой концентрацией полиэлектролита и слоя с повышенной его концентрацией (коацерватный слой) [76]. Коацервацию подразделяют на простую и сложную.

В случае простой коацервации выделение коацерватного слоя происходит в результате удаления гидратной оболочки макромолекулы полиэлектролита, которое может быть вызвано введением в раствор полимера низкомолекулярного вещества, обладающего сродством к молекулам воды, такого как соль или спирт, а также изменением температуры или разбавлением системы [10, 76]. Методом осадительной коацервации при помощи сульфата натрия получали хитозановые микросферы и микрочастицы в работах [77, 78].

Сложная коацервация происходит в результате взаимодействия между положительными и отрицательными зарядами двух полимеров, и, как правило, вызывается изменением pH [20]. Сложная коацервация может быть одно-, двух- и трехкомплексной (рис. 1.5).

При однокомплексной коацервации положительно и отрицательно заряженные ионы полиамфолита взаимодействуют друг с другом, в результате чего растворимость полимера понижается и происходит выделение коацервата.

При двухкомплексной коацервации происходит притяжение двух противоположно заряженных полиэлектролитов, либо полиэлектролита и низкомолекулярного иона. Трехкомплексные коацерваты образуются при взаимодействии полиамфолита, поликислоты или полиоснования и низкомолекулярного иона [79].

Примером однокомплексной коацервации может служить получение микрочастиц на основе хитозан сульфата [80] (рис. 1.6).

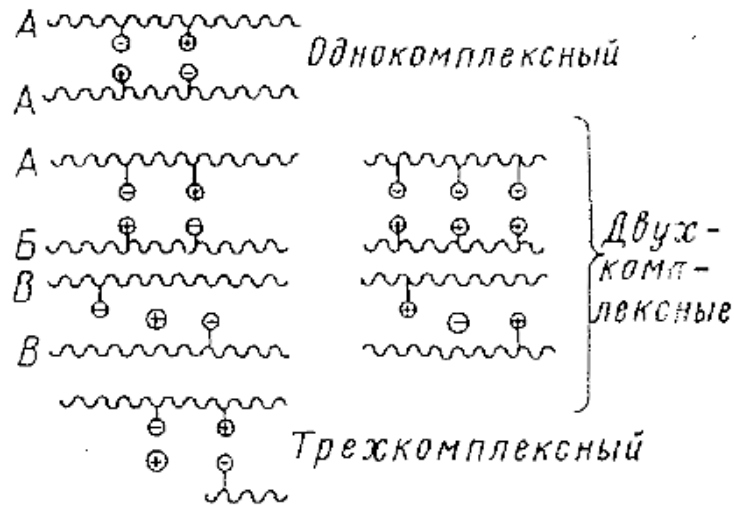


Рисунок 1.5. Взаимодействие ионов в растворе при образовании сложных коацерватов различных типов [10].

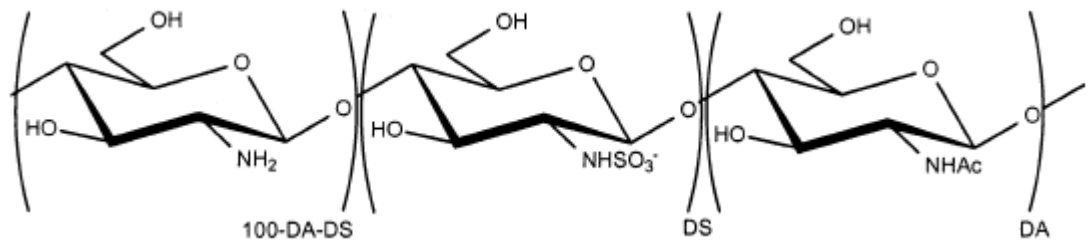


Рисунок 1.6. Химическое строение N-сульфированного хитозана. DA – степень деацетилирования, DS – степень сульфирования.

Частицы были получены в результате подкисления раствора сульфата хитозана 0,02M HCl, за счет электростатического взаимодействия положительно заряженных протонированных аминных групп и отрицательно заряженных сульфогрупп полиамфолита, и затем выделены центрифугированием. Размер полученных частиц варьировался от 280 до 420 нм в зависимости от pH раствора полимера.

Для получения микросфер двухкомплексной коацервацией используют такие полимеры, как альгинат натрия [81-83], натрий карбоксиметил целлюлозу [84], к-каррагинан [85], декстран сульфат [86], желатин [87].

Полимерные частицы на основе полиэлектролитного комплекса хитозан – альгинат с включенным белком были получены в работе [83]. Раствор альгината натрия, содержащий БСА или инсулин, по каплям добавляли к совместному раствору хитозана и  $\text{CaCl}_2$ . Отверждение капель происходило в течение 15 минут, после этого частицы отфильтровывали, промывали деионизированной водой и сушили при комнатной температуре. Размер полученных частиц составил 900-1000 мкм.

### *Сшивание с образованием ковалентной связи*

Получение хитозановых микросфер данным методом осуществляют на основе эмульсии в/м. Сформированные в эмульсии капли раствора хитозана (капли дисперсной фазы) отверждают за счет образования ковалентной связи между аминными группами хитозана и молекулярными группами (как правило, альдегидными) сшивающего агента. В качестве сшивающих агентов могут быть использованы такие соединения, как глутаровый альдегид [88, 89], генипин [90, 91], гепарин [92], эпихлоргидрин [93 – 95], ванилин [96].

В работе [89] раствор хитозана в 5%-й уксусной кислоте добавляли в парафиновое масло, содержащее эмульгатор спан 80, при перемешивании (2000 – 4000 об/мин) и комнатной температуре. Далее смесь перемешивали при скорости 500 об/мин. Через час и через два часа к образовавшейся эмульсии дважды добавляли по каплям 25%-й водный раствор глутарового альдегида. Капли дисперсной фазы отверждали в течение еще одного часа, далее суспензию отстаивали, декантировали супернатант. Микросферы выделяли, промывали эфиром и сушили при комнатной температуре. Средний диаметр полученных образцов находился в диапазоне 10-14 мкм.

В ряде работ используют смешанные методы: на первой стадии происходит ионотропное гелеобразование, либо формирование ПЭК в каплях дисперсной фазы обратной эмульсии, на второй – их последующее отверждение сшивающим агентом [97 – 100].

В работе [101] осуществляли термальное сшивание хитозановой матрицы микросфер лимонной кислотой. В этом случае сшивание может происходить за счет образования ионной связи между отрицательно заряженными карбоксильными группами сшивающего агента и положительно заряженными протонированными аминными группами хитозана (рис. 1.7а), либо за счет возникновения ковалентной связи (рис. 1.7б).

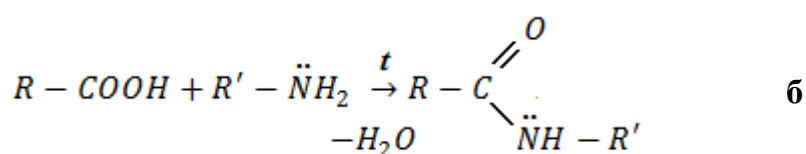
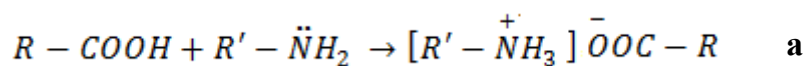


Рисунок 1.7. Ионное взаимодействие хитозана и лимонной кислоты (а) и взаимодействие с образованием ковалентной связи (б).

Лимонную кислоту добавляли к 2,7% раствору хитозана в 2%-й уксусной кислоте. Раствор сшитого хитозана охлаждали до 0 °С и добавляли к 25 мл парафинового масла при той же температуре, перемешивали 2 минуты, затем добавляли к 75 мл парафинового масла, разогретого до 120 °С. Термальное сшивание проводили в течение 40 минут в стеклянном стакане при интенсивном перемешивании (900 об./мин). Полученные микросферы выделяли центрифугированием, промывали диэтиловым эфиром и сушили.

Предположение об образовании амидной связи между хитозаном и лимонной кислотой в процессе получения микросфер при высоких температурах было высказано Varshosaz J. и сотрудниками в результате проводимых ими исследований [102]. Было показано, что хитозановые микросферы, отвежденные лимонной кислотой при умеренных температурах (60 °С), имеют значительно больший процент набухания в водной среде и скорость высвобождения ЛВ, по сравнению с микросферами, сшитыми при повышенной температуре (120 °С). Varshosaz предположил, что различия в

свойства микросфер можно объяснить разным механизмом сшивки. При умеренной температуре происходит электростатическое взаимодействие между протонированной аминогруппой хитозана и карбоксилат ионом лимонной кислоты в водном растворе, что приводит к образованию соли. При повышенной температуре (метод Orienti) карбоксильные группы лимонной кислоты присоединяют протон, и затем медленно реагируют с нуклеофильной аминогруппой хитозана до образования амида. В результате уменьшается количество гидрофильных групп в хитозане, что приводит к снижению процента водной сорбции и эрозии микросфер по сравнению со сшитыми при умеренной температуре образцами.

### ***Распылительная сушка***

Метод распылительной сушки позволяет получить сухой порошок из жидкой фазы и достаточно часто используется в фармацевтической промышленности. Суть метода заключается в том, что раствор полимера, в котором предварительно растворяют или диспергируют лекарственное вещество, распыляют в потоке горячего воздуха, что приводит к формированию мелких капель и последующему испарению из них растворителя с образованием микросфер, размер которых зависит от условий распыления [10, 75, 103]. Применительно к получению хитозановых микросфер рассматриваемый метод имеет ряд недостатков. Так, было показано, что при повышенной температуре сушки (168 °С) в 1-2%-й уксусной кислоте происходит ацетилирование макромолекул хитозана. Таким образом, в процессе получения микросфер данным методом степень деацетилирования полимера понижалась, что оказывало непосредственное влияние на скорость деградации частиц и кинетику высвобождения препарата [104]. Также необходимо отметить, что в случае инкапсулирования белков методом распылительной сушки, может происходить агрегация и денатурирование их макромолекул под действием высокой температуры, поэтому сохранение стабильности микроинкапсулированных белков в процессе получения

микросфер с помощью высушивания распылением является одной из основных проблем данного метода. Тем не менее, процесс получения микросфер методом распылительной сушки является быстрым, удобным и легко масштабируется [75], вследствие этого существует ряд работ, посвященных получению хитозановых микросфер данным способом [105 – 107].

### **1.2.3.2. Контролируемое высвобождение инсулина из хитозановых микросфер**

В литературе приведен ряд исследований, посвященных изучению факторов, оказывающих влияние на кинетику высвобождения белка из хитозановых микросфер в среде тонкого кишечника и процент первоначального высвобождения БАВ. Предпринимались попытки регулировать растворимость хитозановой матрицы микросфер при рН 7,4 и, следовательно, получить возможность контролировать скорость высвобождения белка, посредством подбора концентрации и ММ хитозана [108-110]; получения микросфер на основе композитов хитозана и различных полимеров, таких как полилактид-со-гликолид [111, 112], полиметакрилаты [113, 114]; подбора подходящих сшивающих агентов, среди которых лимонная кислота [101, 102], генипин [90,91], глутаровый альдегид – триполифосфат [89], п-фталевый альдегид – глутаровый альдегид [115], варьирования их концентраций; получения микросфер на основе ПЭК, например, хитозан – альгинат [83], хитозан – альгинат – пектин [116], хитозан – карбоксиметил кешью гум [110]. Также в ряде работ была проведена оптимизация традиционных способов получения микросфер [117-119].

Было установлено, что уменьшение молекулярной массы хитозана [108] и его концентрации [109] увеличивают скорость высвобождения белка в среде, имитирующей среду тонкого кишечника. По всей вероятности, это связано со снижением прочности и повышением скорости деструкции полимерной матрицы. Polk и сотрудники [108] показали, что использование в процессе получения микросфер хитозана с высокой молекулярной массой ( $1,25 \times 10^6$  Да),

или смеси хитозанов с высокой и низкой молекулярной массой (от  $0,25 \times 10^6$  до  $1,25 \times 10^6$  Да), уменьшает процент первоначального высвобождения и скорость высвобождения белка в течение первых 4 часов инкубации, при этом происходит повышение скорости выделения белка в течение следующих 20 часов.

Поскольку соотношение мономеров в полилактид-со-гликолиде влияет на скорость его биодеструкции, введение ПЛГА с заданными свойствами в полимерную матрицу хитозана, или нанесение его на хитозановые микросферы в качестве оболочки, может не только повысить прочность полимерной матрицы в кислой среде, но и позволить контролировать скорость высвобождения белка в среде тонкого кишечника.

Альгинатные ядра, содержащие бычий сывороточный альбумин, были получены на основе эмульсии в/м и диспергированы в растворе хитозана (80 кДа, степень деацетилирования  $\geq 80\%$ ) с различными концентрациями при pH от 4 до 6. Микросферы выделяли центрифугированием и диспергировали в растворе ПЛГА (50:50 и 70:30) в ацетонитиле. Смесь ультразвуковали и добавляли по каплям в арахисовое масло, содержащее ПАВ (Спан 80). После удаления ацетонитрила под вакуумом, отвержденные микросферы выделяли центрифугированием, промывали и лиофилизировали [112]. Были получены сферические частицы (рис. 1.8), средний размер которых составил  $30,96 \pm 9,08$  мкм, эффективность включения БСА – около 60%. Было показано, что соотношение мономеров в полилактид-со-гликолиде оказывает значительное влияние на кинетику высвобождения белка из микросфер (рис. 1.9). При увеличении доли более гидрофобного лактида в ПЛГА, скорость высвобождения уменьшается, а процент первоначального высвобождения падает от 40% до 20%.

При использовании ПЛГА с соотношением лактид:гликолид 70:30 за 100 часов инкубации микросфер в фосфатно-солевом буфере при pH 7,4 было высвобождено не более 30% БСА. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что нанесение ПЛГА-оболочки на хитозановые



микросферы позволяет обеспечить пролонгированное высвобождение БАВ в тонком кишечнике.

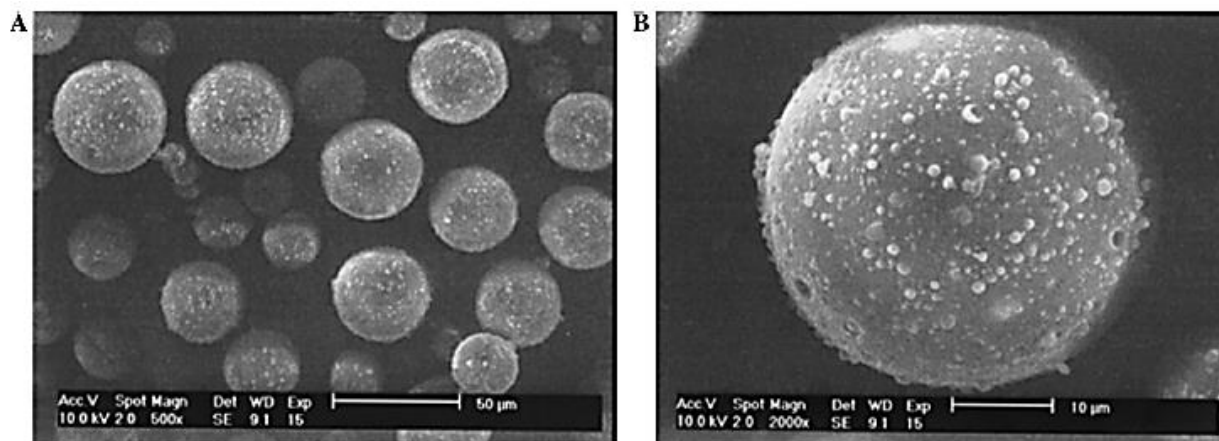


Рисунок 1.8. Микрофотографии микросфер на основе композитов ПЛГА-хитозан-альгинат, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии [112].

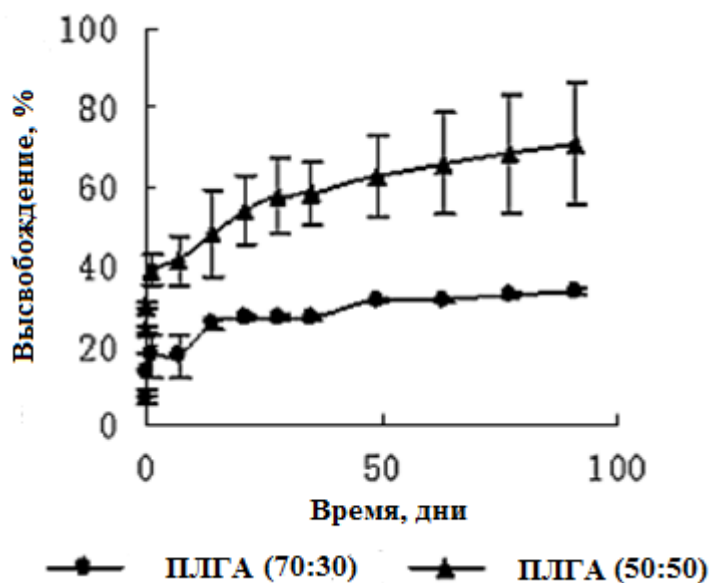


Рисунок 1.9. Кинетика высвобождения БСА из микросфер на основе ПЭЖ хитозан – альгинат, покрытых оболочкой ПЛГА с разным соотношением мономеров в фосфатно-солевой буфер (рН 7,4) [112].

В работе [115] изучали влияние способа сшивания полимерной матрицы на кинетику высвобождения белка из микросфер на основе хитозана и смеси хитозана и N-[2-гидрокси-3-метил-аммоний пропил] хитозан хлорида в соотношении 1:1. Последний был выбран авторами в качестве компонента

полимерной матрицы, поскольку известно, что производные хитозана на основе четвертичных соединений аммония нетоксичны и увеличивают проницаемость стенок тонкого кишечника [120-122]. Водную фазу (раствор хитозана или смеси хитозанов в уксусной кислоте) продавливали через стеклянную пористую мембрану в масляную фазу (парафиновое масло:петролейный эфир 7:5), содержащую эмульгатор РО 500.

Полученную эмульсию отверждали глутаровым альдегидом, либо последовательно п-фталевым, затем – глутаровым альдегидом (рис. 1.10). Бычий сывороточный альбумин включали в образцы методом сорбции.

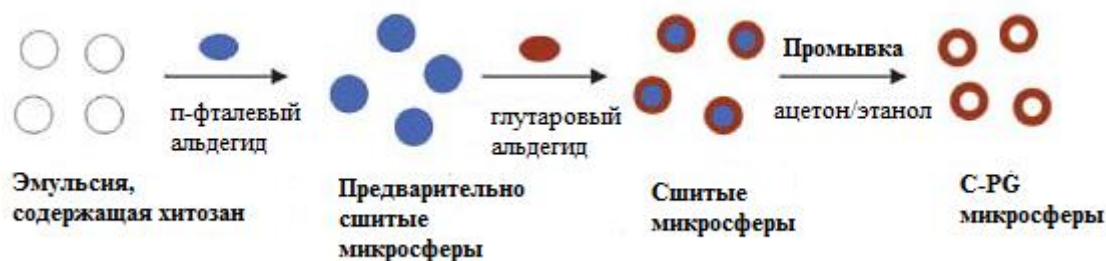


Рисунок 1.10. Получение хитозановых микросфер, отвержденных п-фталевым и глутаровым альдегидом [115].

Образцы микросфер, которые были получены, приведены в табл. 1.3. Размеры микросфер варьировались от 7,3 до 7,7 мкм. Были получены четыре образца микросфер с различной внутренней структурой (рис. 1.11): **C-G** – твердые хитозановые микросферы, с низкой пористостью, сшитые глутаровым альдегидом; **C-PG** – полые хитозановые микросферы с твердой оболочкой, сшитые п-фталевым и глутаровым альдегидом; **CH-G** – микросферы на основе смеси хитозана и N-[2-гидрокси-3-метил-аммоний пропил] хитозан хлорида, сшитые глутаровым альдегидом, имеющие микропористую структуру; и **CH-PG** – микросферы на основе смеси хитозана и N-[2-гидрокси-3-метил-аммоний пропил] хитозан хлорида, сшитые п-фталевым и глутаровым альдегидом, структура которых включает в себя большое количество пор и микроканалов.

**Таблица 1.3.** Образцы микрофер, полученных на основе хитозана [115].

Образец	Полимеры	Сшивающие агенты
C-G	хитозан	Глутаровый альдегид
C-PG	хитозан	п-Фталевый альдегид, глутаровый альдегид
CH-G	хитозан: N-[2-гидрокси-3-метил-аммоний пропил] хитозан хлорид 1:1	Глутаровый альдегид
CH-PG	хитозан: N-[2-гидрокси-3-метил-аммоний пропил] хитозан хлорид 1:1	п-Фталевый альдегид, глутаровый альдегид

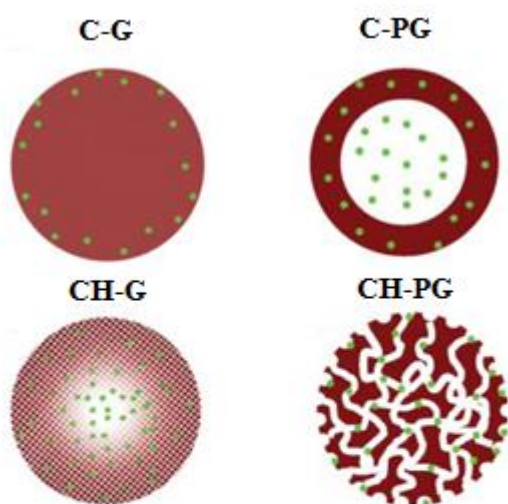


Рисунок 1.11. Схематическое изображение структуры полученных микрофер с включенным БСА [115].

Кинетику высвобождения БСА из микрофер изучали, инкубируя образцы в фосфатно-солевом буфере с pH 7,4. Кривые высвобождения белка показаны на рис. 1.12. Авторы объясняют различный профиль кривых высвобождения отличием в структуре полимерной матрицы полученных частиц. Образцы на основе хитозана, сшитых глутаровым альдегидом (C-G), также как и на основе смеси хитозанов, сшитых и п-фталевым и глутаровым альдегидами (CH-PG), продемонстрировали самый

высокий процент первоначального высвобождения БСА. В первом случае, по мнению авторов, в процессе включения БСА в образец C-G большое количество макромолекул белка адсорбировалось на поверхности частиц и в первоначальный момент высвобождения перешло в фосфатно-солевой буфер. Во втором случае, полимерная матрица микрофер имела большое количество пор и каналов, через которые белок легко высвобождался в первоначальный

момент. Остальные два образца (С-PG и СН-G) содержали включенный БСА внутри полимерной матрицы. Таким образом, высвобождение белка происходило за счет диффузии макромолекул через поры микросфер за счет градиента концентрации БСА, что объясняет низкую скорость высвобождения.

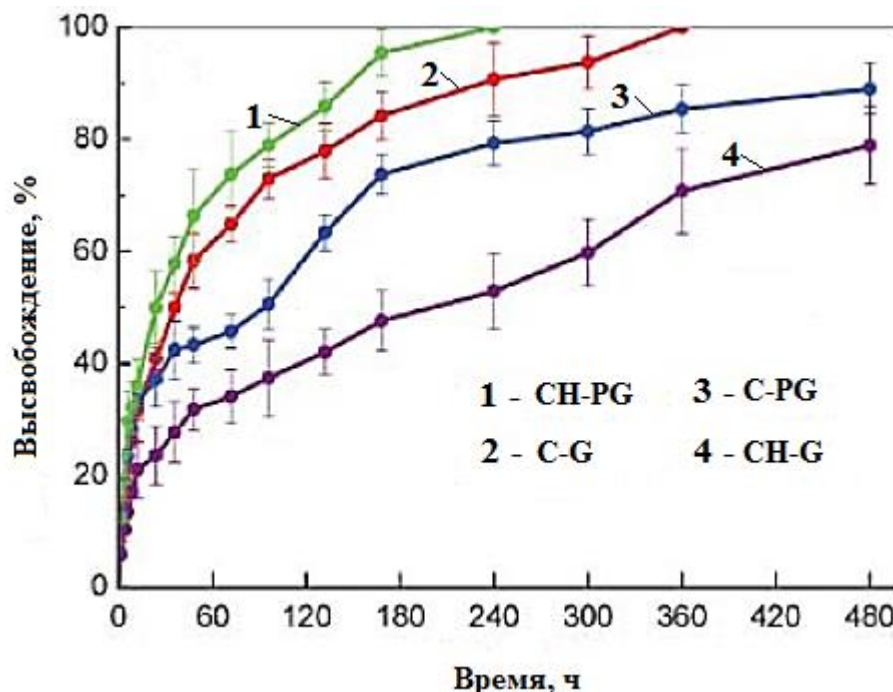


Рисунок 1.12. Кинетика высвобождения БСА из хитозановых микросфер в фосфатно-солевой буфер (рН 7,4) [115].

Регулирование прочности хитозановой матрицы микросфер и ее растворимости при рН среды тонкого кишечника возможно осуществить не только варьируя тип и концентрацию сшивающих агентов, но и отрицательно заряженных полиэлектролитов, образующих при взаимодействии с хитозаном полиэлектролитный комплекс.

В работе [116] получали микросферы с включенным белком на основе полиэлектролитных комплексов хитозан – альгинат и хитозан – альгинат – пектин. Совместный раствор бычьего сывороточного альбумина и хитозана добавляли по каплям в совместный водный раствор триполифосфата натрия и альгината натрия. В процессе получения микросфер варьировали концентрацию БСА и альгината, либо добавляли глутаровый альдегид или пектин во внешнюю фазу.

Диаметр полученных частиц составлял 0,78 – 0,92 мм. Эффективность включения БСА в микросферы варьировалась от 13 до 90%. Фотографии микросфер приведены на рис. 1.13.

Было показано, что количество высвобожденного БСА из микросфер на основе ПЭК хитозан – альгинат уменьшалось с повышением процента включения белка в микросферы. Процент первоначального высвобождения БСА из данных образцов микросфер при высоких концентрациях включенного белка достигал 40%. Было установлено, что введение глутарового альдегида, либо пектина в полимерную матрицу, способствует значительному снижению процента первоначального высвобождения. Лучший результат был получен при добавлении пектина во внешнюю фазу с концентрацией 1%.

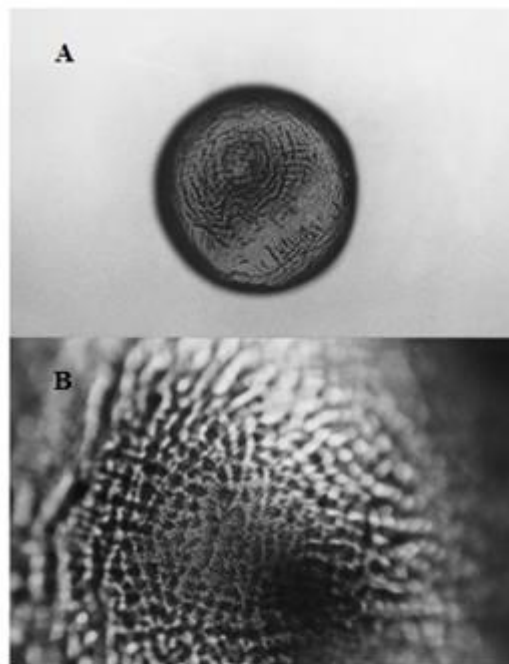


Рисунок 1.13. Фотографии хитозановых микросфер, полученных на основе ПЭК хитозан – альгинат. Увеличение: (А) – в 4 раза; (В) – в 20 раз [116].

### 1.3. Повышение агрегативной устойчивости эмульсий, используемых для получения систем доставки ЛВ

Как было показано в разделе 1.2.3.2., в большинстве случаев получение носителей ЛВ с контролируемым профилем высвобождения препарата авторы пытаются достичь посредством разработки систем доставки с регулируемой скоростью деградации полимерной матрицы. В то же время, с точки зрения характеристик получаемых микросфер, большое значение имеет процесс формирования капель раствора полимера. Отверждение капель дисперсной фазы эмульсии представляется более удобным способом получения микросфер по сравнению с отверждением капель раствора полимера в водной среде,

поскольку позволяет достичь требуемых свойств носителей ЛВ посредством регулирования дисперсности и агрегативной устойчивости исходных эмульсий. Так, получение микросфер с небольшими размерами и высокой удельной поверхностью за счет повышения агрегативной устойчивости и снижения диаметра капель эмульсии обеспечивает высокую эффективность включения препарата методом сорбции. Размеры, полидисперсность и степень агрегации микросфер, зависящие в том числе от вышеперечисленных свойств исходных эмульсий, оказывают непосредственное влияние на профиль высвобождения лекарственного вещества.

Эмульсионный способ получения микросфер может быть использован при отверждении капель всеми перечисленными выше методами – ионотропным гелеобразованием, коацервацией, ковалентным сшиванием и распылительной сушкой. Тем не менее, в литературе приведены немногочисленные и отрывочные данные о взаимосвязи физико-химических свойств исходных эмульсий и конечных характеристик микросфер, таких как размеры, полидисперсность, эффективность включения БАВ и кинетика его высвобождения.

### **1.3.1. Факторы агрегативной устойчивости эмульсий**

Эмульсии – дисперсные системы, в которых капли одной жидкости (дисперсной фазы) распределены в другой (дисперсионной среде). Как правило, одна из фаз эмульсий – это вода, другая – углеводород (масло) [123]. Эмульсии являются лиофобными дисперсными системами, которые отличаются слабым (молекулярным) взаимодействием между дисперсной средой и дисперсионной фазой и обладают высокой удельной свободной поверхностной энергией границы раздела фаз ( $10^1 - 10^2$  мДж/м<sup>2</sup>). Нестабилизированные эмульсии термодинамически неустойчивы ( $\Delta G > 0$ ), межфазное натяжение в таких системах превышает значение критического межфазного натяжения  $\sigma_{кр}$ . В связи с этим в эмульсиях протекают различные самопроизвольные процессы, в результате которых система стремится

перейти в энергетически более выгодное состояние. Агрегативная неустойчивость эмульсий проявляется в образовании агрегатов капель дисперсной фазы (коагуляции) и увеличении размеров дисперсных частиц в результате их слияния (коалесценции). Оба эти процесса приводят к уменьшению поверхностной энергии системы [124]. Факторы, обеспечивающие агрегативную устойчивость эмульсий, подразделяют на термодинамические и кинетические. К первым относятся те факторы, которые снижают межфазное натяжение на границе раздела фаз, тем самым создавая энергетические барьеры, замедляющие или предотвращающие процесс коагуляции (электростатический, адсорбционно-сольватационный, энтропийный). Кинетические факторы (структурно-механический и гидродинамический) уменьшают скорость коагуляции за счет наличия на поверхности частиц адсорбционных слоев ПАВ, которые образуют двухмерную пленку, обладающую повышенными структурно-механическими свойствами, и гидродинамических свойств дисперсионной среды.

Действие ряда вышеперечисленных факторов на агрегативную устойчивость эмульсий может быть объяснено с точки зрения теории ДЛФО. В соответствии с теорией ДЛФО взаимодействие двух крупных частиц рассматривают как взаимодействие между двумя плоскими параллельными пластинами, общая энергия которого, приходящаяся на единицу площади, равна:

$$U = U_э + U_м, \quad (1.1)$$

где  $U_э$  – энергия электростатического отталкивания;  $U_м$  – энергия молекулярного притяжения.

Функция этих энергий от расстояния между пластинами равна:

$$dU_э = \Pi_э dh, \quad (1.2)$$

$$dU_м = \Pi_м dh, \quad (1.3)$$

где  $\Pi_э$  – электростатическая составляющая расклинивающего давления;  $\Pi_м$  – молекулярная составляющая расклинивающего давления.

Расклинивающее давление возникает при большом уменьшении толщины пленки в зазоре между двумя пластинами вследствие перекрывания поверхностных слоев, и равно разности между давлением на поверхность прослойки и давлением в объемной фазе, являющейся продолжением прослойки [125]. Выделяют четыре составляющих расклинивающего давления, которые учитывают как силы отталкивания, так и притяжения, действующие в пленке [126]:  $\Pi_э$  – электростатическая составляющая, которая обусловлена взаимным перекрыванием ДЭС;  $\Pi_а$  – адсорбционная составляющая, которая обусловлена перекрыванием молекулярных (неионных) адсорбционных слоев на поверхности частиц дисперсной фазы;  $\Pi_с$  – структурная составляющая, которая обусловлена формированием граничных слоев дисперсионной среды с особой структурой вблизи поверхности частиц (образованием сольватных слоев);  $\Pi_м$  – молекулярная составляющая, которая обусловлена действиями ван-дер-ваальсовых сил притяжения между молекулами, из которых состоит дисперсная частица.

В теории ДЛФО принимают, что давление отталкивания обусловлено только электростатическими силами ( $\Pi_э$ ), а притяжения – межмолекулярными ( $\Pi_м$ ). Зависимость энергий  $U_э$  и  $U_м$  от расстояния  $h$  между пластинами представляют в следующем виде:

$$U_э = B \times e^{ae}, \quad (1.4)$$

где  $a$  – величина, обратная толщине диффузной части ДЭС,  $B$  – константа, которая:

а) для слабо заряженных поверхностей пропорциональна  $B_1 \sim \varphi_δ^2 \times a$ ,

где  $\varphi_δ$  – потенциал диффузной части ДЭС;

б) для сильно заряженных поверхностей пропорциональна  $B_2 \sim (C_0T)/a$ , где  $C_0$  – концентрация противоионов в растворе.

$$U_м = - \frac{A^*}{12\pi h^2}, \quad (1.5)$$



$$A^* = A_{д.с.} + A_{д.ф.} - 2A_{межф} \quad (1.6)$$

где  $A_{д.с.}$  – константа Гамакера дисперсионной среды;  $A_{д.ф.}$  – константа Гамакера дисперсной фазы;  $A_{межф}$  – постоянная взаимодействия дисперсной фазы и дисперсионной среды.

Отсюда зависимость общей энергии системы от расстояния между пластинами:

$$U = Ve^{ax} - \frac{A^*}{12\pi h^2} \quad (1.7)$$

Зависимость энергии притяжения и отталкивания капель и общей энергии их взаимодействия от расстояния между ними представлена на рис. 1.14. Потенциальные кривые, характерные для дисперсных систем с различной степенью агрегативной устойчивости, показаны на рис. 1.15. Агрегативно устойчивые системы, в которых коагуляция частиц отсутствует, обладают высоким потенциальным барьером, величина которого превышает тепловую энергию ( $\Delta E \gg k_B T$ ), и неглубоким вторичным энергетическим минимумом ( $|U_{\text{min II}}| < k_B T$ ) (кривая 1, рис. 1.15). В том случае, если величина потенциального барьера небольшая (сравнима с величиной тепловой энергии), не все столкновения частиц дисперсной фазы являются эффективными и в системе происходит медленная коагуляция (кривая 2, рис. 1.15). При наличии в системе высокого потенциального барьера ( $\Delta E \gg k_B T$ ), предотвращающего взаимодействие частиц в I минимуме, и глубокого вторичного минимума ( $|U_{\text{min II}}| > k_B T$ ), происходит быстрая флокуляция частиц, которая приводит к образованию коагуляционных структур; частицы при этом остаются разделенными прослойкой дисперсионной среды (кривая 3, рис. 1.15). Если же в системе действуют только силы притяжения ( $\Delta E \leq 0$ ,  $|U_{\text{min II}}| < k_B T$ ), происходит взаимодействие капель дисперсной фазы в I минимуме, которое приводит к их слиянию (коалесценции) (кривая 4, рис. 1.15) [127]. Таким образом, электростатический фактор устойчивости дисперсных систем обусловлен тем, что увеличение потенциала на поверхности частиц в области

его малых значений, вызванное формированием двойного электрического слоя, приводит к росту величины потенциального барьера. Уже при значениях поверхностного потенциала дисперсных частиц, равных 20 мВ, профиль потенциальной кривой будет соответствовать кривой 1 (рис. 1.15), а система – являться агрегативно устойчивой [128].

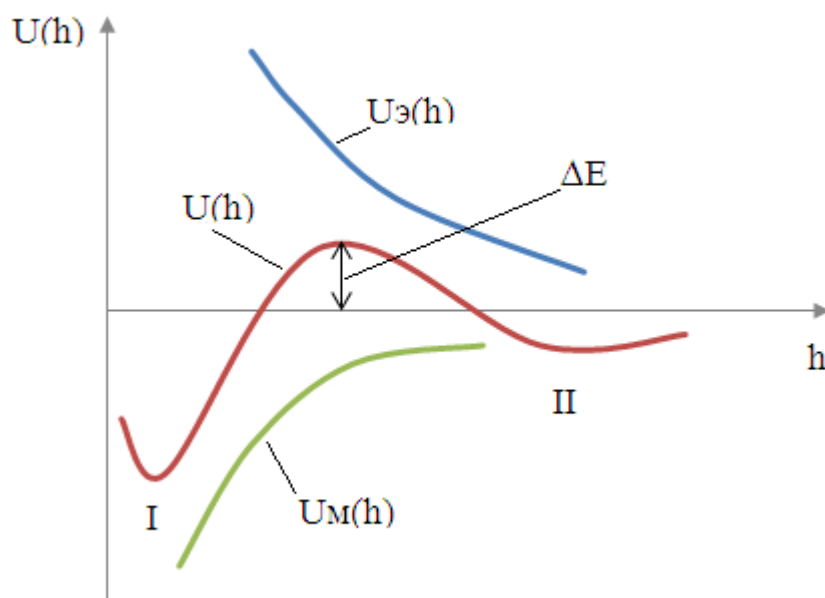


Рисунок 1.14. Зависимость энергии электростатического отталкивания  $Uэ$ , энергии молекулярного притяжения  $Uм$  и их суммарной энергии  $U$  от расстояния  $h$ .

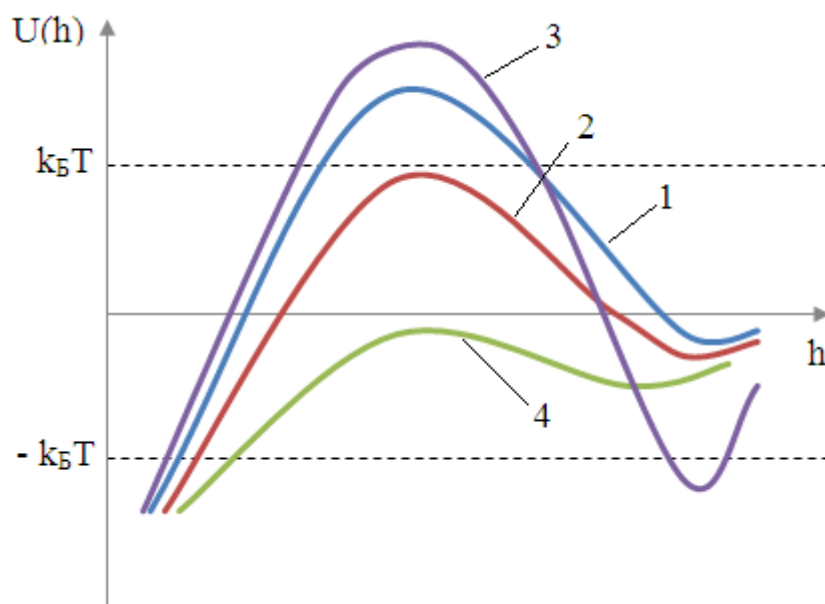


Рисунок 1.15. Потенциальные кривые для дисперсных систем с разной степенью агрегативной устойчивости.

При действии адсорбционно-сольватационного фактора агрегативной устойчивости происходит изменение энергии молекулярного притяжения между частицами (эффект экранирования) или разъединение частиц на такие расстояния, на которых действие молекулярных сил значительно ослаблено (эффект защиты расстоянием). В данном случае рассматривают влияние адсорбционных слоев только на молекулярное притяжение частиц. Расчет энергии молекулярной составляющей с учетом наличия на межфазной поверхности адсорбционных слоев проводят по уравнению:

$$U_{\text{м(АДС)}} = - \frac{r_1 r_2}{6(r_1 + r_2)} \left[ \frac{A}{H - 2\delta} + \frac{B}{H - \delta} + \frac{C}{H} \right], \quad (1.8)$$

где  $\delta$  - толщина адсорбционного слоя [м];  $r_1, r_2$  - радиусы частиц [ м ];  $H$ , - расстояние между частицами [ м ];  $A, B, C$  - постоянные, зависящие от природы дисперсной фазы, адсорбционных слоев и дисперсионной среды [Дж].

При перекрытии адсорбционных слоев (энтропийный фактор агрегативной устойчивости) рассматривают энергию стерического взаимодействия, которая складывается из двух составляющих:

1) свободной энергии смешения, затрачиваемой на стерическое взаимодействие частиц при смешении адсорбционных слоев без их деформирования и возникающее при сближении частиц на расстояния  $\delta \leq H \leq 2\delta$ ;

2) свободной упругой энергии, затрачиваемой на стерическое взаимодействие частиц, которое возникает в результате уменьшения энтропии молекул адсорбата вследствие деформирования (сжатия) адсорбционных слоев при их сближения на расстояние  $H < \delta$ .

Расчет энергии стерического взаимодействия частиц проводят по уравнению Фишера (1959):

$$U_{\text{ст}} = \frac{4\pi}{3} RTA_2 C_\delta^2 \left( \delta - \frac{H}{2} \right)^2 \left( 3r + 2\delta + \frac{H}{2} \right), \quad (1.9)$$

где  $R$  - газовая постоянная [Дж/моль К];  $T$  – температура [К];  $C_\delta$  - плотность адсорбционных слоев [кг/м<sup>3</sup>];  $A_2$  - второй вириальный коэффициент [мольм<sup>3</sup>/кг<sup>2</sup>];  $\delta$  - толщина адсорбционного слоя [м];  $r$  - радиус, взаимодействующих частиц [м].

Действие молекулярных и электростатических поверхностных сил приводит к изменению структуры и состава дисперсионной среды вблизи межфазной поверхности (формированию сольватных, адсорбционных, двойных электрических поверхностных слоев). Физические свойства дисперсионной среды в таких слоях отличаются от свойств дисперсионной среды в объемной фазе. В результате перекрытия таких поверхностных слоев возникают дополнительные силы взаимодействия между сближающимися частицами – структурные силы (структурная составляющая расклинивающего давления).

В первом приближении зависимость энергии структурной составляющей расклинивающего давления от расстояния можно описать с помощью уравнения:

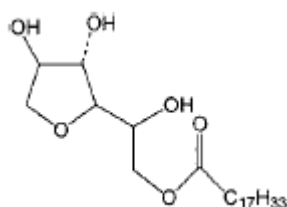
$$U_c = 2\pi \frac{r_1 r_2}{r_1 + r_2} K L^2 \exp\left(-\frac{H}{L}\right), \quad (1.10)$$

где  $K$  [Н/м<sup>2</sup>] и  $L$  [м] – постоянные для данной системы.

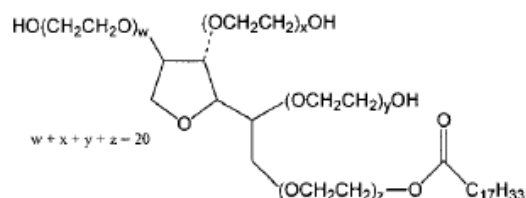
### **1.3.2. Стабилизация эмульсий с помощью поверхностно-активных веществ**

При выборе ПАВ для получения хитозановых микросфер эмульсионным способом необходимо учитывать требования, предъявляемые к вспомогательным веществам, входящим в состав лекарственных форм, в том числе для перорального введения. Используемые поверхностно-активные вещества, помимо обладания необходимыми функциональными свойствами (стабилизирующим действием) при минимальном содержании в препарате, должны быть нетоксичны, не вызывать аллергических реакций, быть

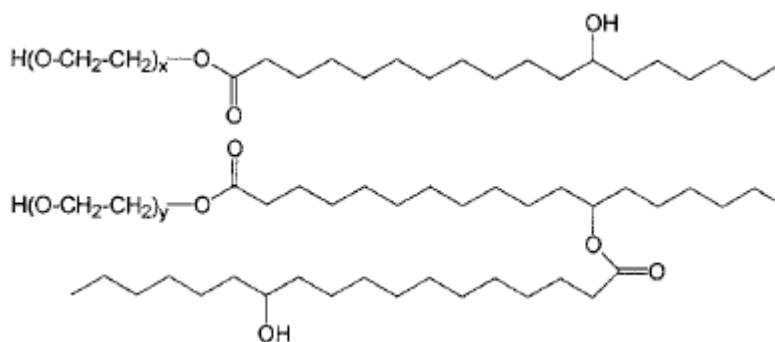
химически индифферентными к веществам, входящим в состав препарата, обеспечивать биологическую доступность ЛВ, не подвергаться микробной контаминации, быть экономически выгодными [129]. В настоящее время в составе пероральных форм лекарственных веществ используют следующие коммерчески доступные неионогенные ПАВ: кремофор EL, кремофор RH 40, полисорбат 20 (Твин 20), полисорбат 80 (Твин 80), D- $\alpha$ -токоферол полиэтиленгликоль 1000 сукцинат (TPGS), солютол HS-15, сорбитанмоноолеат (Спан 80), полиоксил 40 стеарат, полксамеры (плюроники) и различные гликозилированные глицериды – лабрафил М-1944CS, лабрафил М-2125CS, лабрасол и т.д. [130]. Формулы некоторых из них приведены на рис. 1.16.



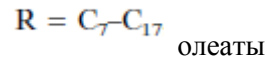
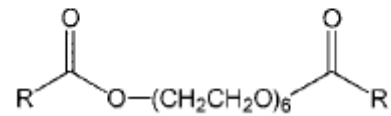
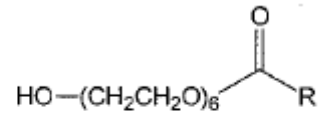
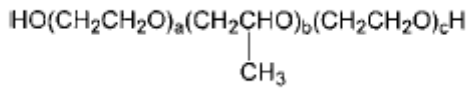
Сорбитанмоноолеат (Спан 80)  
ММ 428



Полиоксиэтилен 80 сорбитан  
моноолеат (Полисорбат 80, Твин 80)  
ММ 1310

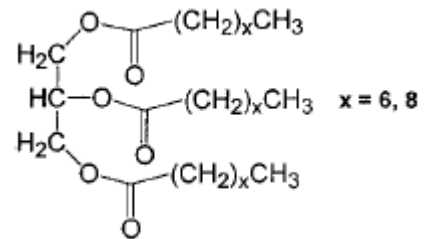
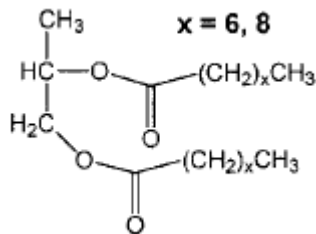


Полиэтиленгликоль 660  
12-гидроксистеарат (Солютол HS-15)



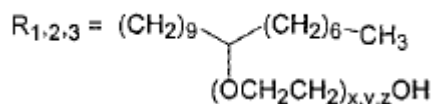
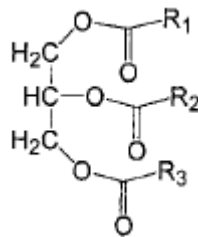
Поли(этиленоксид)/поли(пропилен оксид)/поли(этиленоксид) триблок сополимеры (полосамеры, плуроники)

Эфиры моно- и диолеиновой кислоты полиэтиленгликоля 300



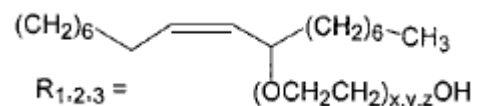
Сложный диэфир пропиленгликоля и каприловой и каприновой кислот (Миоглиоль 840)

Сложные триэфиры пропиленгликоля и каприловой и каприновой кислот (Миоглиоль 810, 812, Лабрафак, Кромадол GTCC-PN)



R = Полиэтиленгликоль 12 оксистеарат  
x+y+z=40

Полиоксил 40 гидрированное касторовое масло (Кремофор RH 40)



R = полиэтиленгликоль рицинолеаты  
x+y+z+35

Полиоксил 35 касторовое масло (Кремофор EL)

Рисунок 1.16. Структура некоторых коммерческих неионогенных ПАВ, используемых для получения лекарственных форм для перорального введения.

Для стабилизации исходной эмульсии при получении хитозановых микросфер используют, как правило, неионогенные ПАВ сорбитан моноолеаты (Спаны), либо смеси Спанов с полисорбатами (Твинами) [73, 88, 89, 96, 100, 131]. Также в ряде работ в качестве ПАВ использовали тетраглицерил рицинолеаты [132], гексаглицерил пента эфир (РО 500) [133, 134], сополимер окиси этилена и окиси пропилена (лутрол F127) [135]. Были попытки создать хитозановые микросферы на основе эмульсий, содержащих анионный ПАВ диоктилсульфосукцинат натрия [136]. Механизм стабилизации эмульсий заключается в первую очередь в уменьшении межфазного натяжения, которое происходит в результате адсорбции ПАВ на границе раздела фаз, под влиянием перечисленных выше термодинамических факторов агрегативной устойчивости: электростатического (в случае использования анионных и катионных ПАВ) [137], адсорбционно-сольватационного (в случае использования неионогенных ПАВ) [138], и энтропийного. Когда стабилизатор образует прочные адсорбционные слои, обладающие повышенными структурно-механическими свойствами [139, 140], а также в том случае, если он является структурообразователем и способен повышать вязкость дисперсионной среды [141], действуют кинетические факторы агрегативной устойчивости – структурно-механический и гидродинамический. Однако действие последних двух факторов проявляется в большей степени при стабилизации эмульсии высокомолекулярными соединениями.

Зависимость поверхностного натяжения ПАВ  $\sigma$  от их концентрации  $C$  в водных растворах описывает эмпирическое уравнение Шишковского:

$$\sigma = \sigma_0 - B \ln(1 + AC), \quad (1.11)$$

где  $\sigma_0$  – поверхностное натяжение воды;  $B$  – постоянная, зависящая от класса ПАВ, мДж/м<sup>2</sup>;  $A$  – постоянная, зависящая от адсорбционной активности используемого ПАВ, моль<sup>-1</sup>. Поверхностная активность индивидуального ПАВ в исследуемой системе определяется начальным наклоном изотермы

поверхностного натяжения и равна предельному значению отрицательной производной поверхностного натяжения по концентрации при  $c \rightarrow 0$ :

$$g = - \left( \frac{d\sigma}{dc} \right)_{c \rightarrow 0} \quad (1.12)$$

Согласно правилу Дюкло – Траубе, при удлинении гидрофобного хвоста в молекулах ПАВ одного гомологического ряда, вследствие снижения их растворимости в полярных растворителях, растет поверхностная активность ПАВ и увеличивается постоянная  $A$  в уравнении Шишковского. В случае неполярных растворителей с увеличением углеводородной цепи растворимость ПАВ повышается и поверхностная активность падает [124, 141].

Связь между поверхностным натяжением  $\sigma$  и адсорбцией  $\Gamma_i$  в  $i$ -компонентной двухфазной системе описывает фундаментальное адсорбционное уравнение Гиббса [123]:

$$- d\sigma = \sum \Gamma_i d\mu_i, \quad (1.13)$$

где  $\mu_i$  – химический потенциал для  $i$ -го компонента.

Для разбавленных растворов ПАВ зависимость удельной адсорбции  $\Gamma$  от концентрации раствора  $C$  определяется уравнением:

$$\Gamma = - \frac{C}{RT} \cdot \frac{d\sigma}{dC}, \quad (1.14)$$

Согласно теории Ленгмюра, адсорбционное равновесие на границе раздела фаз раствор ПАВ – газ носит динамический характер, поскольку адсорбция ПАВ определяется двумя конкурирующими процессами – переходом молекул ПАВ из объема раствора на границу раздела фаз, и их обратным переходом в объем раствора (десорбция). Принимая, что молекулы ПАВ адсорбируются только на свободных участках поверхности (занятых только молекулами растворителя) и то, что адсорбционный слой представляет собой монослой,



связь между адсорбцией  $\Gamma$  и концентрацией  $C$  можно описать с помощью уравнения адсорбции Ленгмюра [124]:

$$\Gamma = \Gamma_{max} \frac{AC}{1 + AC}, \quad (1.15)$$

где  $\Gamma_{max}$  – предельное значение удельной адсорбции (при образовании насыщенного монослоя ПАВ);  $A$  – отношение констант скоростей адсорбции  $K_a$  и десорбции  $K_d$ :

$$A = \frac{K_a}{K_d} \quad (1.16)$$

В зависимости от концентрации ПАВ в растворе, адсорбционной насыщенности поверхности и характера расположения молекул в поверхностном слое, выделяют следующие типы строения адсорбционного слоя [124, 142, 143]:

1) **Разреженный монослой** При низких концентрациях поверхностно-активного вещества в адсорбционном слое молекулы ПАВ находятся на больших расстояниях друг от друга, при этом силы притяжения, действующие между молекулами, относительно невелики. В этом случае молекулы ПАВ постоянно перемещаются по поверхности в результате броуновского движения и данные пленки рассматривают как двумерный аналог идеального газа. Углеводородные радикалы молекул ПАВ в таком монослое расположены параллельно поверхности (рис. 1.17а).

2) **Плотный монослой** С ростом концентрации ПАВ в адсорбционном слое расстояние между молекулами сокращается и становится меньше их длины. Силы, действующие между молекулами, возрастают, и вследствие этого часть молекул слипается, образуя в монослое конденсированные участки. На таких участках, гидрофобные хвосты молекул ПАВ ориентируются перпендикулярно поверхности и параллельно друг другу. В результате возникает латеральное взаимодействие молекул ПАВ, которое усиливается с

ростом длины цепи углеводородного хвоста. Строение плотного монослоя приведено на рис. 1.17б.

