

L. Gumeniuk, Ya. Mykhalionok, L. Momot, L. Vretik, A. Burban

COPOLYMER OF BUTYLMETHACRYLATE WITH METHYL-(4-METHACRYLOXY)-BENZOATE AS BASIC MATERIAL OF COMPOSITIONS FOR PHOTSENSITIVE MEMBRANES

A series of poly(butylmethacrylate) samples with different molecular mass was synthesized by free radical polymerization as well as copolymer of butylmethacrylate with methyl-(4-methacryloxy)-benzoate. By the method of IR-spectroscopy it was proven the presence of photoactive methyl-(4-methacryloxy)-benzoate links in the copolymer. It was shown that under the action of UV-illumination a chemical structure of the copolymer was changed due to Fries photorearrangement.

Key words: copolymer of butylmethacrylate, photochemical modification, Fries rearrangement.

Матеріал надійшов 20.01.2013

УДК 544.777

Колесник І. С., Антонюк Н. Г., Бурбан А. Ф.

ПОРІВНЯННЯ МЕТОДІВ МІКРОКАПСУЛЮВАННЯ α -АМІЛАЗИ В АЛЬГІНАТНІ МІКРОКАПСУЛИ

Методами екструзії, мікроемульсійним та «layer-by-layer» одержано мікрокапсули з α -амілазою на основі натрій альгінату. Досліджено кінетику вивільнення ферменту з одержаних мікрокапсул у кислому та нейтральному середовищах.

Ключові слова: мікрокапсулювання, мікроемульсійний метод, метод екструзії, метод «layer-by-layer», натрій альгінат, α -амілаза.

Вступ

За останні роки іммобілізація ферментів набула важливого практичного значення при розробці штучних органів, біосенсорів та систем контрольованої доставки лікарських засобів. Важливим класом біополімерів, які використовуються для іммобілізації ферментів та клітин, є полісахариди, такі як агароза, альгінат, декстран, хітозан тощо. Особливо широке біомедичне застосування, у тому числі і в тканинній інженерії, знайшов альгінат через його біосумісність, нетоксичність та здатність до деструкції в організмі.

Матеріали та методи

Методика мікрокапсулювання α -амілази методом екструзії. Мікрокапсули були сформовані за допомогою екструзії формувальної суміші через шприц з голкою діаметром 0,1 мм.

Готували формувальний 2 % розчин альгінату натрію або суміші полімеру з α -амілазою. Утворену суміш екструзією через шприц по краплях переносили в 0,3 М розчин CaCl_2 , витримували для зшивання протягом години і відділяли фільтрацією. Промиті водою капсули висушували на повітрі за кімнатної температури.

Методика мікрокапсулювання α -амілази методом «layer-by-layer». Для нанесення поліелектролітних шарів було використано метод «layer-by-layer» (рис.1). Для нанесення одного шару 0,1 г альгінатних мікрокапсул, одержаних методом екструзії, занурювали на 15 хв у 20 мл розчину хітозану з концентрацією 0,2 %, а після промивання дистильованою водою - у 20 мл розчину 0,2 % α -амілази, і знову відмивали дистильованою водою. Процедуру повторювали до нанесення потрібної кількості шарів. Потім мікрокапсули відмивали і висушували.

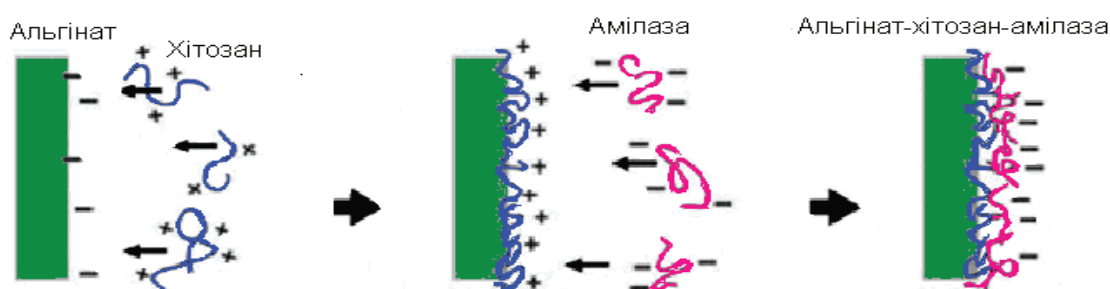


Рис. 1. Схематичне зображення нанесення шарів методом «layer-by-layer»

вали на повітрі за кімнатної температури.

Методика мікрокапсулювання α -амілази мікроемulsійним методом. Розчин суміші альгінату натрію та α -амілази додавали до 150 мл рослинної олії, що містила 2,2 г нейногенної поверхнево-активної речовини Tween-80. Перемішування проводили на механічній мішалці протягом 10 хв при швидкості перемішування 1200 об./хв. Після чого для забезпечення процесу зшивання додавали 30 мл 0,3 М розчину хлориду кальцію. Час подальшого перемішування становив 30 хв. Відстоюювали 1 год для затвердіння мікрокапсул, промивали дистильованою водою та етиловим спиртом, відфільтровували на ультрафільтраційній коміріці непроточного типу Amicon 8200 (Milipore, США) під тиском 3 атм.

Ефективність мікрокапсулювання визначали за відношенням реального вмісту ферменту у капсулах ($