3) **Предельно упакованный монослой** При высоких концентрациях ПАВ, когда адсорбция достигает предельного значения ( $\Gamma = \Gamma_{\max}$ ), монослой имеет максимально плотную упаковку, при этом все молекулы ПАВ расположены перпендикулярно поверхности, и каждая из них занимает минимальную площадь («часток Лэнгмюра»). В насыщенном монослое силы, действующие между углеводородными радикалами, затрудняют перемещение молекул ПАВ. Такие конденсированные пленки рассматривают как твердые.

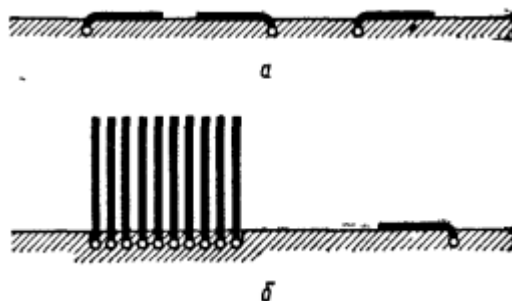


Рисунок 1.17. Ориентация молекул ПАВ в адсорбционном слое: **а** – разреженный монослой; **б** – плотный монослой.

Подобные представления о плотно упакованном монослое основаны на расчетах молекулярных параметров насыщенных монослоев (площади, занимаемой одной молекулой ПАВ  $s_0$  (молекулярная площадка) и толщины адсорбционного слоя  $\delta$ ), выполненных впервые Ленгмюром [143].

На практике для стабилизации эмульсий в большинстве случаев используют смеси поверхностно-активных веществ, поскольку они способны проявлять синергизм – снижать межфазное натяжение и повышать агрегативную устойчивость дисперсной системы в большей степени, чем каждое из ПАВ в отдельности [144, 145]. При введении в систему смеси двух индивидуальных ПАВ происходит формирование смешанного монослоя на границе раздела фаз, либо смешанных мицелл в растворе [146]. Параметры молекулярного взаимодействия двух различных поверхностно-активных

веществ, образующих смешанный монослой, можно определить с помощью уравнений (1.17) и (1.18) [146]:

$$\frac{X_1^{\sigma 2} \cdot \ln\left(\frac{\alpha_1 c_{12}}{X_1^{\sigma} c_1^0}\right)}{(1 - X_1^{\sigma})^2 \cdot \ln\left[\frac{(1 - \alpha_1) c_{12}}{(1 - X_1^{\sigma}) c_2^0}\right]} = 1 \quad (1.17)$$

$$\beta^{\sigma} = \frac{\ln(\alpha_1 c_{12} / X_1^{\sigma} c_1^0)}{(1 - X_1^{\sigma})^2} \quad (1.18)$$

где  $X_1^{\sigma}$  – мольная доля первого ПАВ в общем смешанном монослое;  $c_1^0$ ,  $c_2^0$  и  $c_{12}$  – мольные концентрации первого, второго и смеси ПАВ в растворе при мольной доле первого ПАВ –  $\alpha_1$ , необходимой для того, чтобы межфазное натяжение было равно заданной величине  $\sigma$ ;  $\beta^{\sigma}$  – параметр взаимодействия ПАВ для формирования смешанного монослоя на границе раздела вода – масло.

Для оценки параметров молекулярного взаимодействия двух ПАВ в смешанных мицеллах, используют уравнения [147]:

$$\frac{X_1^{M2} \cdot \ln\left(\frac{\alpha c_{12}^M}{X_1^M c_1^M}\right)}{(1 - X_1^M)^2 \cdot \ln\left[\frac{(1 - \alpha) c_{12}^M}{(1 - X_1^M) c_2^M}\right]} = 1 \quad (1.19)$$

$$\beta^M = \frac{\ln(\alpha c_{12}^M / X_1^M c_1^M)}{(1 - X_1^M)^2} \quad (1.20)$$

где  $X_1^M$  – мольная доля первого ПАВ в общем смешанной мицелле;  $c_1^M$ ,  $c_2^M$  и  $c_{12}^M$  – критические концентрации мицеллообразования первого, второго и смеси ПАВ в растворе при заданном значении  $\alpha$ ;  $\beta^M$  – параметр взаимодействия ПАВ для формирования смешанной мицеллы в водном растворе.

В течение последних трех десятилетий были охарактеризованы параметры межмолекулярного взаимодействия значительного количества смесей индивидуальных ПАВ [148 – 151]. В большинстве случаев при смешении ПАВ параметр  $\beta$  имеет отрицательное значение, что свидетельствует о взаимном притяжении их молекул. Положительное значение параметра взаимодействия

характерно для систем, в которых между молекулами ПАВ действуют силы отталкивания. К таким системам относятся смеси ПАВ с нормальными и фторированными углеводородными цепями; либо смеси двух анионных ПАВ, в смешанных мицеллах которых (или монослое) возникает электростатическое отталкивание молекул [145, 152].

Взаимодействие между двумя индивидуальными ПАВ происходит, главным образом, за счет сил электростатического притяжения или отталкивания. Силы электростатического притяжения уменьшаются в ряду: анионное ПАВ – катионное ПАВ > анионное ПАВ – цвиттер-ионное ПАВ (акцептор протона) > катионное ПАВ – цвиттер-ионное ПАВ (донор протона) > анионное ПАВ – неионогенное ПАВ РОЕ > катионное ПАВ – неионогенное ПАВ РОЕ [145].

Условия существования синергизма смеси поверхностно-активных веществ, который проявляется как в понижении поверхностного и межфазного натяжения, так и в уменьшении ККМ при образовании смешанных мицелл, а также антагонизма смеси ПАВ, приведены в таблице 1.4.

**Таблица 1.4.** Условия существования синергизма и антагонизма смеси ПАВ.

Проявление синергизма смеси ПАВ	Условия существования синергизма	Условия существования антагонизма
Эффективность уменьшения поверхностного и межфазного натяжения	$\beta^\sigma < 0$ $ \beta^\sigma  >  \ln(c_1^0/c_2^0) $	$\beta^\sigma > 0$ $ \beta^\sigma  >  \ln(c_1^0/c_2^0) $
Эффективность уменьшения ККМ смеси ПАВ (в водной среде)	$\beta^M < 0$ $ \beta^M  >  \ln(c_1^M/c_2^M) $	$\beta^M > 0$ $ \beta^M  >  \ln(c_1^M/c_2^M) $

### 1.3.3. Стабилизация эмульсий с помощью полимеров.

Поверхностно-активные полимеры содержат в своей структуре гидрофобные и гидрофильные участки. Выделяют три типа ВПАВ: полимеры с гидрофильной основной цепью и гидрофильными боковыми цепями (липополисахариды, гидрофобизированный крахмал, алкилзамещенные полиуретаны) (рис. 1.18а), полимеры с гидрофобной основной цепью и гидрофильными боковыми цепями (гликопротеины, этоксилированные полиакрилаты, силиконовые ПАВ) (рис. 1.18б) и полимеры, состоящие из чередующихся гидрофобных и гидрофильных участков (некоторые белки, блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида) (рис. 1.18в) [152].

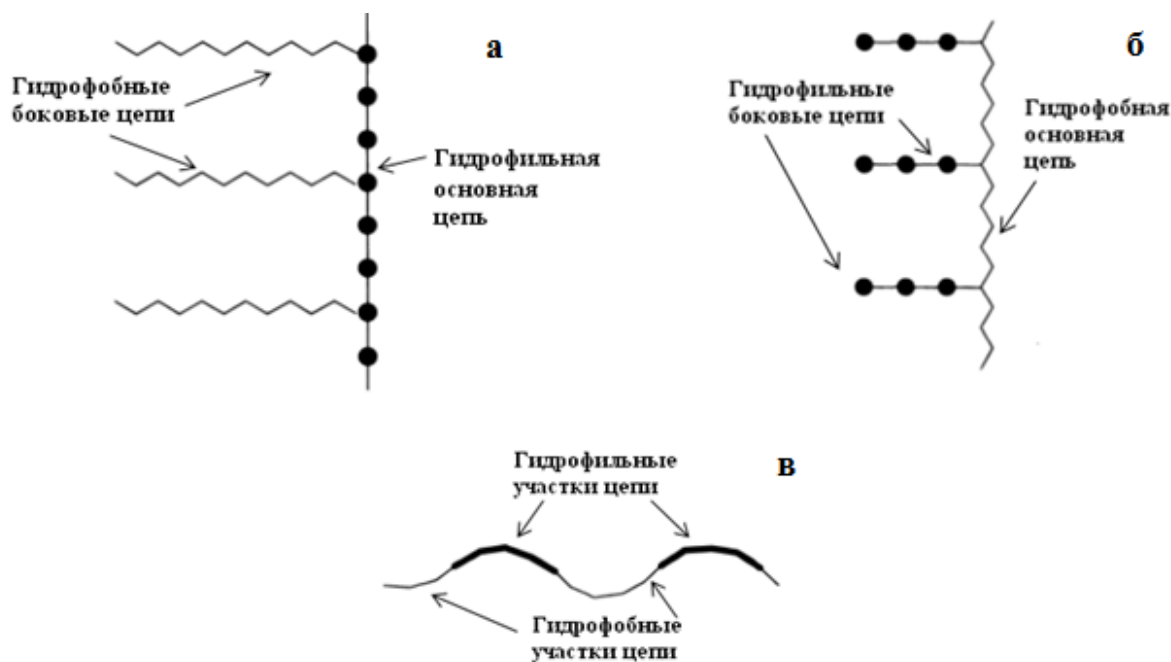


Рисунок 1.18. Структура молекул высокомолекулярных ПАВ [152].

Поскольку макромолекулы полимеров способны находиться в различных конформационных состояниях, адсорбция высокомолекулярных соединений на границе раздела фаз в значительной степени отличается от адсорбции низкомолекулярных ПАВ. Отдельные участки макромолекулы полимера располагаются на межфазной границе, остальная часть молекулы находится в растворе, образуя петли и хвосты (рис. 1.19) [153].

Состояние макромолекул полимера в поверхностном слое можно описать с помощью уравнения [128]:

$$A_{\infty} = k\bar{M}^{\alpha} \quad (1.21)$$

где  $A_{\infty}$  - ёмкость монослоя (в граммах полимера);  $k$  – константа пропорциональности;  $\bar{M}$  - средняя молекулярная масса полимера;  $\alpha$  – параметр, зависящий от конформации макромолекулы в адсорбционном слое.

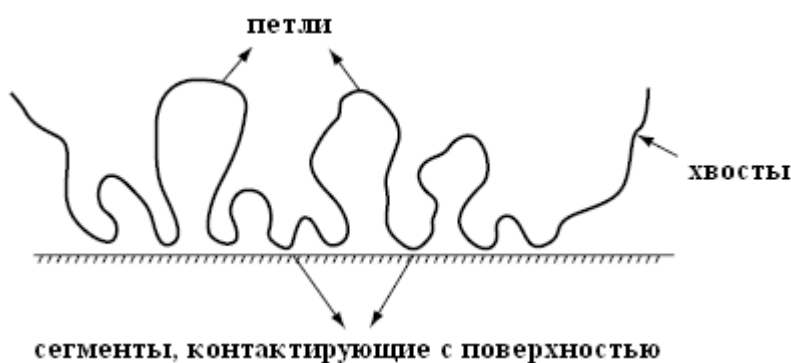


Рисунок 1.19. Схематическое представление молекулы полимера, адсорбированной на межфазной границе [153].

Значения параметра  $\alpha$  варьируются от 0 до 1. При  $\alpha = 0$  все участки макромолекулы полностью находятся на межфазной границе, не образуя сегментов, остающихся в растворе; при  $\alpha = 1$  адсорбированные молекулы закрепляются на границе раздела фаз одним концом, при этом макроцепь погружена в раствор и располагается перпендикулярно поверхности (рис. 1.25а). При  $0 < \alpha < 1$  могут существовать различные конформационные состояния адсорбированного полимера.

Сато и Руч [154] выделяют следующие основные конформационные состояния макромолекул полимера на межфазной поверхности, помимо вышеперечисленных: закрепление на поверхности хвостов макромолекулы (рис. 1.20б), множественное закрепление концами боковых цепей (рис. 1.20в), деформированные статистические клубки (рис. 1.20г), неоднородное

распределение сегментов макромолекулы на поверхности (рис. 1.20д), многослойная адсорбция (рис. 1.20е).

Отличительной особенностью адсорбции полимеров на межфазной границе является длительное время адсорбции. Значительное увеличение времени адсорбции полимеров по сравнению с адсорбцией низкомолекулярных ПАВ обусловлено двумя факторами – замедленной диффузией макромолекул из раствора на границу раздела фаз и большим временем, требуемым для достижения равновесного расположения молекул в поверхностном слое, учитывая большое количество возможных конформационных состояний полимера [155].

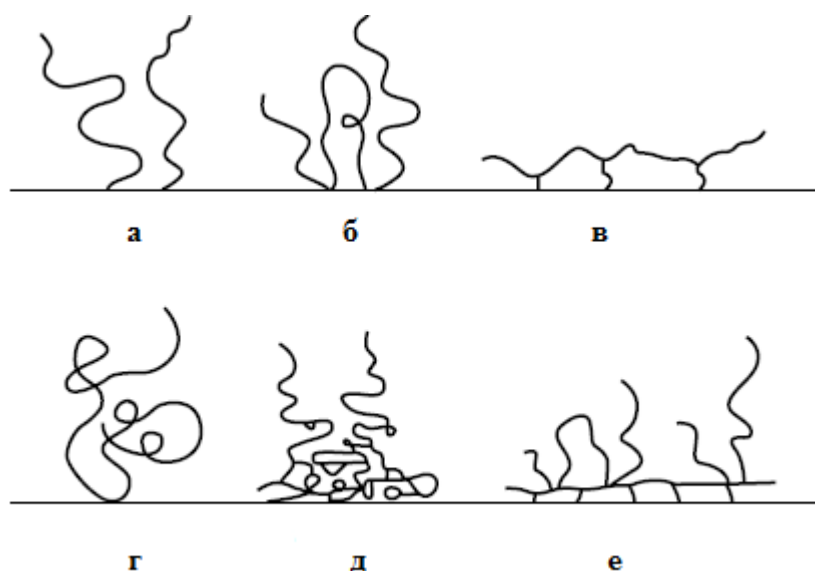


Рисунок 1.20. Возможные конформационные состояния адсорбированного полимера [128, 154].

Механизм адсорбции водорастворимых полимеров, имеющих гидрофильную основную цепь и гидрофобные боковые группы, а также полимеров, состоящих из чередующихся гидрофобных и гидрофильных сегментов, заключается в переносе гидрофобных групп или гидрофобных участков основной цепи из водной фазы в масляную, что сопровождается увеличением энтропии системы, т.е. уменьшением ее свободной энергии,

которое обусловлено гидрофобным взаимодействием углеводородных хвостов макромолекулы с органической фазой.

В результате адсорбции на межфазной границе маслорастворимых полимеров, состоящих из гидрофобной основной цепи и гидрофильных боковых цепей, происходит переход гидрофильных групп из масляной фазы в водную, и их ионизация. В этом случае уменьшение свободной энергии системы происходит за счет возникающего энтальпийного эффекта [156]. Примером может служить адсорбция полимеров Eudragit, ионизация боковых гидрофильных групп которых в водной фазе (четвертичные аммониевые группы) приводит к значительному снижению межфазного натяжения на границе вода – метилен хлорид [157].

Помимо уменьшения межфазного натяжения на границе раздела фаз вода – масло в результате адсорбции поверхностно-активных полимеров, в стабилизации эмульсий с помощью ВПАВ большую роль играет образование коллоидно-адсорбционного слоя с гелеобразной структурой, обладающего высокой структурной прочностью (структурно-механического барьера), который способен эффективно препятствовать коалесценции капель дисперсной фазы [155].

В случае использования структурообразующих полимеров немаловажную роль в стабилизации эмульсий может иметь гидродинамический фактор. Например, в процессе получения прямых эмульсий в присутствии частично сшитых акрилатных сополимеров, последние многократно разбухают в водной (дисперсионной среде), образуя гидрогель, предотвращающий сближение и агрегацию капель дисперсной фазы [144]. В ряде работ использовали хитозан в качестве стабилизатора прямых эмульсий [158 – 161]. Авторы постулируют, что стабилизирующее действие хитозана в эмульсиях масло-в-воде обусловлено не только электростатическим и энтропийным фактором, но также и гидродинамическим, за счет значительного повышения вязкости дисперсионной среды при введении в эмульсию концентрированных растворов хитозана, представляющих собой неньютоновскую жидкость.



#### 1.4. Выводы из литературного обзора

1. Хитозановые микросферы являются перспективными системами контролируемой доставки инсулина в ЖКТ благодаря таким свойствам полимера-носителя, как биосовместимость, биodeградация, отсутствие токсичности, мукоадгезия. Мукоадгезивные свойства имеют большое значение в случае пероральной доставки ЛВ, поскольку повышают эффективность всасывания препарата.

2. Одним из преимуществ хитозановых микросфер как систем доставки ЛВ является возможность получить желаемый профиль высвобождения препарата посредством регулирования прочности сшивки полимерной матрицы, что оказывает непосредственное влияние скорость разрушения микросфер в среде желудка и тонкого кишечника и кинетику высвобождения БАВ.

3. Хитозановые микросферы, предназначенные для включения в них водорастворимых биологически активных веществ (БАВ), могут быть получены введением полимера в водную фазу в процессе приготовления обратных эмульсий вода – парафиновое масло, стабилизированных эмульгаторами II рода. Процесс формирования капель раствора хитозана имеет большое значение с точки зрения характеристик получаемых микросфер. Регулирование дисперсности и агрегативной устойчивости исходных эмульсий позволяет достичь требуемых свойств носителей ЛВ. К сожалению, в литературе приведены немногочисленные и отрывочные данные о взаимосвязи физико-химических свойств исходных эмульсий и конечных характеристик микросфер, таких как размеры, полидисперсность, эффективность включения БАВ и кинетика его высвобождения.

Анализ литературных данных позволяет сформулировать следующие задачи исследования:

- исследовать влияние неионогенных ПАВ на межфазное натяжение на границе «водный раствор уксусной кислоты – парафиновое масло»;

- определить адсорбционную способность хитозана и систем полимер – ПАВ на межфазной границе;
- определить границы области существования эмульсии в зависимости от состава и температуры системы;
- изучить влияние адсорбционной способности исследуемых ПАВ и хитозана на дисперсность и агрегативную устойчивость полученных на их основе эмульсий и характеристики хитозановых микросфер;
- получить гелевые микросферы заданной дисперсности, способные удерживать инсулин и обеспечивать его пролонгированное высвобождение.
- исследовать влияние плотности сшивки хитозанового геля на сорбционную емкость микросфер и кинетику высвобождения инсулина.

## 2. Экспериментальная часть

### 2.1. Характеристики исходных веществ

Химические реагенты: лимонную кислоту, уксусную кислоту, н-гексан, хлористый метилен, этанол, орто-фосфорную кислоту (Лабтех, Россия) квалификации «ос.ч» и «х.ч», – использовали без дополнительной очистки.

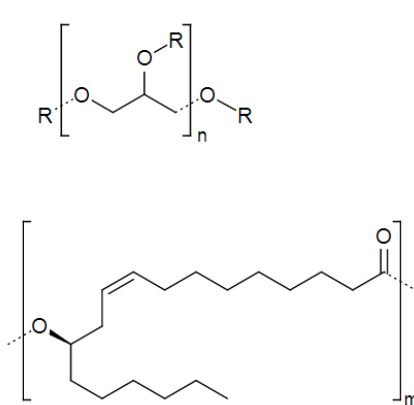
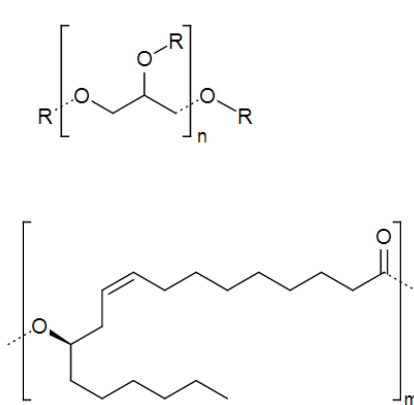
Водные растворы кислоты хлористоводородной и натрия гидроксида готовили из стандарт-титров («Лабтех», Россия). Дистиллированная вода была получена перегонкой с использованием дистиллятора «ДЭ-10» и имела следующие показатели качества: рН = 6,0; электропроводность  $5 \cdot 10^{-5}$  См·м<sup>-1</sup>. Фосфатно-солевой буфер (в таблетках, ООО «Русбиолинк», Россия) имел рН 7,4 (0,01 М).

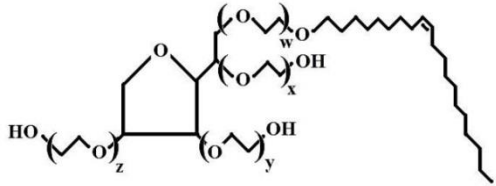
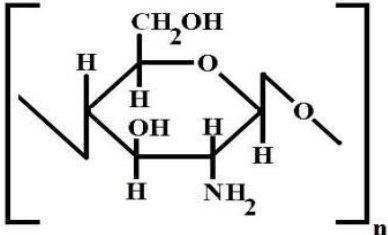
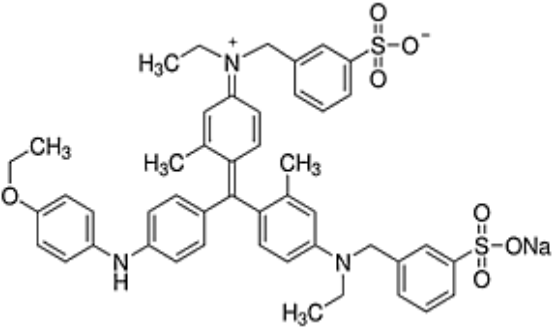
В работе использовали хитозан (ЗАО «Биопрогресс», Россия) с молярной массой 200 000 г/моль и степенью деацетилирования 82%; парафиновое масло «Pionier» фирмы Хансен и Розенталь (H&R, Германия); неионогенные маслорастворимые ПАВ: полиглицерил-6-полирицинолеат-15 (Hexaglyn PR-15) и полиглицерил-10-полирицинолеат-20 (Decaglyn PR-20) с ГЛБ 3,2 (Nikko Chemicals Co., Ltd., Япония).

В качестве биологически активного вещества применяли человеческий генно-инженерный инсулин Актрапид НМ (Ново-Нордиск, Дания), раствор с концентрацией 3,5 мг/мл (100 ЕД/мл); молярная масса активного компонента составляет 5807 г/моль.

В таблице 2.1 представлены сведения о составе, свойствах и производителях реактивов, использованных в работе.

**Таблица 2.1.** Состав и свойства реактивов, используемых в работе.

Название, производитель	Свойства	Структура
<p>Полиглицерил-6-полирицинолеат-15</p> <p>(Hexaglyn PR-15, Nikko Chemicals Co., Ltd., Япония)</p>	<p>Жидкость, от желтоватого до коричневатого цвета со слабым характерным запахом;</p> <p>эмульгатор и стабилизатор для эмульсий в/м;</p> <p>ГЛБ 3,2; М = 4885 г/моль</p>	 <p>R = H или</p> <p>n = 6</p>
<p>Полиглицерил-10-полирицинолеат-20</p> <p>(Decaglyn PR-20, Nikko Chemicals Co., Ltd., Япония)</p>	<p>Вязкая жидкость, от светло-желтого до коричневого цвета, со слабым характерным запахом;</p> <p>эмульгатор и стабилизатор для эмульсий в/м;</p> <p>ГЛБ 3,2; М = 6662 г/моль</p>	 <p>R = H или</p> <p>n = 10</p>

<p>Полиоксиэтилен(20) сорбитан моноолеат (Твин 80, Sigma- Aldrich)</p>	<p><math>C_{58}H_{114}O_{26}</math> Вязкая маслянистая жидкость янтарного цвета; ГЛБ 15; М = 1310 г/моль</p>	 <p style="text-align: center;"><math>x + y + z + w = 20</math></p>
<p>Хитозан,  (ЗАО «Биопрогресс», Россия)</p>	<p>Желтоватый порошок; Степень деацетилирова- ния 82%; М = 200 000 г/моль</p>	
<p>Кумасси (бриллиантовый голубой) G-250, («ДИАЭМ», Россия)</p>	<p><math>C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2</math> (в виде натриевой соли); кристаллы темно- фиолетового цвета; массовая доля красителя 86,6%; М = 854 г/моль</p>	

## 2.2. Методики исследования

### 2.2.1. Измерение межфазного натяжения

Определение межфазного натяжения ПАВ и хитозана на границе раздела фаз 2%-й раствор уксусной кислоты – парафиновое масло проводили методом веса-объёма капли [162] на сталагмометре *Harvard Apparatus 55-2222 (Harvard Apparatus, США)*. Область исследованных концентраций масляных растворов полиглицерил-6-полирицинолеата (ПГ-6-ПР) составляла 0,01-6,9 моль/м<sup>3</sup>, растворов полиглицерил-10-полирицинолеата (ПГ-10-ПР) – 0,01-5,1 моль/м<sup>3</sup>. Концентрации растворов Твин 80 в водной фазе – от 0,02 до 12,9 моль/м<sup>3</sup>. Смеси ПГ-6-ПР:Твин 80 с массовыми соотношениями 0,93:0,07; 0,85:0,15; 0,76:0,24 изучали в области концентраций 0,01-7,3 моль/м<sup>3</sup>, 0,01-7,81 моль/м<sup>3</sup>, 0,01-8,4 моль/м<sup>3</sup>, соответственно. Область исследованных концентраций водных растворов хитозана составляла 1,33 – 26,7 г/л. Межфазное натяжение смесей хитозан/ПГ-6-ПР измеряли, используя концентрации растворов полимера от 1,0 г/л (0,1% масс.) до 20,0 г/л (2% масс.). Эксперимент проводили при комнатной температуре. Основная погрешность прибора не превышает 0,2 мН/м.

Схема установки по определению межфазного натяжения методом веса-объёма капли приведена на рис. 2.1. В шприц (4) помещали более плотную фазу (воду или водный раствор ПАВ), в измерительную ячейку (5) – менее плотную фазу (масло или раствор ПАВ в масле). Перед запуском установки измерительную ячейку с менее плотной фазой взвешивали на аналитических весах. Оптимальную скорость выделения более плотной фазы (мл/мин) подбирали экспериментально таким образом, чтобы формирование капли происходило приблизительно в течение 2 мин. При включении насоса-дозатора (1) подвижная платформа (2), величину перемещения которой фиксировали при помощи микрометра (3), приводила в движение шток поршня (6). В результате происходило формирование капли более плотной фазы на кончике насадки, которая постепенно увеличивалась в размерах, затем отрывалась.

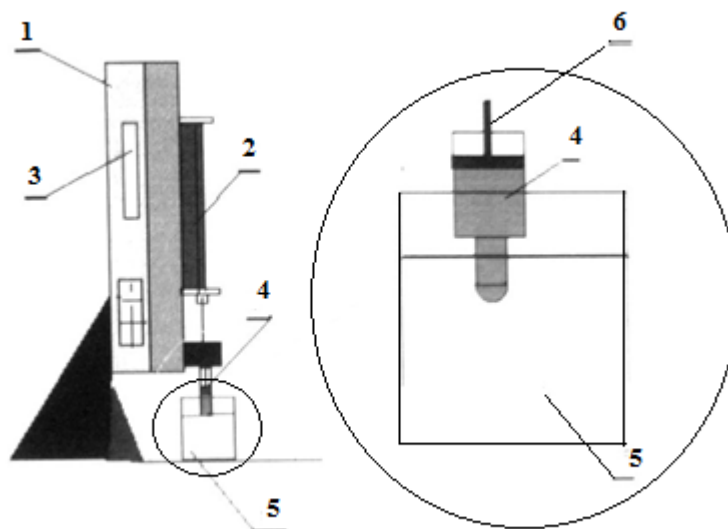


Рисунок 2.1. Схема установки по определению межфазного (поверхностного) натяжения методом веса-объема капли.

После отрыва 10 капель измерительную ячейку вновь взвешивали и рассчитывали массу и объем одной капли. Плотности растворов ПАВ и 2%-го раствора уксусной кислоты определяли с помощью пикнометров. Была определена плотность парафинового масла, значение которой составило  $846 \text{ кг/м}^3$ . Межфазное натяжение ПАВ на границе раздела фаз рассчитывали по уравнению Тейта:

$$mg = 2\pi r\sigma = V \cdot (\rho^\alpha - \rho^\beta) \cdot g, \quad (2.1)$$

где  $\sigma$  – межфазное натяжение ( $\text{мН/м}$ );  $r$  – радиус капилляра ( $\text{м}$ );  $m$  – масса капли ( $\text{кг}$ );  $g$  – ускорение свободного падения ( $\text{м/с}^2$ );  $V$  – объем капли ( $\text{м}^3$ );  $\rho^\alpha$  и  $\rho^\beta$  – плотности контактирующих жидких фаз, ( $\text{кг/м}^3$ ).

Для учета поправки на неполный отрыв капли в уравнение Тейта вводили поправочный множитель  $f$ , который численно зависит от безразмерного параметра  $r/v^{1/3}$  и является справочной величиной [123]:

$$mg = 2\pi r\sigma f \quad (2.2)$$

### ***2.2.2. Методика получения эмульсий вода – парафиновое масло***

Для приготовления эмульсий 2%-й раствор уксусной кислоты/ПАВ/парафиновое масло использовали неионогенные ПАВ ряда полиглицерил полирицинолеатов. Содержание ПГПР в исходной системе варьировали от 1% масс. до 4% масс. В стакане взвешивали ПАВ и парафиновое масло в рассчитанных количествах, смесь перемешивали на магнитной мешалке при 60 °С до растворения ПАВ, затем приливали предварительно нагретый до той же температуры 2%-й раствор уксусной кислоты, либо раствор хитозана в 2%-й уксусной кислоте. При введении хитозана в эмульсию его концентрацию в водной фазе варьировали от 1,0 до 20,0 г/л. Полученную эмульсию гомогенизировали 5 минут при скорости 1500 об/мин на лабораторном гомогенизаторе «Ace Homogenizer model AM-11» (Nihonseiki Kaisha Ltd, Япония), затем переносили обратно в стакан и выдерживали при нагревании и постоянном перемешивании в течение 1 часа. В эксперименте по изучению влияния сшивающего агента на свойства эмульсий, содержащих хитозан, к полученной системе по каплям добавляли водный раствор лимонной кислоты до необходимого соотношения вода – масло в системе, и далее эмульсию перемешивали при 60 °С в течение еще 3 часов. Концентрации растворов лимонной кислоты варьировали в пределах от 0 до 320 г/л. Соотношение водной и масляной фаз варьировали от 1:9 до 8:2.

Полученные системы выдерживали в течение 5 суток при комнатной температуре, при этом происходило отделение избытка дисперсионной среды. Через определенные интервалы времени определяли отношение высоты столба эмульсии к общей высоте столба жидкости, строили кривые зависимости изменения объема эмульсий, сформировавшихся в системе, от времени хранения. На основе полученных результатов рассчитывали концентрацию дисперсной фазы в равновесных эмульсиях. После полного расслоения фаз избыток масляной фазы декантировали и проводили дисперсионный анализ полученных образцов эмульсий.



### **2.2.3. Оценка стабильности эмульсий**

#### **2.2.3.1 Определение степени устойчивости эмульсии при повышенной температуре**

Пробирки диаметром 14 мм и высотой 100 (120) мм наполняли на 2/3 объема испытуемой эмульсией, закрывали пробками, помещали в термостат с температурой  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ . Эмульсию выдерживали в термостате в течение 24 часов, и затем определяли стабильность. Считали, что эмульсия стабильна, если после термостатирования в пробирках не наблюдалось выделение водной фазы (при этом допускается выделение масляной фазы не более 0,5 см) [163].

#### **2.2.3.2. Устойчивость при центрифугировании**

Метод основан на разделении эмульсии на водную и жировую фазы при центрифугировании [163]. При проведении испытания две пластмассовые пробирки наполняли на 2/3 объема испытуемой эмульсией и взвешивали. Разность массы пробирок с эмульсией не превышала 0,2 г. Пробирки помещали на водяную баню и выдерживали 20 мин при  $60^\circ\text{C}$ . Проводили центрифугирование в течение 5 мин при частоте вращения 6000 об/мин. Если расслоение эмульсии наблюдали только в одной пробирке, то испытания повторяли с новыми порциями эмульсии. Эмульсию считали стабильной, если после центрифугирования в пробирках наблюдали выделение слоя водной фазы не более 0,1 см или слоя масляной фазы не более 0,5 см.

### **2.2.4. Методика фазовых исследований**

Фазовые исследования проводили прямым титрованием фаз. В прозрачной пробирке (флаконе) готовили смесь предварительно взвешенных компонентов (ПГПР и масляной фазы в рассчитанных соотношениях) и проводили титрование 2%-ым раствором уксусной кислоты при перемешивании на магнитной мешалке (400 об/мин), либо вручную. Пробирки выдерживали в течение 1 часа в термостате при  $20^\circ\text{C}$ , либо  $60^\circ\text{C}$ . Визуально в проходящем

свете проводили анализ числа и вида фаз. В том случае, если расслоение не наблюдалось, время выдерживания увеличивали до 5 часов. По результатам проведенных исследований строили диаграммы вода – ПАВ – масло, которые представляли треугольником Гиббса, и определяли область существования стабильной эмульсии. Вершины треугольника Гиббса соответствуют трем чистым компонентам, а боковые стороны – трем двухкомпонентным системам (рис.2.2).

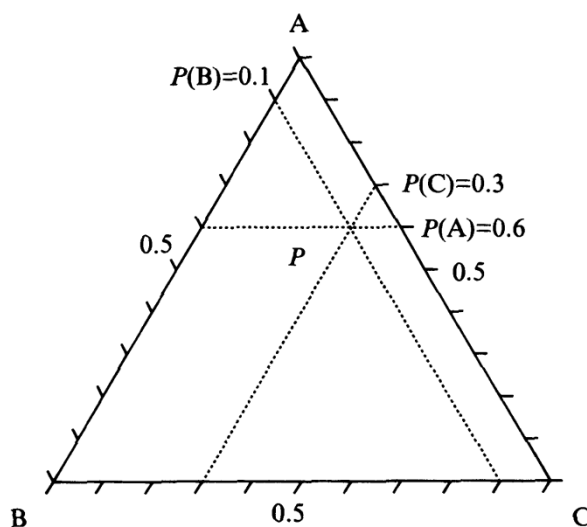


Рисунок 2.2. Треугольник Гиббса для системы из трех компонентов А, В и С при постоянной температуре [158].

На диаграмме, представленной на рис.2.2 количество компонентов А, В и С в точке Р определяется расстоянием до противоположной стороны. Содержание компонента А в точке Р соответствует 60%, компонента В – 10%, компонента С – 30% [158].

### **2.2.5. Реологические исследования**

Для оценки реологических свойств эмульсий вода – масло и растворов хитозана, которые являются структурированными системами с достаточно высокой вязкостью, использовали ротационный вискозиметр. Для определения

вязкости разбавленных неструктурированных растворов ПГПР использовали капиллярный вискозиметр Уббелоде.

### **2.2.5.1. Измерение вязкости эмульсий и растворов полимера**

Измерение вязкости эмульсий вода – масло и растворов полимера проводили на ротационном вискозиметре Rheotest RV 2.1 (Rheotest, Medingen GmbH, Германия) при 25 °С, используя два коаксиальных цилиндра S/N. Измерения проводили при 12 скоростях деформации (3 - 1312 с<sup>-1</sup>); показания в делениях шкалы индикаторного прибора снимали при каждой скорости деформации.

Область исследованных концентраций водных растворов хитозана составляла 1,0 – 20,0 г/л. Соотношение вода – масло в исследуемых эмульсиях составляло 8:2, концентрации ПАВ (ПГ-6-ПР) варьировали от 2,0 до 5,0% масс.

По полученным данным строили кривые зависимости скорости деформации от напряжения сдвига и зависимости вязкости от напряжения сдвига [164].

### **2.2.5.2. Измерение вязкости растворов ПАВ**

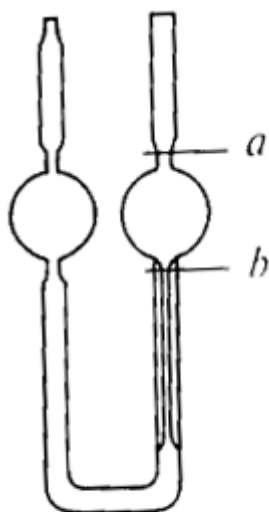


Рисунок 2.3.

Вискозиметр Уббелоде.

Для определения эффективной вязкости растворов ПАВ в парафиновом масле использовали вискозиметр Уббелоде. Капиллярный вискозиметр Уббелоде представляет собой U-образную трубку, которая снабжена небольшими резервуарами одинакового объема, расположенными на одном уровне (рис. 2.3) [165]. В одном из колен резервуара имеется капилляр, через который исследуемая жидкость перетекает в другой резервуар. Измерение вязкости растворов с помощью данного вискозиметра производят, определяя время вытекания через

капилляр жидкости постоянного объема.

В левое колено вискозиметра наливают исследуемый раствор в таком количестве, чтобы её уровень доходил до середины шариков. С помощью резиновой груши засасывают жидкость в вискозиметре выше отметки  $a$  в правом колене. С помощью секундомера измеряют время истечения чистого растворителя  $\tau_0$ , а затем каждого из приготовленных растворов ПАВ  $\tau$  от верхней отметки  $a$  до нижней отметки  $b$ . Для каждого раствора измерения проводили трижды и находили среднее значение времени истечения  $\tau_{\text{ср}}$ . Область исследованных концентраций растворов ПГ-6-ПР составляла 0,9 – 6,9 моль/м<sup>3</sup>.

Динамическую вязкость,  $\eta$  (Па·с), рассчитывали с помощью уравнения (2.3) [166]:

$$\eta = \frac{\eta_0}{\tau_0} \cdot \frac{\rho}{\rho_0} \cdot \tau, \quad (2.3)$$

где  $\eta_0$  – вязкость растворителя при рабочей температуре, Па·с;  $\tau$  и  $\tau_0$  – время истечения раствора ПАВ и растворителя (парафинового масла), соответственно, с;  $\rho$  и  $\rho_0$  – плотность раствора ПАВ и растворителя, соответственно, кг/м<sup>3</sup>.

### **2.2.6. Определение pH-пределов растворимости хитозана**

Раствор хитозана с концентрацией 13,3 г/л в 2%-й уксусной кислоте турбодиметрически оттитровывали 0,1 н. раствором натрия гидроксида. Измеряли значение pH системы с помощью pH-метра Sartorius HP-15 (Sartorius AG, Германия) и определяли оптическую плотность (D) растворов с помощью фотоэлектродиметра «UNICO-1200» ("Unico Sys", США) на рабочей длине волны 340 нм при использовании кюветы с толщиной слоя 1 см. В качестве кюветы сравнения использовали кювету с дистиллированной водой. По полученным данным строили график зависимости оптической плотности раствора от pH.

## ***2.2.7. Исследование взаимодействия хитозана с лимонной кислотой***

### ***2.2.7.1. Исследование взаимодействия хитозана с лимонной кислотой методом УФ-спектрофотометрии***

#### Спектрофотометрическое титрование

Спектрофотометрическое титрование растворов хитозана растворами лимонной кислоты проводили при pH 5,0 и 5,7 на приборе Helios Zeta (Thermo Fisher Scientific, США); pH растворов регулировали с помощью pH-метра Sartorius HP-15 (Sartorius AG, Германия), укомплектованного комбинированным микроэлектродом, используя 1н. раствор натрия гидроксида. Раствор хитозана (0,2 г/л) в 0,2%-й уксусной кислоте оттитровывали водными растворами лимонной кислоты с концентрациями 3,0 мг/мл и 30,0 мг/мл при комнатной температуре. Титрование осуществляли до заданных значений массовых соотношений, строили спектры растворов в диапазоне длин волн 200 – 300 нм. Оценивали изменения оптической плотности при длине волны 226 нм.

#### Исследование взаимодействия хитозана с лимонной кислотой турбодиметрическим методом

Растворы хитозана в 2%-й уксусной кислоте с концентрацией 13,3 г/л и заданным значением pH (5,0 и 5,7), объемом 1,5 мл, смешивали с 0,5 мл раствора лимонной кислоты с требуемой концентрацией. Массовые соотношения хитозан : лимонная кислота варьировали от 7:1 до 1:10. Полученные смеси выдерживали в течение 3 часов при температуре 60<sup>0</sup>С в термостате, затем – в течение 3 суток при комнатной температуре, гомогенизировали на шейкере Vortex (VWR International, Германия), разбавляли в 50 раз и измеряли спектры на спектрофотометре Helios Zeta (Thermo Fisher Scientific, США) в УФ-области по раствору сравнения. Контрольные образцы готовили аналогично и выдерживали в течение 3 суток

после приготовления при комнатной температуре и далее анализировали таким же образом. Строили кривые зависимости относительной мутности растворов ( $D/D_{\max}$ ) от массового соотношения компонентов X (хитозан : лимонная кислота) [167]. Оценивали изменения оптической плотности при длине волны 226 нм.

#### Исследование кинетики взаимодействия хитозана с лимонной кислотой

Водный раствор лимонной кислоты с концентрацией 14 г/л добавляли к раствору хитозана в 2%-й уксусной кислоте с концентрацией 13,3 г/л (массовое соотношение хитозан:лимонная кислота 3:1) в трехгорлой колбе, снабженной обратным холодильником и термометром, при перемешивании на магнитной мешалке и температуре 60°C. Предварительно рН раствора хитозана доводили до 4 с помощью рН-метра Sartorius HP-15 (Sartorius AG, Германия), используя 1N NaOH. Продолжали перемешивание при 60 °C в течение 6 часов. Из раствора отбирали пробы через 0, 1, 2, 4 и 6 часов после добавления лимонной кислоты. Пробу разводили в 3 раза 1,5%-ой уксусной кислотой и снимали спектры полученных растворов на спектрофотометре Helios Zeta (Thermo Fisher Scientific, США) в области 200-400 нм, используя в качестве раствора сравнения 1,5%-й раствор уксусной кислоты. Погрешность определения оптической плотности в интервале оптической плотности 0,1 – 1,0 не превышала 0,05.

Исследование кинетики взаимодействия хитозана с лимонной кислотой при более высоких температурах (75 °C и 90 °C) проводили, используя описанную выше методику. Время перемешивания раствора составляло 3 часа, отбор проб производили через каждые 0,5 часа.

#### ***2.2.7.2. Исследование взаимодействия хитозана с лимонной кислотой методом фотон-корреляционной спектроскопии***

К раствору хитозана с концентрацией 0,2 г/л в 2%-й уксусной кислоте постепенно прибавляли раствор лимонной кислоты в дистиллированной воде с

концентрацией 30 г/л. Предварительно рН растворов хитозана и лимонной кислоты доводили до необходимого значения (рН 4,0; 5,0; 5,7) с помощью 1н. раствора натрия гидроксида. Величину рН измеряли с помощью рН-метра Sartorius HP-15 (Sartorius AG, Германия), укомплектованного комбинированным микроэлектродом. Средние размеры, распределение по размерам и индекс полидисперсности образующихся частиц измеряли с помощью анализатора распределения частиц по размерам и дзета-потенциала Malvern Zetasizer ZS (Malvern Instruments Ltd, UK).

### ***2.2.8. Получение хитозановых микросфер***

Хитозановые микросферы были получены по методу, описанному Varshosaz J. et al. (рис.2.4) [102]. Растворы хитозана в 2%-й уксусной кислоте готовили при 40-50 °С. Водную фазу добавляли к раствору полиглицерил полирицинолеата в парафиновом масле при перемешивании на магнитной мешалке со скоростью 200 об/мин и нагревании до 60 °С. Концентрацию ПАВ в масляной фазе варьировали от 1 до 4% масс. Полученную эмульсию гомогенизировали в течение 5 мин на лабораторном гомогенизаторе «Ace Homogenizer model AM-11» (Nihonseiki Kaisha Ltd, Япония) при 1500 об/мин. Далее эмульсию переносили в стакан и перемешивали на магнитной мешалке при 200 об/мин и 60 °С в течение 1 часа. Затем к эмульсии по каплям добавляли водный раствор лимонной кислоты как сшивающего агента и перемешивали смесь при нагревании в течение 5,5 часов. Концентрацию хитозана в водной фазе варьировали от 1,0 до 20,0 г/л. Массовое соотношение хитозан:лимонная кислота при всех используемых концентрациях полимера в системе составляло 3:1; также был получен образец микросфер, не содержащий сшивающий агент. Соотношение водной и масляной фаз в системе варьировали от 2:8 до 8:2.

Полученную систему отстаивали до разделения на два слоя – однородной суспензии и избыточной дисперсионной среды, масло декантировали, микросферы промывали гексаном при центрифугировании (6000 об/мин) в течение 10 мин 4-6 раз, затем сушили при комнатной температуре. Выделенные

микросферы трижды промывали 50 мл хлористого метилена в чашке Петри и высушивали в сушильном шкафу при 60 °С в течение 1 часа.

Выход микросфер определяли по формуле (2.4):

$$w = \frac{m_1}{m_2 + m_3} \times 100, \quad (2.4)$$

где  $w$  – выход микросфер от теоретического, %;  $m_1$  – масса полученных микросфер;  $m_2$  – количество хитозана, используемое для получения микросфер (мг);  $m_3$  – количество сшивающего агента, используемого для отверждения микросфер (мг).

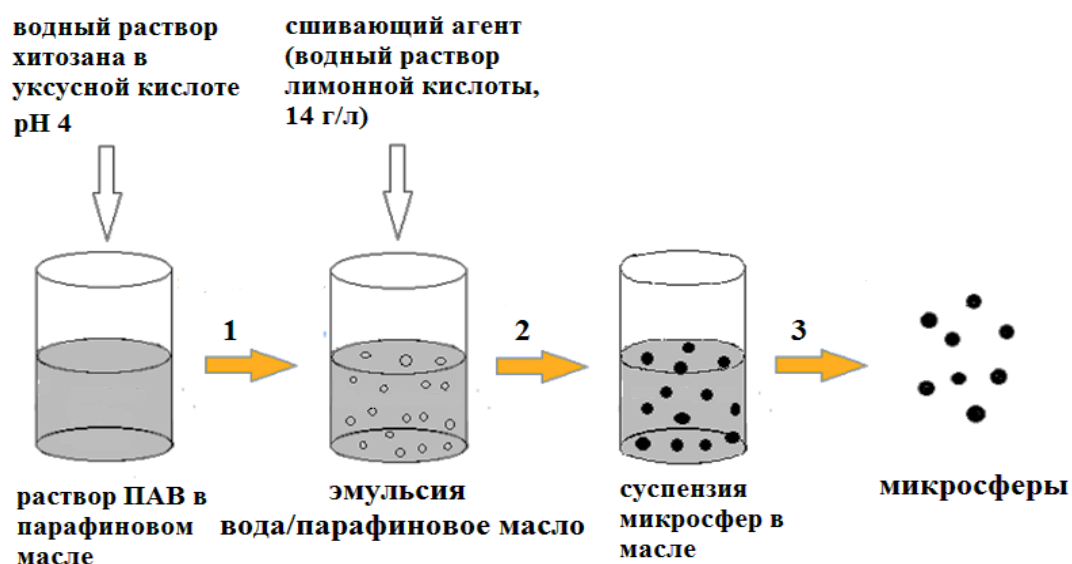


Рисунок 2.4. Стадии получения хитозановых микросфер: 1 – перемешивание; 2 – отверждение капель эмульсии; 3 – выделение микросфер, промывка, сушка.

### 2.2.9. Микроскопические исследования

Для определения формы и морфологии микросфер использовали микрофотографии, полученные при помощи сканирующей электронной микроскопии (микроскоп Jeol JSM-6700F, JEOL Ltd., США). Для увеличения проводимости образцов, а также усиления контраста при просмотре в режиме вторичных электронов, на образцы был напылен слой платины с помощью установки магнетронного напыления платиной Jeol JFC-1600.



При выполнении дисперсионного анализа использовали световой микроскоп Биомед-2 (Биомед, Россия) с цифровой камерой-окуляром ScoreTek DCM 130 (ScoreTek, Китай). Для получения достоверных результатов подсчёт частиц по фракциям проводили не менее 6 раз в разных местах исследуемого образца. По результатам анализа рассчитывали среднечисленный, среднеповерхностный и среднемассовый радиусы микросфер (либо капель эмульсии), используя формулы (2.5) – (2.8) [168].

$$r_n = \frac{\sum n_i r_i}{\sum n_i}, \quad (2.5)$$

где  $r_n$  – среднечисленный радиус микросфер (или капель эмульсии);  $r_i$  – средний радиус частиц для фракции  $i$ ;  $n_i$  – число частиц с радиусом  $r_i$ ;  $\sum n_i$  – суммарное число частиц в системе.

Средний радиус частиц для фракции  $i$  определяли по формуле (2.6):

$$r_i = \frac{x}{2} \times \left( m + \frac{1}{2} \right), \quad (2.6)$$

где  $x$  – цена деления шкалы, мкм;  $m$  – целое число делений, укладывающееся в диаметре частиц данной фракции.

$$r_s = \frac{\sum n_i r_i^3}{\sum n_i r_i^2}, \quad (2.7)$$

$$r_m = \frac{\sum n_i r_i^4}{\sum n_i r_i^3}, \quad (2.8)$$

где  $r_s$  и  $r_m$  – среднеповерхностный и среднемассовый или среднеобъёмный радиусы частиц, соответственно.

Коэффициент полидисперсности  $k$  рассчитывали по формуле (2.9):

$$k = \frac{r_n}{r_m}, \quad (2.9)$$

По результатам проведённых расчётов строили интегральные и дифференциальные кривые распределения.

### ***2.2.10. Включение инсулина в микросферы и определение эффективности включения***

Включение инсулина в микросферы осуществляли методом сорбции [102]. Микросферы (30 мг) выдерживали в растворе белка с концентрацией 1,55 г/л в течение 48 часов. В ряде экспериментов использовали растворы инсулина с концентрацией 0,78 и 1,17 г/л и варьировали время выдержки микросфер в растворе белка в пределах от 6 до 96 часов. Наполненные инсулином микросферы выделяли и высушивали в сушильном шкафу при 40 °С.

Концентрацию инсулина в растворе после включения определяли спектрофотометрически по методу Бредфорда при длине волны 595 нм [169]. Эффективность включения рассчитывали по формуле (2.10):

$$\text{ЭВ} = \frac{M_0 - M}{M_0} \times 100, \quad (2.10)$$

где ЭВ – эффективность включения, %;  $M_0$  – масса инсулина в исходном растворе, мг;  $M$  – масса инсулина в растворе после включения в микросферы, мг.

### ***2.2.11. Исследование высвобождения инсулина из микросфер in vitro***

Для изучения кинетики высвобождения инсулина навеску микросфер (10 мг) инкубировали в 5 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,4) при 37 °С и постоянном перемешивании на шейкере (200 об/мин). Через определенные промежутки времени (0,5; 1; 2; 4; 6; 24; 48; 72 часа) суспензию

центрифугировали в течение 10 мин при частоте вращения 6000 об/мин. Супернатант отделяли, к осадку микросфер добавляли 5 мл свежего фосфатного буферного раствора. Образцы помещали на шейкер и продолжали перемешивание в тех же условиях. Концентрацию инсулина в супернатанте определяли спектрофотометрически по методу Бредфорда. Процент инсулина, высвобожденного из микросфер за время  $\tau$ , определяли по формуле:

$$B_{\tau} = \frac{M_{\tau}}{M_{\text{вкл}}} \times 100, \quad (2.11)$$

где  $B_{\tau}$  – процент высвобожденного за время  $\tau$  инсулина, % масс.;  $M_{\tau}$  – масса высвобожденного за время  $\tau$  инсулина, мг;  $M_{\text{вкл}}$  – масса инсулина, включенного в микросферы, мг.

#### ***2.2.12. Деградация микросфер в фосфатно-солевом буфере***

30 мг микросфер с включенным инсулином выдерживали в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) в течение 150 часов. Затем микросферы дважды отмывали дистиллированной водой при центрифугировании (6000 об/мин в течение 10 минут), выделяли и высушивали. Полученный образец исследовали при помощи сканирующей электронной микроскопии (микроскоп Jeol JSM-6700F, JEOL Ltd., США).

#### ***2.2.13. Набухание микросфер в фосфатно-солевом буфере***

10 мг незаполненных микросфер выдерживали в 2 мл фосфатно-солевого буфера (рН 7,4) в течение 6 часов при комнатной температуре. Образцы центрифугировали (6000 об/мин в течение 10 минут), отбирали буфер, промокали микросферы фильтровальной бумагой и взвешивали [170]. Степень набухания определяли по формуле (2.12):

$$H = \frac{M_{\text{в}} - M_0}{M_0} \times 100, \quad (2.12)$$

где  $H$  – степень набухания микросфер, %;  $M_{\text{в}}$  – масса влажных микросфер после выдержки в фосфатно-солевом буфере, мг;  $M_0$  – масса сухих микросфер до выдержки в фосфатно-солевом буфере, мг.

#### ***2.2.14. Инфракрасная спектроскопия***

Инфракрасные спектры образцов хитозановых микросфер снимали на ИК–Фурье спектрометре фирмы “Nicolet” (США) “IR-380” с использованием таблеток KBr. Обработку спектров производили с помощью программного обеспечения “OMNIC” компании “Thermo Scientific”. Спектры снимали в области от  $400 \text{ см}^{-1}$  до  $4000 \text{ см}^{-1}$  при комнатной температуре. Исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования имени Д.И. Менделеева.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Поверхностные свойства ПАВ и полимера

##### 3.1.1. Поверхностные свойства ПАВ ряда полиглицерил полирицинолеатов

Полиглицерил полирицинолеаты – неионогенные поверхностно-активные вещества с низким гидрофильно-липофильным балансом, часто применяемые в пищевой промышленности для получения обратных эмульсий [171]. В процессе адсорбции молекулы ПГПР на межфазной границе вода/масло в обратной эмульсии остаток полиглицерила, содержащий гидрофильные – OH группы, переходит в капли водной фазы, а гидрофобный остаток полирицинолеата – остается в масляной фазе (рис. 3.1). В результате происходит снижение удельной поверхностной энергии на границе капель дисперсной фазы с дисперсионной средой [124], обеспечивая стабилизацию эмульсии вода-в-масле.

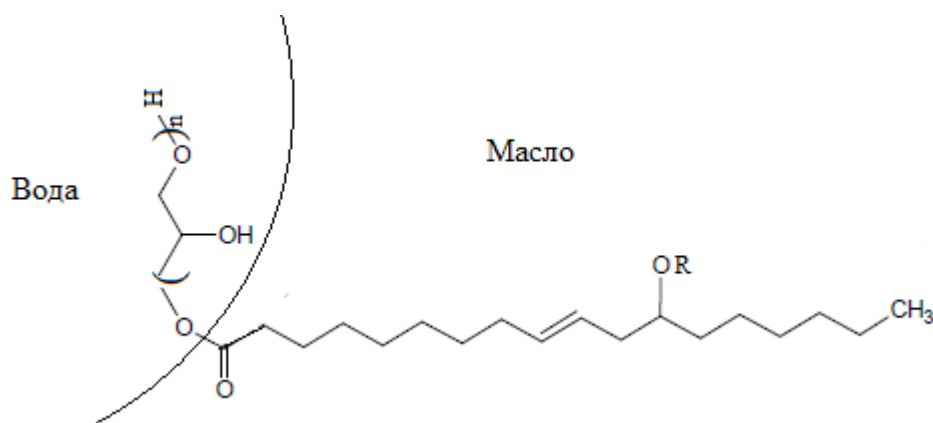


Рисунок 3.1. Ориентация молекулы ПГПР, адсорбированной на межфазной границе вода – масло в обратной эмульсии (R – остаток полирицинолеата).

Изотермы межфазного натяжения на границе жидкость/жидкость позволяют получить информацию о ряде значимых параметров ПАВ, таких как предельная адсорбция ( $A_{\infty}$ ), величина посадочной площадки ( $s_0$ ), толщина адсорбционного слоя ( $\delta$ ) и т.д. Полученные нами кривые зависимости

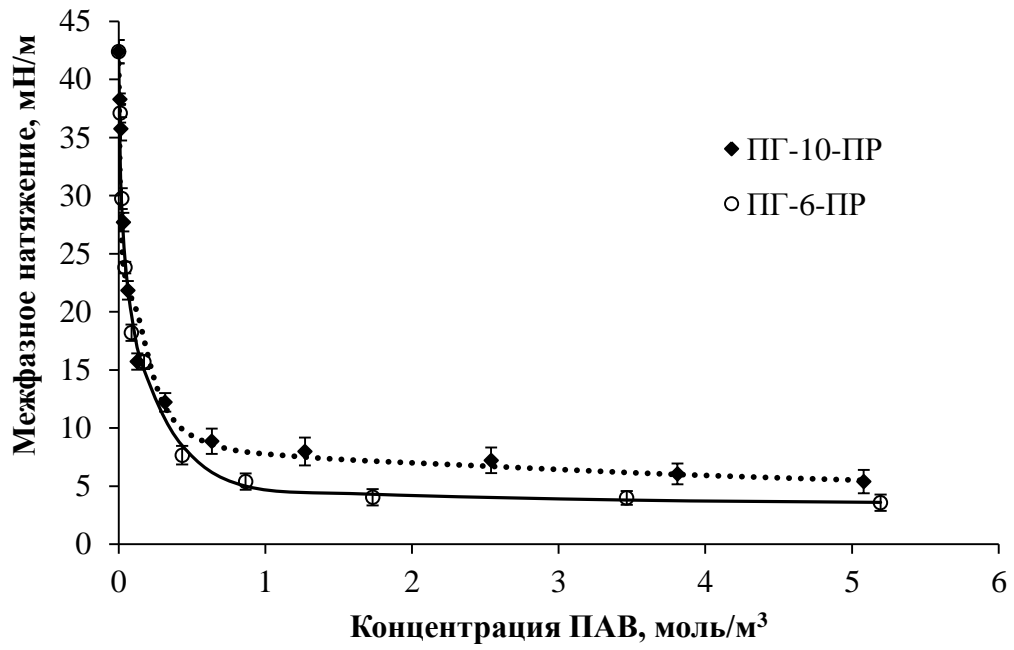
межфазного натяжения на границе раздела фаз 2%-й раствор уксусной кислоты/парафиновое масло от концентрации и логарифма концентрации ПАВ ряда полиглицерил полирицинолеатов приведены на рис. 3.2 (а, б).

Было установлено, что полиглицерил-6-полирицинолеат снижает межфазное натяжение от 42 мН/м (0% ПГПР в системе) до 3,6 мН/м (4% масс. ПГ-6-ПР), полиглицерил-10-полирицинолеат – до 5,4 мН/м (4% масс. ПГ-10-ПР). Значения критических концентраций мицеллообразования ПГ-6-ПР и ПГ-10-ПР составляют 2,3 моль/м<sup>3</sup> (1,4% масс.) и 2,5 моль/м<sup>3</sup> (2% масс.), соответственно. Полученные данные сравнимы с приведенными в литературе значениями ККМ и межфазного натяжения ПГПР на границе воды и различных масел: подсолнечного [170,172] и соевого [173].

Так, на границе вода/подсолнечное масло при содержании ПГПР (ГЛБ 1,5±0,5) в масляной фазе 4% масс., значение межфазного натяжения оказалось равным 3,5 мН/м [171]. Как сообщили авторы, критическая концентрация мицеллообразования ПГПР в исследуемой системе находится в интервале от 0,76 до 1,5% масс. В работе [172] было получено меньшее значение межфазного натяжения на границе вода/подсолнечное масло (2,9 мН/м) при концентрации ПГПР в масле 4% масс. Когда в качестве масляной фазы использовали соевое масло [173], значение межфазного натяжения при концентрациях ПГПР в масле выше 0,8% масс. оставалось постоянным и составило 1,8 мН/м. Некоторые несоответствия в данных, приведенных в перечисленных выше работах, можно было бы объяснить не только различной природой масел, но, вероятно, и тем, что используемые ПГПР были получены из разных источников и не имели в точности одинаковых характеристик.

Нами были рассчитаны параметры адсорбционного слоя неионогенных ПАВ на межфазной границе вода/масло. Изотермы гиббсовской адсорбции исследуемых ПАВ на межфазной границе вода – масло строили по полученным изотермам межфазного натяжения.

а



б

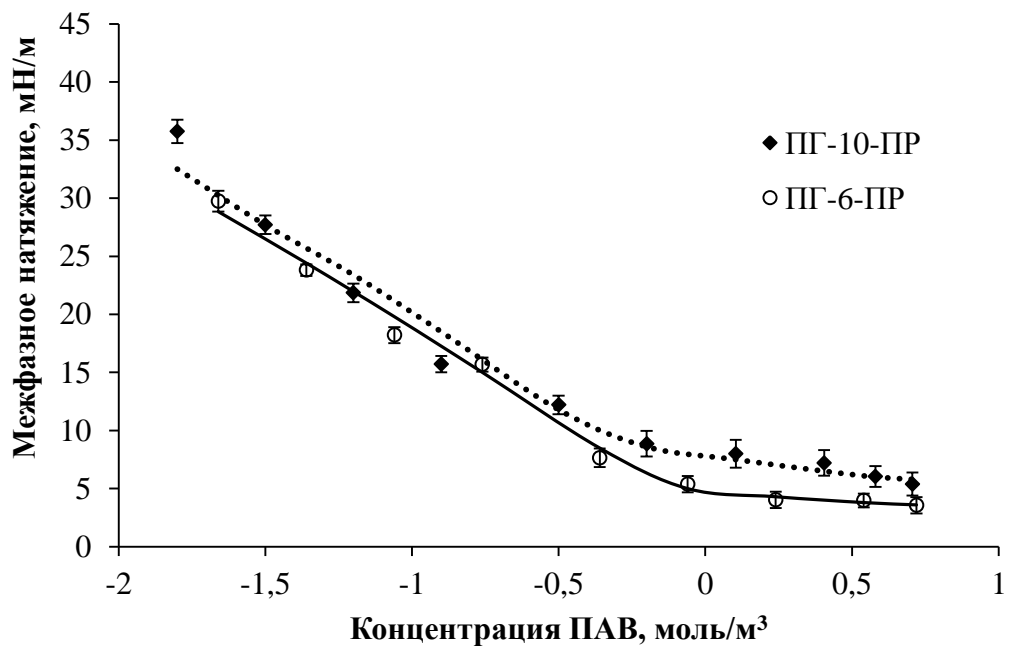


Рисунок 3.2. Зависимость межфазного натяжения ПГПР от концентрации  $c$  (а) и  $\lg c$  ПАВ в масляной фазе (б).

Значение гиббсовской адсорбции ( $\Gamma$ ) для данной концентрации ПАВ определяли с использованием фундаментального адсорбционного уравнения Гиббса для бинарного раствора (1.14).

Производную  $d\sigma/dc$  определяли графически, как тангенс угла наклона касательной по отношению к оси абсцисс, проведенной к кривой  $\sigma = f(c)$  в точке, соответствующей данной концентрации.

С использованием изотерм гиббсовской адсорбции по уравнениям 3.1-3.3 были определены значения предельной адсорбции ПАВ и рассчитаны параметры адсорбционных слоёв исследуемых ПАВ на межфазной границе вода/масло: площадь, занимаемую одной молекулой ( $s_0$ ) и толщину адсорбционного слоя ( $\delta$ ).

$$s_0 = \frac{1}{N_A \cdot A_\infty} \quad (3.1)$$

где  $A_\infty$  – предельная мономолекулярная адсорбция – ёмкость монослоя, моль/м<sup>2</sup>;

$N_A$  – число Авогадро.

Предельную адсорбцию  $A_\infty$  определяли с использованием изотерм гиббсовской адсорбции. Для веществ, обладающих значительной поверхностной активностью, можно принять  $A \approx \Gamma$ . Таким образом, величину максимальной гиббсовской адсорбции  $\Gamma_{max}$  приравнивали к предельной ленгмюровской адсорбции  $A_\infty$ .

Для определения величины  $A_\infty$  использовали уравнение Ленгмюра в линейной форме:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_\infty} + \frac{1}{A_\infty \cdot K} \cdot \frac{1}{c} \quad (3.2)$$

где  $A$  – величина адсорбции, моль/м<sup>2</sup>;  $c$  – концентрация ПАВ, моль/м<sup>3</sup>;

$K$  – константа адсорбционного равновесия.



$$\delta = \frac{A_{\infty} \cdot M}{\rho} \quad (3.3)$$

где  $M$  – молекулярная масса ПАВ, кг/моль;  $\rho$  – плотность ПАВ, кг/м<sup>3</sup>.

Значения величин  $A_{\infty}$ ,  $s_0$  и  $\delta$  для двух исследуемых ПАВ приведены в таблице 3.1.

**Таблица 3.1.** Значения параметров адсорбционных слоёв неионогенных ПАВ на межфазной границе вода-масло.

ПАВ	ККМ, моль/м <sup>3</sup>	$\sigma_{\text{мин}}$ , мН/м	$A_{\infty} \cdot 10^6$ , моль/м <sup>2</sup>	$s_0$ , нм <sup>2</sup>	$\delta$ , нм
ПГ-6-ПР	2,3±0,1	3,6±0,5	4,7±0,3	0,35±0,02	19,0±1,4
ПГ-10-ПР	2,5±0,1	5,4±0,8	4,9±0,5	0,34±0,01	28,0±2,1

Установлено, что величины посадочных площадок исследуемых ПАВ сравнительно малы — 0,35 и 0,34 нм<sup>2</sup> для ПГ-6-ПР и ПГ-10-ПР, соответственно. Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что на границе раздела фаз молекулы ПАВ образуют сплошной мономолекулярный слой, в котором остатки рицинолевой кислоты ориентированы по нормали.

Как правило, выбор ПАВ для получения эмульсий с требуемыми характеристиками осуществляют исходя из его гидрофильно–липофильного баланса (ГЛБ). Использование в процессе приготовления эмульсии ПАВ с оптимальным для данной системы ГЛБ позволяет увеличить адсорбцию молекул на межфазной поверхности, в наибольшей степени понизить межфазное натяжение и получить более устойчивую эмульсию.

В данной работе мы оценивали влияние гидрофильно-липофильного баланса смесей ПАВ на межфазное натяжение на границе вода – масло. Поскольку ПГПР являются эмульгаторами второго рода и используются для получения обратных эмульсий, диапазон значений ГЛБ смеси ПАВ варьировали от 3,2 до 6,0. В качестве ПАВ с высоким ГЛБ был выбран неионогенный эмульгатор Твин 80, значение гидрофильно-липофильного

баланса которого составляет 15,0. Требуемые соотношения эмульгаторов определяли исходя из принципа аддитивного сложения ГЛБ ПАВ [174]:

$$\text{ГЛБ}_{\text{смеси}} = W_{\text{ПГ-6-ПР}} \cdot \text{ГЛБ}_{\text{ПГ-6-ПР}} + W_{\text{Твин}} \cdot \text{ГЛБ}_{\text{Твин}}, \quad (3.4)$$

где  $\text{ГЛБ}_{\text{смеси}}$  – это значение ГЛБ смеси ПАВ;  $W_{\text{ПГ-6-ПР}}$  и  $W_{\text{Твин}}$  – массовые доли эмульгаторов в смеси;  $\text{ГЛБ}_{\text{ПГ-6-ПР}}$  и  $\text{ГЛБ}_{\text{Твин}}$  – величины ГЛБ эмульгаторов.

Полученные изотермы межфазного натяжения масляных растворов индивидуальных ПАВ и их смесей в разных соотношениях на границе с 2%-м раствором уксусной кислоты приведены на рис. 3.3.

Значения межфазного натяжения ПГ-6-ПР, Твин 80 и их смесей с массовыми соотношениями ПГ-6-ПР/Твин 80 0,93:0,07; 0,85:0,15; 0,76:0,24 при постоянной концентрации ПАВ в масле, равной 5 моль/м<sup>3</sup>, составляют 3,6 мН/м, 1,2 мН/м, 1,7 мН/м, 1,0 мН/м и 0,97 мН/м, соответственно. Таким образом, введение Твин 80 до 23,7% масс. от общего содержания ПАВ в системе понижает межфазное натяжение на границе раздела фаз более чем в 3 раза по сравнению с чистым ПГ-6-ПР.

На рисунке 3.4 представлена зависимость значений межфазного натяжения на границе 2%-й раствор уксусной кислоты/парафиновое масло от ГЛБ смеси поверхностно-активных веществ при их суммарной концентрации в масле 5 моль/м<sup>3</sup>. Из рисунка видно, что оптимальными для получения обратных эмульсий в исследуемой системе являются ГЛБ 5 и 6.

Были рассчитаны параметры адсорбционных слоев смесей неионогенных ПАВ на межфазной границе 2%-й раствор уксусной кислоты/парафиновое масло. Полученные значения приведены в таблице 3.2.

Смеси ПАВ зачастую проявляют синергизм, в результате чего смесь веществ оказывается более активной, чем каждое из них в отдельности.

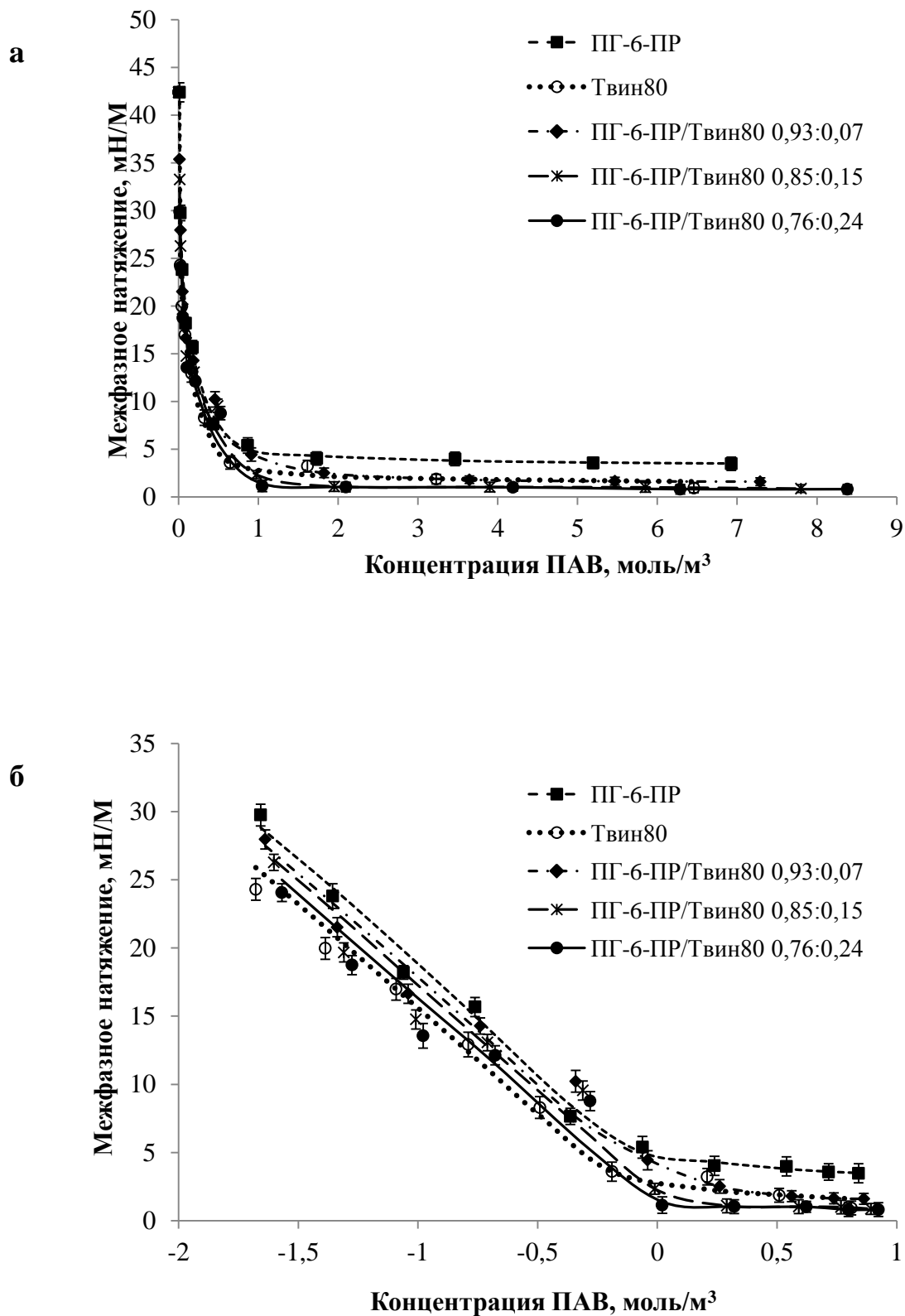


Рисунок 3.3. Зависимость межфазного натяжения от концентрации (а) и логарифма концентрации (б) индивидуальных ПАВ и их смесей в системе 2%-й раствор уксусной кислоты/парафиновое масло.

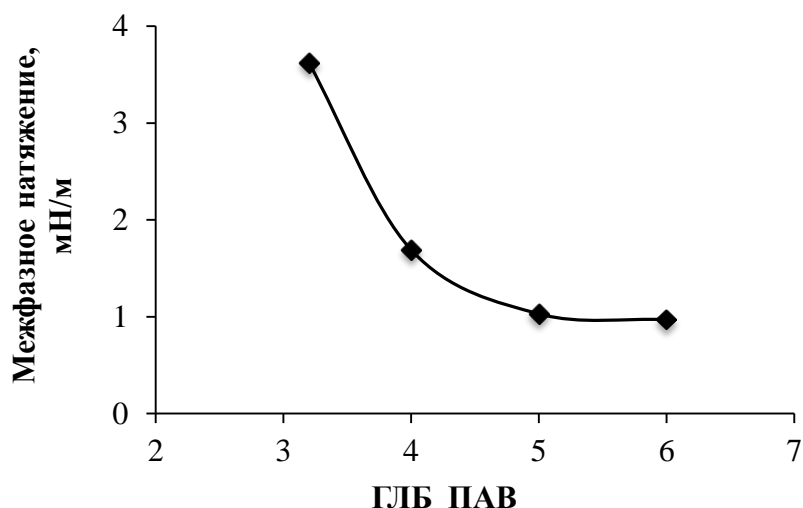


Рисунок 3.4. Влияние ГЛБ смесей ПАВ на межфазное натяжение на границе парафиновое масло/2%-й раствор уксусной кислоты (суммарная концентрация ПАВ в масле 5 моль/м<sup>3</sup>).

**Таблица 3.2.** Значения параметров адсорбционных слоёв смесей неионогенных ПАВ на межфазной границе вода-масло.

ПГ-6-ПР/ Твин-80	ГЛБ смеси	$\sigma_{\text{мин}}$ , мН/м	$A_{\infty} \cdot 10^6$ , моль/м <sup>2</sup>	$s_0$ , нм <sup>2</sup>
1:0	3,2	3,6±0,5	4,7±0,3	0,35±0,02
0,93:0,07	4,0	1,7±0,3	4,2±0,4	0,4±0,01
0,85:0,15	5,0	1,0±0,1	4,1±0,2	0,41±0,02
0,76:0,24	6,0	0,97±0,1	3,85±0,3	0,43±0,02
0:1	15,0	1,2±0,2	4,0±0,2	0,42±0,01

Оценить количественно силу взаимодействия двух ПАВ на межфазной поверхности в зависимости от их природы позволяет параметр межмолекулярного взаимодействия ПАВ  $\beta$ , который можно рассчитать с использованием экспериментальных зависимостей межфазного натяжения от концентрации и состава смесей в соответствии с подходом Розена по уравнениям (1.17), (1.18).

По расположению изотерм межфазного натяжения видно (рис.3.3), что при высоких концентрациях ПАВ, Твин-80 снижает межфазное натяжение сильнее,

чем ПГ-6-ПР и его смеси с Твин-80, за исключением образца с соотношением ПГ-6-ПР/твин 0,76:0,24, где результат уже практически такой же, как и для чистого Твин 80. Однако, как было показано выше, на начальных участках кривой смеси ведут себя активнее. Это в любом случае говорит о наличии синергизма в смеси ПАВ по отношению к растворам индивидуальных ПАВ, что подтверждают рассчитанные значения параметра взаимодействия ПАВ для формирования смешанного монослоя на границе раздела вода-масло  $\beta^\sigma$  (табл.3.3).

**Таблица 3.3.** Значения параметра взаимодействия ПАВ для формирования смешанного монослоя на границе раздела вода-масло.

ПГ-6-ПР/ Твин-80	$\beta^\sigma$
0,93:0,07	-0,86
0,85:0,15	-2,01
0,76:0,24	-2,41

Как следует из данных, приведенных в таблице 3.3, параметры взаимодействия всех исследуемых смесей имеют отрицательное значение, что свидетельствует о наличии межмолекулярного притяжения в адсорбционном слое у смесей ПГ-6-ПР и Твин 80. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что наибольший синергизм проявляет смесь ПГ-6-ПР/Твин 80 с массовым соотношением компонентов 0,76:0,24.

### **3.1.2. Адсорбция полимера на границе раздела фаз вода-масло**

Было изучено влияние концентрации растворов хитозана на межфазное натяжение на границе раздела фаз «раствор уксусной кислоты – парафиновое масло». Зависимость межфазного натяжения от концентрации полимера на границе раздела фаз вода – масло представлена на рис. 3.5. С повышением

концентрации полимера в растворе от 0 до 20 г/л (2% масс.), величина межфазного натяжения уменьшается от 43 мН/м до 24,5 мН/м. Таким образом, хитозан по сравнению с ПАВ проявляет относительно низкую активность.

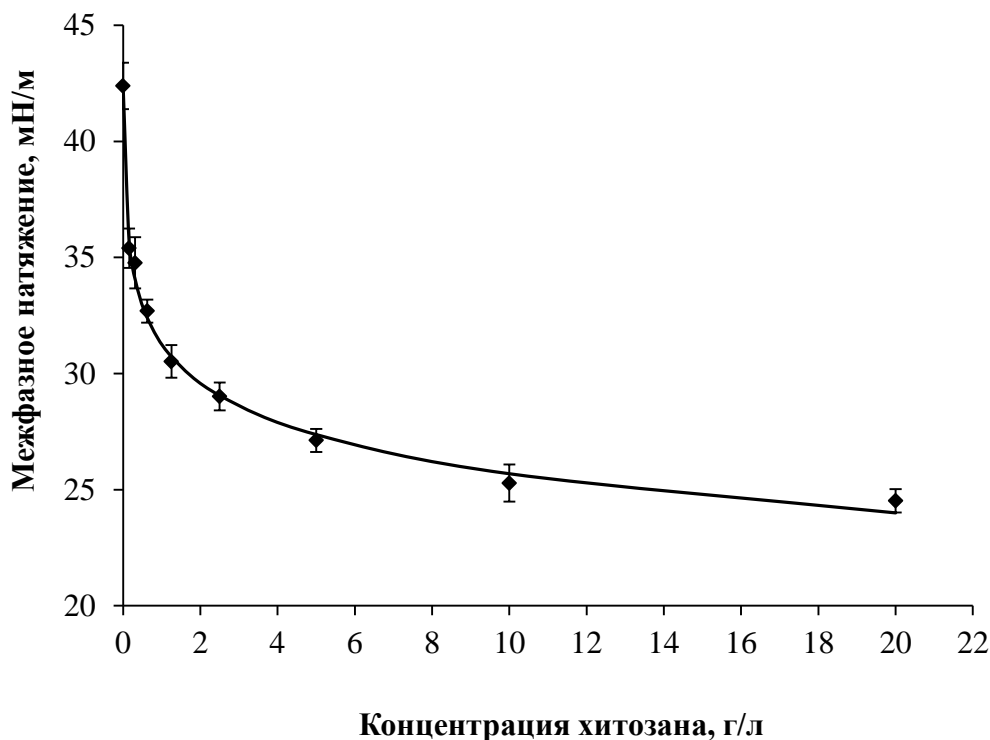
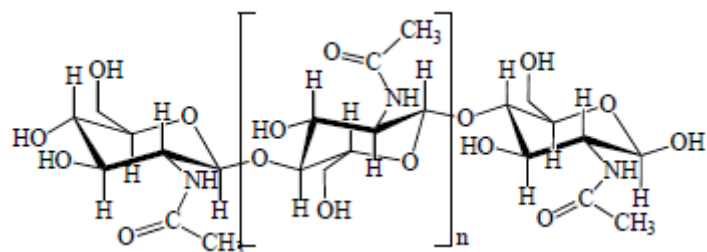
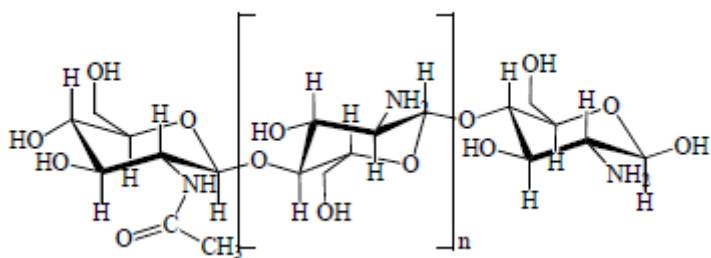


Рисунок 3.5. Изотерма межфазного натяжения на границе парафинового масла и растворов хитозана в 2%-й уксусной кислоте.

Хитозан — линейный аминополисахарид, который получают деацетилированием хитина. Хитин и хитозан состоят из различного количества остатков 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкопиранозы и *N*-ацетил-2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкопиранозы, связанных между собой  $\beta(1\rightarrow4)$  гликозидными связями [51]. Строение молекул хитина и хитозана показано на рисунке 3.6. Вследствие неполной завершенности реакции деацетилирования содержание остаточных ацетильных групп в хитозане может достигать 30% [175]. Молекулы хитозана высоко гидрофильны в растворе уксусной кислоты за счет наличия протонированных аминных групп.



а



б

Рисунок 3.6. Структура молекулы полностью ацетилированного хитина (а) и хитозана (б) [51].

Гидрофобными группами, переходящими в масляную фазу в процессе адсорбции полимера на межфазной границе, являются ацетамидные и депротонированные аминогруппы. Поскольку степень деацетилирования используемого в данной работе полимера составляет 82%, а степень протонирования аминогрупп при pH 4,1 (pH 2%-го раствора хитозана в 2%-ной уксусной кислоте) равна 90% [176], можно говорить о том, что содержание гидрофобных групп незначительно по сравнению с положительно заряженными аминогруппами. В связи с небольшим количеством и неоднородным распределением гидрофобных групп по цепи полимера, их переход в масляную фазу в процессе формирования адсорбционного слоя требует оптимального расположения макромолекул на границе вода – масло. Однако, конформационные превращения жесткоцепных молекул хитозана затруднены и требуют времени. Это является причиной низкой поверхностной активности и большого времени достижения равновесных значений адсорбции хитозана на границе раздела фаз [177].

Как видно из представленных на рис. 3.7 изотерм межфазного натяжения смешанных систем полимер – ПАВ, основной вклад в уменьшении межфазного натяжения на границе раздела фаз вносит поверхностно-активное вещество. При росте концентрации хитозана в водной фазе от 0 до 20 г/л, значения величин минимального межфазного натяжения находятся в пределах 3,0 – 3,5 мН/м (содержание ПАВ в масле 6,93 моль/м<sup>3</sup>).

На границе раздела фаз при совместной адсорбции могут происходить следующие процессы: конкурентная адсорбция или образование комплекса хитозан – ПАВ. Формирование равновесного адсорбционного слоя на границе раздела фаз для низкомолекулярных ПАВ происходит практически мгновенно, тогда как для полимеров требует нескольких часов [155]. Таким образом, низкомолекулярный ПАВ занимает межфазную поверхность значительно быстрее, чем макромолекулы полимера. При конкурентной адсорбции, полимер в дальнейшем может вытеснять молекулы ПАВ с поверхности. Во втором случае, молекулы хитозана могут связываться с адсорбционным слоем ПАВ за счет комплексообразования, в результате чего образуется «якорь», который предотвращает десорбцию молекул поверхностно-активного вещества.

Положительно заряженные протонированные аминогруппы хитозана способны в кислой среде связывать жирные кислоты (олеиновая, линолевая, стеариновая, пальмитиновая, линоленовая кислоты), образуя нерастворимые ПАВ-полиэлектrolитные комплексы (ПАВ-ПЭК). Растворимые комплексы образуются только при низких концентрациях полиэлектролитов (ниже 10<sup>-4</sup> моль/л), хотя, в зависимости от концентрации ПАВ в растворе, появляются различные молекулярные структуры (растворимые агрегаты, стабилизированные адсорбцией полимера мицеллы) [178]. Неионогенные ПАВ характеризуются слабой склонностью к взаимодействию с гидрофильными гомополимерами. Для полимеров с гидрофильными участками возможно связывание полярных фрагментов за счет действия ориентационных и индукционных взаимодействий, а также образования водородных связей.



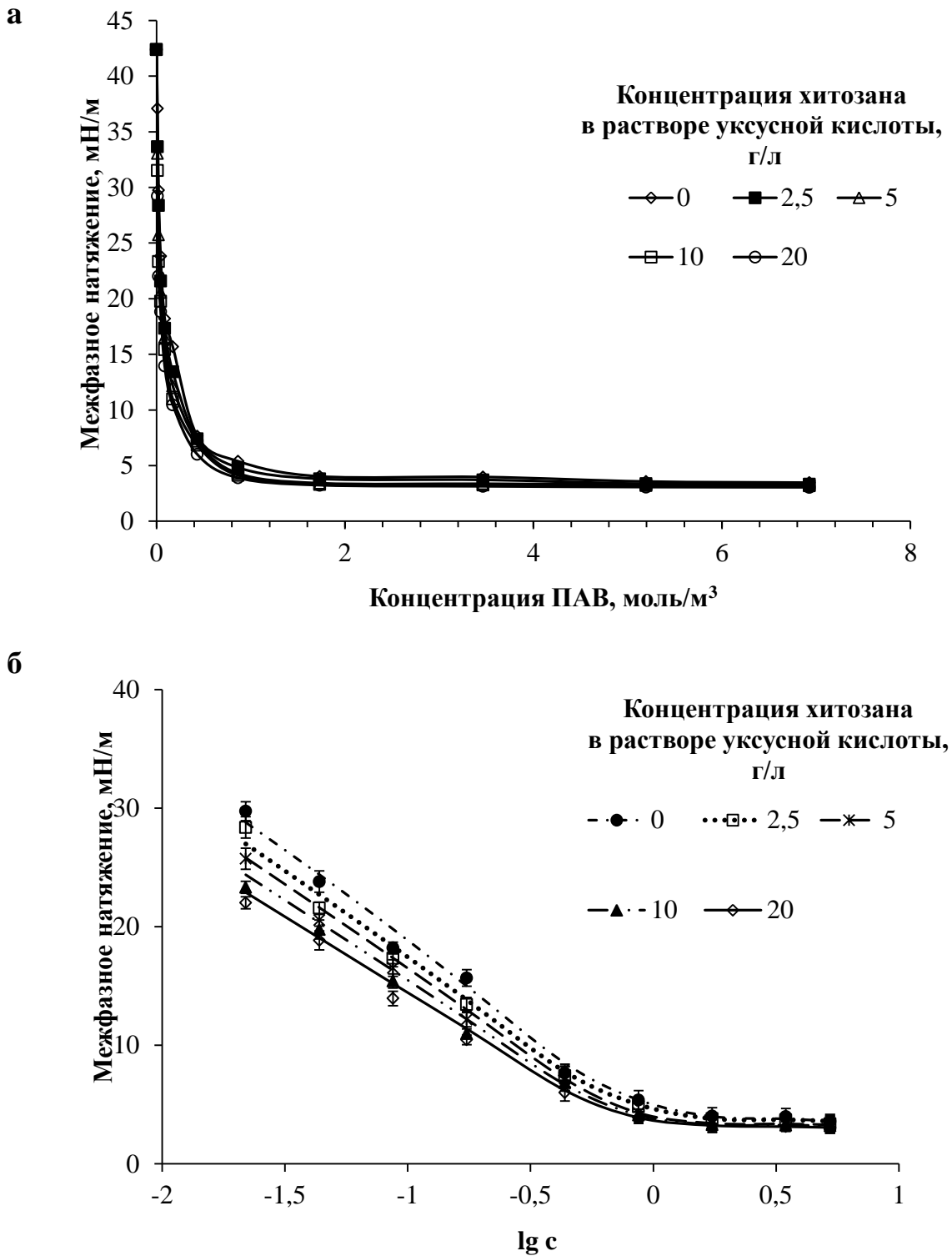


Рисунок 3.7. Изотермы межфазного натяжения в системе 2%-й раствор уксусной к-ты/ПГ-6-ПР+хитозан/парафиновое масло при разных концентрациях хитозана в растворе уксусной кислоты (г/л).

В случае полимеров с гидрофобными участками, связывание происходит за счет действия дисперсионных сил [152]. В результате образования дополнительных водородных и гидрофобных связей между молекулами

маслорастворимого ПАВ и водорастворимого полимера возрастает прочность межфазных слоев. Поскольку структурно-механические свойства слоя, возникающего на границе раздела фаз, являются главным фактором, определяющим устойчивость капель дисперсной фазы к коалесценции, время жизни элементарных капель в случае образования комплекса полимер – ПАВ увеличивается [155].

Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что при использовании в качестве ПАВ полиглицерил-6-полирицинолеата, преобладающим является процесс связывания молекул хитозана и ПГ-6-ПР, который может происходить в водной фазе за счет образования водородных связей между гидроксильными группами ПАВ и протонированными и депротонированными аминогруппами хитозана.

### **3.2. Исследование взаимодействия хитозана с лимонной кислотой**

Методами фотон-корреляционной и УФ-спектроскопии было исследовано взаимодействие хитозана с лимонной кислотой при различных соотношениях реагентов, pH среды и температурах. Значения pH растворов хитозана и лимонной кислоты регулировали с помощью pH-метра, используя 1н. раствор натрия гидроксида. Определение растворимости используемого в работе хитозана с молекулярной массой 200 кДа проводили турбодиметрическим титрованием 1,3%-го раствора хитозана в 2%-й уксусной кислоте 0,1н. раствором натрия гидроксида. Исходя из результатов титрования, был выбран рабочий диапазон значений pH растворов хитозана (pH от 4,0 до 6,0).

Изучение взаимодействия хитозана с лимонной кислотой методом фотон-корреляционной спектроскопии проводили путем титрования раствора хитозана с концентрацией 0,2 г/л раствором лимонной кислоты при комнатной температуре и заданном значении pH. Было установлено, что при уменьшении массовых соотношений хитозан : лимонная кислота (X) от 0,5 до 0,1 при pH 5,0 и 5,7 происходит значительный рост размеров частиц в системе (рис. 3.8).

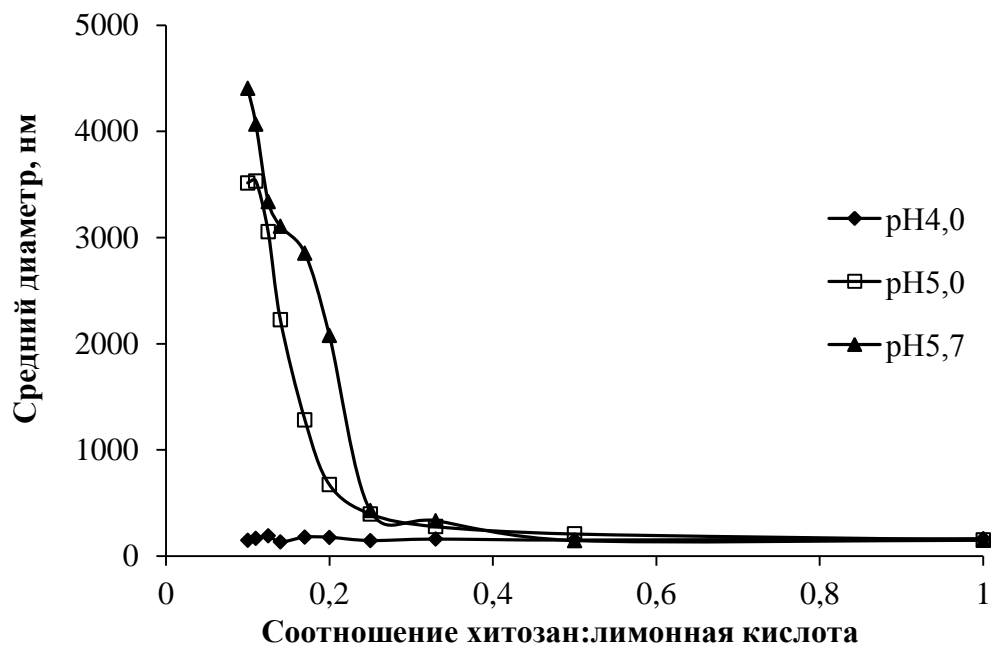


Рисунок 3.8. Зависимость средних размеров частиц комплекса лимонная кислота – хитозан от соотношения компонентов в растворе при разных значениях рН.

Распределение по размерам частиц хитозана и комплекса хитозан – лимонная кислота при различных значениях рН растворов и выборочных соотношениях компонентов приведено на рис. 3.9-3.12.

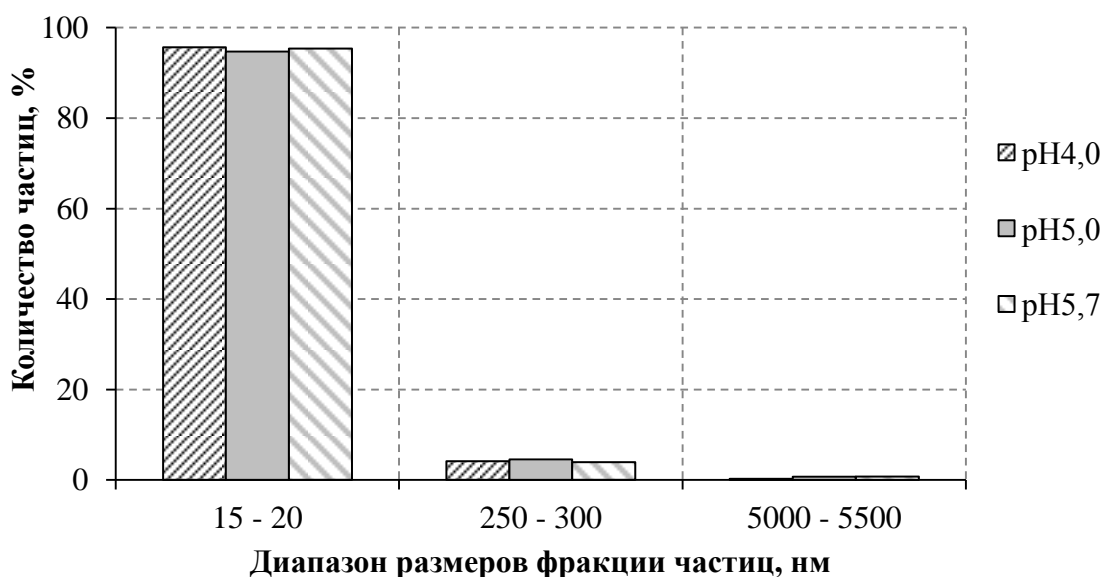


Рисунок 3.9. Процентное содержание фракций частиц с размерами в трех различных диапазонах в растворах хитозана с различными значениями рН (4,0; 5,0 и 5,7).



Рисунок 3.10. Процентное содержание фракций частиц с размерами в трех различных диапазонах в совместных растворах хитозана и лимонной кислоты ( $X = 1$ ) с различными значениями pH (4,0; 5,0 и 5,7).

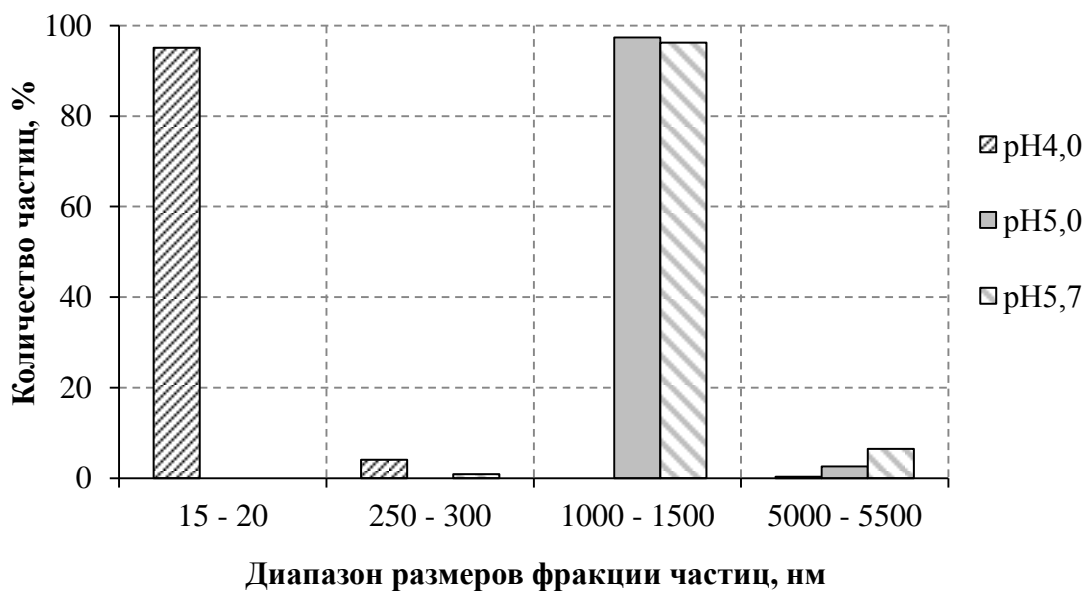


Рисунок 3.11. Процентное содержание фракций частиц с размерами в четырех различных диапазонах в совместных растворах хитозана и лимонной кислоты ( $X = 0,2$ ) с различными значениями pH (4,0; 5,0 и 5,7).

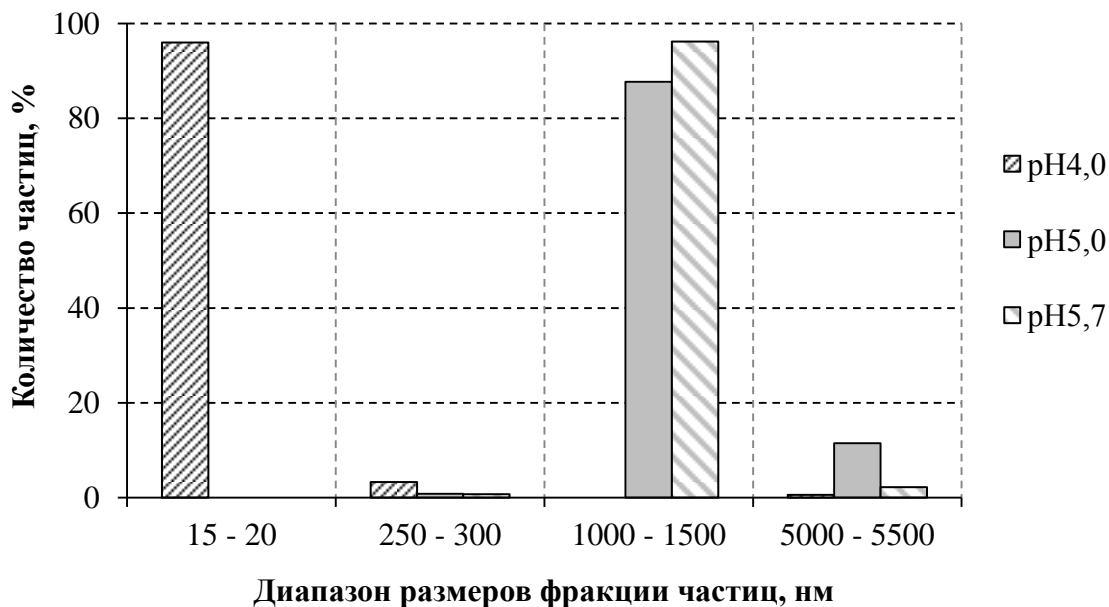


Рисунок 3.12. Процентное содержание фракций частиц с размерами в четырех различных диапазонах в совместных растворах хитозана и лимонной кислоты ( $X = 0,11$ ) с различными значениями pH (4,0; 5,0 и 5,7).

Из полученных данных видно, что в растворах полимера при всех исследованных значениях pH присутствуют три фракции частиц, средний диаметр которых находится в диапазонах 15 – 20 нм, 250 – 300 нм, 5000 – 5400 нм. Преобладающей из них является первая фракция (рис. 3.9). Картина остается такой же для совместного раствора хитозана и лимонной кислоты при их массовом соотношении 1:1 ( $X = 1$ ) (рис. 3.10). Когда в раствор полимера вводят пятикратный избыток лимонной кислоты ( $X = 0,2$ ) (рис. 3.11), при повышении значений pH от 4,0 до 5,0 и 5,7 наблюдается практически полное исчезновение частиц с размерами 15-20 нм и 250-300 нм и появление новой фракции с размерами частиц от 1000 до 1500 нм и наиболее высоким их содержанием. Та же фракция является преобладающей в том случае, когда соотношение хитозан : лимонная кислота составляет 1:9 ( $X = 0,11$ ) (рис. 3.12). Доля фракции 5000 – 5500 нм увеличивается при обоих рассматриваемых соотношениях. Наблюдаемый рост размеров частиц свидетельствует о том, что при  $pH \geq 5,0$  и соотношениях  $X < 0,5$  в системе образуется комплекс за счет

возникновения ионных связей между положительно заряженными протонированными аминогруппами хитозана и отрицательно заряженными карбоксильными группами лимонной кислоты. В литературе [179] приводят следующий механизм его образования (при полной диссоциации лимонной кислоты) (рис. 3.13).

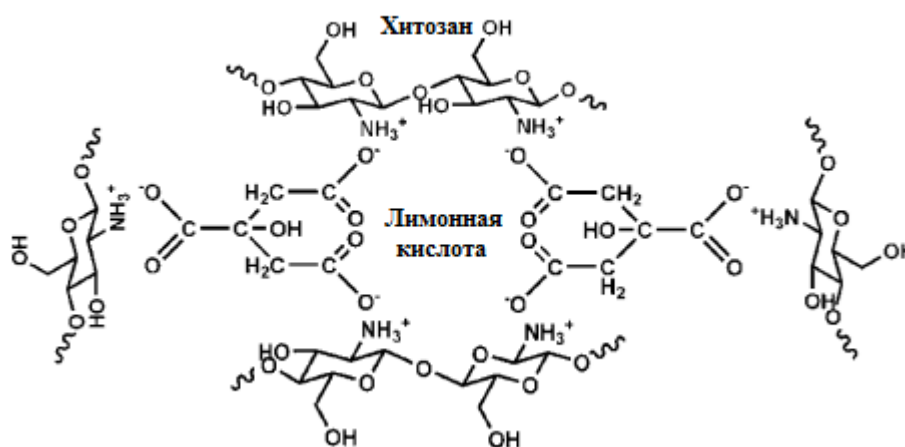


Рисунок 3.13. Предполагаемый механизм образования цитрата хитозана [179].

Высокие значения pH, требуемые для образования комплекса, можно объяснить тем, что при увеличении щелочности среды повышается число отрицательно заряженных карбоксильных групп, тогда как количество протонированных аминогрупп хитозана уменьшается не столь значительно (90% при pH 4,0; 78% при pH 5,0 и 54% при pH 5,7) [176].

Спектрофотометрическое титрование раствора хитозана с концентрацией 0,2 г/л раствором лимонной кислоты проводили при комнатной температуре и двух значениях pH – 5,0 и 5,7. Полученные результаты представлены на рис. 3.14. Было показано, что при уменьшении массовых соотношений хитозан : лимонная кислота от 1,0 до 0,5 начинается рост оптической плотности растворов, а при соотношениях  $X < 0,5$  происходит значительное увеличение мутности системы, что свидетельствует об образовании комплекса и подтверждает результаты, полученные с помощью фотон-корреляционной спектроскопии.

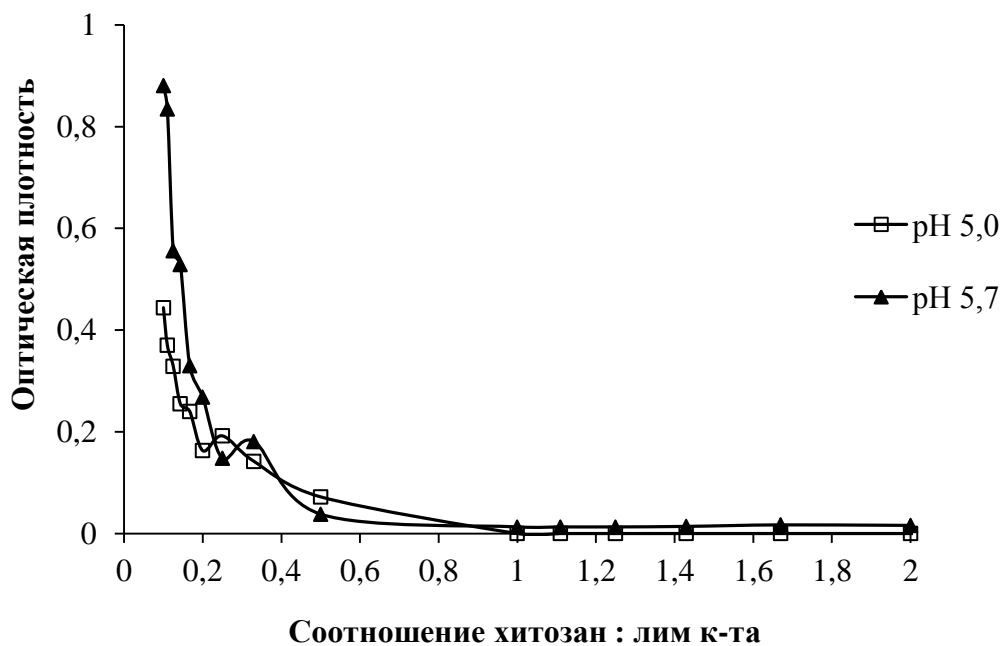


Рисунок 3.14. Зависимость оптической плотности совместных растворов хитозана и лимонной кислоты от соотношения компонентов при разных значениях pH.

Исследование процесса комплексообразования турбодиметрическим методом проводили при pH растворов хитозана 5,0 и 5,7 и концентрации в 50 раз превышающей значение, используемое в предыдущих экспериментах. Массовые соотношения хитозан : лимонная кислота варьировали от 0,1 до 7. При смешении растворов полимера и сшивающего агента наблюдали разделение системы на две фазы вследствие образования нерастворимого комплекса хитозан – лимонная кислота.

Образцы термостатировали при 60 °С в течение трех часов, затем охлаждали, выдерживали при комнатной температуре в течение нескольких суток, разбавляли и определяли оптическую плотность на спектрофотометре. Результаты сравнивали с данными, полученными для образцов, приготовленных с теми же соотношениями компонентов и pH среды, не подверженных нагреванию и выдержанных при комнатной температуре в течение такого же периода времени. Зависимость относительной мутности системы ( $D/D_{\max}$ ) от массового соотношения компонентов X при различных pH

и температурах приведены на рис. 3.15-3.17. Было показано, что при комнатной температуре рост относительной мутности наблюдается при уменьшении соотношений полимер/сшивающий агент от 1 до 0,6 при рН 5,0 и от 1 до 0,3 при рН 5,7. С повышением температуры растворов до 60 °С происходит увеличение диапазона значений  $X$ , при которых образуется комплекс ( $0,6 < X < 4$  при рН 5,0 и  $0,3 < X < 3$  при рН 5,7). На перечисленных участках кривых относительная мутность образцов, приготовленных при 60 °С, выше, чем у образцов, выдержанных при комнатной температуре. Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение температуры способствует формированию комплекса хитозан – лимонная кислота. Это можно объяснить тем, что рост температуры приводит к разрыву водородных связей в макромолекуле хитозана и большее количество аминогрупп оказывается доступно для взаимодействия с отрицательно заряженными карбоксильными группами сшивающего агента.

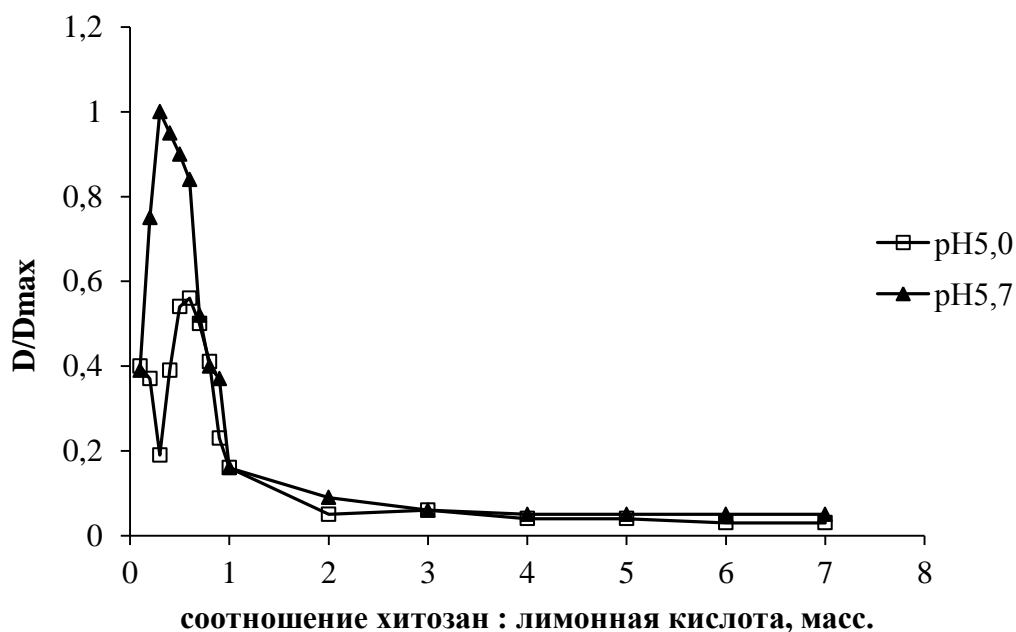


Рисунок 3.15. Зависимость относительной мутности ( $D/D_{max}$ ) от массового соотношения хитозан : лимонная кислота при комнатной температуре и разных рН.



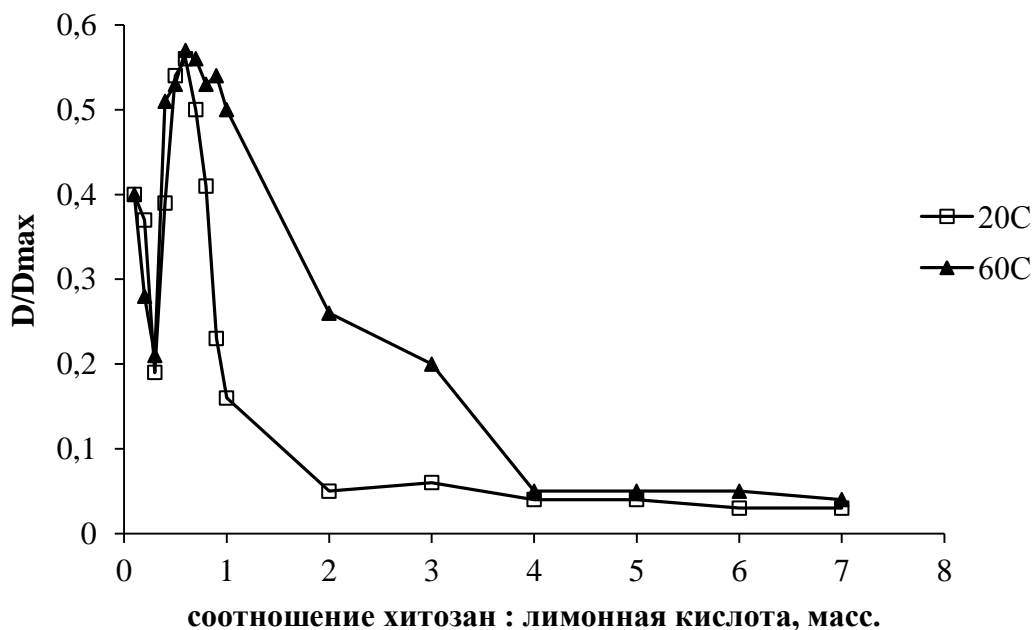


Рисунок 3.16. Зависимость относительной мутности ( $D/D_{max}$ ) от массового соотношения хитозан : лимонная кислота при разных температурах и pH 5,0.

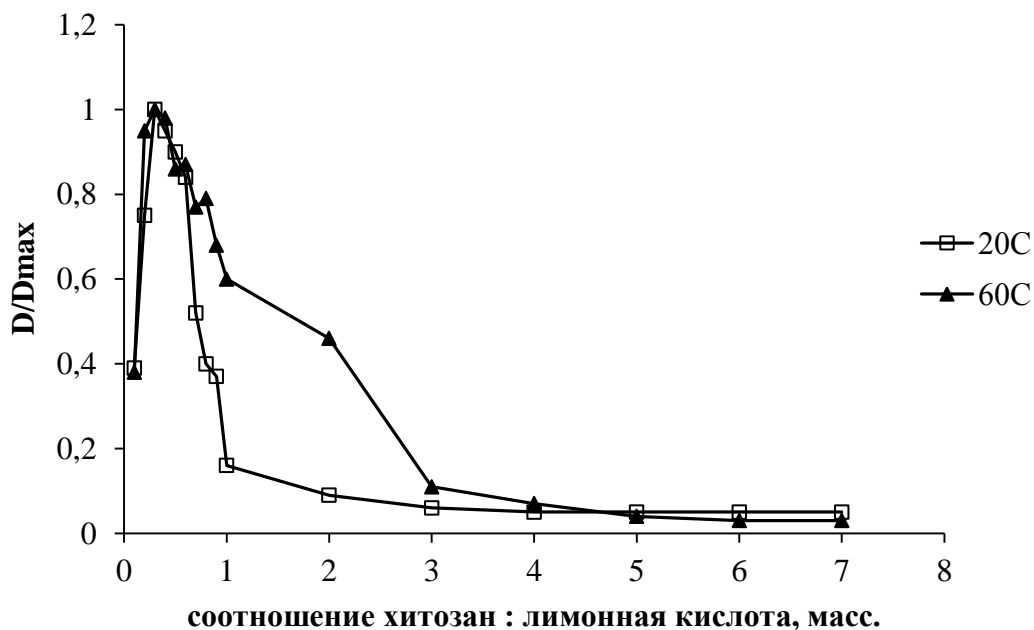


Рисунок 3.17. Зависимость относительной мутности ( $D/D_{max}$ ) от массового соотношения хитозан : лимонная кислота при разных температурах и pH 5,7.

Ранее в литературе было показано, что при взаимодействии хитозана с гидрофильными макромолекулами сополимера малеиновой кислоты и N-

винилпирролидона при повышенной температуре (70 °С) происходит образование полиэлектролитного комплекса, насыщенного макромолекулами хитозана (при мольных соотношениях хитозан:сополимер  $>1$ ), вследствие разрыва слабых межмолекулярных связей, которому способствует термическая обработка [167].

Как было показано выше (рис.3.8), при рН 4,0, когда диссоциация лимонной кислоты протекает только по одной карбоксильной группе [180], соотношении реагентов  $X < 1$  и комнатной температуре, комплексообразование не происходит. В результате изучения нами кинетики взаимодействия хитозана с лимонной кислотой ( $X = 3$ ) методом УФ-спектроскопии при рН 4,0 было установлено, что комплекс хитозана – лимонная кислота образуется при нагревании (60 °С) и длительном перемешивании их совместного раствора. Об этом свидетельствует увеличение поглощения в области длин волн 220 – 350 нм (рис. 3.18).

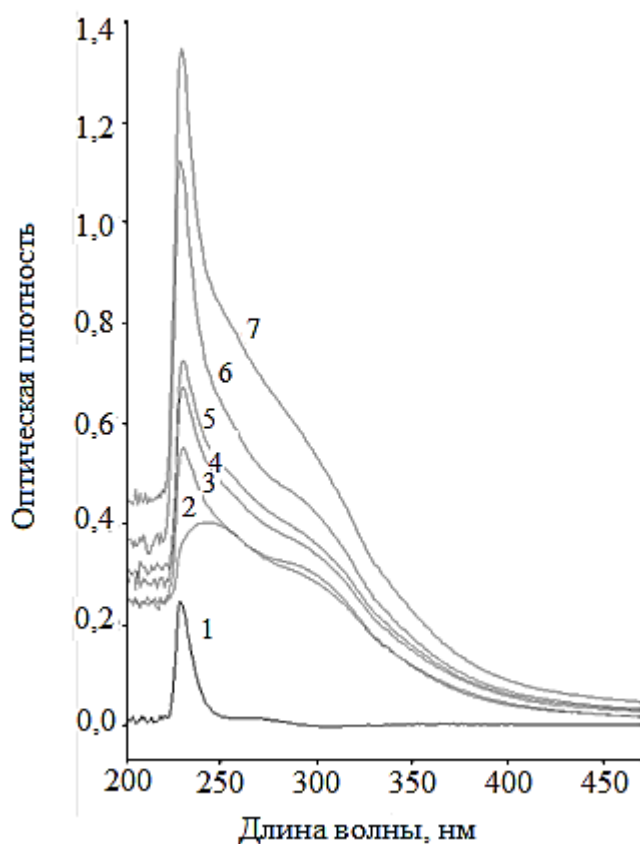
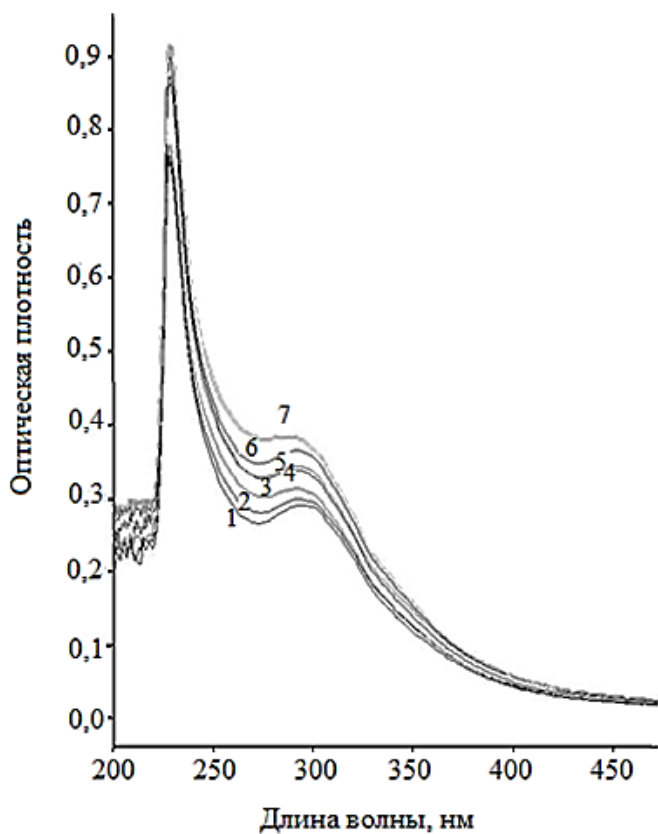


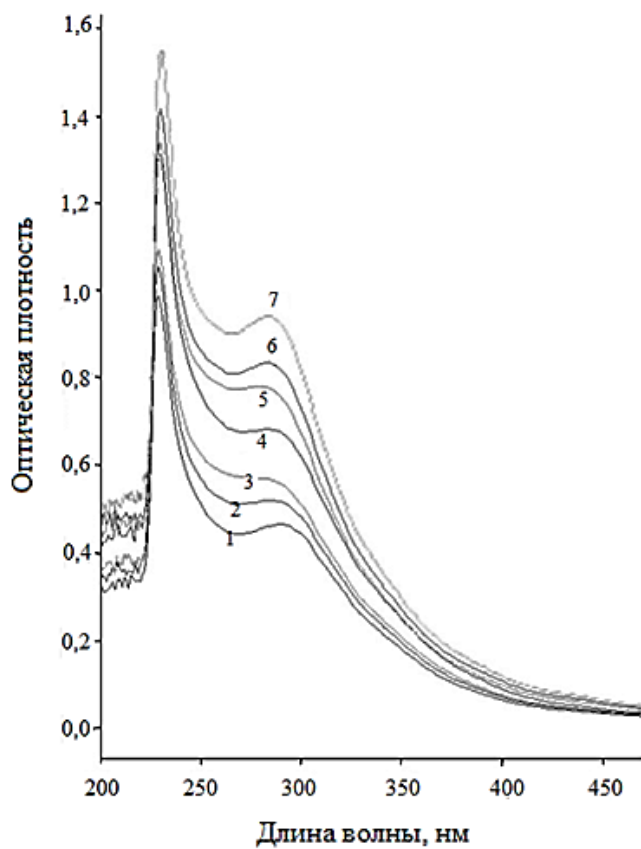
Рисунок 3.18. УФ-спектры раствора лимонной кислоты с концентрацией 1,1 г/л (1) и раствора хитозана с концентрацией 3,3 г/л в 1,5% уксусной к-те (2); а также совместного раствора лимонной кислоты (3,3 г/л) и хитозана (10 г/л) (массовое соотношение хитозан:лимонная кислота 3:1) в 1,5% уксусной к-те: (3) - свежеприготовленного; и выдержанного при перемешивании и нагревании при 60°C в течение: (4) - 1 часа; (5) - 2 часов; (6) - 4 часов; (7) - 6 часов, после трехкратного разбавления.

При увеличении температуры до 75 °С и 90 °С было отмечено появление дополнительного максимума в области 270 – 330 нм (рис. 3.19 а, б), что может быть связано с образованием ковалентной связи между аминогруппами хитозана и карбоксильными группами сшивающего агента. Ранее подобное предположение было высказано Varshosaz и сотрудниками [102], исходя из результатов сравнения характеристик хитозановых микросфер, сшитых лимонной кислотой, получение которых осуществляли эмульсионным способом при умеренной (60 °С) и повышенной (120 °С) температурах.

С целью избежать выпадения осадка вследствие образования нерастворимого комплекса хитозан – сшивающий агент в процессе получения хитозановых микросфер, в дальнейших исследованиях были использованы растворы хитозана, значение рН которых составляло 4,0.



А



Б

Рисунок 3.19. УФ-спектры совместного раствора хитозана (10 г/л) и лимонной кислоты (3,3 г/л) (массовое соотношение хитозан:лимонная кислота 3:1) в 1,5% уксусной к-те, выдержанного при перемешивании и нагревании при 75°C (А) и 90°C (Б) в течение: (1) - 15 мин; (2) - 30 мин; (3) - 1 часа; (4) - 1,5 часов; (5) - 2 часов; (6) - 2,5 часов; (7) - 3 часов, после троекратного разбавления.

### **3.3. Исследование свойств обратных эмульсий вода – парафиновое масло**

#### ***3.3.1. Процессы, протекающие в эмульсиях***

В процессе получения эмульсии в результате диспергирования происходит возникновение частиц дисперсной фазы и уменьшение их размеров, при этом вероятность столкновения частиц возрастает. Если образующаяся эмульсия является агрегативно устойчивой, капли внутренней фазы оседают на дно, либо всплывают наверх, в зависимости от соотношения плотности фаз, образуя при этом плотную упаковку (объемная доля дисперсной фазы  $\sim 0,6-0,7$ ). В том случае, если дисперсная система обладает избыточной свободной энергией, она является агрегативно неустойчивой. В таких системах протекают различные самопроизвольные процессы, направленные на то, чтобы приблизить ее к равновесному состоянию [124]. В агрегативно неустойчивых эмульсиях в результате взаимодействия частиц могут происходить процессы агрегации, флокуляции, структурообразования и коалесценции (рис.3.20).

На первом этапе в результате сближения частиц дисперсной фазы и их взаимной фиксации на небольших расстояниях друг от друга происходит образование агрегатов из нескольких частиц, разделенных прослойками поверхностных слоев. При этом исходная форма и размер отдельной частицы остаются такими же, как и до агрегации. Таким образом, уменьшение поверхностной энергии происходит не за счет сокращения удельной поверхности, а вследствие уменьшения межфазного натяжения в тонких пленках дисперсионной среды между частицами. В результате последующего процесса флокуляции агрегаты укрупняются, становясь седиментационно неустойчивыми. В том случае, если плотность вещества дисперсной фазы больше плотности дисперсионной среды, агрегаты оседают на дно, в противном случае – постепенно всплывают наверх [124]. При этом происходит образование коагуляционных структур, в которых места контактов частиц также разделены тонкими пленками поверхностных слоев. Более глубокий

процесс коагуляции приводит к разрушению прослоек поверхностных слоев и непосредственному контакту частиц. В результате происходит полное их слияние (коалесценция) с образованием более крупных капель, за которым может последовать полное разделение фаз [128].

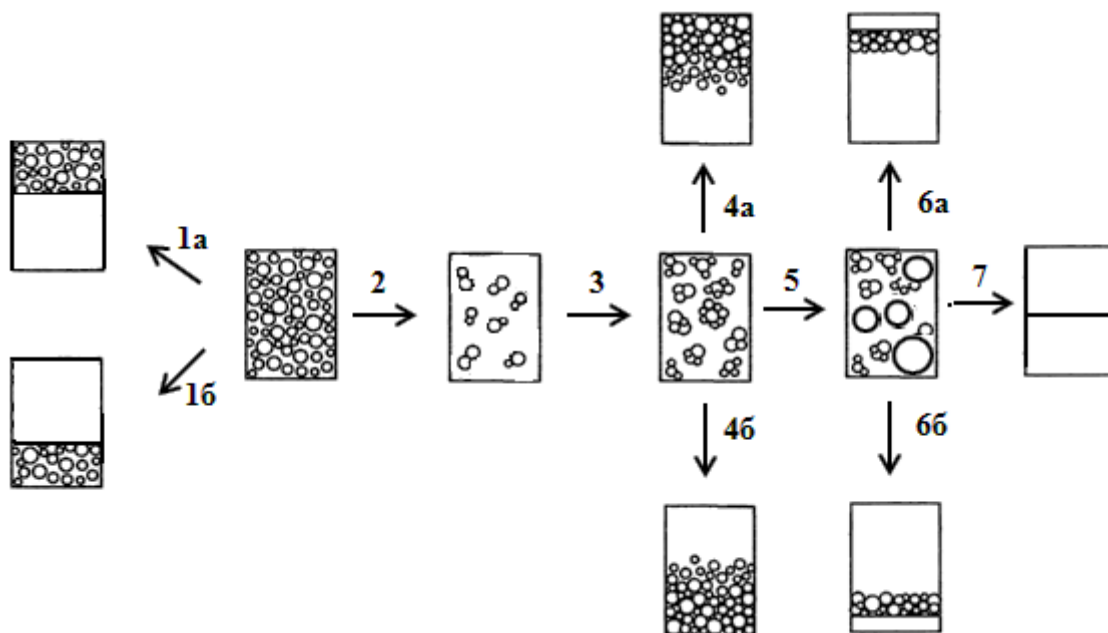


Рисунок 3.20. Процессы, протекающие в эмульсиях:

**1** – агрегативно устойчивые эмульсии: **(а)** - плотность дисперсной фазы меньше плотности дисперсионной среды; **(б)** – плотность дисперсной фазы больше плотности дисперсионной среды; **2** – агрегация; **3** – флокуляция; **4** – всплывание **(а)** или седиментация **(б)** флокул; **5** – коалесценция; **6** – всплывание **(а)** или седиментация **(б)** флокул и частичное расслоение фаз; **7** – полное расслоение фаз.

В этом случае уменьшение поверхностной энергии происходит из-за сокращения межфазной поверхности. Укрупнение капель дисперсной фазы приводит к потере седиментационной устойчивости системы. Капли, плотность которых больше плотности дисперсионной среды, оседают; капли, плотность которых меньше плотности дисперсионной среды – всплывают наверх. При этом может происходить частичное, либо полное расслоение фаз [124].

### **3.3.2. Выбор соотношения водной и масляной фаз для получения обратных эмульсий**

Для получения микросфер на основе эмульсий вода/ПАВ/парафиновое масло представляет интерес определение области существования исследуемой эмульсии, которое позволило бы подобрать оптимальное соотношение исходных реагентов и могло бы способствовать получению устойчивой системы и обеспечению высокого выхода продукта. Положение границ существования нераслаивающейся эмульсии и областей расслоения в системе вода/ПАВ/масло зависит от температуры, соотношения компонентов и свойств поверхностно-активного вещества. Треугольники Гиббса систем 2%-й раствор уксусной кислоты/ПГПР/ парафиновое масло были построены на основании данных, полученных в результате водного титрования смеси масло/ПАВ при 20 °С и 60 °С, а также изучения поведения систем с низкой концентрацией ПАВ (от 1% до 5% масс.) (рис. 3.21-3.24, 3.26). Макроскопически однородная система (1) занимает обширную площадь на диаграмме и при небольшом содержании ПАВ представляет собой нераслаивающуюся эмульсию. При концентрации ПГ-6-ПР ~30% масс. на диаграмме появляются области расслоения (2, 3), площадь которых увеличивается с ростом температуры. Как было показано выше (п.3.3.1), расслоение происходит за счет седиментации, либо всплывания образующихся в системе флокул капель дисперсной фазы. Область расслаивающейся системы оказалась больше в случае использования в качестве ПАВ ПГ-10-ПР (рис. 3.21, 3.23).

Область расслоения, расположенная в правом нижнем углу диаграмм (рис. 3.21-3.24), представляется наиболее оптимальной для получения хитозановых микросфер в связи с тем, что равновесные эмульсии на основе данных систем являются менее концентрированными, так как капли дисперсной фазы находятся в избытке масла, что способствует лучшему выделению микросфер.

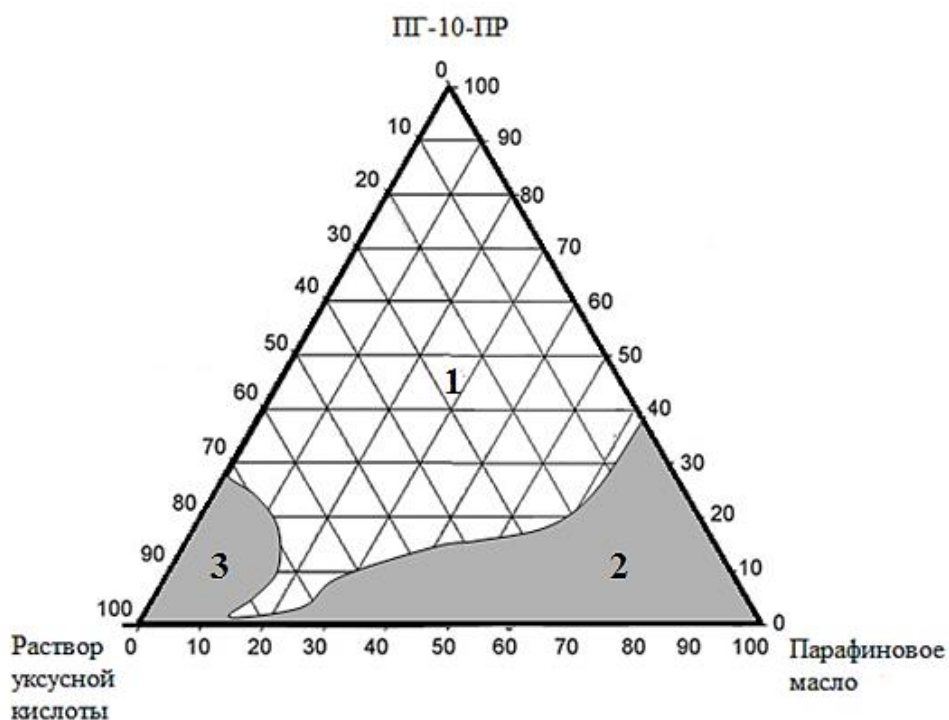


Рисунок 3.21. Треугольник Гиббса системы 2%-й раствор уксусной кислоты / ПГ-10-ПР / парафиновое масло при 20°C.

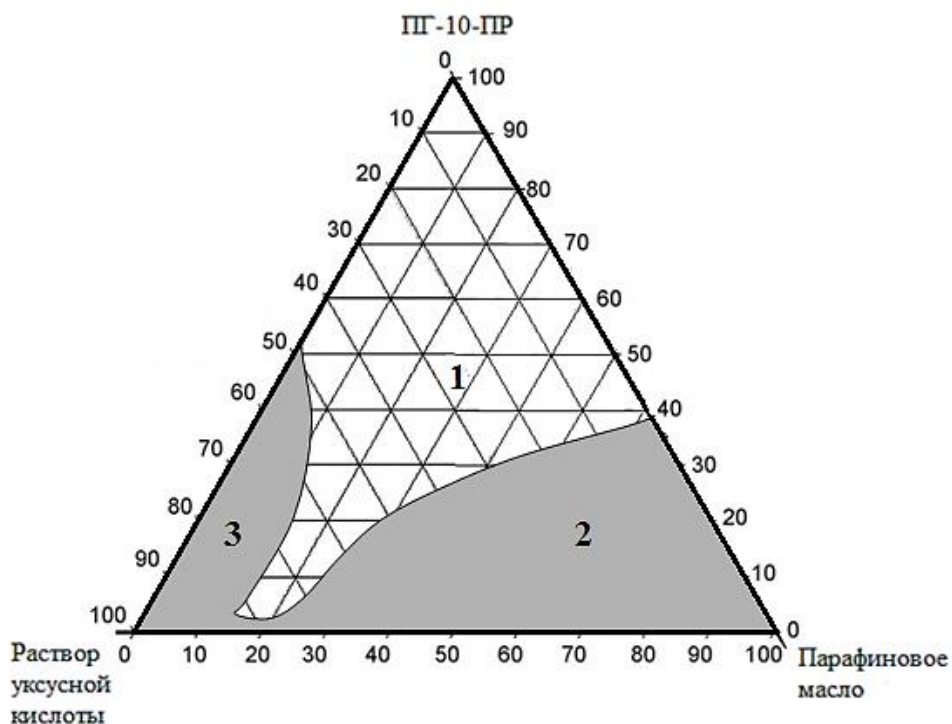


Рисунок 3.22. Треугольник Гиббса системы 2%-й раствор уксусной кислоты / ПГ-10-ПР / парафиновое масло при 60°C.

**1** – макроскопически однородная система; области расслоения эмульсий;  
**2** – расслоение с отделением избытка масла; **3** – расслоение с отделением избытка ВОДЫ.



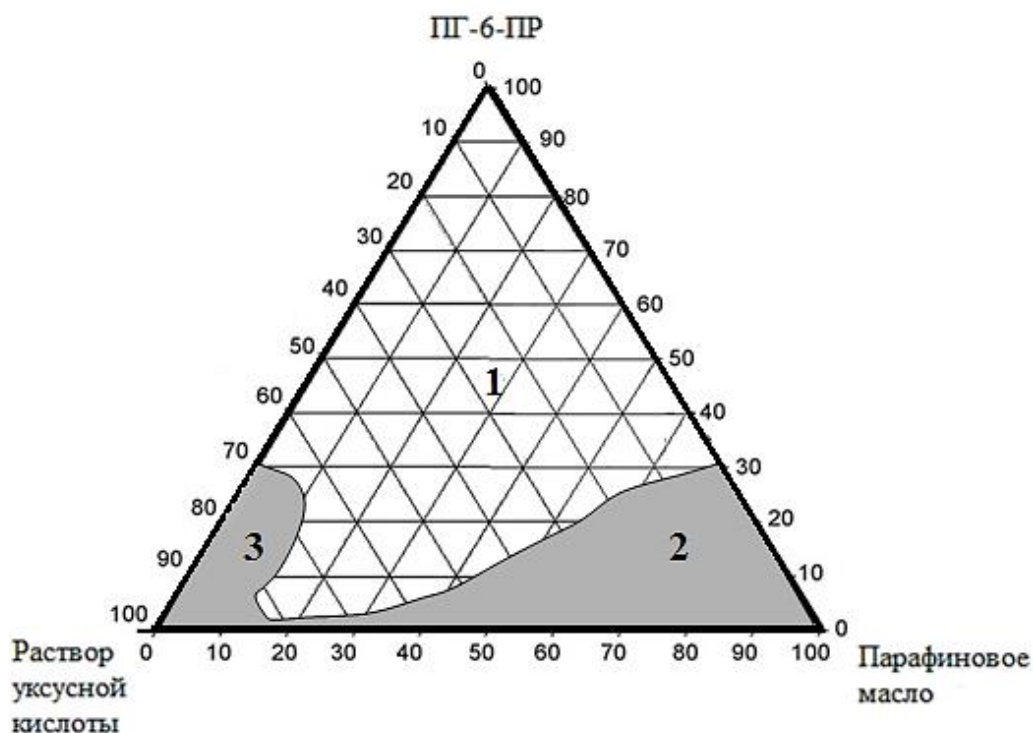


Рисунок 3.23. Треугольник Гиббса системы 2%-й раствор уксусной кислоты /ПГ-6-ПР/ парафиновое масло при 20°C.

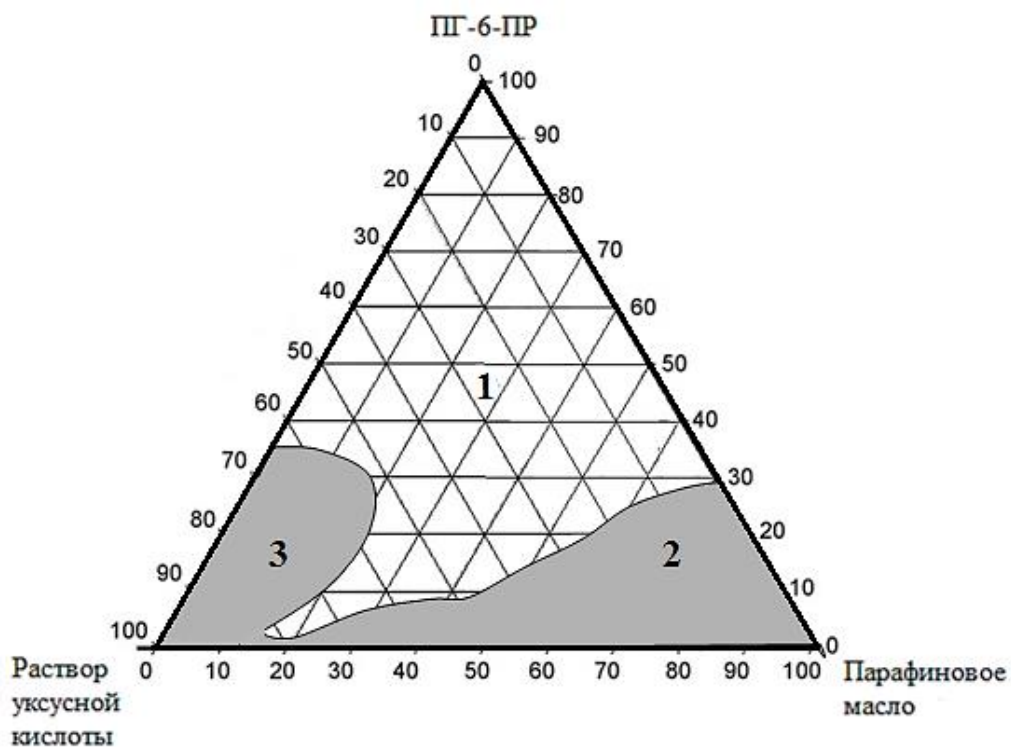


Рисунок 3.24. Треугольник Гиббса системы 2%-й раствор уксусной кислоты /ПГ-6-ПР/ парафиновое масло при 60°C.

**1** – макроскопически однородная система; области расслоения эмульсий;  
**2** – расслоение с отделением избытка масла; **3** – расслоение с отделением избытка воды.

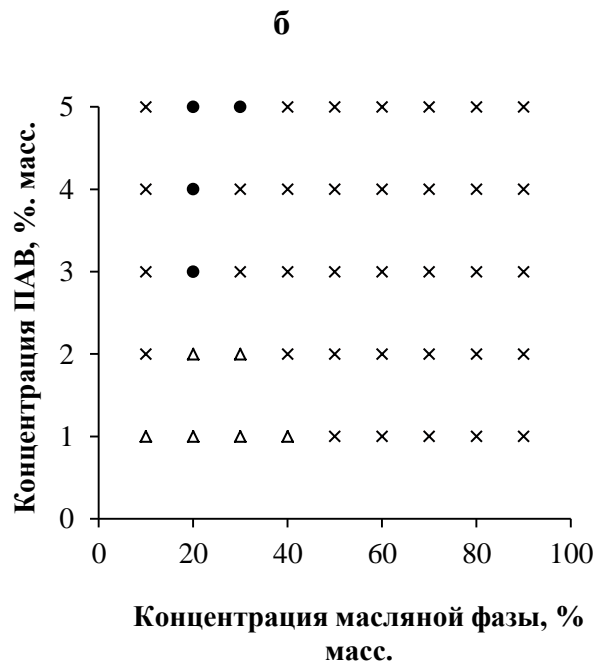
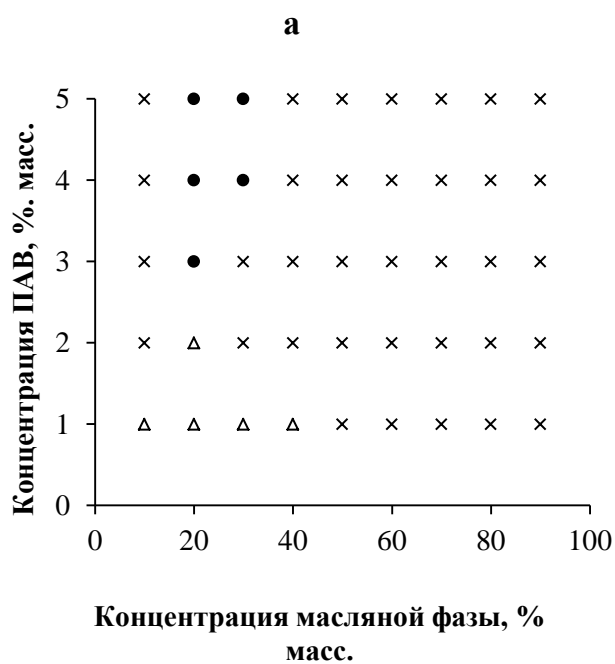
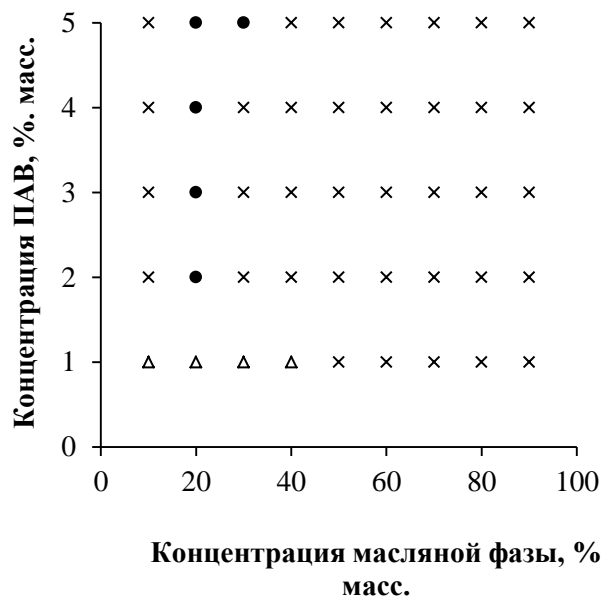
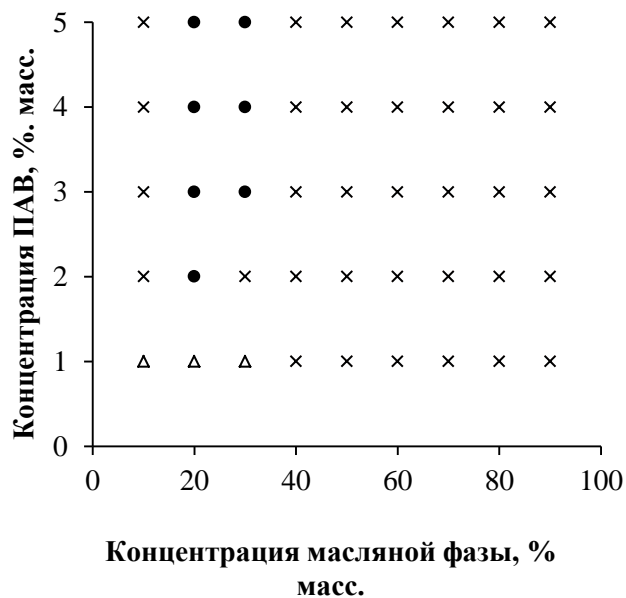
Поскольку на практике для получения эмульсий удобнее использовать низкие концентрации ПАВ, нами были более подробно рассмотрены системы, полученные при концентрациях ПГПР в диапазоне от 1% до 5% масс. Было показано, что при концентрациях ПГ-6-ПР меньше 2% масс. и ПГ-10-ПР – меньше 3% масс., на диаграмме появляется область, в которой разрушение эмульсии сопровождается отделением как водной, так и масляной фазы (рис. 3.25, рис.3.26 (Δ)). Это свидетельствует о протекающих в системе процессах коагуляции и коалесценции, в результате которых происходит потеря седиментационной устойчивости и частичное расслоение фаз (рис.3.20).



Рисунок 3.25. Трехкомпонентные системы 2%-й раствор уксусной к-ты/ПГ-6-ПР/парафиновое масло (1% масс. ПАВ, 20 °С).

Установлено, что при повышении температуры от 20 °С до 60 °С область расслоения (×, Δ) увеличивается в случае использования обоих ПАВ (рис.3.26). Область стабильной эмульсии (•) занимает на диаграмме большую площадь для систем, содержащих ПГ-6-ПР (рис. 3.26 а, в).

Влияние температуры и строения молекулы ПАВ на форму диаграмм состояния исследуемых трехкомпонентных систем можно было бы объяснить, проводя аналогию с винзоровскими системами [152].



• Однородная эмульсия    x Расслоение эмульсии с отделением избытка воды, либо масла    Δ Расслоение эмульсии с отделением избытка воды и масла

Рисунок 3.26. Влияние состава и температуры на расслоение эмульсий: (а) - ПГ-6-ПР при 20 °С; (б) - ПГ-6-ПР при 60 °С; (в) – ПГ-10-ПР при 20 °С; (г) – ПГ-10-ПР при 60°С; время выдержки – 1 сутки.

Классификацию Винзора используют для описания фазового поведения микроэмульсий. В трехкомпонентной (псевдотрехкомпонентной) системе вода/масло/ПАВ, при низких концентрациях последнего, наблюдается следующая последовательность установления равновесия между фазами:



где WI – система Винзора I, в которой микроэмульсия находится в равновесии с избытком масла;

WII – система Винзора II, в которой микроэмульсия находится в равновесии с избытком воды;

WIII – система Винзора III, в которой микроэмульсия находится в равновесии с избытком обеих фаз (рис. 3.27).

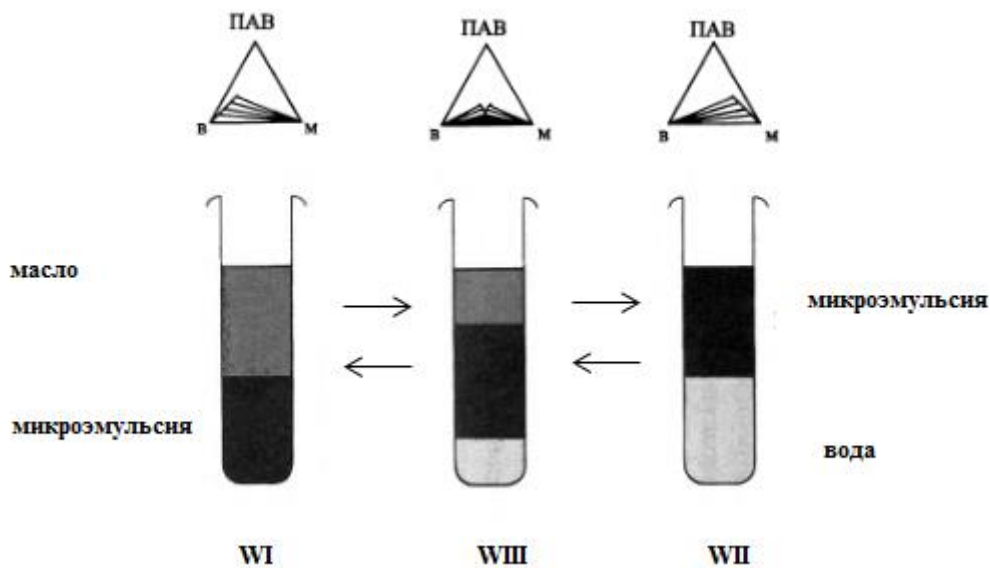


Рисунок 3.27. Фазовые переходы в трехкомпонентной системе вода – масло – ПАВ [152].

Фазовые переходы WI → WIII → WII могут быть вызваны различными факторами, помимо изменения состава системы: уменьшением длины углеводородной цепи масла, степенью ароматичности масла, введением в систему короткоцепочечных водорастворимых спиртов или высших

маслорастворимых спиртов в качестве со-ПАВ. Значимую роль в осуществлении таких переходов играет структура ПАВ: увеличение длины алкильной цепи ПАВ, уменьшение числа оксиэтиленовых групп в ПАВ. Для систем с неионогенным ПАВ фазовые переходы  $WI \rightarrow WIII \rightarrow WII$  происходят при увеличении температуры; при содержании в системе с неионогенным ПАВ электролита – с повышением концентрации электролита [180]. На представленных диаграммах (рис.3.21-3.24, 3.26) расслоение трехкомпонентной системы при уменьшении концентрации ПАВ происходит по аналогии с расслоением винзоровских систем: в области, находящейся в правом нижнем углу диаграммы, расслоение эмульсии сопровождается отделением избытка масла; в левом нижнем углу диаграммы – отделением избытка воды.

При повышении температуры от 20 °С до 60 °С на представленных диаграммах происходит увеличение размеров площади расслаивающейся системы, расположенной в области высоких концентраций воды. По всей вероятности, это может быть связано с дегидратацией полярных групп неионогенных поверхностно-активных веществ, что способствует повышению растворимости ПАВ в масле и приводит к отделению водной фазы [181].

При замене ПГ-6-ПР на ПГ-10-ПР при повышенной температуре также происходит увеличение площади расслаивающейся системы, расположенной на диаграмме в области с большим содержанием воды, как при высоких (рис. 3.22, 3.24), так и при низких концентрациях ПАВ (рис. 3.26 б, г; 2% ПАВ). Наблюдаемый эффект можно было бы объяснить тем, что ПГ-10-ПР, который имеет большее число остатков рицинолевой кислоты в гидрофобном фрагменте, обладает лучшей растворимостью в парафиновом масле.

Исходя из результатов исследования адсорбции ПАВ ряда полиглицерил полирицинолеатов на межфазной границе вода – масло и определения положения границ существования стабильной эмульсии, можно говорить о том, что ПГ-6-ПР является лучшим стабилизатором для системы «раствор уксусной к-ты – парафиновое масло». Вследствие этого для дальнейших исследований были выбраны системы, стабилизированные ПГ-6-ПР. Были изучены свойства

ряда эмульсий, полученных при массовых соотношениях вода:масло от 8:2 до 1:9. Для исследования была выбрана минимальная концентрация ПГ-6-ПР (2% масс.), при которой в системе возможно образование стабильной эмульсии и не происходит частичное расслоение фаз. Полученные системы выдерживали в течение 5 суток при комнатной температуре, при этом происходило отделение избытка дисперсионной среды (рис. 3.28). Через определенные интервалы времени определяли отношение высоты столба эмульсии к общей высоте столба жидкости, строили кривые зависимости изменения объема эмульсий, сформировавшихся в системе, от времени хранения. На основе полученных результатов рассчитывали концентрацию дисперсной фазы в равновесных эмульсиях. После полного расслоения избыток масляной фазы декантировали и проводили дисперсионный анализ полученных образцов эмульсий.



Рисунок 3.28. Трехкомпонентные системы раствор уксусной к-ты/ПГ-6-ПР/парафиновое масло (2% масс. ПАВ, 60°C). Соотношение водной и масляной фаз: (1) 9:1, (2) 8:2, (3) 7:3, (4) 6:4, (5) 1:1, (6) 4:6, (7) 3:8, (8) 2:8, (9) 1:9.

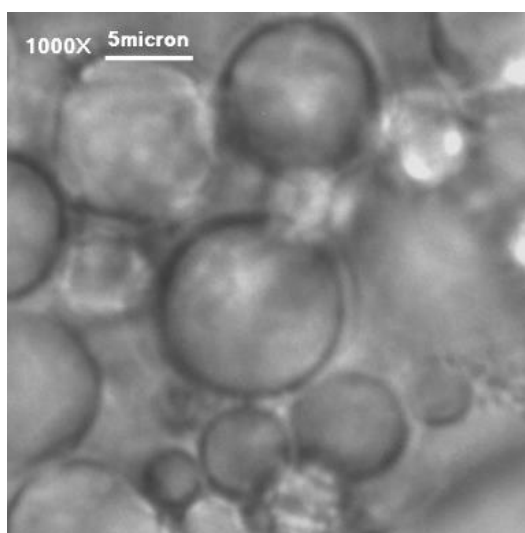
Изучение распределения микрокапель эмульсий по размерам проводили с помощью дисперсионного анализа методом оптической микроскопии. Микрофотографии образцов эмульсий приведены на рис. 3.29 (а-д). Были рассчитаны среднечисленный, среднемассовый, среднеповерхностный радиусы капель и коэффициенты полидисперсности; значения приведены в таблице 3.4 и на рис. 3.30. Гистограммы распределения капель эмульсий по размерам приведены в Приложении (табл. 1).

**Таблица 3.4.** Влияние концентрации водной фазы исходной системе на размеры капель в равновесных эмульсиях.

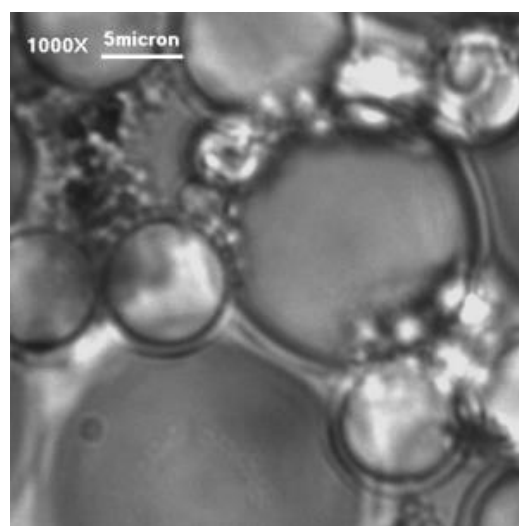
Содержание водной фазы*, % масс.	$\Gamma_n$ , мкм	$\Gamma_s$ , мкм	$\Gamma_m$ , мкм	k
80	3,0	4,6	4,9	0,6
70	3,5	5,3	5,8	0,6
50	3,6	5,3	5,7	0,6
20	3,8	5,6	6,8	0,6
10	4,3	6,7	8,6	0,5

\*в исходной системе

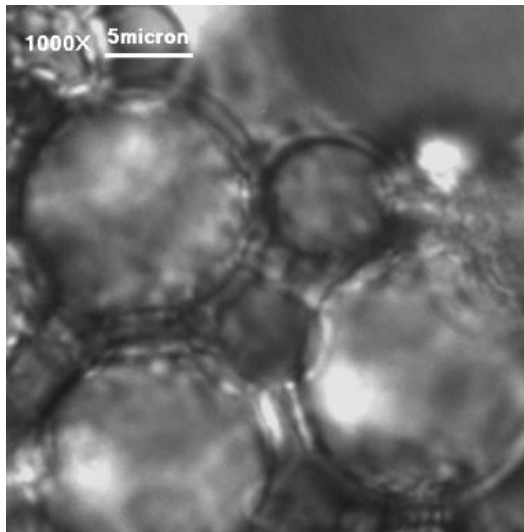
Было показано, что с увеличением содержания водной фазы в системе от 10% масс. до 80% масс., среднемассовый радиус капель эмульсий падает от 8,6 мкм до 4,9 мкм (рис.3.30).



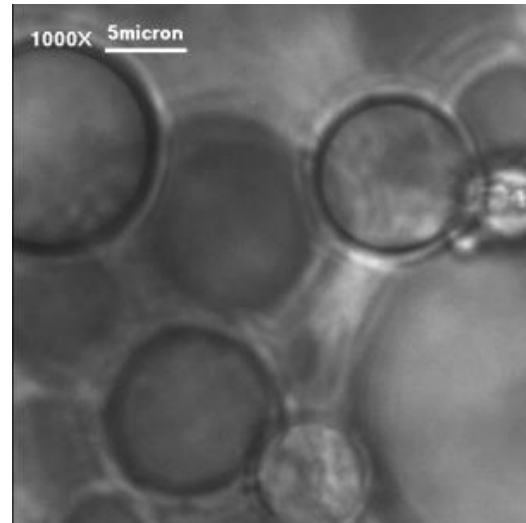
**а**



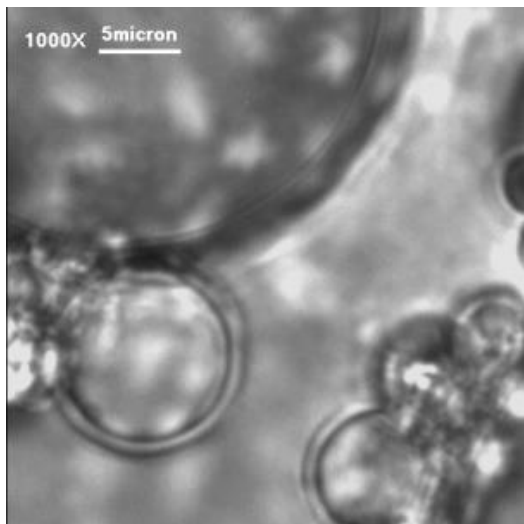
**б**



В



Г



Д

Рисунок 3.29. Микрофотографии образцов эмульсий, полученных при содержании водной фазы в исходной системе: а – 80% масс., б – 70% масс., в – 50% масс., г – 20% масс., д – 10% масс. (увеличение 1000х).

Как было установлено, концентрация внутренней фазы уже при соотношении вода - масло 3:7 составляет 69% (рис.3.31). Этот факт свидетельствует о том, что при введении в систему воды от 30% масс. и выше, полученные эмульсии являются концентрированными. В тот момент, когда в процессе диспергирования эмульсии коалесценция начинает преобладать над разрушением частиц дисперсной фазы, слияние капель эмульсии приводит к росту их размеров [156]. Таким образом, в результате коалесценции размер капель увеличивается в процессе приготовления и при хранении эмульсий. С ростом соотношения вода – масло увеличивается доля внутренней фазы в обратной эмульсии, при этом возрастает взаимодействие частиц, вызванное «вынужденным» их сближением [128]. Происходит взаимная фиксация капель



эмульсии на расстоянии, соответствующем положению второго энергетического минимума, которая приводит к формированию пространственной структуры в эмульсии [182]. При этом между частицами остается прослойка прочных поверхностных слоев, которая препятствует коалесценции капель и росту их размеров.

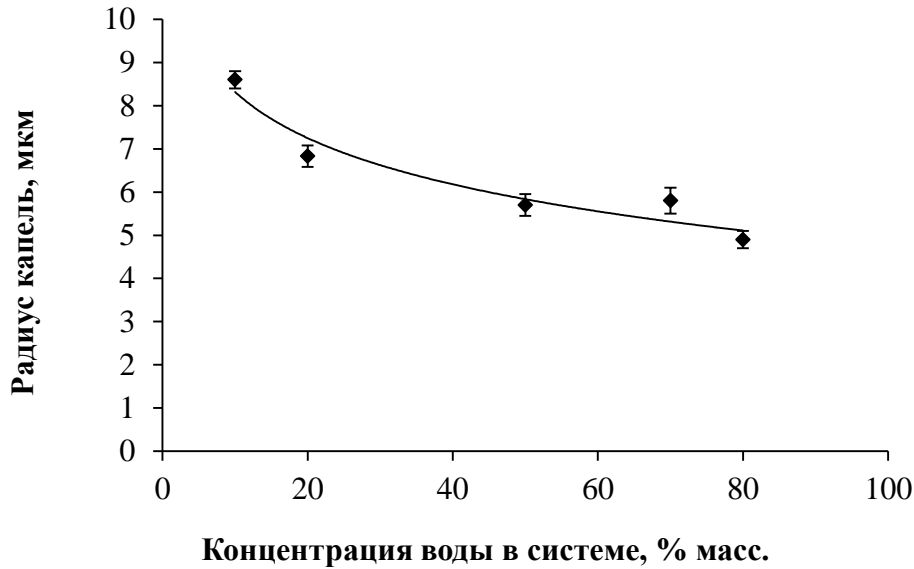


Рисунок 3.30. Влияние концентрации воды в системе на среднемассовый радиус капель эмульсии.

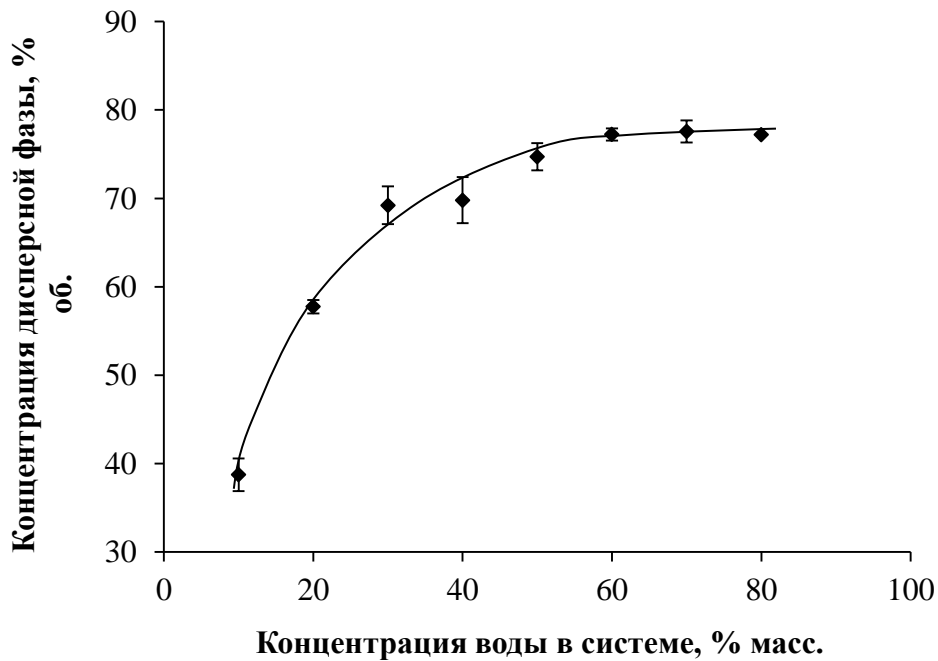


Рисунок 3.31. Влияние содержания воды в исходной системе на концентрацию дисперсной фазы в равновесной эмульсии.

Показано, что увеличение содержания водной фазы способствует уменьшению скорости расслоения эмульсий (рис.3.32), причиной которого является повышение концентрации дисперсной фазы в равновесной эмульсии и образование прочной коагуляционной структуры.

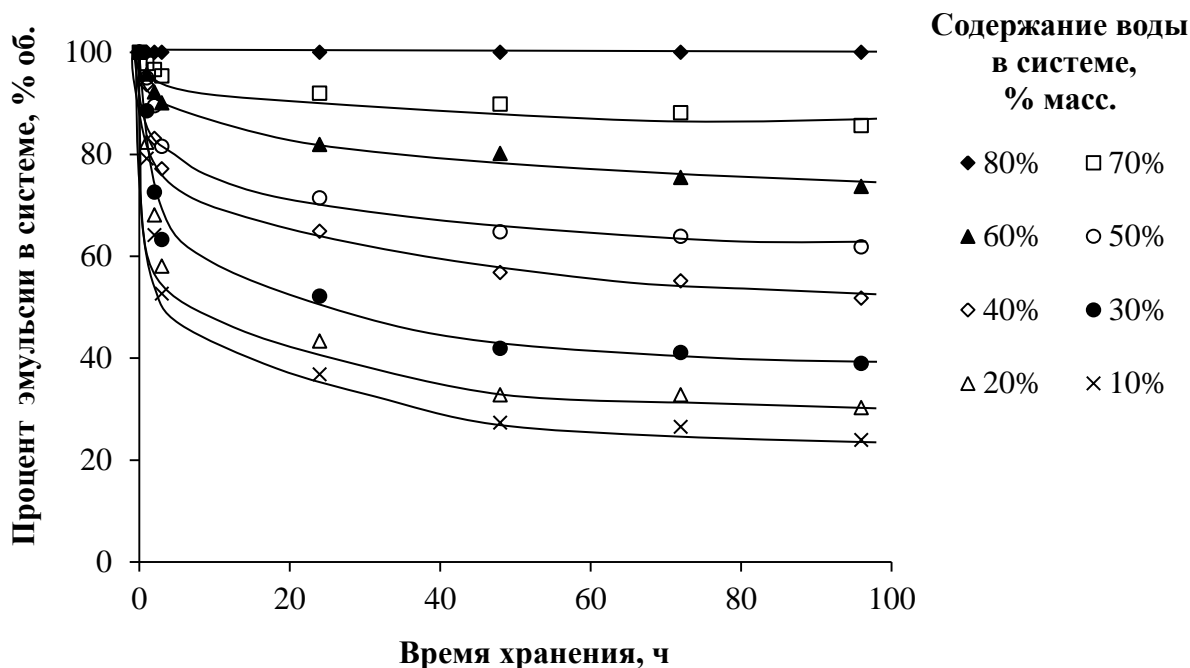


Рисунок 3.32. Влияние содержания воды в исходной системе на кинетику изменения объема эмульсий, сформировавшихся в системе при хранении.

Для дальнейших исследований было выбрано соотношение вода/масло 2:8, поскольку в этом случае не возникает стесненных условий и частицы хитозанового геля могут быть легко выделены из системы, а капли дисперсной фазы данной эмульсии имеют сравнительно небольшие размеры.

### 3.4.3. Влияние концентрации ПАВ на свойства обратных эмульсий

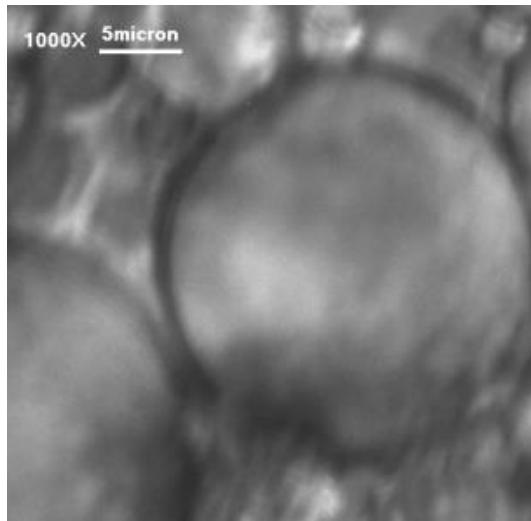
Были приготовлены эмульсии 2%-й раствор уксусной кислоты/ПАВ/парафиновое масло с соотношением водной и масляной фаз 2:8 и содержанием ПАВ от 1% масс. до 4% масс. Полученные системы выдерживали при 20 °С в течение 5 суток, декантировали избыток масляной фазы и методом оптической микроскопии определяли распределение микрокапель эмульсий по

размерам. Микрофотографии образцов эмульсий приведены на рис. 3.33 (а-г). Рассчитанные значения среднечисленного ( $r_n$ ), среднеповерхностного ( $r_s$ ) и среднемассового ( $r_m$ ) радиусов капель и коэффициентов полидисперсности ( $k$ ) приведены в табл. 3.5. Гистограммы распределения капель эмульсий по размерам приведены в Приложении (табл. 2).

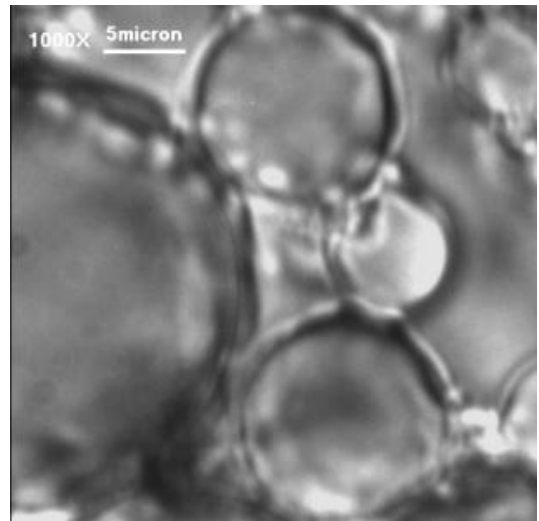
**Таблица 3.5.** Влияние концентрации ПАВ исходной системе на размеры капель в равновесных эмульсиях.

Содержание ПГПР		$r_n$ , МКМ	$r_s$ , МКМ	$r_m$ , МКМ	$k$
% масс.	моль/м <sup>3</sup>				
1,0	1,7	3,7	9,6	14,1	0,3
1,5	2,6	3,6	7,2	9,1	0,4
2,0	3,5	3,8	5,6	6,8	0,6
3,0	5,2	3,3	5,7	6,7	0,5
4,0	6,9	3,4	4,9	5,7	0,6

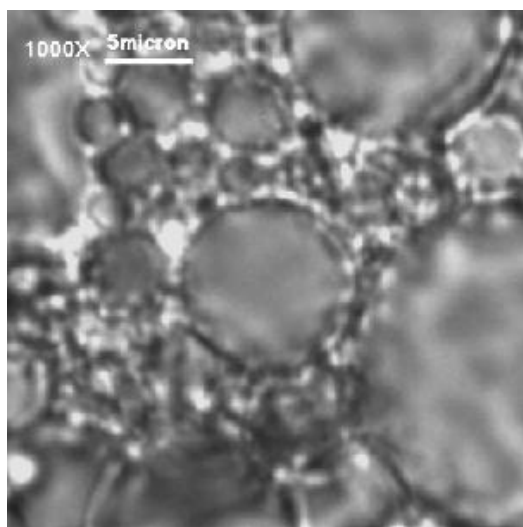
В готовых эмульсиях происходит коагуляция капель дисперсной фазы, приводящая к их коалесценции и последующему разделению фаз. При наличии на межфазной поверхности прочных адсорбционных слоев, взаимодействие частиц во втором энергетическом минимуме приводит к образованию коагуляционной структурной сетки, препятствующей осаждению частиц. В случае высокодисперсных частиц с развитыми поверхностными слоями (адсорбционными, сольватными) эмульсия может быть агрегативно устойчивой. Было показано, что с увеличением концентрации полиглицерил-6-полирицинолеата в эмульсии среднемассовый радиус капель уменьшается более чем в два раза – от 14 до 6 мкм (рис.3.34). Установлено, что все эмульсии являются высоко полидисперсными, однако, при повышении концентрации ПАВ, наблюдается тенденция к уменьшению полидисперсности (табл.3.5).



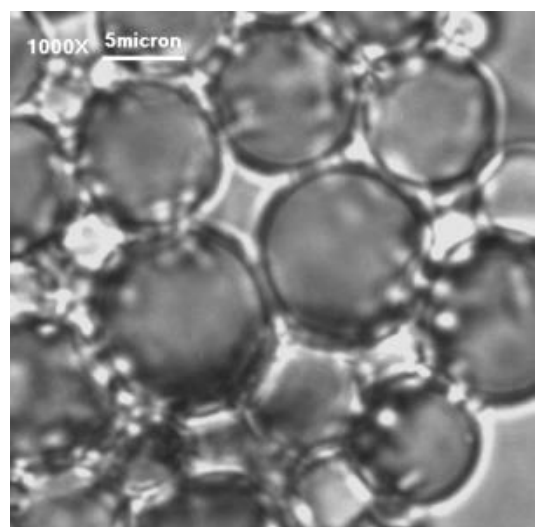
а



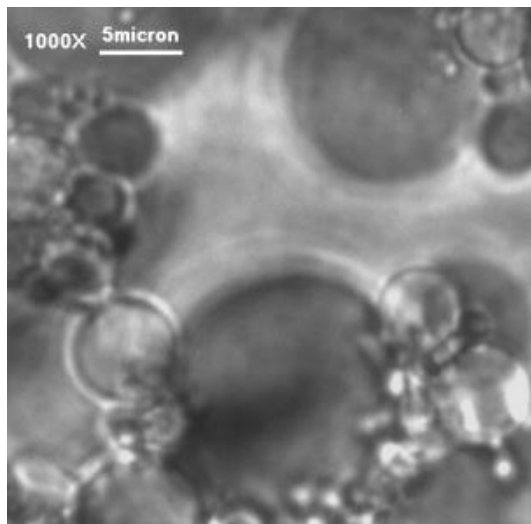
б



в



г



д

Рисунок 3.33. Микрофотографии образцов эмульсий, полученных при содержании ПГ-6-ПР в исходной системе: (а) – 1% масс., (б) – 1.5% масс., (в) – 2% масс., (г) – 3% масс., (д) – 4% масс. (увеличение 1000х).

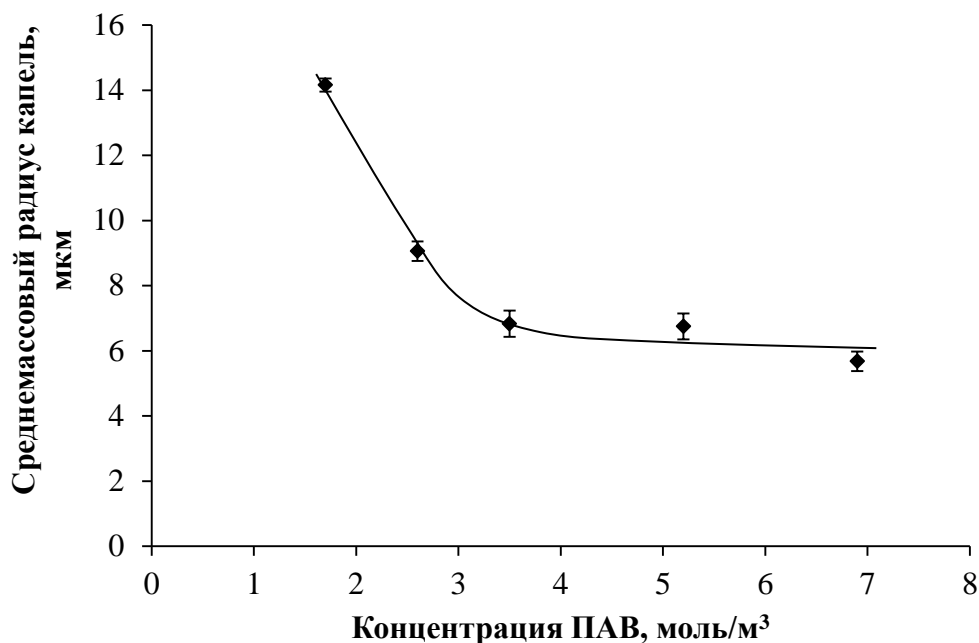


Рисунок 3.34. Зависимость среднемасового радиуса капель эмульсии от концентрации ПГ-6-ПР в исходной системе.

Так как почти все используемые в работе концентрации ПГПР выше ККМ, можно говорить о том, что с ростом содержания ПАВ межфазное натяжение на границе раздела фаз остается постоянным и не оказывает влияния на уменьшение размеров капель эмульсии. Поэтому, наблюдаемый эффект, по всей вероятности, связан с формированием прочных адсорбционных слоев на поверхности капель дисперсной фазы, а также с повышением вязкости дисперсионной среды.

Адсорбционные слои ПАВ могут создавать структурно-механический барьер, обеспечивающий метастабильное равновесие дисперсной системы и ее агрегативную устойчивость [124]. На границе раздела фаз полярные группы ПГПР находятся внутри дисперсной фазы, а неполярные хвосты (остатки рицинолевой кислоты) могут формировать на поверхности капель двухмерную пленку, обладающую повышенными структурно-механическими свойствами, препятствующую процессам коагуляции и коалесценции.

Установление непосредственного контакта между каплями эмульсии – это необходимое условие агрегации дисперсных частиц [124]. При введении

избытка ПГПР в эмульсию происходит повышение динамической вязкости масляной фазы (рис.3.35), которое связано с образованием мицеллярных систем в растворе ПАВ. Это затрудняет вытеснение дисперсионной среды из зазора между частицами и снижает вероятность коалесценции.

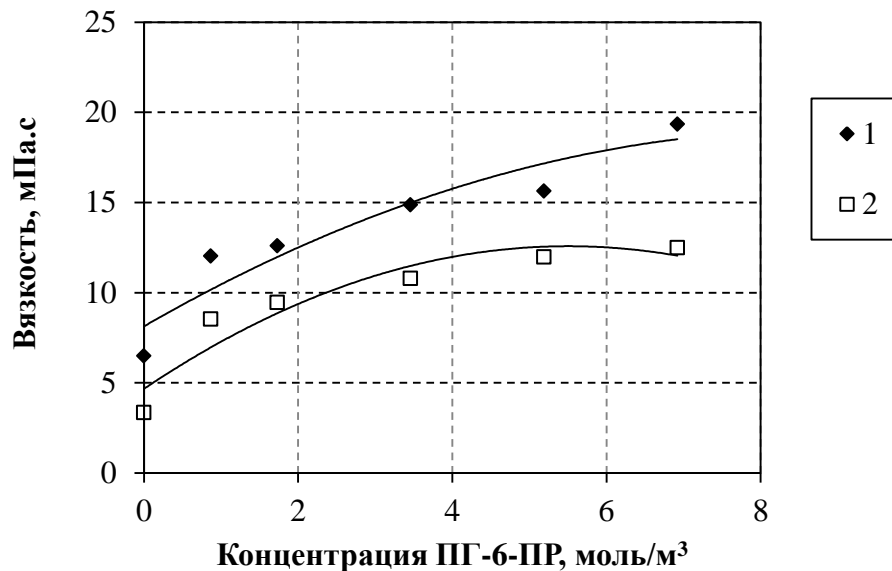


Рисунок 3.35. Вязкость растворов ПГ-6-ПР в парафиновом масле при 20 °C (1) и 60 °C (2).

Кривая зависимости концентрации дисперсионной фазы от содержания ПАВ в равновесных эмульсиях приведена на рис. 3.36. Было показано, что концентрация дисперсионной фазы в равновесной эмульсии уменьшается от 69,3% об. до 53,4% об. с ростом содержания ПГПР в исходной системе от 1,7 до 6,9% масс.

При концентрациях ПГ-6-ПР  $\geq 3,5$  моль/м³ ( $\geq 2\%$  масс.), кривые зависимости размеров капель эмульсии от содержания ПАВ в системе выходят на плато (рис.3.34). При тех же концентрациях ПГ-6-ПР существует плато на кривой зависимости концентрации дисперсионной фазы от содержания ПАВ (рис.3.36). Наблюдаемая корреляция свидетельствует о том, что размер частиц оказывает непосредственное влияние на равновесную концентрацию дисперсионной фазы в эмульсии. Таким образом, с ростом содержания ПАВ в системе происходит понижение среднего значения радиуса капель, а также уменьшение концентрации дисперсионной фазы в эмульсии, что приводит к

возрастанию числа частиц в единице объема, и в результате образующаяся структурная сетка флокулированных капель дисперсной фазы занимает больший объем.

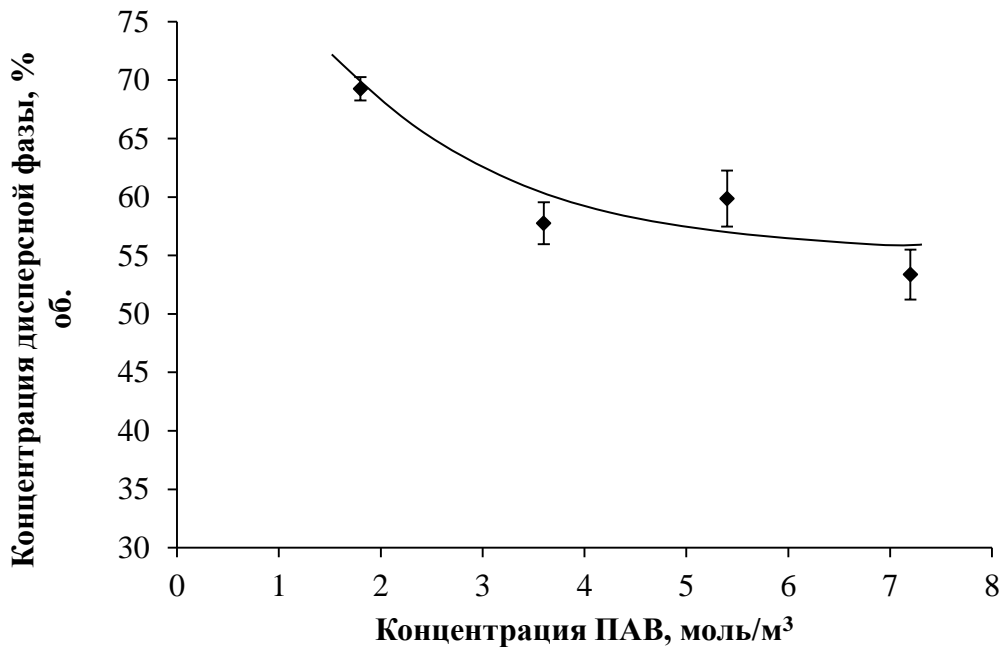


Рисунок 3.36. Влияние содержания ПАВ в исходной системе на концентрацию дисперсной фазы в равновесной эмульсии.

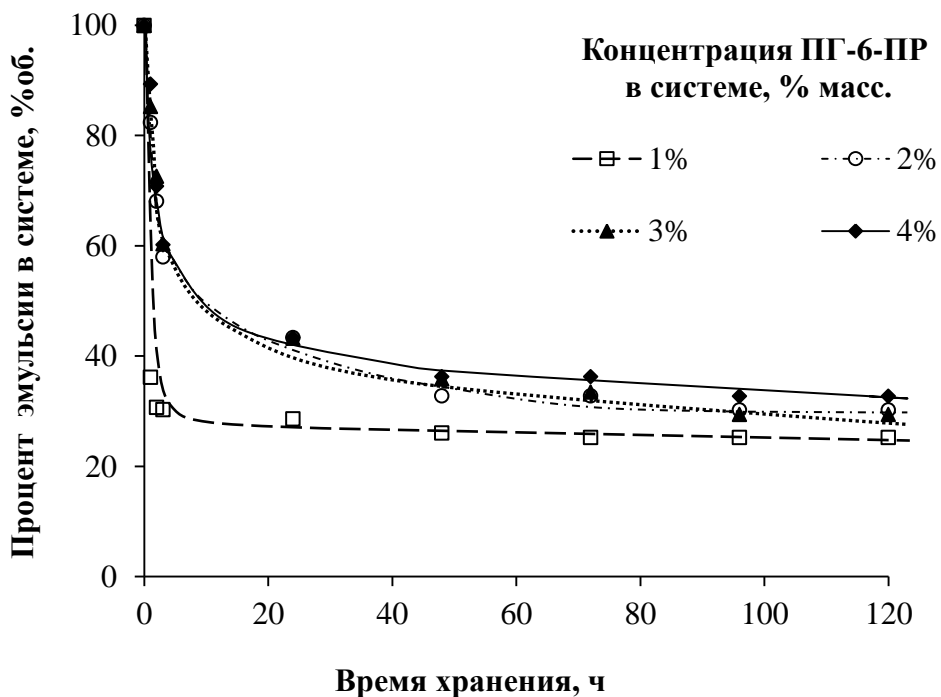


Рисунок 3.37. Влияние содержания ПАВ в исходной системе на кинетику изменения объема эмульсий, сформировавшихся в системе при хранении.

Уменьшение скорости расслоения эмульсии (рис.3.37) с увеличением концентрации ПАВ свидетельствует о формировании более прочной коагуляционной структуры в эмульсии. Можно предположить, что при введении ПГПР в эмульсию в избытке, при концентрациях в масле выше ККМ, данное поверхностно-активное вещество играет роль структурообразователя, увеличивает вязкость дисперсионной среды, что способствует повышению седиментационной устойчивости.

Для того чтобы подтвердить данное предположение, были исследованы эмульсии, содержащие ПГ-6-ПР с концентрацией выше ККМ (от 2 до 5% масс.) и постоянным соотношением водной и масляной фаз в исходной системе, равным 8:2. Было показано, что при выдержке данных эмульсий в течение пяти суток при 20°C расслоения не происходит.

Дополнительно изучали устойчивость полученных эмульсий при центрифугировании (5 мин, 6000 об/мин) и при выдержке в термостате в течение 24 часов при 60°C. Было показано, что в результате обоих тестов исследуемые системы остаются стабильными. Концентрация дисперсной фазы в равновесных эмульсиях составляла 77,2%.

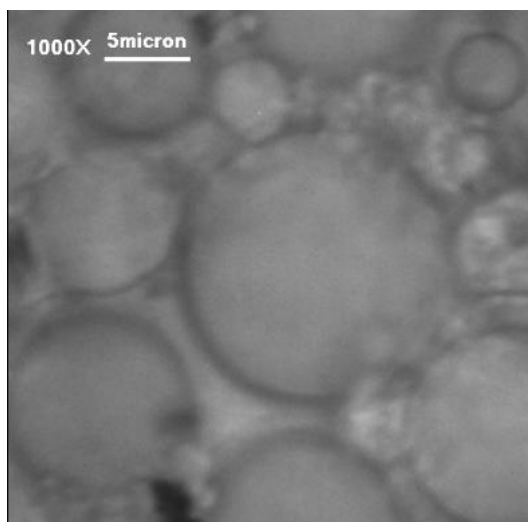
Изучение распределения микрокапель эмульсий по размерам проводили с помощью дисперсионного анализа методом оптической микроскопии. Микрофотографии образцов эмульсий приведены на рис. 3.38 (а-е). Были рассчитаны среднечисленный, среднемассовый, среднеповерхностный радиусы капель и коэффициенты полидисперсности; значения приведены в таблице 3.6. Гистограммы распределения капель эмульсий по размерам приведены в Приложении (таблица 3).

Из таблицы 3.6 видно, что происходит уменьшение размеров капель эмульсии с ростом концентрации ПАВ в системе. Как можно предположить, это связано с формированием коагуляционной пространственной структуры и повышением вязкости дисперсионной среды, которые способствуют снижению интенсивности процесса коалесценции.

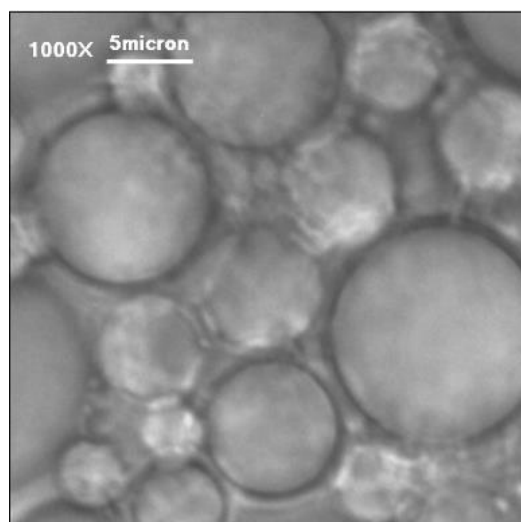


**Таблица 3.6.** Влияние концентрации ПАВ исходной системе на размеры капель в равновесных эмульсиях.

Содержание ПГ-6-ПР		$\Gamma_n$ , МКМ	$\Gamma_s$ , МКМ	$\Gamma_m$ , МКМ	k
% масс.	МОЛЬ/М <sup>3</sup>				
2,0	4,0	3,0	4,6	4,9	0,6
3,0	5,9	3,1	4,7	5,3	0,6
3,5	6,9	2,7	4,3	5,0	0,6
4,0	7,9	2,7	3,6	4,1	0,7
4,5	8,9	2,4	3,4	3,7	0,7
5,0	9,9	2,2	3,2	3,5	0,6



а



б

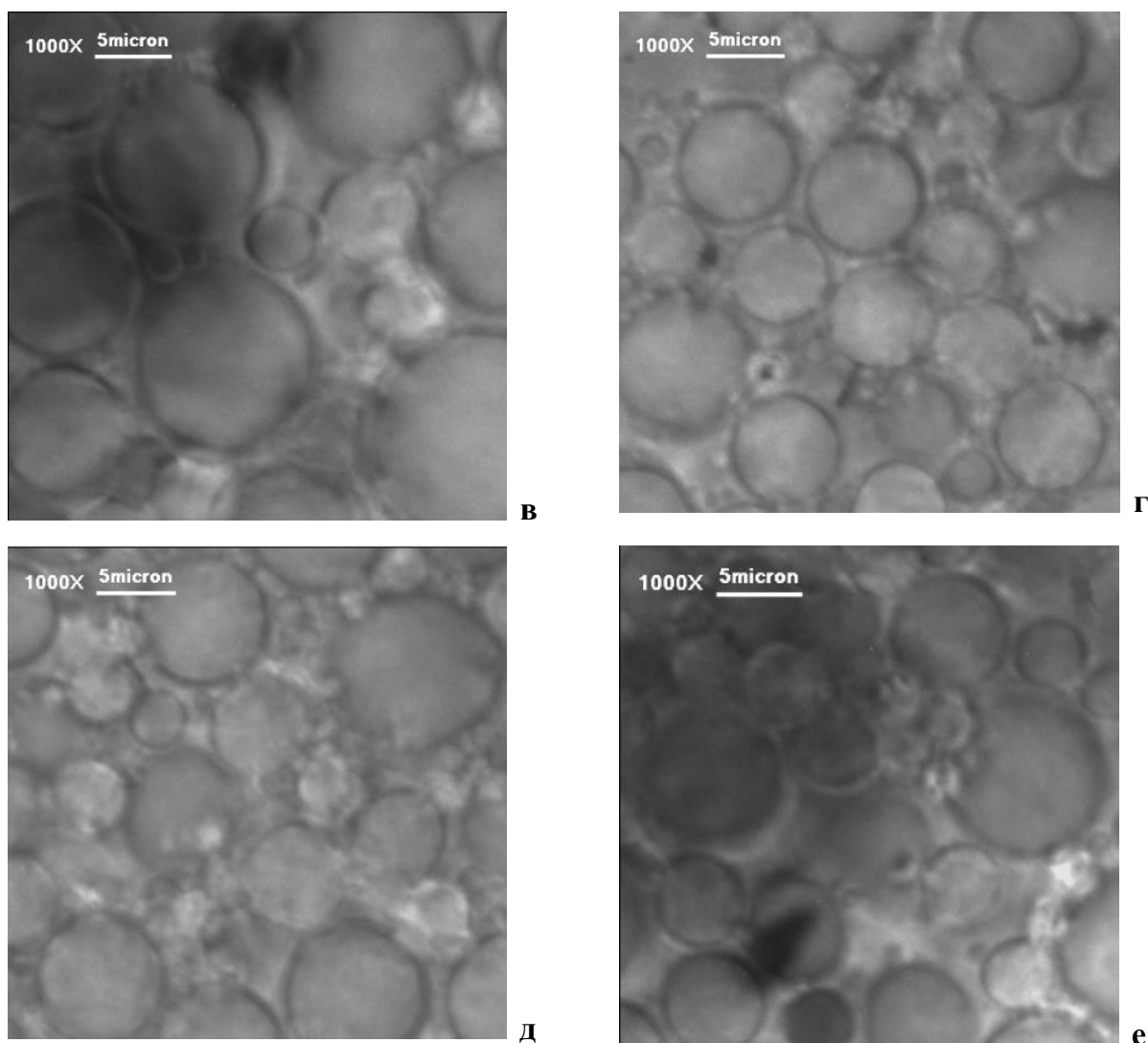


Рисунок 3.38. Микрофотографии образцов эмульсий, полученных при различных концентрациях ПГ-6-ПР исходной системе: а – 2% масс., б – 3% масс., в – 3,5% масс., г – 4% масс., д – 4,5% масс., е – 5% масс. (увеличение 1000х).

На основе данных реологических исследований полученных эмульсий были построены кривые зависимости эффективной вязкости исследуемых образцов от скорости сдвига, которые представлены на рис. 3.39. Было показано, что происходит значительное повышение вязкости эмульсий от 2,6 до 11,2 Па·с при увеличении содержания ПАВ в исходной системе от 2% масс. до 5% масс. Высокая вязкость концентрированных дисперсных систем обусловлена наличием в них пространственной структурной сетки из агрегированных частиц.

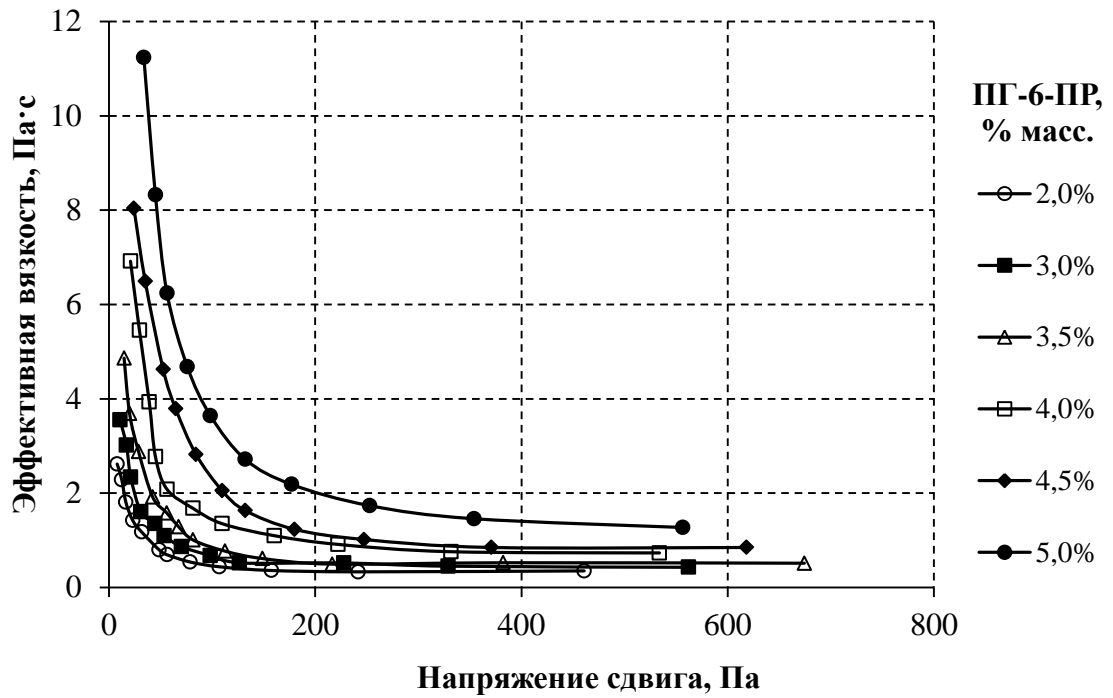


Рисунок 3.39. Влияние содержания ПГ-6-ПР (% масс.) на эффективную вязкость эмульсий.

Известно также, что рост вязкости эмульсий при введении в систему низкомолекулярных коллоидных ПАВ с концентрацией выше ККМ связан с образованием мицелл и мицеллярных агрегатов в дисперсионной среде, что вызывает потерю подвижности (иммобилизацию) непрерывной фазы [139, 183].

С использованием кривых течения эмульсий с различным содержанием ПГ-6-ПР (рис.3.40) были определены значения предела текучести  $P_T$  и критического напряжения сдвига  $P_K$ . Полученные данные представлены в таблице 3.7.

На основе зависимости предела текучести от концентрации ПАВ было найдено значение первой критической концентрации структурообразования ККС-1, которое составило  $1,0 \pm 0,1$  %масс. (рис.3.41).

Увеличение предела текучести с ростом концентрации ПАВ можно объяснить тем, что при используемых концентрациях ПГПР в исследуемой эмульсии образуется структура, возрастание прочности которой с повышением

содержания в системе ПГ-ПР, создает сопротивление потоку и при приложении бесконечно малого напряжения течение такой системы не происходит.

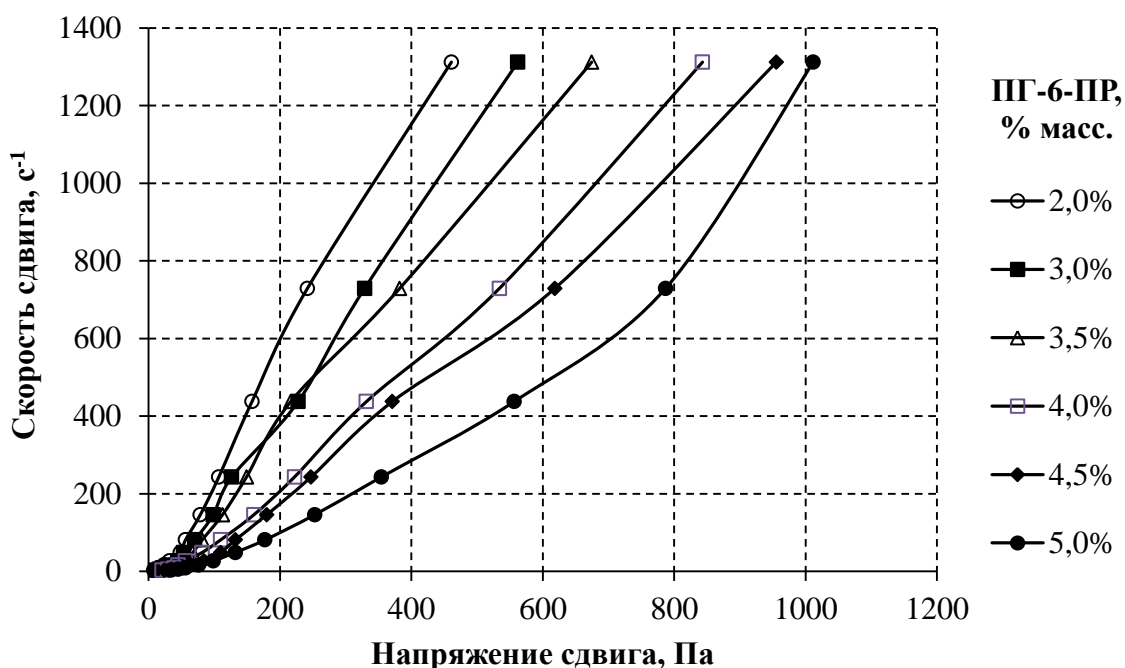


Рисунок 3.40. Кривые течения эмульсий с различным содержанием ПГ-6-ПР (% масс.).

**Таблица 3.7.** Критическое напряжение сдвига и предел текучести эмульсий с постоянной концентрацией дисперсной фазы и различными концентрациями ПГ-6-ПР.

Содержание ПГ-6-ПР, % масс.	Критическое напряжение сдвига $P_k$ , Н/м <sup>2</sup>	Предел текучести $P_T$ , Н/м <sup>2</sup>
2,0	12	30
3,0	15	45
3,5	29	60,5
4,0	39	79
4,5	45	91
5,0	53	105

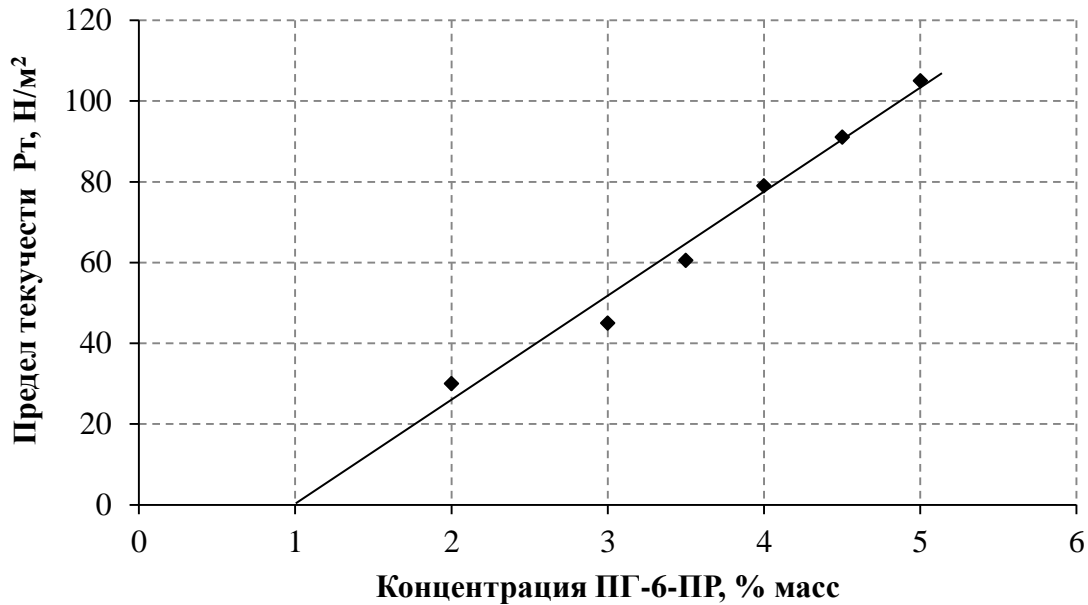


Рисунок 3.41. Зависимость предела текучести от концентрации ПАВ.

Для исследуемых эмульсий был произведен расчет прочности единичных контактов в соответствии с моделью системы агрегатов, предложенной Потаниным А.А. и Урьевым Н.Б [184], по уравнению:

$$\bar{F}_1 = \frac{\dot{\gamma}_m \cdot \eta_{мин} \cdot d^2}{6,4} \quad (3.5)$$

где  $\dot{\gamma}$  – скорость сдвига, соответствующая полному разрушению структуры,  $c^{-1}$ ;  $d$  – средний размер частиц, м;  $\eta_{мин}$  – эффективная вязкость, соответствующая полностью разрушенной структуре.

Переходный участок реологических кривых в соответствии с моделью Потанина А.А. и Урьева Н.Б. описывается степенной функцией типа уравнения Оствальда-Де Виля:

$$P = k \cdot \dot{\gamma}^n, \quad (3.6)$$

где  $P$  – напряжение сдвига, Па;  $k$  – коэффициент консистенции материала;  $\dot{\gamma}$  – скорость сдвига,  $c^{-1}$ ;  $n$  – индекс течения.

Из рисунка 3.42 видно, что полученные зависимости  $lg\eta = f(lg\dot{\gamma})$  для исследуемых эмульсий с различным содержанием ПАВ хорошо описываются уравнением Оствальда-Де Виля.

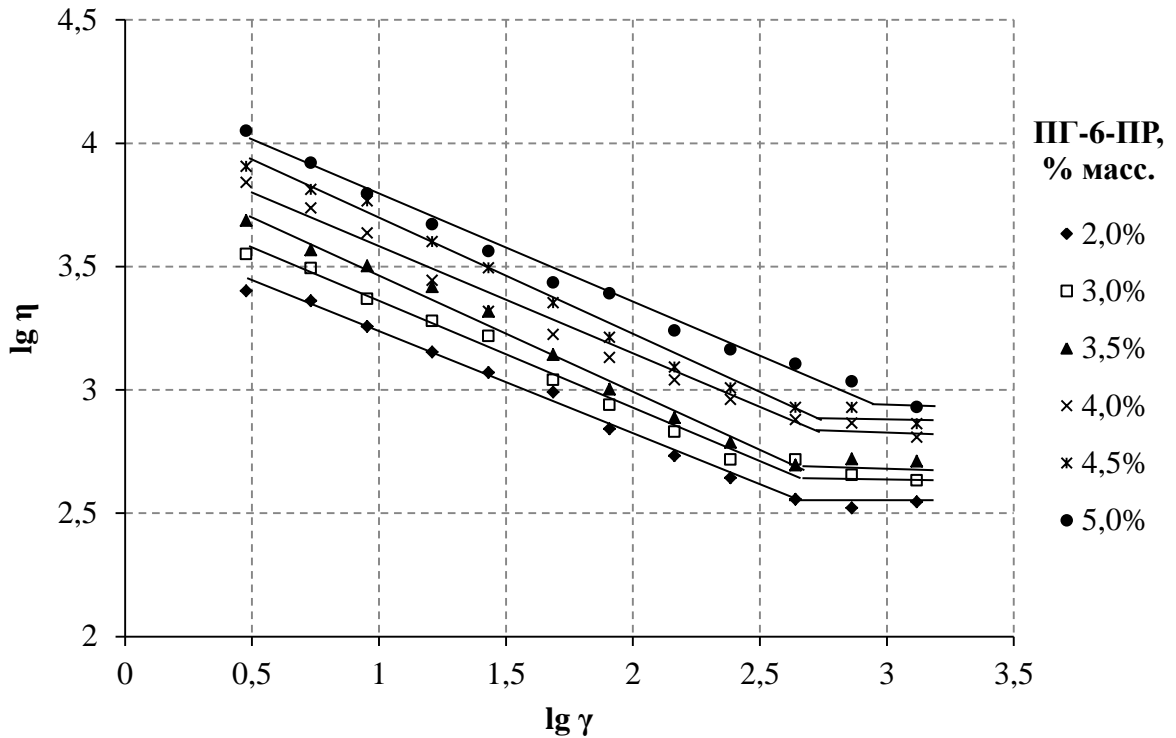


Рисунок 3.42. Кривые эффективной вязкости в координатах  $lg\eta = f(lg\dot{\gamma})$ .

Значение константы  $n$ , зависящей от степени агрегации частиц, было определено по тангенсу угла наклона прямых и во всех случаях не превышало 0,5 (табл.3.8). Это свидетельствует о том, что исследуемые системы являются слабоструктурированными. Следовательно, расчет прочности межчастичных контактов может быть произведен в соответствии с моделью Потанина А.А. и Урьева Н.Б. для слабоструктурированных систем.

Величину  $\dot{\gamma}_m$  определяли по зависимостям  $lg\eta = f(lg\dot{\gamma})$  (рис.3.42). Значения рассчитанных прочностей единичных контактов приведены в таблице 3.8. Из полученных данных видно, что по мере повышения концентрации ПАВ, наблюдается тенденция увеличения прочности контактов между каплями эмульсий.

**Таблица 3.8.** Расчет прочности единичных контактов в исследуемых эмульсиях методом Потанина А.А. и Урьева Н.Б.

Концентрация ПГ-6-ПР, % масс.	$\eta_{\text{мин}}$ , мПа·с	$\dot{\gamma}_M$ , с <sup>-1</sup>	$d \cdot 10^6$ , м	n	Прочность единичных контактов $\bar{F}_1 \cdot 10^9$ , Н
2,0	351,2	416,8	6,0	0,43	0,8
3,0	428,4	478,6	6,2	0,45	1,2
3,5	514,0	478,6	5,4	0,45	1,1
4,0	642,5	524,8	5,4	0,45	1,6
4,5	728,2	549,5	4,8	0,47	1,5
5,0	771,0	831,8	4,4	0,48	1,9

Рассчитанные значения прочности единичных контактов свидетельствуют о том, что контакты между частицами дисперсной фазы во всех эмульсиях – коагуляционные. Таким образом, можно говорить о том, что в исследуемых системах образуется коагуляционная пространственная структура, которая, наряду с повышением вязкости дисперсионной среды, обеспечивает их седиментационную устойчивость. При этом взаимная фиксация частиц дисперсной фазы, разделенных прослойками поверхностных слоев, способствует снижению интенсивности процесса коалесценции капель эмульсии. Это приводит к уменьшению их размеров.

По результатам исследования для последующей работы была выбрана концентрация ПГ-6-ПР в системе 3,5 моль/м<sup>3</sup> (2% масс.).

#### ***3.4.4. Влияние концентрации полимера на свойства обратных эмульсий***

С целью изучения влияния концентрации хитозана на свойства эмульсий раствор уксусной кислоты – парафиновое масло, в водную фазу вводили полимер. Концентрация хитозана в растворе уксусной кислоты варьировалась от 0 до 20 г/л (2% масс.), концентрация ПАВ в исходной системе составляла 2% масс., соотношение вода/масло – 2:8. Рассчитанные значения среднечисленного

( $r_n$ ), среднеповерхностного ( $r_s$ ) и среднемассового ( $r_m$ ) радиусов капель равновесных эмульсий и коэффициентов полидисперсности ( $k$ ) приведены в таблице 3.9. Гистограммы распределения капель эмульсий по размерам приведены в Приложении (табл.4). Микрофотографии образцов эмульсий приведены на рис. 3.43 (а-г).

**Таблица 3.9.** Влияние концентрации растворов хитозана на размеры капель в равновесных эмульсиях.

Концентрация полимера в водной фазе,		$r_n$ , мкм	$r_s$ , мкм	$r_m$ , мкм	k
% масс.	г/л				
0,00	0,00	3,8	5,6	6,8	0,6
0,10	1	0,7	1,7	2,0	0,5
0,25	2,5	1,1	2,0	2,2	0,6
0,50	5	0,7	1,2	1,3	0,6
1,00	10	0,7	1,2	1,3	0,6
1,50	15	0,6	1,1	1,3	0,6
2,00	20	0,7	1,2	1,4	0,6

При введении в водную фазу эмульсии 1 г/л (0,1% масс.) хитозана, среднемассовый радиус капель уменьшается от 6,8 мкм до 1,3 мкм. При дальнейшем увеличении концентрации полимера размеры капель не изменяются (рис.3.44). Одновременно снижается полидисперсность эмульсий.

Значительное уменьшение размеров микрокапель в присутствии хитозана свидетельствует о росте агрегативной устойчивости системы. В процессе диспергирования эмульсии, не содержащей хитозан, первоначально образуются капли небольшого размера, но с течением времени, в результате коалесценции, капли увеличиваются до того момента, пока в системе не наступает равновесие.

Введение хитозана, как было показано выше, не приводит к значительному уменьшению межфазного натяжения на границе раздела уксусная кислота/раствор ПГПР в парафиновом масле.



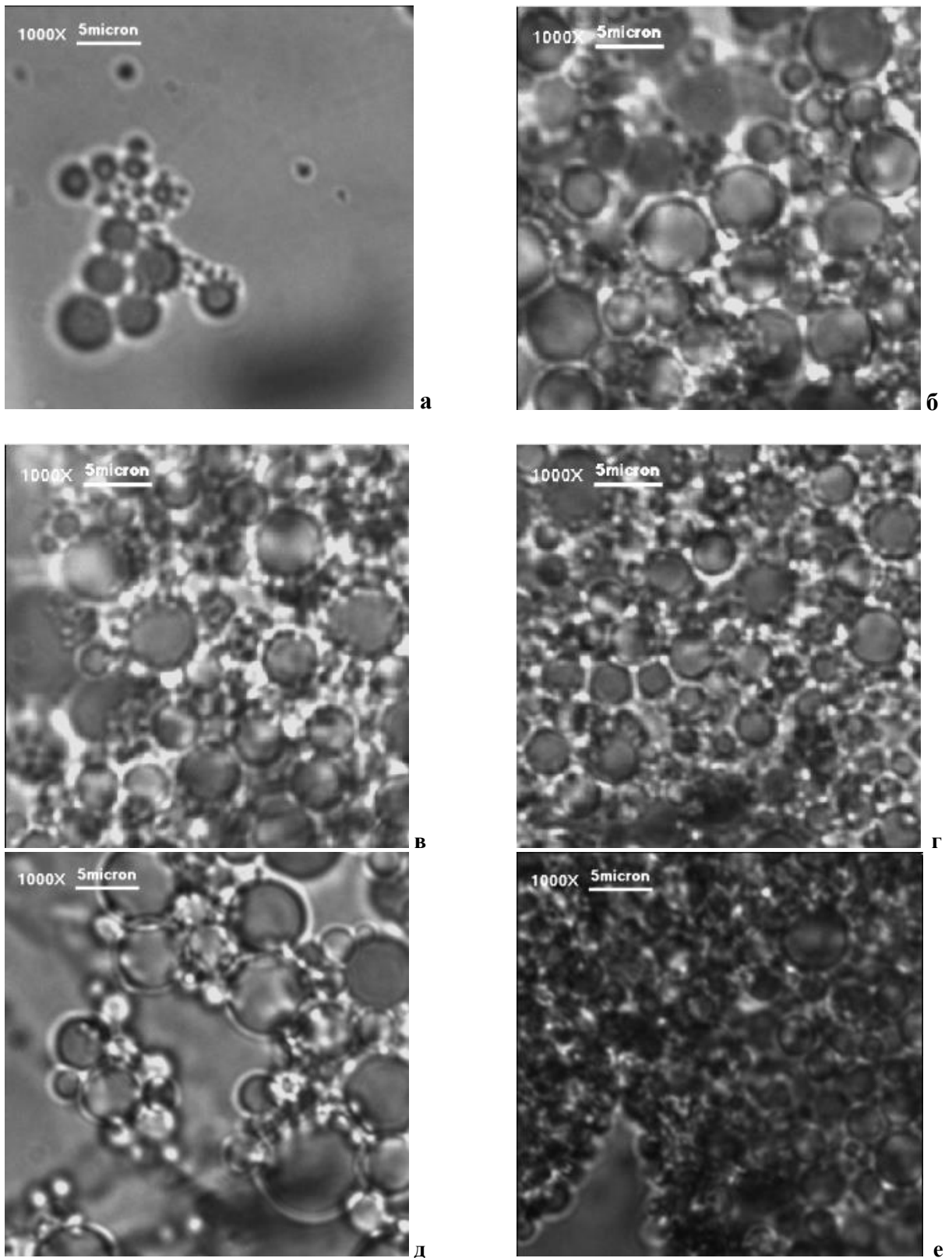


Рисунок 3.43. Микрофотографии образцов эмульсий, содержащих полимер, при концентрациях хитозана в растворе уксусной кислоты: (а) – 1 г/л, (б) – 2,5 г/л., (в) – 5 г/л, (г) – 10 г/л, (д) – 15 г/л, (е) – 20 г/л (увеличение 1000х).

Однако, известно, что в результате адсорбции макромолекул поверхностно-активных полимеров на границе раздела фаз вода – масло, возникает межфазный слой, обладающий высокой структурной прочностью [155]. Поскольку низкомолекулярный ПГПР адсорбируется на межфазной поверхности значительно быстрее, чем макромолекулы полимера, можно говорить о том, что в первую очередь повышение агрегативной устойчивости исследуемой системы связано с образованием комплекса полимер – ПАВ на межфазной границе. Комплекс хитозан – ПГПР создает структурно-механический барьер, который стабилизирует капли дисперсной фазы, препятствуя процессам коагуляции и коалесценции, вследствие чего размеры капель не увеличиваются при выдержке эмульсий.

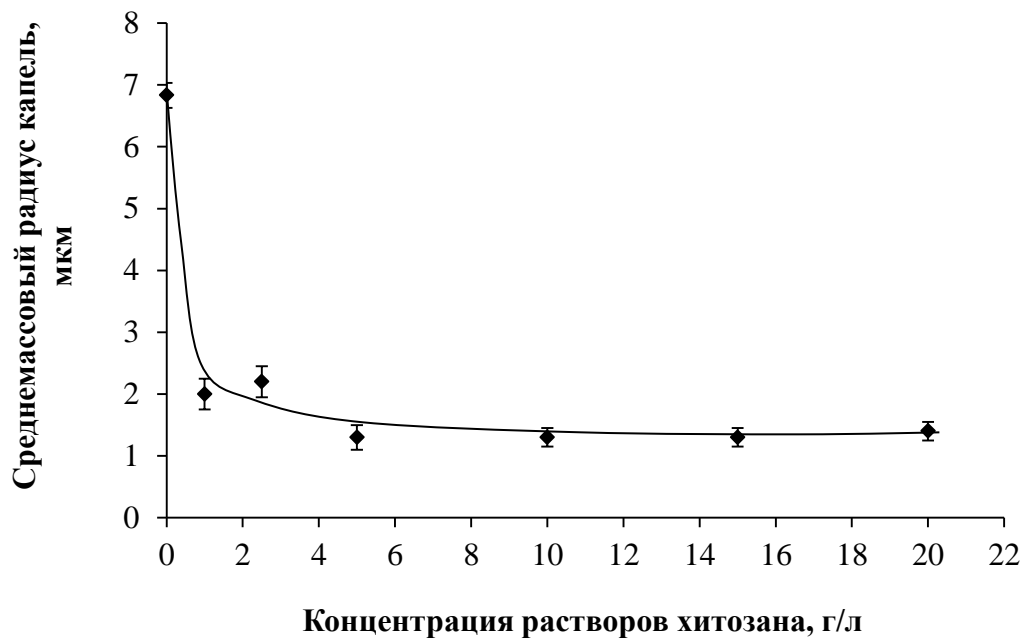


Рисунок 3.44. Зависимость среднемассового радиуса капель эмульсии от концентрации растворов хитозана.

На рис. 3.45 представлена зависимость концентрации равновесных эмульсий от содержания хитозана в водной фазе. Было показано, что с введением хитозана в систему и увеличением содержания полимера в водной фазе до 0,5% масс. происходит повышение концентраций дисперсной фазы в

равновесных эмульсиях от  $\sim 57\%$  об. до  $\sim 73\%$  об., что, наряду со значительным увеличением скорости расслоения, свидетельствует о повышении агрегативной устойчивости дисперсной системы.

Небольшое уменьшение концентрации дисперсной фазы в равновесной эмульсии (рис. 3.45), а также скорости расслоения системы (рис. 3.46, пунктирные линии), при концентрациях хитозана в водной фазе  $> 5$  г/л (0,5% масс.), вероятно, связано с образованием пространственной структуры в объеме дисперсной фазы.

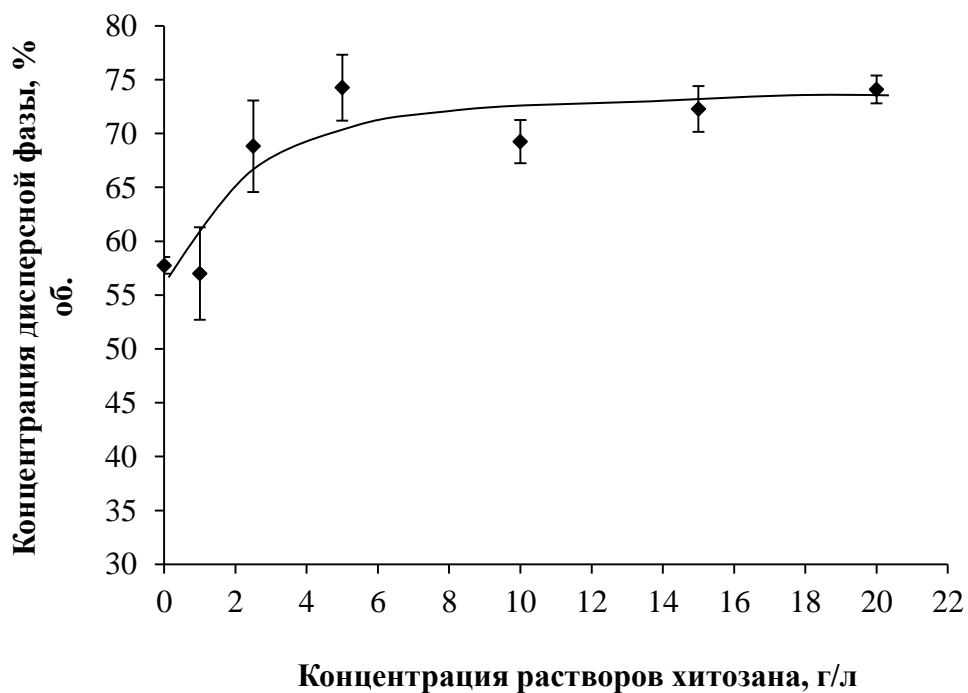


Рисунок 3.45. Влияние содержания хитозана в растворе на концентрацию дисперсной фазы в равновесной эмульсии (120 ч хранения).

На рис. 3.47 представлены кривые эффективной вязкости растворов хитозана в 2%-й уксусной кислоте. Из полученных результатов видно, что наблюдается закономерное повышение вязкости с ростом концентрации полимера в растворе, а также всё более заметным становится неньютоновское поведение системы. Вязкость растворов полимера с концентрацией 0,1 – 0,5% масс. не превышает 10 мПа·с; полученные кривые свидетельствуют о том, что

исследуемые растворы являются ньютоновскими жидкостями. При концентрациях хитозана  $\geq 1\%$  масс. растворы полимера структурированы.

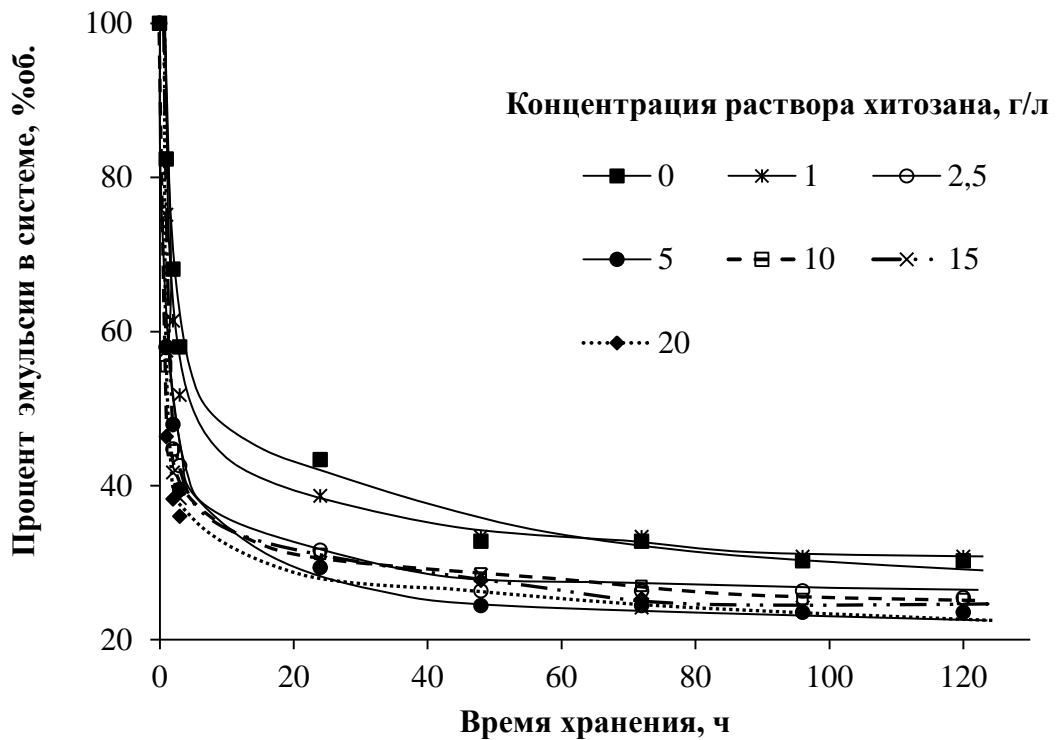


Рисунок 3.46. Влияние концентрации раствора хитозана (г/л) на кинетику изменения объема эмульсий, сформировавшихся в системе при хранении.

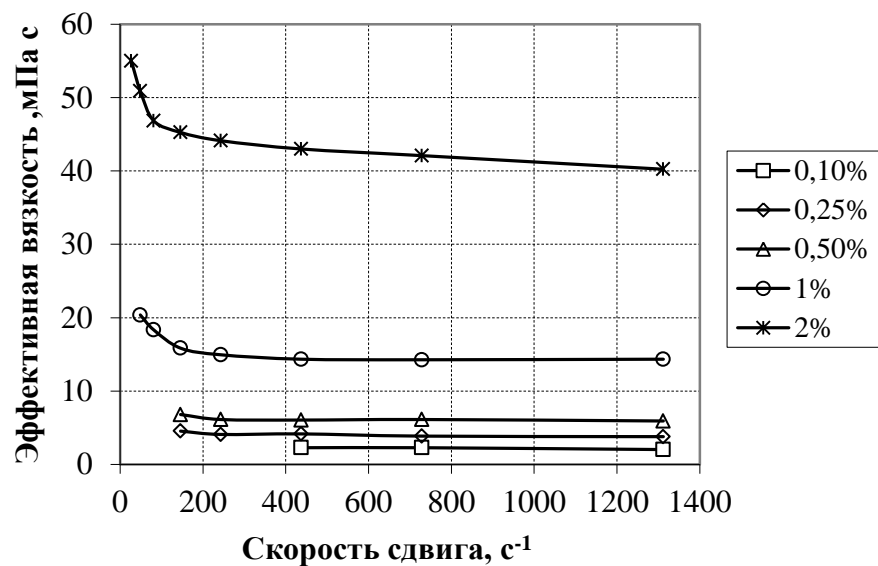


Рисунок 3.47. Зависимость эффективной вязкости от напряжения сдвига для растворов хитозана с различной концентрацией.

В результате процесса структурообразования в объеме дисперсной фазы, часть макромолекул оказывается связанной, и не участвует в образовании комплекса полимер-ПАВ на межфазной границе. Можно предположить, что это является причиной уменьшения прочности адсорбционного слоя, что, по-видимому, приводит к снижению поверхностной активности полимера и некоторому падению агрегативной устойчивости. По результатам исследования для последующей работы была выбрана концентрации хитозана в водной фазе 10 г/л.

#### ***3.4.5. Введение лимонной кислоты в эмульсии, содержащие полимер***

Изучали свойства эмульсий, полученных на основе водного раствора хитозана в парафиновом масле, с последующим добавлением раствора лимонной кислоты. Соотношения лимонная кислота:хитозан варьировали от 0:1 до 8:1, соотношение вода – масло в исходной системе составляло 2:8. Микрофотографии образцов эмульсий приведены на рис. 3.48 (а-е). Рассчитанные значения среднечисленного ( $r_n$ ), среднеповерхностного ( $r_s$ ) и среднемассового ( $r_m$ ) радиусов капель равновесных эмульсий и коэффициентов полидисперсности ( $k$ ) приведены в табл. 3.10. Гистограммы распределения капель эмульсий по размерам приведены в Приложении (табл.5).

Растворы лимонной кислоты с различной концентрацией вводили в эмульсию, содержащую хитозан (1% масс. в водной фазе) и ПГ-6-ПР (2% масс. в исходной системе), по каплям при перемешивании и нагревании. Было установлено, что при увеличении времени перемешивания эмульсии, не содержащей лимонную кислоту, от 1 до 4 часов в результате процессов коагуляции и коалесценции происходит значительный рост среднемассового радиуса частиц – от 1,3 до 8,3 мкм.

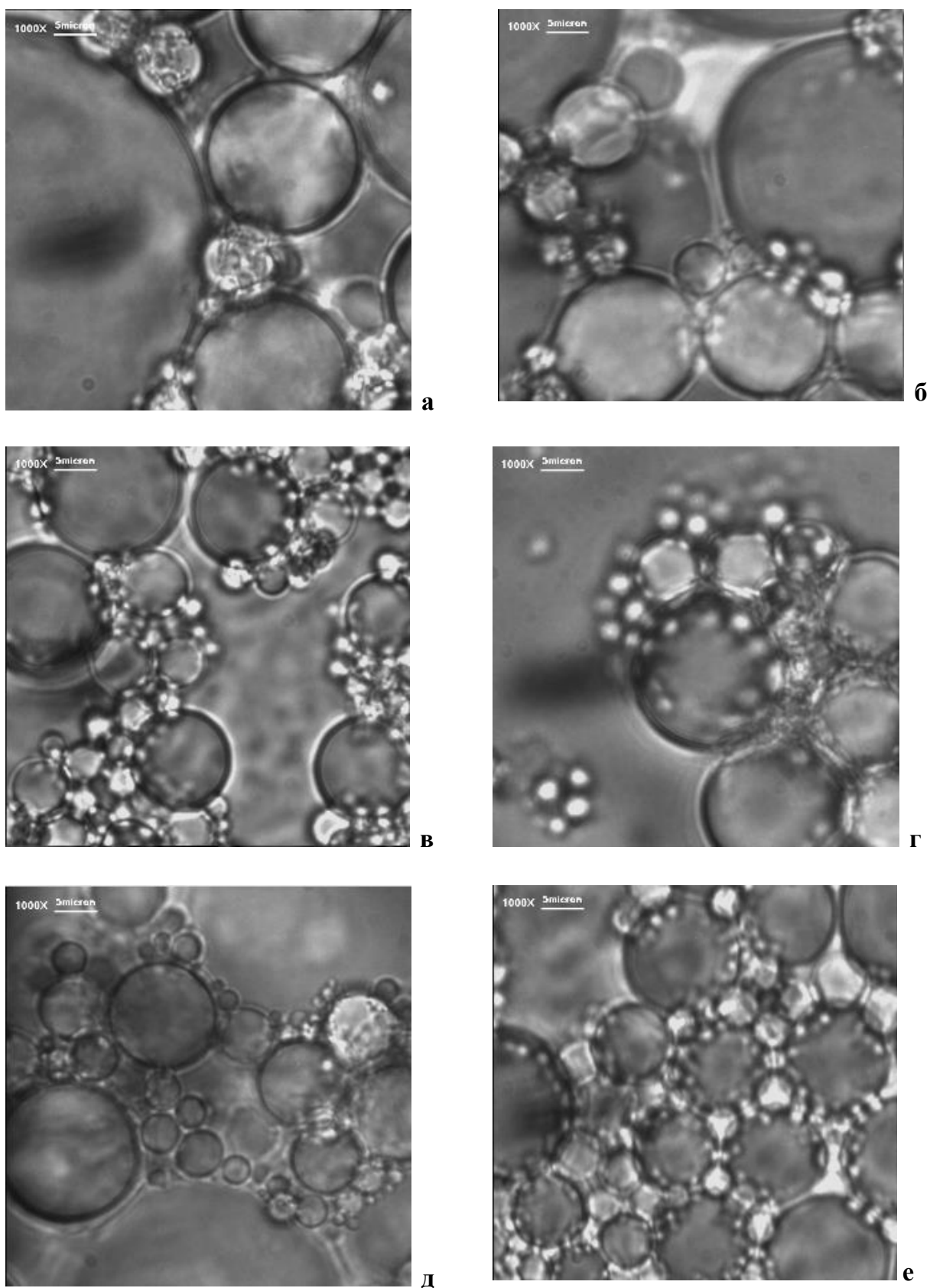


Рисунок 3.48. Микрофотографии образцов эмульсий, при соотношениях лимонная кислота:хитозан: (а) – 0:1, (б) – 0,125:1, (в) – 0,33:1, (г) – 1,25:1, (д) – 4:1, (е) – 8:1 (увеличение 1000х).

Введение лимонной кислоты в эмульсию, содержащую хитозан с концентрацией в водной фазе 1% масс., при соотношении лимонная кислота:полимер 0,33:1, приводит к уменьшению среднемассового радиуса капель приблизительно в 1,5 раза (табл.3.10), что свидетельствует о повышении агрегативной устойчивости дисперсной системы.

**Таблица 3.10.** Влияние массового соотношения лимонная кислота:хитозан на размеры капель в эмульсиях.

Соотношение лим. кислота: хитозан	$\Gamma_n$ , мкм	$\Gamma_s$ , мкм	$\Gamma_m$ , мкм	k
0	4,2	7,3	8,3	0,5
0,125	2,8	5,3	6,2	0,5
0,33	2,8	4,7	5,2	0,6
1,25	2,8	4,8	5,4	0,5
4	2,2	4,3	5,0	0,5
8	2,5	4,45	5,0	0,5

Образование цитрата хитозана повышает гидрофобность полимера [179], вследствие чего уменьшается его растворимость. По-видимому, это приводит к образованию поверхностного гелевого слоя, препятствующего коалесценции капель [178].

На рис. 3.49 представлена кривая зависимости среднемассового радиуса капель от соотношения лимонная кислота:хитозан. Из рисунка видно, что уменьшение размеров капель начинается уже при их массовом соотношении, равном 0,125:1, а при соотношении лимонная кислота:хитозан  $\geq 0,33$ , кривая выходит на плато. При тех же соотношениях лимонной кислоты и хитозана в эмульсии существует плато на кривой зависимости концентрации дисперсной фазы от соотношения реагентов (рис. 3.50), что свидетельствует о достижении наибольшей агрегативной устойчивости.

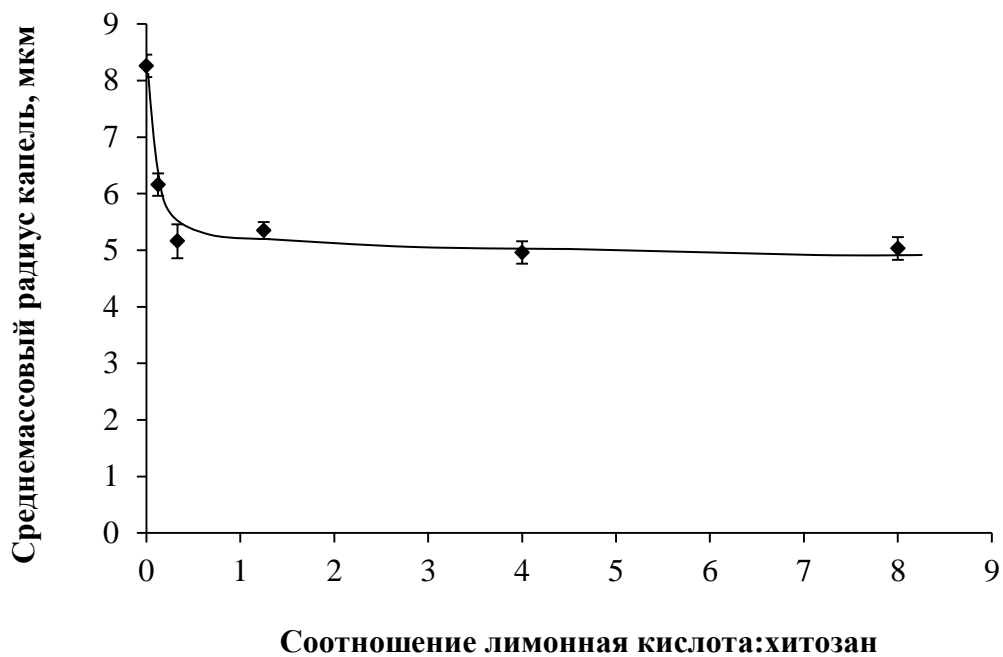


Рисунок 3.49. Зависимость среднemasсового радиуса капель эмульсии от соотношения лимонная кислота:хитозан.

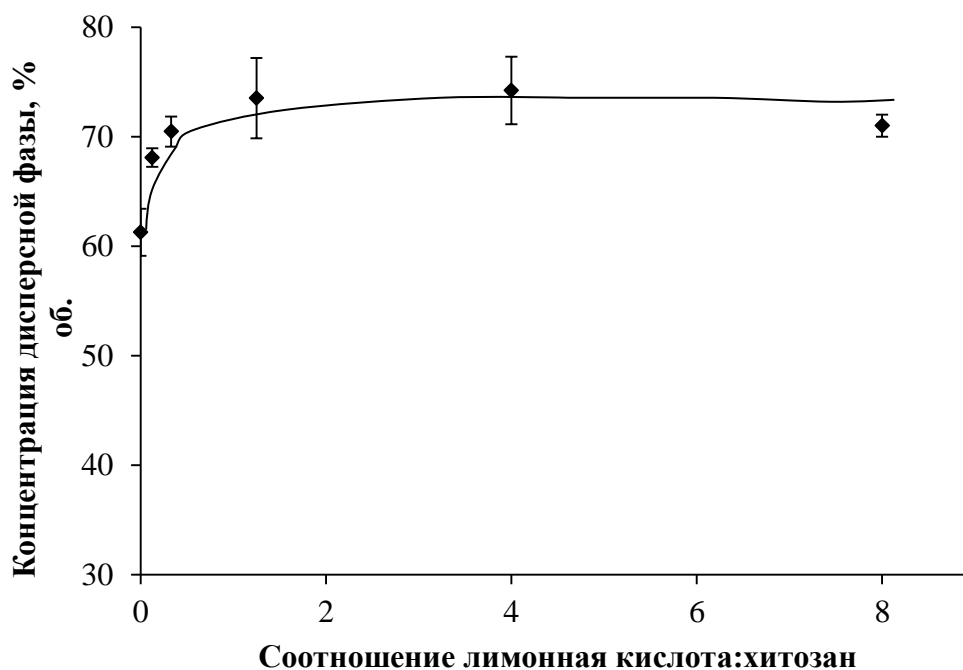


Рисунок 3.50. Зависимость концентрации дисперсной фазы от соотношения лимонная кислота:хитозан.

Однако необходимо отметить, что увеличение избытка лимонной кислоты по отношению к хитозану приводит к снижению скорости расслоения эмульсии



(соотношения лимонная кислота : хитозан 4:1 и 8:1; рис. 3.51), то есть, к некоторому падению агрегативной устойчивости. Исходя из полученных данных для дальнейших исследований было выбрано соотношение лимонная кислота: хитозан 0,33:1.

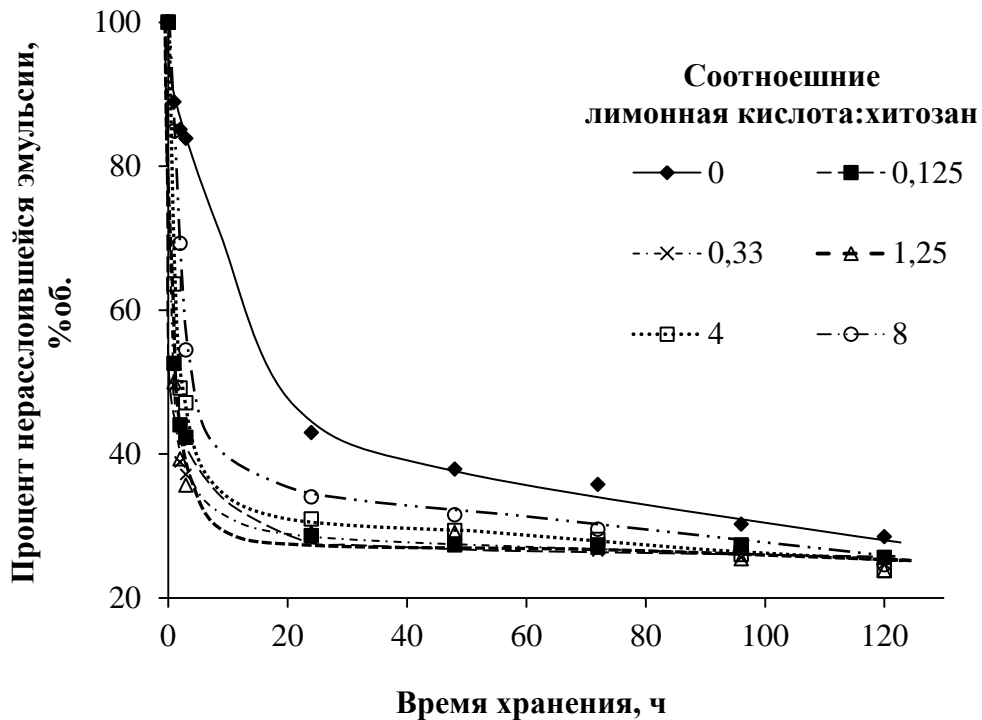


Рисунок 3.51. Влияние соотношения лимонная кислота:хитозан на кинетику изменения объема эмульсий, сформированных в системе при хранении.

### 3.5. Характеристики хитозановых микросфер

Данные, полученные нами в результате изучения адсорбционной способности ПАВ и хитозана, а также дисперсности и агрегативной устойчивости эмульсий на их основе, позволяют регулировать такие характеристики хитозановых микросфер как размеры и полидисперсность, устойчивость к агрегации, степень сшивки хитозанового геля.

Хитозановые микросферы были получены на основе эмульсии вода/парафиновое масло, стабилизированной ПАВ, с последующим отверждением капель дисперсной фазы лимонной кислотой, добавление которой к эмульсии приводит к сшивке макромолекул хитозана и

формированию прочного гидрогеля. В качестве ПАВ использовали полиглицерил-6-полирицинолеат (ПГ-6-ПР) и полиглицерил-10-полирицинолеат (ПГ-10-ПР). В процессе получения микросфер в исходной системе варьировали соотношение масляной и водной фаз, концентрацию ПАВ от 1 до 4% масс. и хитозана от 0,05% масс. до 0,4% масс. Инсулин в микросферы включали методом сорбции, концентрацию растворов белка варьировали в диапазоне от 0,78 до 1,55 г/л, время выдержки микросфер в растворах инсулина – от 6 до 96 часов. Условия получения микросфер приведены в таблице 3.11.

### ***3.5.1. Размеры и морфология частиц***

Такие характеристики микросфер как форма, средние размеры, полидисперсность, морфология поверхности частиц в значительной степени определяют возможность их применения в качестве носителей лекарственных веществ, поскольку оказывают непосредственное влияние на эффективность включения БАВ и кинетику его высвобождения. Перечисленные свойства микросфер находятся в прямой зависимости от коллоидно-химических характеристик исходных эмульсий, а также от технологических условий процесса их получения [79].

Хитозановые микросферы были получены с высоким выходом (70-80%). Морфологию и форму микросфер оценивали с помощью оптической и электронной микроскопии. На рисунках 3.52-3.56 представлены микрофотографии образцов микросфер. Были получены частицы близкой к сферической формы. Определение размеров и распределения по размерам микросфер проводили с помощью оптической микроскопии. Результаты дисперсионного анализа частиц приведены в таблицах 3.12-3.15 и в Приложении (таблицы 1,2,4,5).

**Таблица 3.11.** Условия получения хитозановых микросфер с включенным инсулином.

Содержание масляной фазы*, % масс.	ПАВ	Концентрация ПАВ*, % масс.	Концентрация хитозана*, % масс.	Соотношение хитозан: лимонная кислота	Время выдержки микросфер в растворе инсулина, ч	Концентрация раствора инсулина, г/л
80	ПГ-6-ПР	2	0,2	3:1	48	1,55
50	ПГ-6-ПР	2	0,2	3:1	48	1,55
30	ПГ-6-ПР	2	0,2	3:1	48	1,55
20	ПГ-6-ПР	2	0,2	3:1	48	1,55
80	ПГ-6-ПР	1	0,2	3:1	48	1,55
80	ПГ-6-ПР	3	0,2	3:1	48	1,55
80	ПГ-6-ПР	4	0,2	3:1	48	1,55
80	ПГ-10-ПР	1	0,2	3:1	48	1,55
80	ПГ-10-ПР	2	0,2	3:1	48	1,55
80	ПГ-10-ПР	3	0,2	3:1	48	1,55
80	ПГ-10-ПР	4	0,2	3:1	48	1,55
80	ПГ-6-ПР	2	0,05	3:1	48	1,55
80	ПГ-6-ПР	2	0,1	3:1	48	1,55
80	ПГ-6-ПР	2	0,4	3:1	48	1,55
80	ПГ-6-ПР	2	0,2	0	-	-
80	ПГ-6-ПР	2	0,2	3:1	6	1,55
80	ПГ-6-ПР	2	0,2	3:1	24	1,55
80	ПГ-6-ПР	2	0,2	3:1	96	1,55
80	ПГ-6-ПР	2	0,2	3:1	48	0,78
80	ПГ-6-ПР	2	0,2	3:1	48	1,17

\*В исходной системе

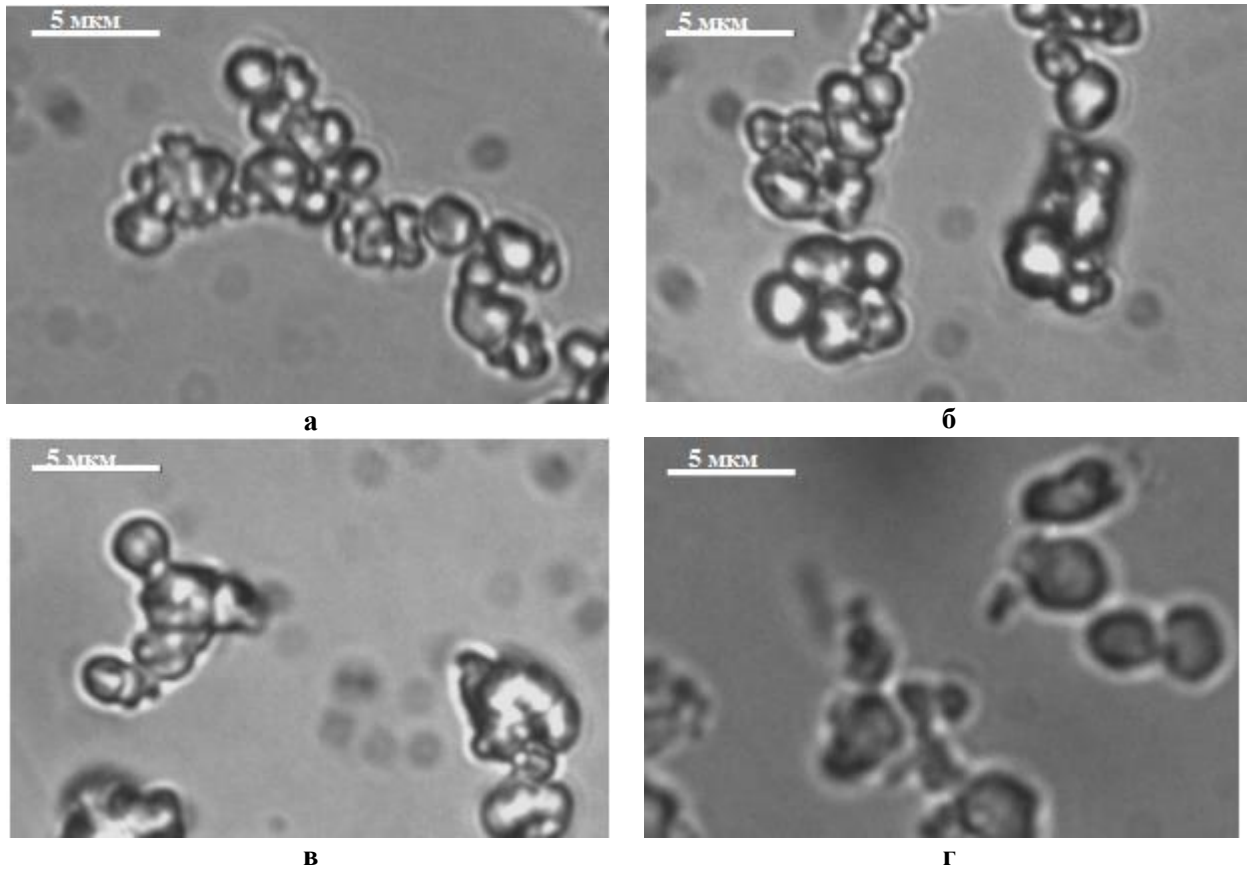
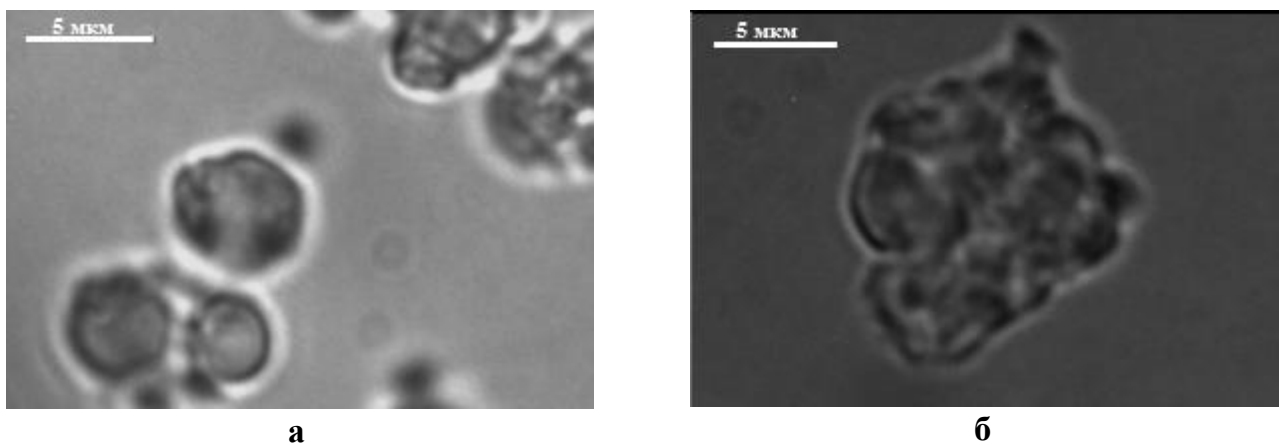


Рисунок 3.52. Микрофотографии образцов микросфер, полученных при разных соотношениях водной и масляной фаз в исходной системе: 8:2 (а), 7:3 (б), 1:1 (в), 2:8 (г), (световой микроскоп Биомед-2).



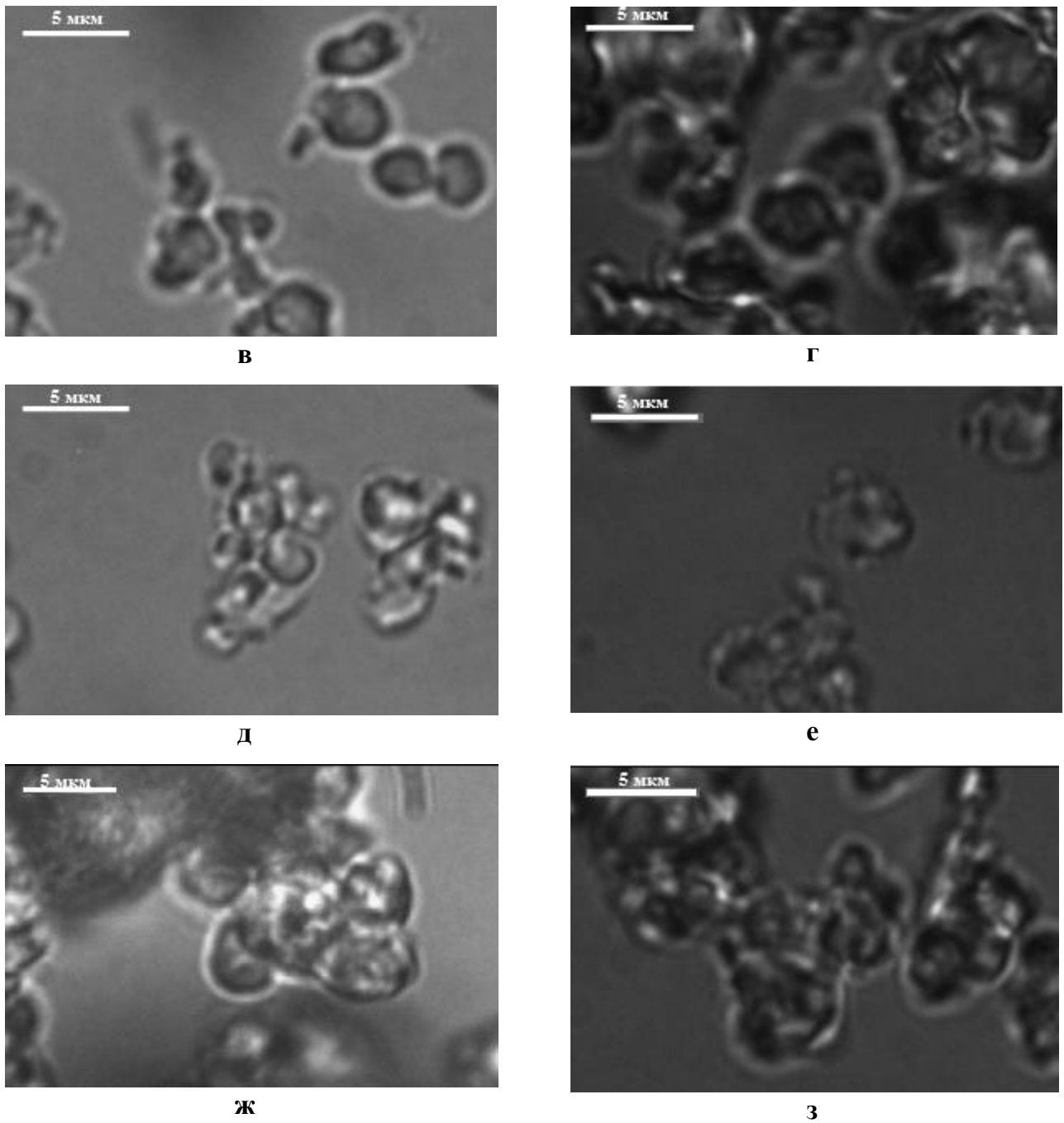


Рисунок 3.53. Микрофотографии образцов микросфер, полученных при разных концентрациях ПГПР в системе: ПГ-6-ПР 1% масс. (а), ПГ-10-ПР 1% масс. (б), ПГ-6-ПР 2% масс.(в), ПГ-10-ПР 2% масс.(г), ПГ-6-ПР 3% масс.(д), ПГ-10-ПР 3% масс.(е), ПГ-6-ПР 4% масс.(ж), ПГ-10-ПР 4% масс.(з), (световой микроскоп Биомед-2).

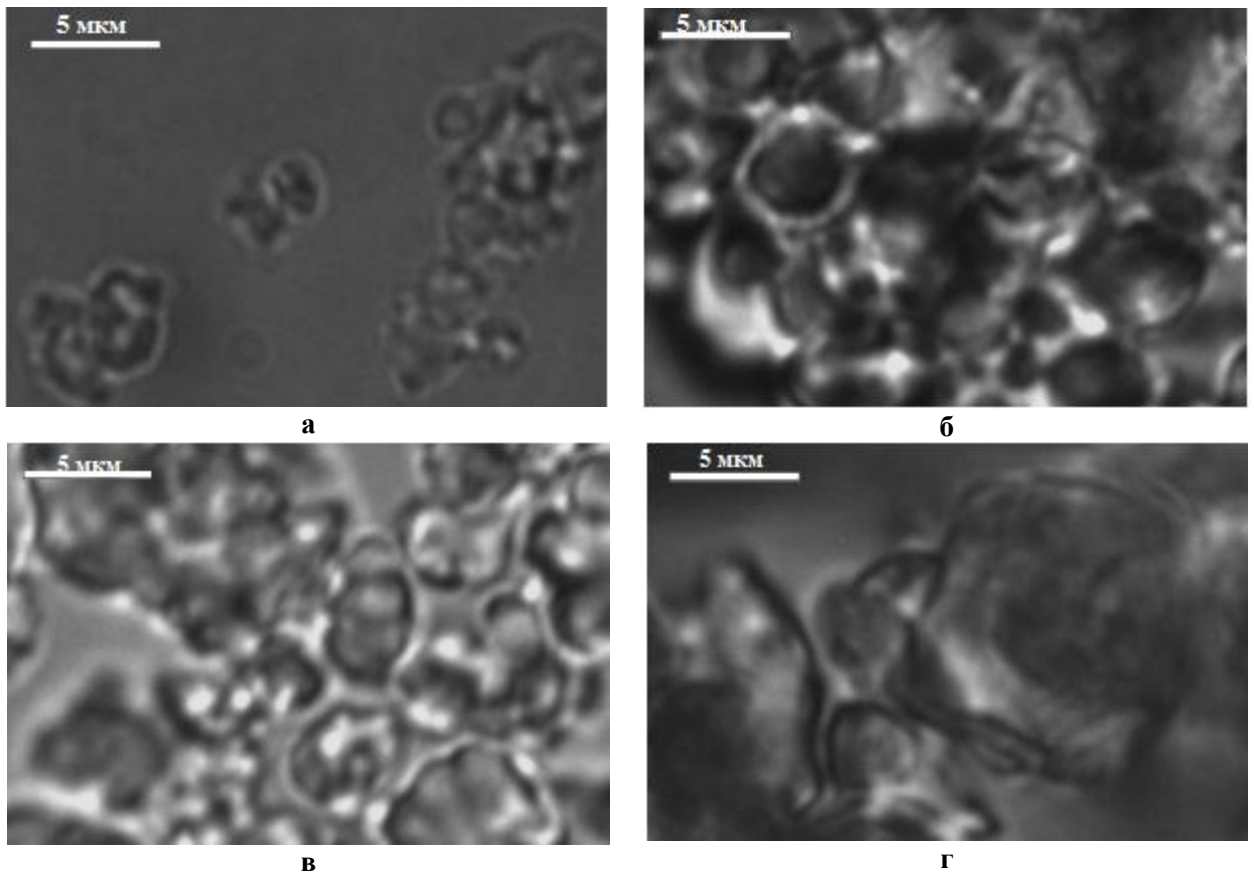


Рисунок 3.54. Микрофотографии образцов микросфер, полученных при разных концентрациях хитозана в исходной системе: 0,05% масс. (а), 0,1% масс. (б), 0,2% масс. (в), 0,4% масс. (г), (световой микроскоп Биомед-2).

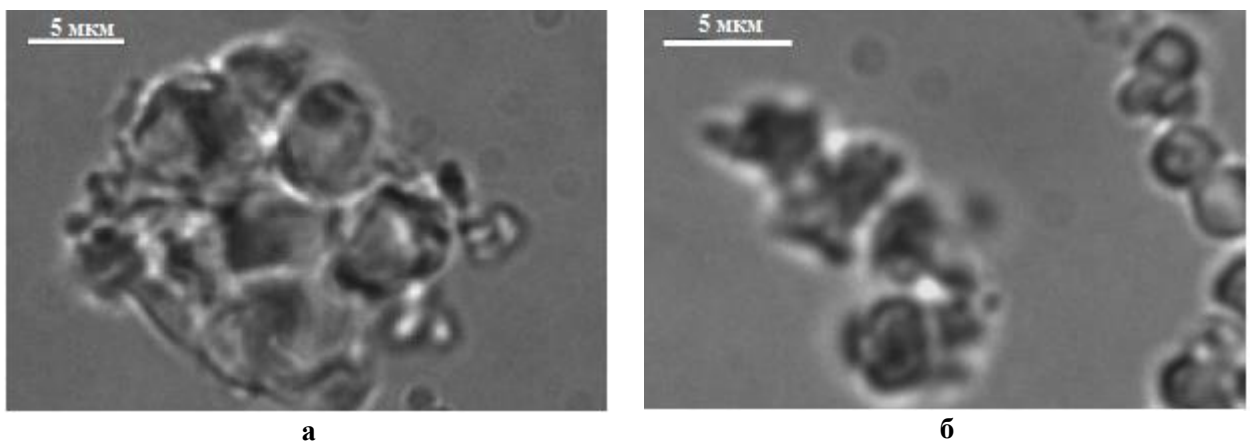


Рисунок 3.55. Микрофотографии образцов микросфер, полученных при разных соотношениях лимонная кислота:хитозан: 0:1 (а), 1:3 (б), (световой микроскоп Биомед-2).

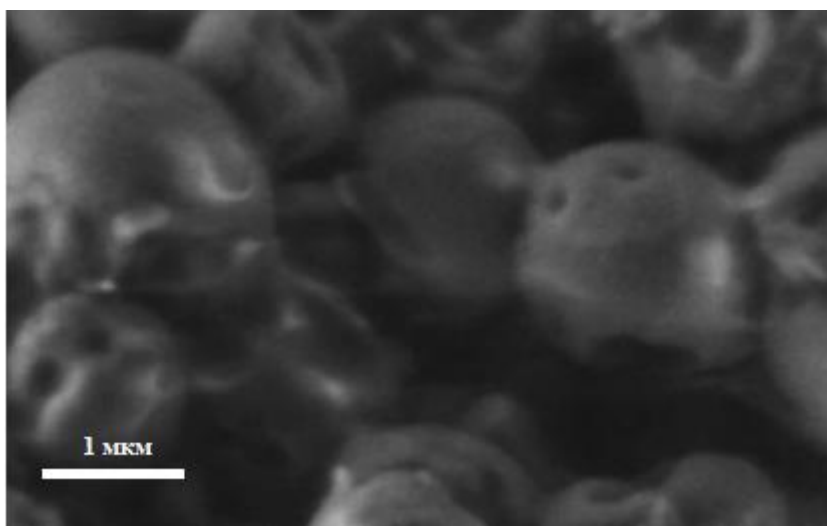
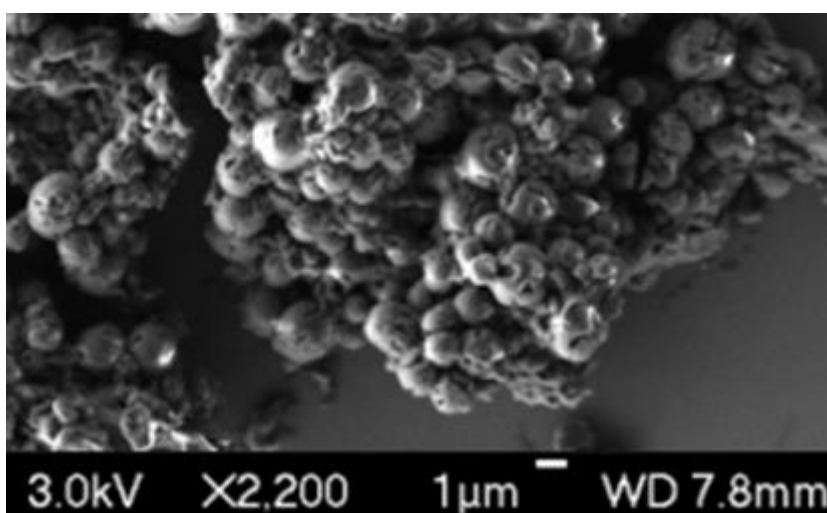
**а****б**

Рисунок 3.56 (а-б). Микрофотографии образца микросфер с включенным инсулином, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа Jeol JSM-6700F.

Показано, что все образцы микросфер были агрегированы. Однако было установлено, что наиболее сильная агрегация частиц в процессе выделения и сушки происходит в образцах, полученных при наибольшем содержании водной фазы, концентрации ПАВ и хитозана в исходной системе. Ранее было отмечено, что повышение содержания водной фазы способствует образованию коагуляционной пространственной структуры в равновесной эмульсии, тогда как при введении меньших объемов воды в систему агрегативная устойчивость эмульсий возрастает. Вследствие этого, в образцах, в процессе получения

которых использовали эмульсии с невысоким содержанием воды, наблюдается большее количество индивидуальных частиц.

Несмотря на то, что введение ПАВ в эмульсию повышает агрегативную устойчивость системы и препятствует коалесценции капель эмульсии, о чем свидетельствует уменьшение среднемассового радиуса и полидисперсности частиц с повышением содержания ПАВ (табл.3.13), было отмечено, что по мере роста концентрации ПГПР степень агрегации частиц увеличивалась. Поскольку почти все используемые в работе концентрации ПАВ выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ), можно предположить, что при введении ПГПР в эмульсию в избытке, данное поверхностно-активное вещество играет роль структурообразователя и способствует формированию коагуляционной пространственной структуры в объеме эмульсий, что в дальнейшем приводит к образованию агрегатов частиц на стадии выделения микросфер.

Наименьшую устойчивость микросфер к агрегации после выделения центрифугированием и сушки наблюдали в случае использования ПГ-10-ПР. Поскольку ПГ-10-ПР обладает лучшей растворимостью в парафиновом масле, и, следовательно, большее число его молекул находится в дисперсионной среде, можно предположить, что он выступает в роли более сильного структурообразователя, по сравнению с ПГ-6-ПР. Более высокая способность к коагуляции капель эмульсий, полученных на основе ПГ-10-ПР, также может быть обусловлена тем, что, как ранее было установлено (рис.3.2), ПГ-10-ПР снижает межфазное натяжение на границе вода – парафиновое масло в меньшей степени, чем ПГ-6-ПР.

Было показано, что с ростом концентрации хитозана в исходной системе от 0,05 до 0,2% масс., при соотношении водной и масляной фаз 2:8, среднемассовый радиус частиц не изменялся (1,8 – 1,9 мкм), но при увеличении концентрации полимера от 0,2% масс. до 0,4% масс. – возрастал более чем в два раза (4,9 мкм) (табл.3.14).



**Таблица 3.12.** Влияние соотношения водной и масляной фаз в исходной системе на средние размеры и полидисперсность образцов микросфер.

Соотношение водной и масляной фаз*	$r_n$ , мкм	$r_s$ , мкм	$r_m$ , мкм	k
2:8	1,1	1,8	1,9	0,6
1:1	1,0	1,6	1,8	0,6
7:3	1,0	1,6	1,8	0,5
8:2	0,7	0,8	1,1	0,6

\*в исходной системе

**Таблица 3.13.** Влияние концентрации ПГПР на средние размеры и полидисперсность образцов микросфер.

Концентрация ПАВ*, % масс.	ПАВ	$r_n$ , мкм	$r_s$ , мкм	$r_m$ , мкм	k
1	ПГ-6-ПР	1,3	2,2	2,5	0,5
2		1,0	1,7	1,9	0,6
3		0,8	1,6	1,8	0,5
4		1,5	2,0	2,2	0,7
1	ПГ-10-ПР	1,6	2,3	2,6	0,6
2		1,5	2,0	2,3	0,6
3		1,2	1,6	1,9	0,6
4		1,1	1,5	1,7	0,7

\*в исходной системе

**Таблица 3.14.** Влияние концентрации хитозана в исходной системе на средние размеры и полидисперсность образцов микросфер.

Содержание хитозана, % масс.		$r_n$ , мкм	$r_s$ , мкм	$r_m$ , мкм	k
В исходной системе	В водной фазе				
0,05	0,25	1,0	1,6	1,8	0,6
0,10	0,5	1,0	1,6	1,8	0,6
0,20	1	1,1	1,8	1,9	0,6
0,40	2	3,3	4,6	4,9	0,7

Поскольку ранее нами было установлено, что с повышением концентрации хитозана в системе от 0,05% масс. до 0,4% масс. средние размеры капель эмульсии не изменяются, можно предположить, что значительный рост размера частиц при высокой концентрации полимера в системе связан с агрегацией микросфер в процессе выделения и отмывки центрифугированием.

Среднемассовый радиус микросфер, сшитых лимонной кислотой, оказался меньше среднемассового радиуса несшитого образца приблизительно в 4,5 раза – 1,9 мкм и 9 мкм, соответственно (табл. 3.15, рис.3.49). Такое значительное уменьшение средних размеров частиц можно объяснить ростом агрегативной устойчивости исходной эмульсии при введении лимонной кислоты, вследствие которого падает среднемассовый радиус капель дисперсной фазы (табл.3.15, рис.3.49). Необходимо отметить, что приведенные в табл. 3.15 результаты дисперсионного анализа образца микросфер, не содержащего лимонную кислоту, хорошо согласуются с данными, полученными для капель исходной эмульсии (табл. 3.10). В то же время, среднемассовый радиус капель эмульсии, на основе которой был получен образец с соотношением сшивающий агент:полимер 1:3, превышает среднемассовый радиус выделенных из данной эмульсии частиц в 2,5 раза (5 и 1,9 мкм, соответственно).

**Таблица 3.15.** Влияние соотношения лимонная кислота:хитозан на средние размеры и полидисперсность образцов микросфер.

Соотношение лимонная кислота: хитозан	$r_n$ , мкм	$r_s$ , мкм	$r_m$ , мкм	k
1:3	1,1	1,8	1,9	0,6
0:1	5,0	7,9	9,0	0,6

Можно предположить, что введение лимонной кислоты в эмульсию с хитозаном способствует процессу гелеобразования [102], при этом впоследствии размеры гелевых частиц уменьшаются в процессе сушки, тогда как размеры частиц несшитого образца, после выделения, отмывки и сушки существенных изменений не претерпевают.

Сшивка хитозана с лимонной кислотой была подтверждена результатами ИК-спектроскопии. На рисунке 3.57 приведены ИК-спектры несшитых хитозановых микросфер (рис. 3.57 а) и хитозановых микросфер, полученных в присутствии лимонной кислоты (массовое соотношение хитозан : лимонная кислота 3:1) (рис. 3.57 б). Спектр несшитого образца микросфер содержит:

- широкую полосу в области  $3700 - 3000 \text{ см}^{-1}$  с максимумом при  $3444 \text{ см}^{-1}$ , которая отвечает валентным колебаниям ОН – и  $\text{NH}_2$  – групп;
- полосы  $2925 \text{ см}^{-1}$  и  $2858 \text{ см}^{-1}$ , которые отвечают симметричным и ассиметричным валентным колебаниям С –Н связей, соответственно;
- полосу  $1633 \text{ см}^{-1}$ , которая свидетельствует о наличии  $-\text{C}=\text{O}$  связи в ацетамидной группе (амид I);
- полосу  $1587 \text{ см}^{-1}$ , которая отвечает деформационным колебаниям  $\text{NH}_2$  – группы;
- полосу  $1419 \text{ см}^{-1}$ , которая соответствует деформационным колебаниям  $-\text{O}-\text{H}$  и  $-\text{C}-\text{H}$  связей;

- полосы  $1153\text{ см}^{-1}$ ,  $1078\text{ см}^{-1}$ ,  $1022\text{ см}^{-1}$ , которые возникают за счёт колебаний C – O, C – N и C – C связей, соответственно [185-187].

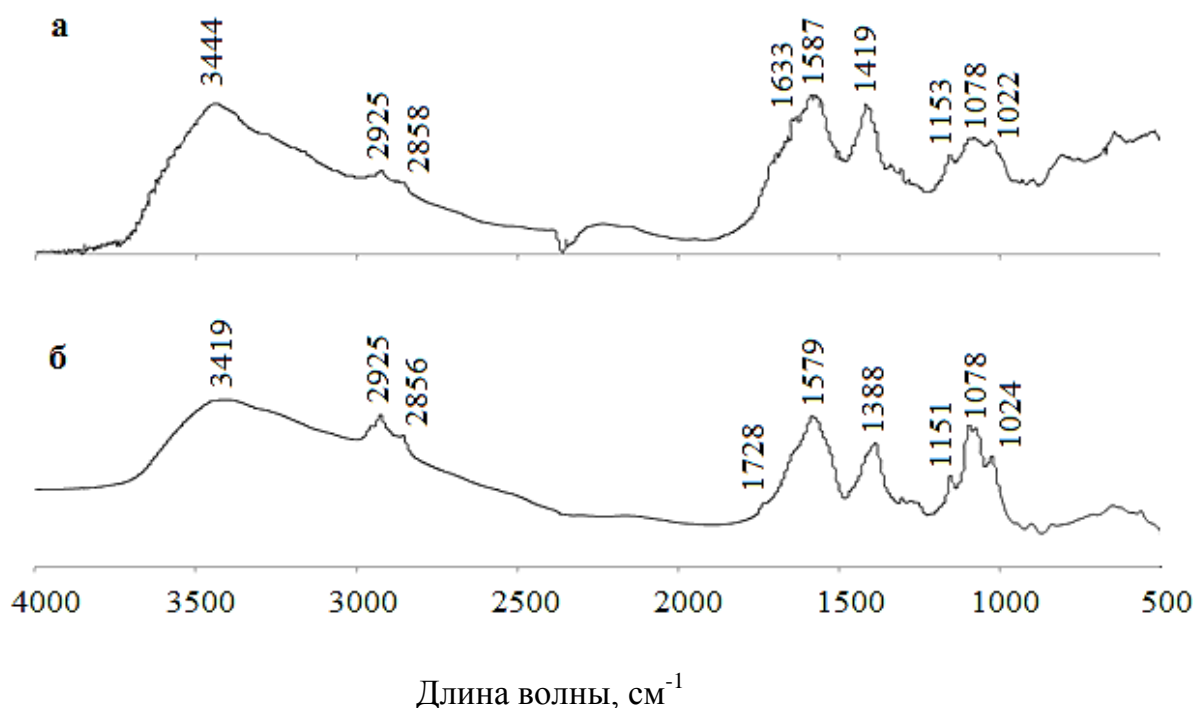


Рисунок 3.56. Фурье ИК-спектры образцов несшитых хитозановых микросфер (а) и хитозановых микросфер, сшитых лимонной кислотой (б).

Полученный спектр несшитого образца хитозановых микросфер во многом схож со спектром чистого хитозана (рис. 3.58), приведенного в литературе [187].

В спектре образца, полученного в присутствии лимонной кислоты, полосы, лежащие в диапазоне длин волн  $3700 - 2800\text{ см}^{-1}$  и  $1200 - 900\text{ см}^{-1}$  не претерпевают значительных изменений, тогда как в области  $1800 - 1500\text{ см}^{-1}$  появляются две полосы –  $1728$  и  $1579\text{ см}^{-1}$ , которые соответствуют валентным колебаниям  $\text{C}=\text{O}$  связи в алифатических карбоновых кислотах и ассиметричным валентным колебаниям  $\text{COO}^-$  группы, соответственно. В области  $1500 - 1200\text{ см}^{-1}$  появляется полоса  $1388\text{ см}^{-1}$ , принадлежащая симметричным валентным колебаниям  $\text{COO}^-$  группы [188]. Известно, что полосы, отвечающие валентным колебаниям  $\text{NH}_3^+$  группы, находятся в

области  $\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$  и на представленных спектрах, вероятно, перекрыты широкой полосой, принадлежащей гидроксид- и аминогруппам хитозана.

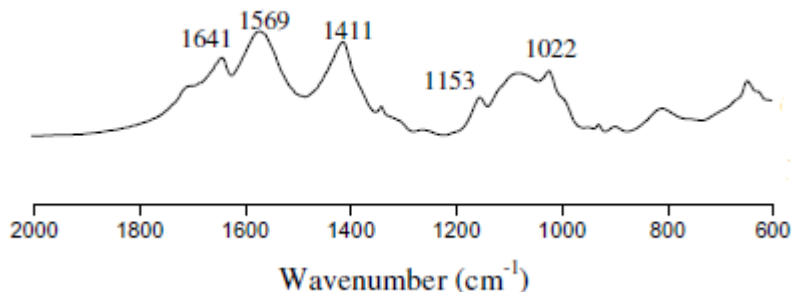


Рисунок 3.58. ИК-спектр хитозана [187].

Возникновение полос 1579 и 1388  $\text{cm}^{-1}$  в ИК-спектре микросфер свидетельствует о существовании ионных связей между протонированными аминными группами хитозана и отрицательно заряженными карбоксильными группами лимонной кислоты и подтверждает то, что сшивка хитозана происходит.

### ***3.5.2. Включение белка в микросферы***

Включение инсулина в микросферы осуществляли методом сорбции. Микросферы выдерживали в растворе белка с концентрацией 1,55 г/л в течение 48 часов. Наполненные инсулином микросферы выделяли и высушивали; в растворе измеряли остаточное количество белка методом Брэдфорд. Эффективность включения определяли по разнице между первоначальной концентрацией инсулина в растворе и концентрацией после включения. В ряде экспериментов варьировали концентрацию раствора инсулина и время выдержки микросфер в растворе белка.

Включение белков методом сорбции предпочтительно в тех случаях, когда при введении их в систему в процессе получения микросфер (метод прямого инкапсулирования) может происходить денатурация макромолекул белка при взаимодействии с органическим растворителем, повышении

температуры, либо изменении рН. Эффективность сорбции зависит от рН и концентрации раствора белка [93], свойств поверхности микросфер (величины удельной поверхности, которая определяется средними размерами и степенью агрегации частиц; наличия функциональных групп, имеющих сродство к молекулам белка) [155, 189, 190], а также от структуры полимерной матрицы (степени сшивки полимера и, следовательно, степени набухания частиц; пористости микросфер, наличия микроканалов) [115].

Результаты определения эффективности включения инсулина в полученные образцы микросфер приведены на рис.3.58-3.60, 3.62, 3.63. Несмотря на то, что с ростом содержания водной фазы в исходной системе от 20% до 80% масс. средние размеры частиц уменьшаются, было установлено, что эффективность включения белка в микросферы при этом снижается от 79% до 52% (рис.3.59). Можно предположить, что это связано с большей свободной для адсорбции межфазной поверхностью менее агрегированных частиц.

Рост концентрации ПГПР не оказывал значительного влияния на эффективность включения БАВ (рис.3.60). Однако, как было установлено, микросферы, полученные в присутствии ПГ-6-ПР, обладают большей способностью включать белок, по сравнению с образцами на основе ПГ-10-ПР, что вероятно, можно объяснить их меньшей степенью агрегации, следовательно, большей величиной удельной поверхности.

Было установлено, что содержание полимера в системе оказывает значительное влияние на эффективность включения инсулина (рис. 3.61). При концентрациях полимера в исходной системе 0,05- 0,2% масс., эффективность включения белка в полученные микросферы находилась в пределах 70-80%.

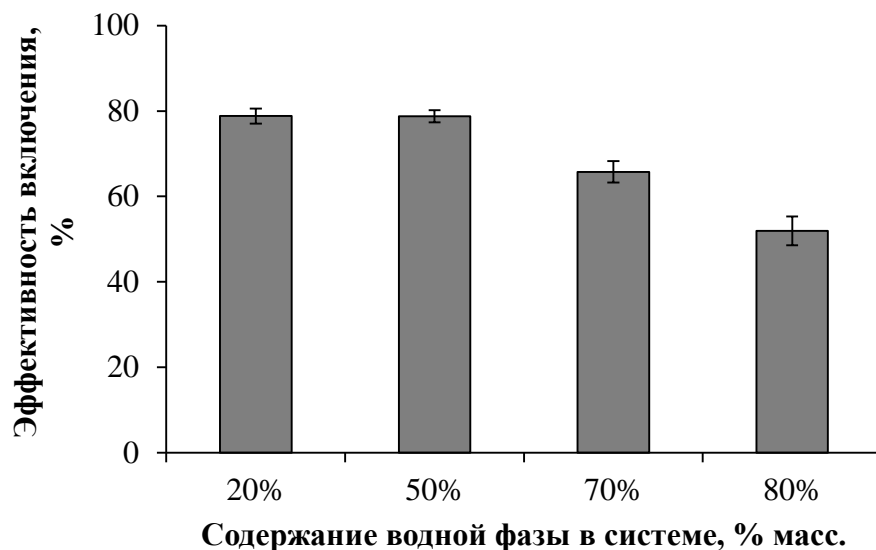


Рисунок 3.59. Эффективность включения инсулина в микросферы, полученные на основе эмульсий в/м с различным содержанием водной фазы (% масс.) в исходной системе.

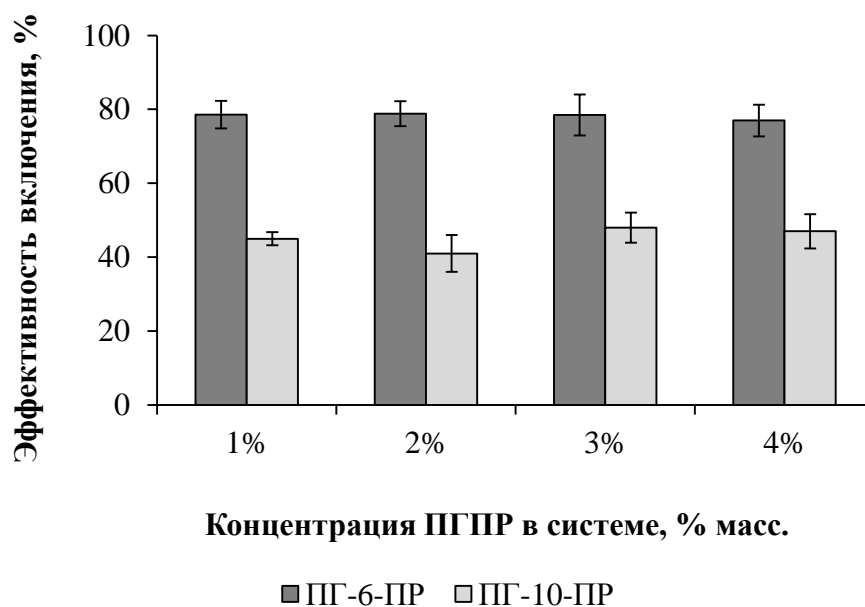


Рисунок 3.60. Влияние концентрации ПГПР в исходной системе на эффективность включения инсулина в микросферы.

При повышении концентрации полимера от 0,2% масс. до 0,4% масс., эффективность включения уменьшалась до 32,6%. По-видимому, это связано с высокой степенью сшивки рассматриваемого образца, а также высокой вязкостью геля, сформированного из раствора хитозана с наибольшей используемой концентрацией (2% масс. хитозана в растворе или 0,4% масс. в

исходной системе). Эти факторы препятствуют проникновению воды внутрь гелевых частиц, что приводит к снижению их способности к набуханию и уменьшает эффективность включения.

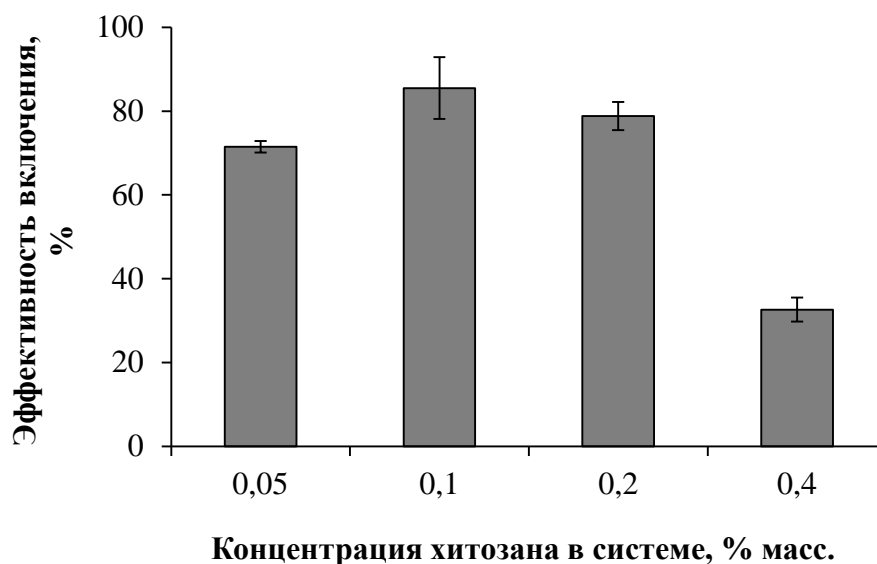


Рисунок 3.61. Влияние концентрации хитозана в исходной системе на эффективность включения инсулина в микросферы.

С целью подтвердить данное предположение, было проведено исследование набухания микросфер, полученных на основе эмульсий с различным содержанием хитозана в дисперсной фазе. Результаты приведены на рис.3.62. Было показано, что с повышением концентрации хитозана в исходной системе от 0,1% до 0,4% масс. степень набухания образцов микросфер, выдержанных в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) в течение 6 часов при комнатной температуре, существенно уменьшалась, от 284% до 170%.

Было исследовано влияние концентрации растворов инсулина и времени сорбции на эффективность включения. Микросферы выдерживали в растворах инсулина с концентрациями 0,78; 1,17 и 1,55 г/л в течение 48 часов, и в растворе инсулина с концентрацией 1,55 г/л в течение 6, 24, 48 и 96 часов. Полученные данные значений эффективности включения инсулина представлены на рис. 3.63, 3.64.



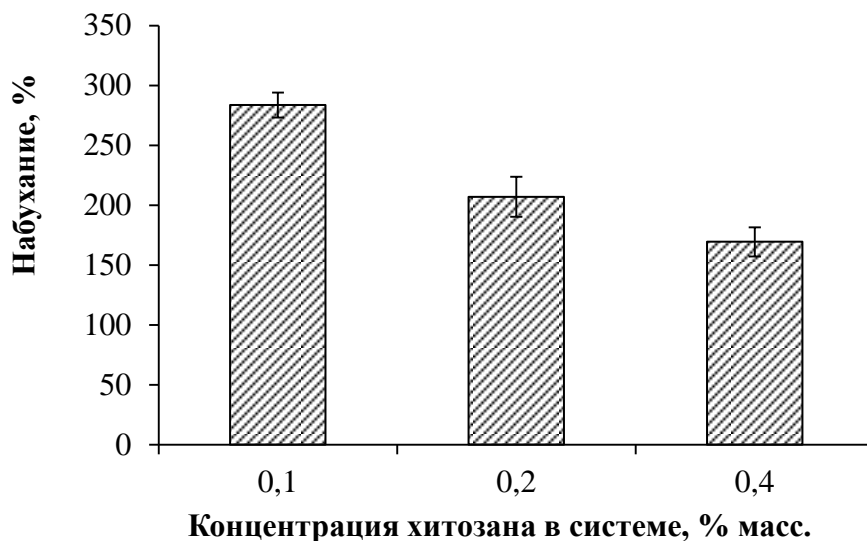


Рисунок 3.62. Влияние концентрации хитозана в исходной системе на степень набухания хитозановых микросфер при выдержке в фосфатно-солевом буфере в течение 6 часов.

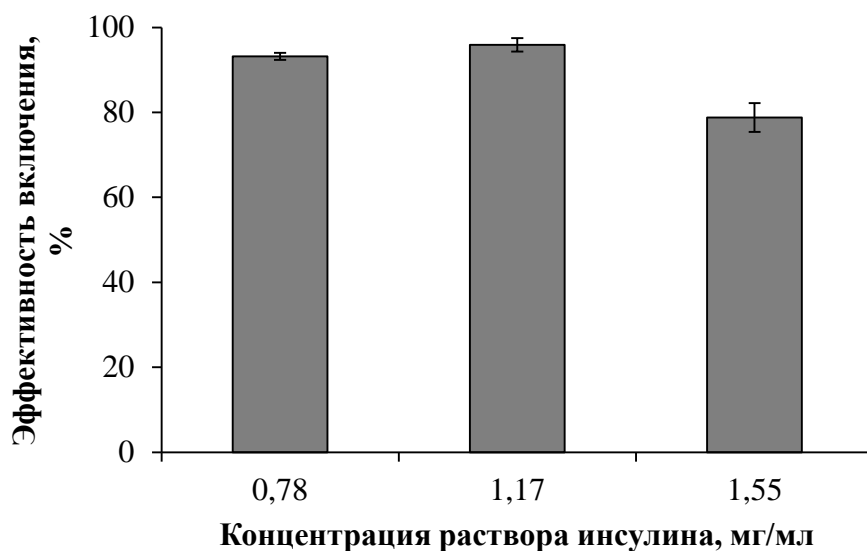


Рисунок 3.63. Влияние концентрации раствора инсулина на эффективность его включения в микросферы.

Было показано, что рост концентрации раствора инсулина от 0,77 г/л до 1,17 г/л не оказывает значительного влияния на эффективность включения. При дальнейшем увеличении концентрации до 1,55 г/л эффективность включения несколько падает, из чего можно заключить, что для насыщения

поверхности микросфер молекулами белка требуется меньшая концентрация инсулина в растворе.

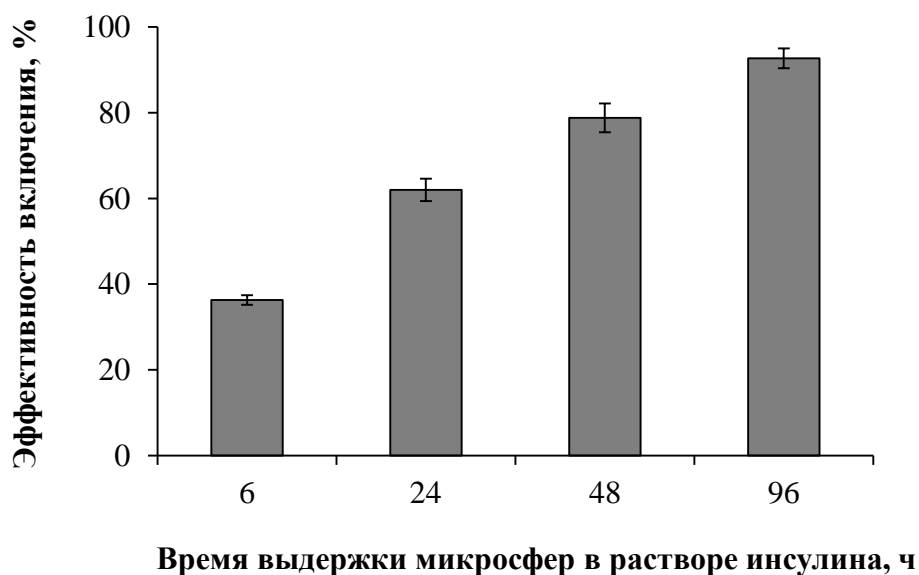


Рисунок 3.64. Влияние времени выдержки микросфер в растворе инсулина с концентрацией 1,55 г/л на эффективность включения.

Увеличение времени выдержки частиц в растворе белка от 6 до 48 часов повышает эффективность включения от 36 до 79%. Этот факт свидетельствует о том, что процесс адсорбции белка на поверхности хитозановых микросфер требует длительного времени.

Было установлено, что при увеличении времени выдержки микросфер в фосфатно-солевом буфере от 6 до 48 часов значительного изменения степени набухания частиц не происходит (рис.3.65). Следовательно, в этом случае данный фактор не оказывает существенного влияния на сорбцию инсулина.



Рисунок 3.65. Влияние времени выдержки хитозановых микросфер в фосфатно-солевом буфере на степень набухания.

### 3.5.3. Высвобождение инсулина из микросфер *in vitro*

Была исследована кинетика высвобождения белка из хитозановых микросфер в фосфатно-солевой буфер при pH 7,4 (рис.3.66-3.69, 3.71, 3.72). Показано, что высвобождение основного количества включенного белка происходит за 24 часа.

Установлено, что с уменьшением содержания воды в исходной системе от 80% до 20% масс. снижается скорость выделения инсулина, при этом процент первоначального высвобождения белка падает от 95% до 61% (рис.3.66).

Высвобождение лекарственного вещества из микросфер может протекать по двум механизмам: за счет диффузии молекул протеина или деградации полимерной матрицы [191]. При этом первоначально происходит быстрое высвобождение молекул, адсорбированных на поверхности частиц, и лишь затем – более медленное высвобождение биологически активного вещества, включенного внутрь микросфер. Таким образом, падение процента первоначального высвобождения инсулина свидетельствует о том, что в процессе включения значительная часть молекул белка диффундирует внутрь полимерной матрицы микросфер, полученных при низкой концентрации водной фазы в системе, тогда как в случае микросфер, полученных на основе

системы с содержанием воды 80% и 70% масс., происходит адсорбция белка на поверхности частиц.

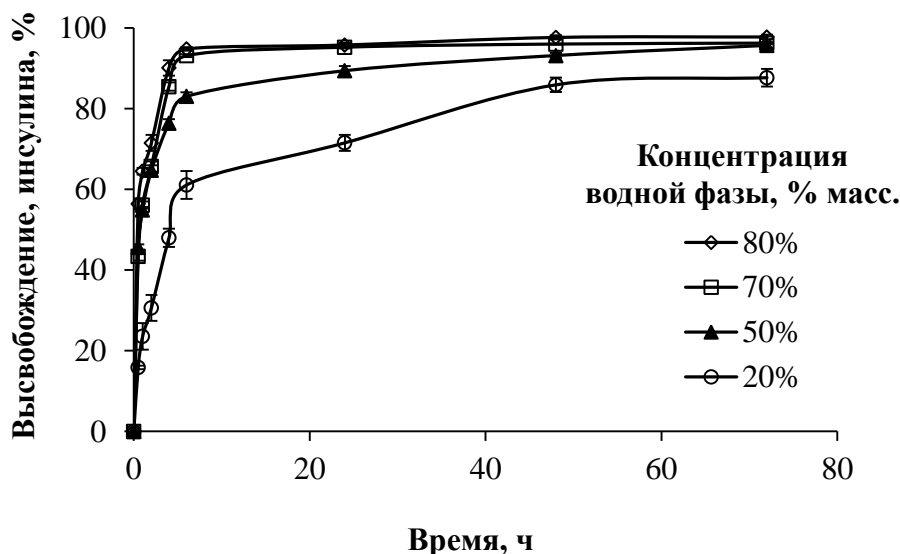


Рисунок 3.66. Высвобождение инсулина из хитозановых микросфер, полученных при разных концентрациях водной фазы в исходной системе (% масс.), в фосфатно-солевой буфер (рН 7,4).

При использовании более высокой концентрации ПАВ (4% масс.), процент первоначального высвобождения возрастает почти до 70%, а при замене ПГ-6-ПР на ПГ-10-ПР – увеличивается до 80% (рис.3.67, 3.68). Поскольку известно, что быстрое первоначальное высвобождение инкапсулируемого вещества является следствием перехода в раствор молекул, расположенных на поверхности частиц [117], то, исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о том, что в процессе включения БАВ в данные образцы большая часть белка остается на поверхности микросфер.

Было показано, что для образцов, полученных на основе ПГ-6-ПР с концентрациями ПАВ в системе 1-3%, процент первоначального высвобождения составляет приблизительно 60%. По всей вероятности, рост процента первоначального высвобождения инсулина, наблюдаемый как при увеличении содержания водной фазы, так и при повышении концентрации ПГ-6-ПР, а также при переходе от ПГ-6-ПР к ПГ-10-ПР, связан со степенью

агрегирования частиц, поскольку в более агрегированных образцах включаемое вещество адсорбируется на поверхности и лишь сравнительно небольшое количество молекул белка проникает внутрь частиц.

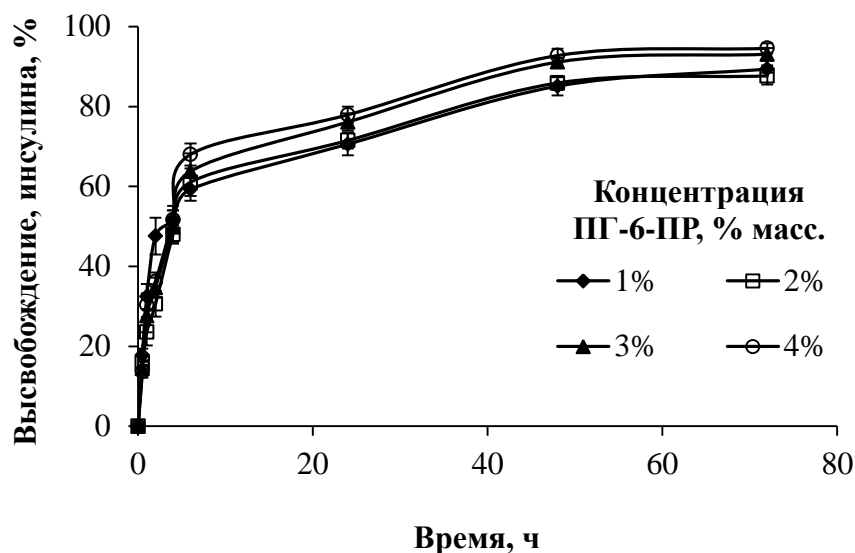


Рисунок 3.67. Высвобождение инсулина из хитозановых микросфер, полученных при разных концентрациях ПГ-6-ПР в исходной системе, в фосфатно-солевой буфер (рН 7,4).

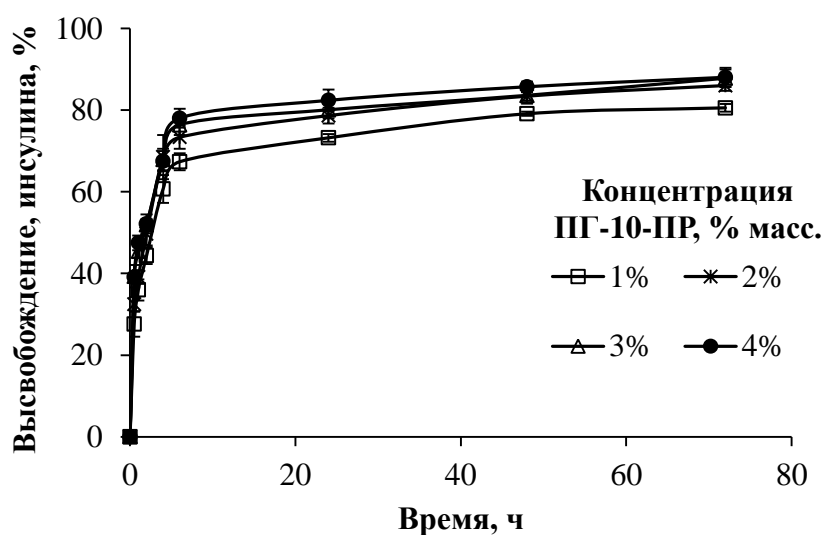


Рисунок 3.68. Высвобождение инсулина из хитозановых микросфер, полученных при разных концентрациях ПГ-10-ПР в исходной системе, в фосфатно-солевой буфер (рН 7,4).

Как показано на рис.3.69, рост концентрации хитозана в системе от 0,05% до 0,2% масс. приводит к уменьшению процента первоначального высвобождения от 85% до 61%. Поскольку в этом диапазоне концентраций хитозана были получены образцы микросфер с приблизительно одинаковыми морфологией и размерами, можно предположить, что в данном случае на процент первоначального высвобождения и скорость высвобождения оказывает влияние степень набухания частиц (рис.3.62).

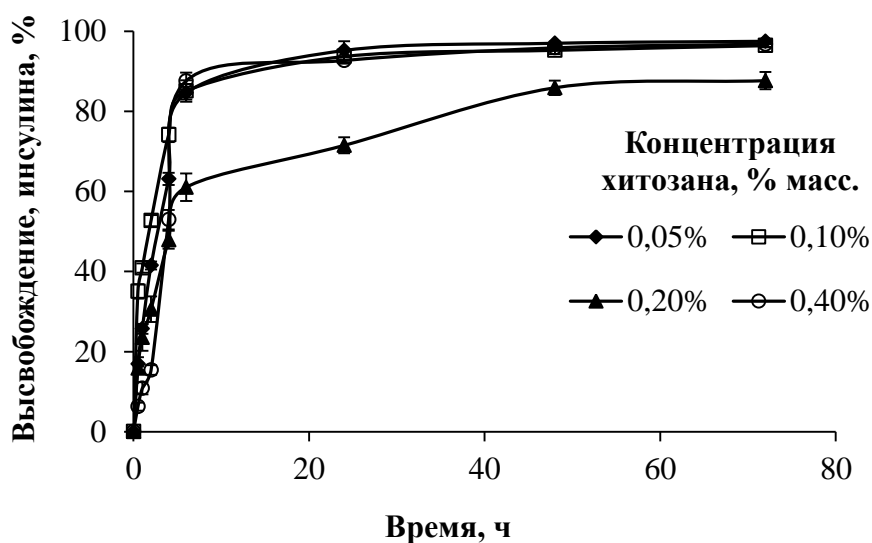


Рисунок 3.69. Высвобождение инсулина из микросфер, полученных при разных концентрациях хитозана в исходной системе, в фосфатно-солевой буфер (pH 7,4).

Высокий процент набухания обеспечивает большую эффективность включения, при этом значительная часть макромолекул инсулина диффундирует внутрь микросфер. Однако низкая степень сшивки полимерной матрицы не позволяет молекулам БАВ удерживаться внутри таких частиц после помещения их в фосфатно-солевой буфер.

Также известно, что в образцах с меньшим содержанием полимера скорость деградации должна увеличиваться, следовательно – возрастать скорость выделения белка [108]. С помощью электронной микроскопии были проведены исследования образцов микросфер, полученных при концентрации

хитозана в системе 0,2% масс., с включенным инсулином, до (рис. 3.70 а, в) и после (рис. 3.70 б, г) выдержки в фосфатно-солевом буфере в течение 150 часов. Из рисунка видно, что в последнем случае образец оказался в значительной степени разрушен.

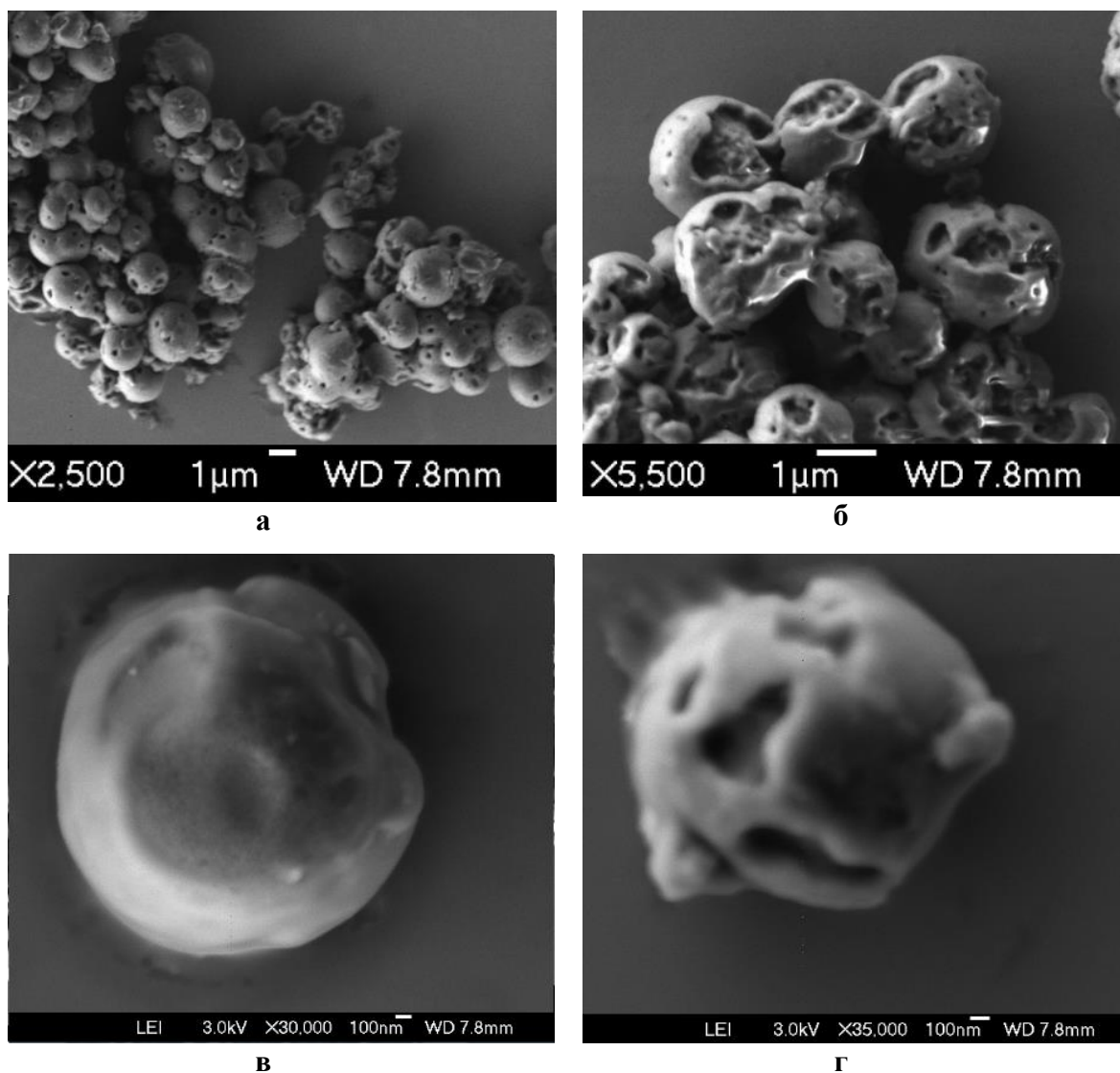


Рисунок 3.70. Микрофотографии образцов микросфер с включенным инсулином, не подверженных деградации (а, в) и выдержанных в фосфатно-солевом буфере в течение 150 часов (б, г), полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа Jeol JSM-6700F.

По всей вероятности, при уменьшении концентрации полимера в системе ниже 0,2% масс., полимерная матрица полученных микросфер оказывается в

большей степени подвержена деградации в фосфатно-солевом буфере, что непосредственно влияет на скорость высвобождения инсулина.

Было установлено, что увеличение концентрации полимера в исходной системе от 0,2% масс. до 0,4% масс. повышает процент первоначального высвобождения от 60% до 88% масс. (рис.3.69). Можно предположить, что это связано с высокой степенью сшивки последнего образца, которая затрудняет диффузию адсорбированного из раствора белка внутрь микросфер и при их последующем помещении в фосфатно-солевой буфер происходит быстрое высвобождение инсулина, адсорбированного на поверхности.

Профили кривых высвобождения инсулина в фосфатно-солевой буфер из образцов микросфер, включение в которые осуществляли из растворов с концентрациями 0,77 – 1,55 г/л, свидетельствуют о различном распределении белка на поверхности частиц и в полимерной матрице (рис.3.71).

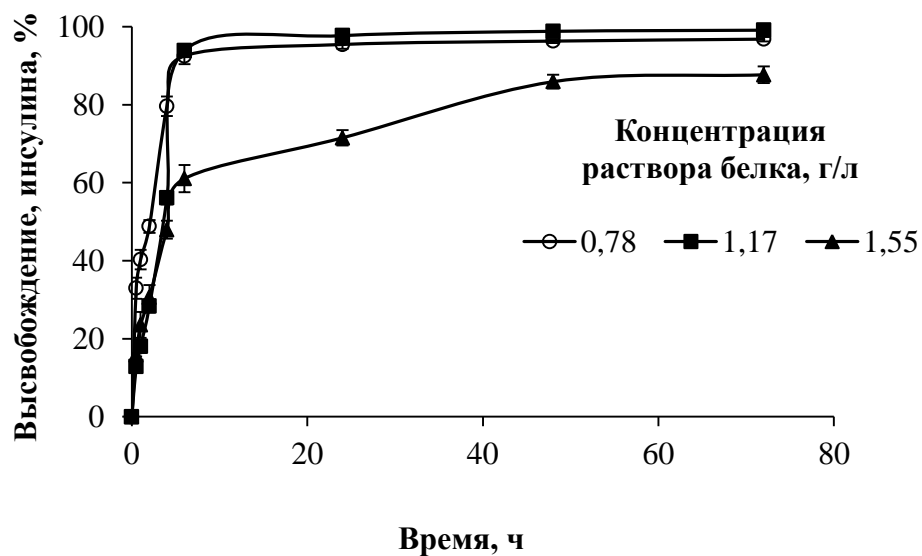


Рисунок 3.71. Высвобождение инсулина из хитозановых микросфер в фосфатно-солевой буфер (pH 7,4). Включение инсулина осуществляли адсорбционным способом из растворов с различной концентрацией белка (г/л).

Как видно из рис.3.71, при повышении концентрации инсулина в растворе, из которого белок адсорбировался на поверхность микросфер, происходит уменьшение скорости его выделения и процента первоначального



высвобождения. Высокая скорость высвобождения инсулина в фосфатно-солевой буфер свидетельствует о том, что молекулы белка из растворов с невысокими концентрациями инсулина (0,77 и 1,17 г/л) не проникали внутрь хитозановых частиц, а преимущественно были адсорбированы на их поверхности. При повышении концентрации раствора белка до 1,55 г/л часть адсорбированного на поверхности инсулина, как можно предположить исходя из результатов исследования, диффундирует внутрь микросфер.

Увеличение времени выдержки микросфер в растворе инсулина от 6 до 48 часов приводит к снижению скорости высвобождения и процента первоначального высвобождения от 90% до 61% (рис.3.72).

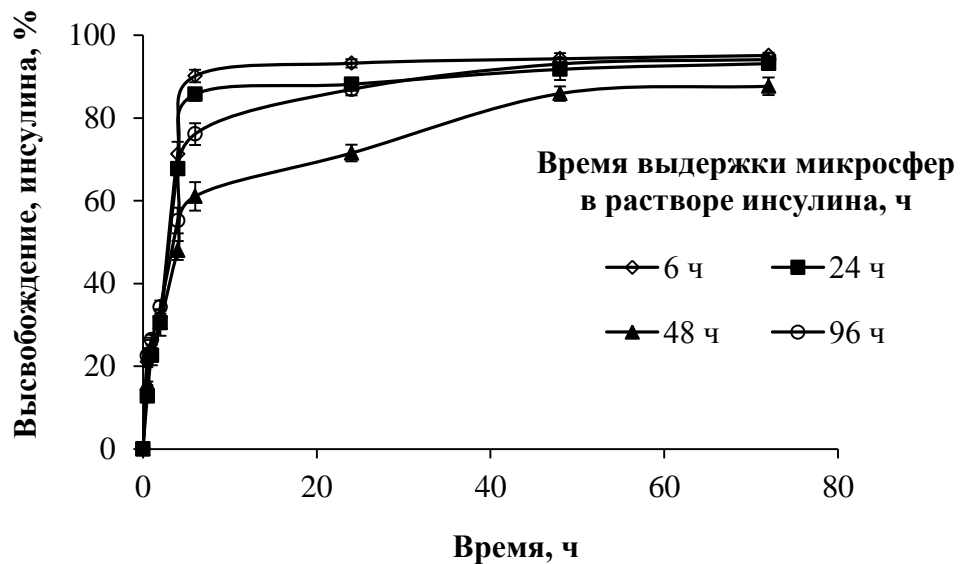


Рисунок 3.72. Высвобождение инсулина из хитозановых микросфер в фосфатно-солевой буфер (рН 7,4). Включение инсулина осуществляли методом сорбции, время выдержки микросфер в растворе инсулина варьировали от 6 до 96 часов.

Это факт свидетельствует о том, что для диффузии молекул белка с поверхности частиц внутрь полимерной матрицы, требуется определенное время и, по всей вероятности, определенная степень насыщения поверхности молекулами белка. Так, за 6 часов выдержки микросфер в растворе инсулина на поверхность частиц было адсорбировано 30% молекул белка из раствора; из

них только 1,5% диффундировали внутрь микросфер. За 24 часа выдержки было адсорбировано около 60% молекул инсулина, из них диффундировали внутрь хитозановой матрицы 5,4%. За 48 часов произошла адсорбция 78% молекул белка из раствора, из которых 31,2% диффундировали внутрь микросфер.

При повышении времени выдержки микросфер в растворе инсулина от 48 до 96 часов процент первоначального высвобождения возрастает от 61% до 76%. По всей вероятности, за 96 часов нахождения в растворе инсулина полимерная матрица микросфер была в значительной степени разрушена. Вследствие этого, после помещения данного образца в фосфатно-солевой буфер в течение первых 6 часов происходит высвобождение не только тех молекул белка, которые были адсорбированы на поверхности частиц, но и включенных в хитозановую матрицу. В этом случае на скорость высвобождения инсулина в первую очередь будет оказывать влияние степень деградации частиц.

Таким образом, комплекс проведенных исследований предоставляет возможность регулировать размеры, устойчивость к агрегации хитозановых микросфер, эффективность включения в них инсулина и скорость выделения БАВ. Помещение хитозановых микросфер с заданными свойствами в капсулы с кислотостойким покрытием позволило бы защитить включенный инсулин от гидролиза под действием кислой среды желудка и обеспечить его контролируемое высвобождение в тонком кишечнике при pH 7,4. При этом мукоадгезивные свойства хитозана должны способствовать адсорбции микросфер на стенках тонкого кишечника и повышать эффективность всасывания препарата.

### 3. ВЫВОДЫ

1. Выявлены закономерности адсорбции ПАВ ряда полиглицерил полирицинолеатов на границе раздела фаз «раствор уксусной кислоты – парафиновое масло». Показано, что ПГ-6-ПР в большей степени снижает межфазное натяжение ( $\sigma_{\min}$  3,6 мН/м) по сравнению с ПГ-10-ПР ( $\sigma_{\min}$  5,4 мН/м), а также обладает меньшим значением ККМ (2,3 и 2,5 моль/м<sup>3</sup>, соответственно), поэтому является более эффективным эмульгатором для получения обратных эмульсий.
2. Установлены закономерности адсорбции смесей ПГПР с полиоксиэтилен(20)сорбитан моноолеатом (Твин 80) на границе раздела фаз «раствор уксусной кислоты – парафиновое масло». На основании рассчитанных значений параметра взаимодействия ПАВ для формирования смешанного монослоя на границе раздела вода – масло  $\beta^{\sigma}$  сделан вывод о наличии межмолекулярного притяжения в адсорбционном слое у смесей полиглицерил-6-полирицинолеата и Твин 80.
3. Исследование зависимости межфазного натяжения от концентрации ПАВ в системах ПАВ – хитозан позволило сделать вывод о том, что на межфазной границе вода/масло происходит образование комплекса между молекулами ПАВ и хитозана.
4. Исследование влияния состава и температуры на положение границ области существования эмульсии и областей расслоения в системе раствор уксусной кислоты/полиглицерил полирицинолеат/парафиновое масло позволило подобрать соотношение водной и масляной фаз (2:8) для получения микросфер наиболее устойчивых к агрегации в процессе их выделения и отмывки, а также обладающих сравнительно небольшими размерами и высокой эффективностью включения БАВ.
5. Изучено влияние адсорбционной способности ПАВ и хитозана на коллоидно-химические характеристики полученных на их основе эмульсий и свойства хитозановых микросфер. Определены условия получения микросфер с регулируемым размером, плотностью сшивки полимерной

матрицы и свободной для адсорбции инсулина поверхностью частиц. Установлены оптимальные в исследуемом диапазоне концентрации ПГ-6-ПР (2% масс.) и хитозана (0,2% масс. в исходной системе (10 г/л в водной фазе)).

6. На основе эмульсий вода – парафиновое масло, стабилизированных ПГПР, получены хитозановые микросферы с размерами 2-4 мкм, способные обеспечивать эффективность включения инсулина до 80% и его высвобождение от 80 до 100% в течение 24 часов.

#### 4. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ЛВ – лекарственное вещество;
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;
- БАВ – биологически активное вещество;
- ПАВ – поверхностно-активное вещество;
- ВПАВ – высокомолекулярное поверхностно-активное вещество;
- ПГПР – полиглицерил полирицинолеат;
- ПЛГА – полилактид-со-гликолид;
- НЧ – наночастицы;
- РНК – рибонуклеиновая кислота;
- ИКД – инсулины короткого действия;
- ИСД – инсулины среднего действия;
- ИДД – инсулины длительного действия;
- ПЭК – полиэлектролитный комплекс;
- БСА – бычий сывороточный альбумин;
- ДЛФО – теория Дерягина — Ландау — Фервея — Овербека;
- ДЭС – двойной электрический слой;
- ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс;
- ККМ – критическая концентрация мицеллообразования.

## 5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Butstraen C., Salaün F. Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan // *Carbohydrate Polymers*. – 2014. – V. 99. – P. 608-616.
2. Joshi A.S., Patil C.C., Shiralashetti S.S., Kalyane N.V. Design, characterization and evaluation of Eudragit microspheres containing glipizide // *Drug Invention Today*. – 2013. – V. 5. – No. 3. – P. 229-234.
3. Elzoghby A.O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research // *Journal of Controlled Release*. – 2013. – V. 172. – No. 3. – P. 1075-1091.
4. Moraes C.M., de Matos A.P., de Paula E., Rosa A.H., Fraceto L.F. Benzocaine loaded biodegradable poly-(d,l-lactide-co-glycolide) nanocapsules: factorial design and characterization // *Materials Science and Engineering: B*. – 2009. – V. 165. – No. 3. – P.243-246.
5. Huang S.-J., Sun S.-L., Feng T.-H., Sung K.-H., Lui W.-L., Wang L.-F. Folate-mediated chondroitin sulfate-Pluronic 127 nanogels as a drug carrier // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2009. – V. 38. – No.1. – P. 64-73.
6. Kim J.H., Li Y., Kim M.S., Kang S.W., Jeong J.H., Lee D.S. Synthesis and evaluation of biotin-conjugated pH-responsive polymeric micelles as drug carriers // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2012. – V. 427. – No. 2. – P. 435-442.
7. Na M., Yiyun C., Tongwen X., Yang D., Xiaomin W., Zhenwei L., Zhichao C., Guanyi H., Yunyu S., Longping W. Dendrimers as potential drug carriers. Part II. Prolonged delivery of ketoprofen by in vitro and in vivo studies // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2006. – V. 41. – No. 5. – P. 670-674.
8. Гельперина С.Э., Швец В.И. Системы доставки лекарственных веществ на основе полимерных наночастиц // *Биотехнология*. – 2009. – Т. 3. – С. 8-13.
9. Kreuter J. Nanoparticles. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* // Eds.: J. Swarbrick, J.C. Boylan. – New York: M. Dekker., USA, 1994. – V. 10. – P. 165-190.
10. Солодовник В.Д. Микрокапсулирование // М: Химия, 1980 – 216 с.

11. Karsa D.R., Stephenson R.A. Chemical aspects of drug delivery systems // London: Royal Chem. Soc., 1996. – 161 p.
12. Соснов А. В., Иванов Р. В., Балакин К. В., Шоболов Д. Л., Федотов Ю. А., Калмыков Ю. М. Разработка систем доставки лекарственных средств с применением микро- и наночастиц // Качественная клиническая практика. – 2008. – Т. 2. – С. 4-12.
13. Алексеев К.В., Грицкова И.А., Кедик С.А. Полимеры для фармацевтической технологии: учебное пособие // Под ред. Кедика С.А. – М.: Изд-во ЗАО «Институт фармацевтических технологий», 2011. – 511 с.
14. Uhrich K.E., Cannizzaro S.M., Langer R.S., Shakesheff K.M.. Polymeric systems for controlled drug release // Chemical Reviews. – 1999. – V. 99. – P. 3181-3198.
15. Кедик С.А., Жаворонок Е.С., Седишев И.П., Панов А.В., Суслов В.В., Петрова Е.А., Сапельников М.Д., Шаталов Д.О., Ерёмин Д.В. Полимеры для систем доставки лекарственных веществ пролонгированного действия (Обзор). Полимеры и сополимеры молочной и гликолевой кислот // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – Т. 2. – No. 3. – С. 18-35.
16. Yedomon B., Fessi H., Charcosset C. Preparation of Bovine Serum Albumin (BSA) nanoparticles by desolvation using a membrane contactor: A new tool for large scale production // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2013. – V. 85. – No. 3. – Pt. A. – P. 398-405.
17. Yuen C.-W. M., Yip J., Liu L., Cheuk K., Kan C.-W., Cheung H.-C., Cheng S.-Y. Chitosan microcapsules loaded with either miconazole nitrate or clotrimazole, prepared via emulsion technique // Carbohydrate Polymers. – 2012. – V. 89. – No. 3. – P. 795-801.
18. Rosiński S., Lewińska D., Wójcik M., Orivec G., Pedraz J.L., Weryński A. Mass transfer characteristics of poly-lysine, poly-ornithine and poly-methylene-co-guanidine membrane coated alginate microcapsules // Journal of Membrane Science. – 2005. – V. 254. – No. 1-2. – P. 249-257.

19. Choi K.Y., Min K.H., Yoon H.Y., Kim K., Park J.H., Kwon I.C., Choi K., Jeong S.Y. PEGylation of hyaluronic acid nanoparticles improves tumor targetability in vivo // *Biomaterials*. – 2011. – V. 32. – No. 7. – P. 1880-1889.
20. Valente J.F.A., Gaspar V.M., Antunes B.P., Coutinho P., Correia I.J. Microencapsulated chitosan–dextran sulfate nanoparticles for controlled delivery of bioactive molecules and cells in bone regeneration // *Polymer*. – 2013. – V. 54. – No.1. – P. 5-15.
21. Uchida T., Nagareya N., Sakakibara S., Konishi Y., Nakai A., Nishikata M., Matsuyama K., Yoshida K. Preparation and characterization of polylactic acid microspheres containing bovine insulin by a w/o/w emulsion solvent evaporation method // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*. – 1997. – V. 45. – No. 9. – P. 1539-1543.
22. Espuelas M.S., Legrand P., Irache J.M., Gamazo C., Orecchioni A.M., Devissaguet J.-Ph., Ygartua P. Poly( $\epsilon$ -caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1997. – V. 158. – No. 1. – P. 19-27.
23. Behera T., Swain P. Antigen adsorbed surface modified poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres stimulates both adaptive and innate immune response in fish // *Vaccine*. – 2012. – V. 30. – No. 35. – P. 5278-5284.
24. Kristmundsdóttir T., Gudmundsson Ó.S., Ingvarsdóttir K. Release of diltiazem from Eudragit microparticles prepared by spray-drying // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1996. – V. 137. – No. 2. – P. 159-165.
25. Yoo J.-W., Giri N., Lee C.H. pH-sensitive Eudragit nanoparticles for mucosal drug delivery // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2011. – V. 403. – No. 1-2. – P. 262-267.
26. Gallardo M., Couarraze G., Denizot B., Treupel L., Couvreur P., Puisieux F. Study of the mechanisms of formation of nanoparticles and nanocapsules of polyisobutyl-2-cyanoacrylate // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1993. – V. 100. – No. 1-3. – P. 55-64.



27. Radwan M. A., Aboul-Enein H. Y. The effect of oral absorption enhancers on the in vivo performance of insulin-loaded poly(ethylcyanoacrylate) nanospheres in diabetic rats // *Journal of Microencapsulation*. – 2002. – V. 19. – No. 2. – P. 225-235.
28. Determan A.S., Trewyn B.G., Lin V.S.-Y., Nilsen-Hamilton M., Narasimhan B. Encapsulation, stabilization, and release of BSA-FITC from polyanhydride microspheres // *J. Controlled Release*. – 2004. – V. 100. – No. 1. – P. 97-109.
29. Zheng C., Xu J., Yao X., Xu J., Qiu L. Polyphosphazene nanoparticles for cytoplasmic release of doxorubicin with improved cytotoxicity against Dox-resistant tumor cells // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2011. – V. 355. – No. 2. – P. 374-382.
30. Xu X.Y., Yu H., Gao S.J., Mao H.-Q., Leong K.W., Wang S. Polyphosphoester microspheres for sustained release of biologically active nerve growth factor // *Biomaterials*. – 2002. – V. 23. – No. 17. – P. 3765-3772.
31. Palamoor M., Jablonski M.M. Synthesis, characterization and in vitro studies of celecoxib-loaded poly(ortho ester) nanoparticles targeted for intraocular drug delivery // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2013. – V. 112. – No. 1. – P. 474-482.
32. Park J.H., Ye M., Park K. Biodegradable Polymers for Microencapsulation of Drugs // *Molecules*. – 2005. – V. 10. – P. 146-161.
33. Чуешов В.И., Чернов М.Ю., Хохлова Л.М. и др. Промышленная технология лекарств // Под ред. Чуешова В.И. – Х: МТК-Книга, Издательство НФАУ, 2002. – Т. 2. – 716 с.
34. Lim L.Y., Wan L.S.C., Thai P.Y. Chitosan Microspheres Prepared by Emulsification and Ionotropic Gelation // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 1997. – V. 23. – No. 10. – P. 981-985.
35. Gupta K.C., Jabrail F.H. Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman // *Carbohydrate Research*. – 2006. – V. 341. – No. 6. – P. 744-756.

36. Zhang Z.-Q., Pan C.-H., Chung D. Tannic acid cross-linked gelatin–gum arabic coacervate microspheres for sustained release of allyl isothiocyanate: Characterization and in vitro release study // *Food Research International*. – 2011. – V. 44. – No. 4. – P. 1000-1007.
37. Quaglia F., De Rosa G., Granata E., Ungaro F., Fattal E., La Rotonda M. I. Feeding liquid, non-ionic surfactant and cyclodextrin affect the properties of insulin-loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by spray-drying // *Journal of Controlled Release*. – 2003. – V. 86. – No. 2-3. – P. 267-278.
38. Судаков К.В. Нормальная физиология // М: Медицинское информационное агентство, 2006. – 920 с.
39. Биохимия: Учеб. для вузов // Под ред. Северина Е.С. – М: ГЭОТАР-Медия, 2003. – 779 с.
40. Патологическая физиология // Под редакцией Зайко Н.Н. и Быця Ю.В. – М. : МЕДпресс информ, 2004. – 640 с.
41. Питерс-Хармел Э., Матур Р. Сахарный диабет: диагностика и лечение // Пер. с англ. Д. Е. Колоды [и др.], ред. пер. Н. А. Федорова. – М.: Практика, 2008. – 496 с.
42. Моругова Т.В. Современная инсулиноterapia // Уфа: Из-во «Здравоохранение Башкортостана», 2000. – 64 с.
43. Машковский М.Д. Лекарственные средства // М.: Новая волна, 2006. – 1206 с.
44. Харкевич Д.А. Фармакология // М: ГЭОТАР-Медия, 2005. – 736 с.
45. Платэ Н.А., Старосельцева Л.К., Валуев Л.И., Сытов Г.А., Ульянова М.В., Валуев И.Л., Ванчугова Л.В. Раствор инсулина для перорального введения // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2006. – Т. 40. – No. 4. - С. 47-50.
46. Sonia T.A., Sharma C.P. Chitosan and its derivatives for drug delivery perspective // *Advances in Polymer Science*. – 2011. – V.243. – P. 23–53.
47. Rani M., Agarwal A., Negi Y. S. Review: Chitosan based hydrogel polymeric beads - As drug delivery system // *BioResources*. – 2010. – V. 5. – No. 4. – P. 2765-2807.

48. Bansal V., Sharma P.K., Sharma N., Pal O.P., Malviya R. Applications of chitosan and chitosan derivatives in drug delivery // *Advances in Biological Research*. – 2011. – V. 5. – No. 1. – P. 28-37.
49. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications.// *Progress in Polymer Science*. – 2006. – V. 31. – P. 603-632.
50. Senel S., McClure S.J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine // *Advanced Drug Delivery*. – 2004. – V. 56. – P. 1467-1480.
51. Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Paños I., Miralles B., Acosta N., Galed G., Heras Á. Functional characterization of chitin and chitosan // *Current Chemical Biology*. – 2009. – V. 3. – P. 203-230.
52. Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications // *Reactive and Functional Polymers*. – 2000. – V. 46. – P. 1-27.
53. Dutta P. K., Dutta J., Tripathi V. S. Chitin and Chitosan: chemistry, properties and applications // *Journal of Scientific and Industrial Research*. – 2004. – V. 63. – No.1. – P.20-31.
54. Sogias I.A., Williams A.C., Khutoryanskiy V.V. Chitosan-based mucoadhesive tablets for oral delivery of ibuprofen // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2012. – V. 436. – No. 1-2. – P. 602-610.
55. Miyazaki S., Nakayama A., Oda M., Takada M., Attwood D. Drug release from oral mucosal adhesive tablets of chitosan and sodium alginate // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1995. – V. 118. – No. 2. – P. 257-263.
56. Huanbutta K., Cheewatanakornkool K., Terad K., Nunthanid J., Sriamornsak P. Impact of salt form and molecular weight of chitosan on swelling and drug release from chitosan matrix tablets // *Carbohydrate Polymers*. – 2013. – V. 97. – No. 1. – P. 26-33.
57. Wu Q.-X., Zhang Q.-L., Lin D.-Q., Yao S.-J. Characterization of novel lactoferrin loaded capsules prepared with polyelectrolyte complexes // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2013. – V. 455. – No. 1-2. – P. 124-131.
58. Park J.-H., Jin H.-E., Kim D.-D., Chung S.-J., Shim W.-S., Shim C.-K. Chitosan microspheres as an alveolar macrophage delivery system of ofloxacin via

- pulmonary inhalation // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2013. – V. 441. – No. 1-2. – P. 562-569.
59. Lacerda L., Parize A.L., Fávere V., Laranjeira M.C., Marghetti, Stulzer H.K. Development and evaluation of pH-sensitive sodium alginate/chitosan microparticles containing the antituberculosis drug rifampicin // *Materials Science and Engineering: C*. – 2014. – V. 39. – No. 1. – P. 161-167.
60. Jose S., Fangueiro J.F., Smitha J., Cinu T.A., Chacko A.J., Premaletha K., Souto E.B. Predictive modeling of insulin release profile from cross-linked chitosan microspheres // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2013. – V. 60. – P. 249-253.
61. Katiyar S., Pandit J., Mondal R.S., Mishra A.K., Chuttani K., Aqil M., Ali A., Sultana Y. In situ gelling dorzolamide loaded chitosan nanoparticles for the treatment of glaucoma // *Carbohydrate Polymers*. – 2014. – V. 102. – P. 117-124.
62. Jana S., Maji N., Nayak A.K., Sen K.K., Basu S.K. Development of chitosan-based nanoparticles through inter-polymeric complexation for oral drug delivery // *Carbohydrate Polymers*. – 2013. – V. 98. – No. 1. – P. 870-876.
63. Abruzzo A., Bigucci F., Cerchiara T., Cruciani F., Vitali B., Luppi B. Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – V. 87. – No. 1. – P. 581-588.
64. Samanta H.S., Ray S. K. Controlled release of tinidazole and theophylline from chitosan based composite hydrogels // *Carbohydrate Polymers*. – 2014. – V. 106. – P. 109-120.
65. Sinha V.R., Singla A.K., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R., Bansal K., Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2004. – V. 274. – No. 1-2. – P. 1-33.
66. Schipper N.G.M., Olsson S., Hoogstraate J.A., De Boer A.G., Varum K.M., Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 2: Mechanism of absorption enhancement // *Pharmaceutical Research*. – 1997. – V. 14. – P. 923-929.

67. Dodane V., Khan M.A., Merwin J.R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1999. – V. 182. – P. 21-32.
68. Kotze A.F., Lueen H.L., De Leeuw B.J., De Boer A.G., Verhoef J.C., Junginger H.E. Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2 // *Journal of Controlled Release*. – 1998. – V. 51. – P. 35-46.
69. He P., Davis S.S., Illum L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1998. – V. 166. – P. 75-88.
70. Dhawan S., Singla A., Sinha V.R. Evaluation mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods // *AAPharmSciTech*. – 2004. – V. 5. – No. 4. – Article 67.
71. Bodmeier R., Oh K.H., Prammar Y. Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 1989. – V. 15. – P. 1475-1494.
72. Ko J.A., Park H.J., Hwang S.J., Park J.B., Lee J.S. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2002. – V. 249. – No. 1-2. – P. 165-174.
73. Shanmuganathan S., Shanumugasundaram N., Adhirajan N., Ramyaa Lakshmi T.S., Babu M. Preparation and characterization of chitosan microspheres for doxycycline delivery // *Carbohydrate Polymers*. – 2008. – V. 73. – P. 201-211.
74. Dambies L., Vincent T., Domard A., Guibal E. Preparation of chitosan gel beads by ionotropic molybdate gelation // *Biomacromolecules*. – 2001. – V. 2. – No. 4. – P. 1198-1205.
75. Wang L., Liu Y., Zhang W., Chen X., Yang T., Ma G. Microspheres and microcapsules for protein delivery: strategies of drug activity retention // *Current Pharmaceutical Design*. – 2013. – V. 19. – P. 6340-6352.
76. Серебровская К.Б. Коацерваты и протоплазма // М.: Химия, 1971. – 147с.

77. Ozbas-Turan S., Akbuga J., Aral C. Controlled release of interleukin-2 from chitosan microspheres // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2002. – V. 91. – P. 1245-1251.
78. Ильина А.В., Губайдуллина А.А., Мелентьев А.И., Варламов В.П. Получение микрочастиц на основе хитозана и исследование их взаимодействия с интерфероном // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2008. – Т. 44. – No. 2. – С. 250-254.
79. Тарасенко Т.А. Межфазные явления при микроэмульсионном инкапсулировании биологически активных веществ // дис. ... канд. хим. наук: 02.00.11. – Москва. – 2005. – 138 с.
80. Schatz C., Bionaz A., Lucas J.-M., Pichot C., Viton C., Domard A., Delai T. Formation of polyelectrolyte complex particles from self-complexation of N-sulfated chitosan // *Biomacromolecules*. – 2005. – V. 6. – P. 1642-1647.
81. Wang X., Zhu K.-X., Zhou H.-M. Immobilization of glucose oxidase in alginate-chitosan microcapsules // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2011. – V. 12. – No. 5. – P. 3042-3054.
82. Wittaya-areekul S., Krueenate J., Prahsarn E.C. Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2006. – V. 312. – P. 113-118.
83. Hari P. R., Chandy T., Sharma C.P. Chitosan/calcium-alginate beads for oral delivery of insulin // *Journal of Applied Polymer Science*. – 1996. – V. 59. – No. 11. – P. 1795-1801.
84. Tiyaboonthai W., Ritthidej G.C. Development of indomethacin sustained release microcapsules using chitosan-carboxymethylcellulose complex coacervation // *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. – 2003. – V. 25. – No. 2. – P. 245-254.
85. Raymond M.C., Neufeld R.J., Poncelet D. Encapsulation of brewers yeast in chitosan coated carrageenan microspheres by emulsification/thermal gelation //

- Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology. – 2004. – V. 32. – No. 2. – P. 275-291.
86. Sakiyama T., Tsutsui T., Masuda E., Imamura K., Nakanishi K. Ionization characteristics of polyelectrolyte complex gels: analysis based on their swelling behaviors // *Macromolecules*. – 2003. – V. 36. – P. 5039-5042.
87. Remunan-Lopez C., Bodmeier R. Effect of formulation and processing variables on the formation of chitosan-gelatin coacervates // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1996. – V. 135. – P. 63-72.
88. Jose S., Fangueiro J.F., Smitha J., Cinu T.A., Chacko A.J., Premaletha K., Souto E.B. Cross-linked chitosan microspheres for oral delivery of insulin: Taguchi design and in vivo testing // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2012. – V. 92. – P. 175– 179.
89. Rajesh R. Dubey, Rajesh H. Parikh. Two-Stage optimization process for formulation of chitosan microspheres // *AAPharmSciTech*. – 2004. V. 5. – No. 1. – Article 5.
90. Yuan Y., Chesnutt B. M., Utturkar G., Haggard W. O., Yang Y., Ong J. L., Bumgardner J. D. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release // *Carbohydrate Polymers*. – 2007. – V. 68. – P. 561-567.
91. Karnchanajindanun J., Srisa-ard M., Baimark Y. Genipin-cross-linked chitosan microspheres prepared by a water-in-oil emulsion solvent diffusion method for protein delivery // *Carbohydrate Polymers*. – 2011. – V. 85. – P. 674–680.
92. Skopa N.B., Calderon F., Levison S.W., Gandhi C.D., Cho C.H. Heparin crosslinked chitosan microspheres for the delivery of neural stem cells and growth factors for central nervous system repair // *Acta Biomaterialia*. – 2013. – V. 9. – No. 6. – P. 6834–6843.
93. Torres M.A., Beppu M.M., Santana C.C. Characterization of chemically modified chitosan microspheres as adsorbents using standard Proteins (bovine serum albumin and lysozyme) // *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. – 2007. – V. 24. – No. 3. – P. 325 – 336.

94. Coelho T.C., Laus R., Mangrich A.S., De Fávère V.T., Laranjeira M.C.M. Effect of heparin coating on epichlorohydrin cross-linked chitosan microspheres on the adsorption of copper (II) ions // *Reactive and Functional Polymers*. – 2007. – V. 67. – No. 5. – P. 468–475.
95. Torres M.A., Vieira R.S., Beppu M., Arruda E.J., Santana C.C. Production of chemically modified chitosan microspheres by a spraying and coagulation method // *Materials Research*. – 2007. – V. 10. – No. 4. – P. 347-352.
96. Peng H., Xiong H., Li J., Xie M., Liu Y., Bai C., Chen L. Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol // *Food Chemistry*. – 2010. – V. 121. – No. 1 – P. 23-28.
97. Gupta K. C., Jabrail F.H. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled release of centchroman // *Carbohydrate Research*. – 2007. – V. 42. – No. 15. – P. 2244-2252.
98. Wang L.-Y., Gu Y.-H., Zhou Q.-Z., Ma G.-H., Wan Y.-H., Su Z.-G. Preparation and characterization of uniform-sized chitosan microspheres containing insulin by membrane emulsification and a two-step solidification process // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2006. – V. 50. – No. 2. – P. 126–135.
99. Kulkarni P.V., Keshavayya J. Chitosan sodium alginate biodegradable interpenetrating polymer network (ipn) beads for delivery of ofloxacin hydrochloride // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2010. – V. 2. – P. 77–82.
100. Rokhade A.P., Shelke N.B., Patil S.A., Aminabhavi T.M. Novel interpenetrating polymer network microspheres of chitosan and methylcellulose for controlled release of theophylline // *Carbohydrate Polymers*. – 2007. – V. 69. – No. 4. – P. 678–687.
101. Orienti I., Aiedeh K., Gianasi E., Bertasi V., Zecchi V. Indomethacin loaded chitosan microspheres. Correlation between the erosion process and release kinetics // *J Microencapsulation*. – 1996. – V. 13. – P. 463-472.



102. Varshosaz J., Alinagari R. Effect of citric acid as cross-linking agent on insulin loaded chitosan microspheres // *Iranian Polymer Journal*. – 2005. – V. 14. – No. 7. – P. 647-656.
103. Takada S., Uda Y., Toguchi H., Ogawa Y. Application of a spray drying technique in the production of TRH-containing injectable sustained-release microparticles of biodegradable polymers // *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. – 1995. – V. 49. – No. 4. – P. 180-184.
104. Shi X.-Y., Tan T.-W. Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of Vitamin D2 // *Biomaterials*. – 2002. – V. 23. – No. 23. – P. 4469–4473.
105. Guerrero S., Teijón C., Muñiz E., Teijón J.M., Blanco M.D. Characterization and in vivo evaluation of ketotifen-loaded chitosan microspheres // *Carbohydrate Polymers*. – 2010. – V. 79. – No. 4. – P. 1006–1013.
106. Muzzarelli C., Stanic V., Gobbi L., Tosi G., Muzzarelli R.A.A. Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and characterisation of the microspheres // *Carbohydrate Polymers*. – 2004. – V. 57. – No. 1. – P. 73–82.
107. He P., Davis S.S., Illum L. Chitosan microspheres prepared by spray drying // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1999. – V. 187. – No. 1. – P. 53-65.
108. Polk A., Amsden B., De Yao K., Peng T., Goosen M.F. Controlled release of albumin from chitosan–alginate microcapsules // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 1994. – V. 83. – No. 2. – P. 178–185.
109. Aiedeh K., Gianasi E., Orienti I., Zecchi V. Chitosan microcapsules as controlled release systems for insulin // *Journal of Microencapsulation*. – 1997. – V. 14. – No. 5. – P. 567–576.
110. Magalhaes G. A., Santos C. M. W., Silva D. A., Maciel J. S., Feitosa J. P. A., Paula H. C. B., De Paula R. C. M. Microspheres of chitosan/carboxymethyl cashew gum (CH/CMCG): Effect of chitosan molar mass and CMCG degree of substitution on the swelling and BSA release // *Carbohydrate Polymers*. – 2009. – V. 77. – No. 2. – P. 217-222.

111. Wang M., Feng Q., Niu X., Tan R., She Z. A spheres-in-sphere structure for improving protein-loading poly (lactide-co-glycolide) microspheres // *Polymer Degradation and Stability*. – 2010. – V. 95. – No. 1. – P. 6-13.
112. Zheng C.-H., Gao J.-Q., Zhang Y.-P., Liang W.-Q. A protein delivery system: biodegradable alginate–chitosan–poly(lactic-co-glycolic acid) composite microspheres // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2004. – V. 323. – No. 4. – P. 1321–1327.
113. S.S., Sharma C.P. Interpolymer complex microparticles based on polymethacrylic acid-chitosan for oral insulin delivery // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2006. – V. 99. – No. 2. – P. 506–512.
114. Hori M., Onishi H., Machida Y. Evaluation of eudragit-coated chitosan microparticles as an oral immune delivery system // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2005. – V. 297 – No. 1-2. – P. 223-234.
115. Wei W., Yuan L., Hu G., Wang L.-Y., Wu J., Hu X., Su Z.-G., Ma G.-H. Monodisperse chitosan microspheres with interesting structures for protein drug delivery // *Advanced Materials*. – 2008. – V. 20. – No. 12. – P. 2292–2296.
116. Cenk A., Julide A. Alternative approach to the preparation of chitosan beads // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1998. – V. 168. – P. 9–15.
117. Ma L., Liu C. Preparation of chitosan microspheres by ionotropic gelation under a high voltage electrostatic field for protein delivery // *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*. – 2010. – V. 75. – No. 2. – P. 448-453.
118. Wu J., Wei W., Wang L., Su Z., Ma G. Preparation of uniform-sized pH-sensitive quaternized chitosan microsphere by combining membrane emulsification technique and thermal-gelation method // *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*. – 2008. – V. 63. – No. 2. – P. 164-175.
119. Liu W., Wu W.D., Selomulya C., Chen X.D. Uniform Chitosan Microparticles Prepared by a Novel Spray-Drying Technique // *International Journal of Chemical Engineering*. – 2011. – V. 2011. – Article ID 267218. – 7 p.
120. Sandri G., Rossi S., Bonferoni M. C. Ferrari F., Zambito Y., Di Colo G., Caramella C. Buccal penetration enhancement properties of *N*-trimethyl chitosan: Influence

- of quaternization degree on absorption of a high molecular weight molecule // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2005. – V. 297 – No. 1-2. – P. 146-155.
121. Hamman J. H., Stander M., Kotze A. F. Effect of the degree of quaternisation of *N*-trimethyl chitosan chloride on absorption enhancement: in vivo evaluation in rat nasal epithelia // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2002. – V. 232 – No. 1-2. – P. 235-242.
122. Thanou M., Florea B.I., Langemeyer M.W., Verhoef J.C., Junginger H.E. *N*-trimethylated chitosan chloride (TMC) improves the intestinal permeation of the peptide drug busserelin in vitro (Caco-2 cells) and in vivo (rats) // *Pharmaceutical Research*. – 2000. – V. 17. – No. 1. – P. 27-31.
123. Адамсон А. Физическая химия поверхностей // Пер. с англ. Абидора И.Г., под ред. Зорина З.М. и др. – М.: Мир, 1979. – 568 с.
124. Сумм Б.Д. Основы коллоидной химии // М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 240с.
125. Дерягин Б.В., Чураев Н.В., Муллер В.М. Поверхностные силы // М.: Наука, 1985. – 398с.
126. Фридрихсберг Д.А. Курс коллоидной химии //Л.: Химия, 1984. – 368с.
127. Зонтаг Г., Штрэнге К. Коагуляция и устойчивость дисперсных систем // Пер. с нем. и редакция Усъярова О.Г. – Л.: «Химия», 1973. – с.152.
128. Фролов Ю.Г. Курс коллоидной химии. Поверхностные явления и дисперсные системы // М.: Химия, 1988. – 464с.
129. И. И. Краснюк, Г. В. Михайлова, Е.Т.Чижова. Фармацевтическая технология. Технология лекарственных форм // Под ред. И. И. Краснюка и Г. В. Михайловой. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 464 с.
130. Strickley R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations // *Pharmaceutical Research*. – 2004. – V. 21. – No. 2. – P. 201-230.
131. Saha T.K., Ichikawa H., Fukumori Y. Gadolinium diethylenetriaminopentaacetic acid-loaded chitosan microspheres for gadolinium neutron-capture therapy // *Carbohydrate Research*. – 2006. – V. 341. – No. 17. – P. 2835-2841.

132. Akamatsu K., Ikeuchi Y., Nakao A., Nakao S. Size-controlled and monodisperse enzyme-encapsulated chitosan microspheres developed by the SPG membrane emulsification technique // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2012. – V. 371. – P. 46–51.
133. Wang L.-Y., Gu Y.-H., Su Z.-G., Ma G.-H. Preparation and improvement of release behavior of chitosan microspheres containing insulin // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2006. – V. 311. – No. 1-2. – P. 187–195.
134. Wei W., Ma G.-H., Wang L.-Y., Wu J., Su Z.-G. Hollow quaternized chitosan microspheres increase the therapeutic effect of orally administered insulin // *Acta Biomaterialia*. – 2010. – V. 6. – No. 1. – P. 205–209.
135. Pepic I., Filipovic-Grcic J., Jalsenjak I. Bulk Properties of Nonionic Surfactant and Chitosan Mixtures // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2009. – V. 336. – No. 1-3. – P. 135-141.
136. El-Gibaly I. Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2002. – V. 249. – No. 1-2. – P. 7-21.
137. Ivanov I.B., Ananthapadmanabhan K.P., Lips A. Adsorption and structure of the adsorbed layer of ionic surfactants // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2006. – V. 123–126. – P. 189–212.
138. Diamant H., Andelman D. Kinetics of surfactant adsorption at fluid/fluid interfaces: non-ionic surfactants // *Europhysics Letters*. – 1996. – V. 34. – No. 8. – P. 575-580.
139. Деркач С.Р., Зотова К.В. Реология пищевых эмульсий // *Вестник МГТУ*. – 2012. – Т. 15. – No. 1. – С. 84-95.
140. Kim J.-W., Lee D., Shum H.C., Weitz D.A. Colloid Surfactants for Emulsion Stabilization // *Advanced Materials*. – 2008. – V. 20. – P. 3239–3243.
141. Ballmann C., Mueller B.W. Stabilizing effect of cetostearyl alcohol and glyceryl monostearate as co-emulsifiers on hydrocarbon-free O/W glyceride creams // *Pharmaceutical Development and Technology*. – 2008. – V. 13. – No. 5. – P. 433-445.

142. Воюцкий С.С. Курс коллоидной химии // М.: Химия, 1975. – 512с.
143. Вережников В.Н. Избранные главы коллоидной химии // Воронеж: Издательско-полиграфический центр ВГУ, 2011. – 188с.
144. Поверхностно-активные вещества и композиции. Справочник // Под ред. Плетнева М.Ю. – М.: ООО «Фирма Клавель», 2002. – 714 с.
145. Rosen M.J. Surfactants and interfacial phenomena // Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience, 2004. – 444 p.
146. Rosen M. J., Hua X. Y. Surface concentrations and molecular interactions in binary mixtures of surfactants // Journal of Colloid and Interface Science. – 1982. – V. 86. – No. 1. – P. 164-172.
147. Holland H.M., Rubigh D.N. Mixed Surfactant Systems. ACS Symp. 50. // Washington: American Chemical Society. – 1992. – P. 491.
148. Rosen, M. J., Zhu Z. H. Synergism in binary mixtures of surfactants: 10. Negative synergism in surface tension reduction effectiveness // Journal of Colloid and Interface Science. – 1989. – V. 133. – No. 2. – P. 473-478.
149. Goralczyk, D., Hac K., Wydro P. Surface properties of the binary mixed systems of alkylpyridinium halides and sodium alkylsulfonates // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2003. – V. 220. – No. 1-3. – P. 55.
150. Соболева О.А., Кривобокова М.В. Смешанные мицеллы и адсорбционные слои неионогенного поверхностно – активного вещества с катионным (мономерным и димерным) // Вестник Московского Университета. Серия 2. – 2004. – Т. 45. – No. 5. – С. 344-349.
151. Zhang Y., Lam Y. M. Study of mixed micelles and interaction parameters for polymeric nonionic and normal surfactants// Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2006. – V.6. – P. 1-5.
152. Холмберг К., Йенссон Б., Кронберг Б., Линдман Б. Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах // Пер. с англ. Ямпольской Г.П., под ред. Сумма Б.Д. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. – 528 с.
153. Handbook of surface and colloid chemistry // Ed.: Birdi K.S. – Boca Raton: CRC Press, 2009. – 756 p.

154. Sato T., Ruch R. Stabilization of colloidal dispersion by polymer adsorption // New York: Marcel Dekker, 1980.
155. Измайлова В.Н., Ребиндер П.А. Структурообразование в белковых системах // М.: Наука, 1974. – 268с.
156. Чернышева Ю.В. Полимерные системы на основе биосовместимых полиэфиров и производных сополи(акрил)метакрилатов для микрокапсулирования биологически активных соединений // дис. ... канд. хим. наук: 02.00.06. – Москва. – 2003. – 143 с.
157. Babak V.G., Baros F., Boulanouar O., Frank Boury, Michel Fromm, Kildeeva N.R., Ubrich N., Maincen P. Impact of bulk and surface properties of some biocompatible hydrophobic polymers on the stability of methylene chloride-in-water mini-emulsions used to prepare nanoparticles by emulsification–solvent evaporation // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2007. – V. 59. – No. 2. – P. 194-207.
158. Calero N., Muños J., Cox P.W., Heuer A., Guerro A. Influence of chitosan concentration on the stability, microstructure and rheological properties of O/W emulsions formulated with high-oleic sunflower oil and potato protein // Food Hydrocolloids. – 2013. – V.30. – No. 1. – P.152-162.
159. Klinkesorn U., Namatsila Y. Influence of chitosan and NaCl on physicochemical properties of low-acid tuna oil-in-water emulsions stabilized by non-ionic surfactant // Food hydrocolloids. – 2009. – V.23. – No. 5. – P. 1374-1380.
160. Speiciene V., Guilmineau F., Kulozik U., Leskauskaite D. The effect of chitosan on the properties of emulsions stabilized by whey proteins // Food Chemistry. – 2007. – V.102. – No. 4. – P. 1048-1054.
161. Rodriguez M.S., Albertengo L.A., Agullo E. Emulsification capacity of chitosan // Carbohydrate polymers. – 2002. – V. 48. – No. 3. – P. 271-276.
162. Alpbaz M., Bilgesu A., Tutkun O. The measurement of interfacial tension by drop-weight method // Communications de la Faculté des Sciences de l'Université d'Ankara. – 1988. – Serier B. – V. 34. – P.103-112.

163. ГОСТ 29188.3-91 Изделия косметические. Методы определения стабильности эмульсий.
164. Северс Э. Т. Реология полимеров // Пер. с англ. Блюменталья М.Г., под ред. Малкина А.Я. – М.: Химия, 1966. — 200 с.
165. Степанов Л.П., Чесноков Н.А. Тр. ВНИИМ Современное состояние техники измерения вязкости // М.: Стандартгиз, 1959.
166. Коллоидная химия поверхностно-активных веществ и полимеров: практикум по технологии косметических средств // Под ред. В. Е. Кима, и А. С. Гродского. - М.: Топ-Книга, 2003. -144 с.
167. М. А. Краюхина, Н. А. Самойлова, А. С. Ерофеев, И. А. Ямсков. Комплексообразование хитозана с сополимерами малеиновой кислоты // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2010. – Т. 52. – No. 3. – С. 394-402.
168. Лабораторные работы и задачи по коллоидной химии // Под ред. Фролова Ю.Г., Гродского А.С., М.: «Химия», 1986. – 216 с.
169. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. – 1976. – V.72. – P. 248-254.
170. Murtaza G., Ahmad M., Khan S. A., Hussain I. Evaluation of cefixime-loaded chitosan microspheres: analysis of dissolution data using DDSolver // Dissolution Technologies. – 2012. – V. 5. – P. 13-19.
171. Pawlik A., Cox P.W., Norton I.T. Food grade duplex emulsions designed and stabilized with different osmotic pressures // Journal of colloid and interface science. – 2010. – V.352. – P.59-67.
172. Marquez A.L., Medrano A., Panizzolo L.A., Wagner J.R. Effect of calcium salt and surfactant concentration on stability of water-in-oil (w/o) emulsions prepared with polyglycerol polyricinoleate // Journal of colloid and interface science. – 2010. – Vol.341. – P.101-108.
173. Gülseren I., Corredig M. Interactions at the interface between hydrophobic and gidrophilic emulsifiers: Polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and milk proteins,

- studied by drop shape tensiometer // *Food Hydrocolloids*. – 2012. – Vol.29. – P.193-198.
174. Hargreaves A.E. Chemical formulation: an overview of surfactant based chemical preparations used in everyday life // Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003. – 180 p.
175. Хитин и Хитозан. Получение, свойства и применение // Под ред. Скрыбина К.Г., Вихоревой Г.А., Варламова В.П. – М.: Наука, 2002. – 368 с.
176. Перминов П.А. Закономерности взаимодействия хитозана с глутаровым альдегидом и их использование при получении ферментсодержащих полимерных материалов // дис. ... канд. хим. наук: 02.00.06. – Москва. – 2007. – 152 с.
177. Payet L., Terentjev E.M. Emulsification and stabilization mechanisms of O/W emulsions in the presence of chitosan // *Langmuir*. – 2008. – V. 24. – P. 12247-12252.
178. Ринодо М., Кильдеева Н. Р., Бабак В. Г. ПАВ-полиэлектролитные комплексы на основе производных хитина // *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева)*. – 2008. – Т. LII. – No. 1. – С.84-90.
179. Watthanaphanit A., Supaphol P., Furuike T., Tokura S., Tamura H., Rujiravanit R. Novel chitosan-spotted alginate fibers from wet-spinning of alginate solutions containing emulsified chitosan-citrate complex and their characterization // *Biomacromolecules*. – 2009. – Vol. 10. – No. 2. – P. 320-327.
180. Химическая энциклопедия: В 5 т. // редкол.: Кнунянц И.Л. (гл. ред.) и др., М.: Сов. энцикл., Даффа – Меди, 1990. – Т.2. – 671 с.
181. Щукин Е.А., Перцов А.В., Амелина Е.А. Коллоидная химия // М.: Высш. школа, 2004. – 445 с.
182. Королева М.Ю., Леошкевич И.О., Юртов Е.В. Флокуляция капель внутренней фазы в обратных эмульсиях: эксперимент и математическое моделирование // *Коллоидный журнал*. – 2011. – Т. 73. – No. 1. – С. 50-56.



183. Reynolds P.A., Gilbert E.P. White J.W. High internal phase water-in-oil emulsion studied by small-angle neutron scattering // *Journal of Physical Chemistry B.* – 2000. – V. 104. – P. 7012-7022.
184. Урьев Н.Б., Потанин А.А. *Текучесть суспензий и порошков* // М.: Химия, 1992. – 256 с.
185. Большаков И.Н., Сизых А.Г., Сурков Е.В., Дуреева Н.С., Шунтиков А.В. Электронные и колебательные спектры хитозана // *Хитин и хитозан. Материалы VIII Международной конференции.* — Казань, 2006. — С. 86-89.
186. Mitra T., Sailakshmi G., Gnanamani A., Mandal A. B. Preparation and characterization of malonic acid cross-linked chitosan and collagen 3D scaffolds: an approach on non-covalent interactions // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* – 2012. – V. 23. – P. 1309-1321.
187. Sarmiento B., Ferreira D., Veiga F., Ribeiro A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies // *Carbohydrate Polymer.* – 2006. – V. 66. – P. 1-7.
188. Sailakshmi G., Mitra T., Chatterjee S., Gnanamani A. Engineering chitosan using  $\alpha$ ,  $\omega$ -dicarboxylic acids — an approach to improve the mechanical strength and thermal stability // *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology.* – 2013. – V. 4. – P. 151-164.
189. Jingling S., Jianmin W., Weihua S., Zhishen J. Chitosan microspheres as immobilized dye affinity support for catalase adsorption // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2005. – V. 37 – No. 1-2. – P. 42-46.
190. Zhang J., Zhang Z., Song Y., Cai H. Bovine serum albumin (BSA) adsorption with Cibacron Blue F3GA attached chitosan microspheres // *Reactive & Functional Polymers.* – 2006. – V. 66. – P. 916–923.
191. Zhou Sh., Deng X., Li X. Investigation on a novel core coated microspheres protein delivery system // *Journal of Controlled Release.* – 2001. – V. 75. – P. 27-36.

## 6. ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. – Гистограммы распределения по размерам капель обратных эмульсий, полученных на основе систем с различным соотношением водной и масляной фаз.

Соотношение водной и масляной фаз*	Массовое распределение $\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм) – r (мкм)																																					
	Капли эмульсии в/м	Микросферы																																				
8:2	<table border="1"> <caption>Estimated data for 8:2 Emulsion Droplets</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>2,5</td></tr> <tr><td>3,1</td><td>11,5</td></tr> <tr><td>4,4</td><td>39,5</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>8,5</td></tr> <tr><td>6,9</td><td>8,5</td></tr> <tr><td>8,1</td><td>6,5</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	0,5	1,9	2,5	3,1	11,5	4,4	39,5	5,6	8,5	6,9	8,5	8,1	6,5	<table border="1"> <caption>Estimated data for 8:2 Microspheres</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>48,5</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>30,5</td></tr> <tr><td>3,1</td><td>0</td></tr> <tr><td>4,4</td><td>0</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>0</td></tr> <tr><td>6,9</td><td>0</td></tr> <tr><td>8,1</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	48,5	1,9	30,5	3,1	0	4,4	0	5,6	0	6,9	0	8,1	0				
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																					
0,63	0,5																																					
1,9	2,5																																					
3,1	11,5																																					
4,4	39,5																																					
5,6	8,5																																					
6,9	8,5																																					
8,1	6,5																																					
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																					
0,63	48,5																																					
1,9	30,5																																					
3,1	0																																					
4,4	0																																					
5,6	0																																					
6,9	0																																					
8,1	0																																					
7:3	<table border="1"> <caption>Estimated data for 7:3 Emulsion Droplets</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>1,5</td></tr> <tr><td>3,1</td><td>5,5</td></tr> <tr><td>4,4</td><td>14,5</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>19,5</td></tr> <tr><td>6,9</td><td>17,5</td></tr> <tr><td>8,1</td><td>10,5</td></tr> <tr><td>9,4</td><td>4,5</td></tr> <tr><td>10,6</td><td>5,5</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	0,5	1,9	1,5	3,1	5,5	4,4	14,5	5,6	19,5	6,9	17,5	8,1	10,5	9,4	4,5	10,6	5,5	<table border="1"> <caption>Estimated data for 7:3 Microspheres</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>5,5</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>72,5</td></tr> <tr><td>3,1</td><td>0</td></tr> <tr><td>4,4</td><td>0</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>0</td></tr> <tr><td>6,9</td><td>0</td></tr> <tr><td>8,1</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	5,5	1,9	72,5	3,1	0	4,4	0	5,6	0	6,9	0	8,1	0
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																					
0,63	0,5																																					
1,9	1,5																																					
3,1	5,5																																					
4,4	14,5																																					
5,6	19,5																																					
6,9	17,5																																					
8,1	10,5																																					
9,4	4,5																																					
10,6	5,5																																					
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																					
0,63	5,5																																					
1,9	72,5																																					
3,1	0																																					
4,4	0																																					
5,6	0																																					
6,9	0																																					
8,1	0																																					
1:1	<table border="1"> <caption>Estimated data for 1:1 Emulsion Droplets</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>2,5</td></tr> <tr><td>3,1</td><td>7,5</td></tr> <tr><td>4,4</td><td>14,5</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>18,5</td></tr> <tr><td>6,9</td><td>15,5</td></tr> <tr><td>8,1</td><td>13,5</td></tr> <tr><td>9,4</td><td>3,5</td></tr> <tr><td>10,6</td><td>4,5</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	0,5	1,9	2,5	3,1	7,5	4,4	14,5	5,6	18,5	6,9	15,5	8,1	13,5	9,4	3,5	10,6	4,5	<table border="1"> <caption>Estimated data for 1:1 Microspheres</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>5,5</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>72,5</td></tr> <tr><td>3,1</td><td>0</td></tr> <tr><td>4,4</td><td>0</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>0</td></tr> <tr><td>6,9</td><td>0</td></tr> <tr><td>8,1</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	5,5	1,9	72,5	3,1	0	4,4	0	5,6	0	6,9	0	8,1	0
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																					
0,63	0,5																																					
1,9	2,5																																					
3,1	7,5																																					
4,4	14,5																																					
5,6	18,5																																					
6,9	15,5																																					
8,1	13,5																																					
9,4	3,5																																					
10,6	4,5																																					
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																					
0,63	5,5																																					
1,9	72,5																																					
3,1	0																																					
4,4	0																																					
5,6	0																																					
6,9	0																																					
8,1	0																																					
2:8	<table border="1"> <caption>Estimated data for 2:8 Emulsion Droplets</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>1,5</td></tr> <tr><td>3,1</td><td>4,5</td></tr> <tr><td>4,4</td><td>11,5</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>11,5</td></tr> <tr><td>6,9</td><td>21,5</td></tr> <tr><td>8,1</td><td>9,5</td></tr> <tr><td>9,4</td><td>14,5</td></tr> <tr><td>10,6</td><td>5,5</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	0,5	1,9	1,5	3,1	4,5	4,4	11,5	5,6	11,5	6,9	21,5	8,1	9,5	9,4	14,5	10,6	5,5	<table border="1"> <caption>Estimated data for 2:8 Microspheres</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>4,5</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>67,5</td></tr> <tr><td>3,1</td><td>6,5</td></tr> <tr><td>4,4</td><td>0</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>0</td></tr> <tr><td>6,9</td><td>0</td></tr> <tr><td>8,1</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	4,5	1,9	67,5	3,1	6,5	4,4	0	5,6	0	6,9	0	8,1	0
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																					
0,63	0,5																																					
1,9	1,5																																					
3,1	4,5																																					
4,4	11,5																																					
5,6	11,5																																					
6,9	21,5																																					
8,1	9,5																																					
9,4	14,5																																					
10,6	5,5																																					
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																					
0,63	4,5																																					
1,9	67,5																																					
3,1	6,5																																					
4,4	0																																					
5,6	0																																					
6,9	0																																					
8,1	0																																					

\*в исходной системе

Таблица 2. – Гистограммы распределения по размерам капель обратных эмульсий, полученных на основе систем с различным содержанием ПАВ (соотношение вода/масло в исходной системе 2:8).

Содержание ПГ-6-ПР *, % масс.	Массовое распределение $\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм) – r (мкм)																																	
	Капли эмульсии в/м	Микросферы																																
1,0	<table border="1"> <caption>Estimated data for 1.0% surfactant content (Droplets)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>1,26</td><td>1,5</td></tr> <tr><td>2,52</td><td>3,5</td></tr> <tr><td>3,78</td><td>3,5</td></tr> <tr><td>5,04</td><td>7,5</td></tr> <tr><td>6,30</td><td>12,0</td></tr> <tr><td>7,56</td><td>4,0</td></tr> <tr><td>8,82</td><td>12,0</td></tr> <tr><td>10,08</td><td>8,0</td></tr> <tr><td>11,34</td><td>21,5</td></tr> <tr><td>12,60</td><td>14,0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	0,5	1,26	1,5	2,52	3,5	3,78	3,5	5,04	7,5	6,30	12,0	7,56	4,0	8,82	12,0	10,08	8,0	11,34	21,5	12,60	14,0	<table border="1"> <caption>Estimated data for 1.0% surfactant content (Microspheres)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>2,0</td></tr> <tr><td>1,26</td><td>36,0</td></tr> <tr><td>2,52</td><td>40,0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	2,0	1,26	36,0	2,52	40,0
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																	
0,63	0,5																																	
1,26	1,5																																	
2,52	3,5																																	
3,78	3,5																																	
5,04	7,5																																	
6,30	12,0																																	
7,56	4,0																																	
8,82	12,0																																	
10,08	8,0																																	
11,34	21,5																																	
12,60	14,0																																	
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																	
0,63	2,0																																	
1,26	36,0																																	
2,52	40,0																																	
2,0	<table border="1"> <caption>Estimated data for 2.0% surfactant content (Droplets)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>1,26</td><td>1,5</td></tr> <tr><td>2,52</td><td>5,0</td></tr> <tr><td>3,78</td><td>12,0</td></tr> <tr><td>5,04</td><td>12,0</td></tr> <tr><td>6,30</td><td>21,5</td></tr> <tr><td>7,56</td><td>9,5</td></tr> <tr><td>8,82</td><td>14,5</td></tr> <tr><td>10,08</td><td>5,0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	0,5	1,26	1,5	2,52	5,0	3,78	12,0	5,04	12,0	6,30	21,5	7,56	9,5	8,82	14,5	10,08	5,0	<table border="1"> <caption>Estimated data for 2.0% surfactant content (Microspheres)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>2,0</td></tr> <tr><td>1,26</td><td>75,0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	2,0	1,26	75,0						
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																	
0,63	0,5																																	
1,26	1,5																																	
2,52	5,0																																	
3,78	12,0																																	
5,04	12,0																																	
6,30	21,5																																	
7,56	9,5																																	
8,82	14,5																																	
10,08	5,0																																	
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																	
0,63	2,0																																	
1,26	75,0																																	
3,0	<table border="1"> <caption>Estimated data for 3.0% surfactant content (Droplets)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>1,26</td><td>1,5</td></tr> <tr><td>2,52</td><td>9,0</td></tr> <tr><td>3,78</td><td>14,0</td></tr> <tr><td>5,04</td><td>9,0</td></tr> <tr><td>6,30</td><td>11,5</td></tr> <tr><td>7,56</td><td>4,5</td></tr> <tr><td>8,82</td><td>29,0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	0,5	1,26	1,5	2,52	9,0	3,78	14,0	5,04	9,0	6,30	11,5	7,56	4,5	8,82	29,0	<table border="1"> <caption>Estimated data for 3.0% surfactant content (Microspheres)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>10,0</td></tr> <tr><td>1,26</td><td>70,0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	10,0	1,26	70,0								
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																	
0,63	0,5																																	
1,26	1,5																																	
2,52	9,0																																	
3,78	14,0																																	
5,04	9,0																																	
6,30	11,5																																	
7,56	4,5																																	
8,82	29,0																																	
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																	
0,63	10,0																																	
1,26	70,0																																	
4,0	<table border="1"> <caption>Estimated data for 4.0% surfactant content (Droplets)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>1,26</td><td>3,0</td></tr> <tr><td>2,52</td><td>8,5</td></tr> <tr><td>3,78</td><td>10,5</td></tr> <tr><td>5,04</td><td>24,0</td></tr> <tr><td>6,30</td><td>18,5</td></tr> <tr><td>7,56</td><td>8,5</td></tr> <tr><td>8,82</td><td>6,5</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	0,5	1,26	3,0	2,52	8,5	3,78	10,5	5,04	24,0	6,30	18,5	7,56	8,5	8,82	6,5	<table border="1"> <caption>Estimated data for 4.0% surfactant content (Microspheres)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>1,0</td></tr> <tr><td>1,26</td><td>38,0</td></tr> <tr><td>2,52</td><td>32,0</td></tr> <tr><td>3,78</td><td>7,0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	1,0	1,26	38,0	2,52	32,0	3,78	7,0				
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																	
0,63	0,5																																	
1,26	3,0																																	
2,52	8,5																																	
3,78	10,5																																	
5,04	24,0																																	
6,30	18,5																																	
7,56	8,5																																	
8,82	6,5																																	
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																	
0,63	1,0																																	
1,26	38,0																																	
2,52	32,0																																	
3,78	7,0																																	

\*в исходной системе

Таблица 3. – Гистограммы распределения по размерам капель обратных эмульсий, полученных на основе систем с различным содержанием ПАВ (соотношение вода – масло в исходной системе 8:2).

Содержание ПГ-6-ПР*, % масс.	Массовое распределение $\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм) – r (мкм)	Содержание ПГ-6-ПР*, % масс.	Массовое распределение $\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм) – r (мкм)
2,0	<p>радиус частиц, мкм</p>	4,0	<p>радиус частиц, мкм</p>
3,0	<p>радиус частиц, мкм</p>	4,5	<p>радиус частиц, мкм</p>
3,5	<p>радиус частиц, мкм</p>	5,0	<p>радиус частиц, мкм</p>

\*в исходной системе

Таблица 4. – Гистограммы распределения по размерам капель обратных эмульсий, полученных на основе систем с различным содержанием хитозана.

Концентрация хитозана в водной фазе, % масс.	Массовое распределение $\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм) – r (мкм)																																			
	Капли эмульсии в/м	Микросферы																																		
0,25	<table border="1"> <caption>Estimated data for 0.25% chitosan concentration (Droplets)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>5</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>55</td></tr> <tr><td>3,1</td><td>25</td></tr> <tr><td>4,4</td><td>0</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>0</td></tr> <tr><td>6,9</td><td>0</td></tr> <tr><td>8,1</td><td>0</td></tr> <tr><td>9,4</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	5	1,9	55	3,1	25	4,4	0	5,6	0	6,9	0	8,1	0	9,4	0	<table border="1"> <caption>Estimated data for 0.25% chitosan concentration (Microspheres)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>5</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>75</td></tr> <tr><td>3,1</td><td>0</td></tr> <tr><td>4,4</td><td>0</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>0</td></tr> <tr><td>6,9</td><td>0</td></tr> <tr><td>8,1</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	5	1,9	75	3,1	0	4,4	0	5,6	0	6,9	0	8,1	0
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																			
0,63	5																																			
1,9	55																																			
3,1	25																																			
4,4	0																																			
5,6	0																																			
6,9	0																																			
8,1	0																																			
9,4	0																																			
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																			
0,63	5																																			
1,9	75																																			
3,1	0																																			
4,4	0																																			
5,6	0																																			
6,9	0																																			
8,1	0																																			
0,5	<table border="1"> <caption>Estimated data for 0.5% chitosan concentration (Droplets)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,41</td><td>5</td></tr> <tr><td>1,1</td><td>90</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>40</td></tr> <tr><td>2,6</td><td>0</td></tr> <tr><td>3,4</td><td>0</td></tr> <tr><td>4,1</td><td>0</td></tr> <tr><td>4,9</td><td>0</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,41	5	1,1	90	1,9	40	2,6	0	3,4	0	4,1	0	4,9	0	5,6	0	<table border="1"> <caption>Estimated data for 0.5% chitosan concentration (Microspheres)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>55</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>25</td></tr> <tr><td>3,1</td><td>0</td></tr> <tr><td>4,4</td><td>0</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>0</td></tr> <tr><td>6,9</td><td>0</td></tr> <tr><td>8,1</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	55	1,9	25	3,1	0	4,4	0	5,6	0	6,9	0	8,1	0
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																			
0,41	5																																			
1,1	90																																			
1,9	40																																			
2,6	0																																			
3,4	0																																			
4,1	0																																			
4,9	0																																			
5,6	0																																			
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																			
0,63	55																																			
1,9	25																																			
3,1	0																																			
4,4	0																																			
5,6	0																																			
6,9	0																																			
8,1	0																																			
1,0	<table border="1"> <caption>Estimated data for 1.0% chitosan concentration (Droplets)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,41</td><td>5</td></tr> <tr><td>1,1</td><td>90</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>40</td></tr> <tr><td>2,6</td><td>0</td></tr> <tr><td>3,4</td><td>0</td></tr> <tr><td>4,1</td><td>0</td></tr> <tr><td>4,9</td><td>0</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,41	5	1,1	90	1,9	40	2,6	0	3,4	0	4,1	0	4,9	0	5,6	0	<table border="1"> <caption>Estimated data for 1.0% chitosan concentration (Microspheres)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>5</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>70</td></tr> <tr><td>3,1</td><td>5</td></tr> <tr><td>4,4</td><td>0</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>0</td></tr> <tr><td>6,9</td><td>0</td></tr> <tr><td>8,1</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	5	1,9	70	3,1	5	4,4	0	5,6	0	6,9	0	8,1	0
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																			
0,41	5																																			
1,1	90																																			
1,9	40																																			
2,6	0																																			
3,4	0																																			
4,1	0																																			
4,9	0																																			
5,6	0																																			
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																			
0,63	5																																			
1,9	70																																			
3,1	5																																			
4,4	0																																			
5,6	0																																			
6,9	0																																			
8,1	0																																			
2,0	<table border="1"> <caption>Estimated data for 2.0% chitosan concentration (Droplets)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,41</td><td>5</td></tr> <tr><td>1,1</td><td>95</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>40</td></tr> <tr><td>2,6</td><td>0</td></tr> <tr><td>3,4</td><td>0</td></tr> <tr><td>4,1</td><td>0</td></tr> <tr><td>4,9</td><td>0</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,41	5	1,1	95	1,9	40	2,6	0	3,4	0	4,1	0	4,9	0	5,6	0	<table border="1"> <caption>Estimated data for 2.0% chitosan concentration (Microspheres)</caption> <thead> <tr> <th>радиус частиц, мкм</th> <th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,63</td><td>0</td></tr> <tr><td>1,9</td><td>5</td></tr> <tr><td>3,1</td><td>10</td></tr> <tr><td>4,4</td><td>30</td></tr> <tr><td>5,6</td><td>45</td></tr> <tr><td>6,9</td><td>0</td></tr> <tr><td>8,1</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,63	0	1,9	5	3,1	10	4,4	30	5,6	45	6,9	0	8,1	0
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																			
0,41	5																																			
1,1	95																																			
1,9	40																																			
2,6	0																																			
3,4	0																																			
4,1	0																																			
4,9	0																																			
5,6	0																																			
радиус частиц, мкм	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)																																			
0,63	0																																			
1,9	5																																			
3,1	10																																			
4,4	30																																			
5,6	45																																			
6,9	0																																			
8,1	0																																			

Таблица 5. – Гистограммы распределения по размерам капель обратных эмульсий, полученных на основе систем с различным соотношением лимонная кислота:хитозан.

Соотношение лимонная кислота: хитозан	Массовое распределение $\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм) – r (мкм)																													
	Капли эмульсии в/м	Микросферы																												
0	<p>Y-axis: <math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</p> <p>X-axis: радиус частиц, мкм</p> <table border="1"> <tr><th>радиус частиц, мкм</th><td>1,25</td><td>3,75</td><td>6,25</td><td>8,75</td><td>11,25</td></tr> <tr><th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th><td>0,5</td><td>4,5</td><td>10,5</td><td>14,5</td><td>11,5</td></tr> </table>	радиус частиц, мкм	1,25	3,75	6,25	8,75	11,25	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,5	4,5	10,5	14,5	11,5	<p>Y-axis: <math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</p> <p>X-axis: радиус частиц, мкм</p> <table border="1"> <tr><th>радиус частиц, мкм</th><td>1,9</td><td>5</td><td>8,1</td><td>11,3</td><td>14,4</td></tr> <tr><th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th><td>0,5</td><td>6,5</td><td>9,5</td><td>16,5</td><td>0,5</td></tr> </table>	радиус частиц, мкм	1,9	5	8,1	11,3	14,4	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,5	6,5	9,5	16,5	0,5				
радиус частиц, мкм	1,25	3,75	6,25	8,75	11,25																									
$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,5	4,5	10,5	14,5	11,5																									
радиус частиц, мкм	1,9	5	8,1	11,3	14,4																									
$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,5	6,5	9,5	16,5	0,5																									
0,33	<p>Y-axis: <math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</p> <p>X-axis: радиус частиц, мкм</p> <table border="1"> <tr><th>радиус частиц, мкм</th><td>1,25</td><td>3,75</td><td>6,25</td><td>8,75</td><td>11,25</td></tr> <tr><th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th><td>0,5</td><td>16,5</td><td>23,5</td><td>0,5</td><td>0,5</td></tr> </table>	радиус частиц, мкм	1,25	3,75	6,25	8,75	11,25	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,5	16,5	23,5	0,5	0,5	<p>Y-axis: <math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</p> <p>X-axis: радиус частиц, мкм</p> <table border="1"> <tr><th>радиус частиц, мкм</th><td>0,63</td><td>1,9</td><td>3,1</td><td>4,4</td><td>5,6</td><td>6,9</td><td>8,1</td></tr> <tr><th><math>\Delta Q_w/\Delta r</math> (%/мкм)</th><td>5,5</td><td>68,5</td><td>8,5</td><td>0,5</td><td>0,5</td><td>0,5</td><td>0,5</td></tr> </table>	радиус частиц, мкм	0,63	1,9	3,1	4,4	5,6	6,9	8,1	$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	5,5	68,5	8,5	0,5	0,5	0,5	0,5
радиус частиц, мкм	1,25	3,75	6,25	8,75	11,25																									
$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	0,5	16,5	23,5	0,5	0,5																									
радиус частиц, мкм	0,63	1,9	3,1	4,4	5,6	6,9	8,1																							
$\Delta Q_w/\Delta r$ (%/мкм)	5,5	68,5	8,5	0,5	0,5	0,5	0,5																							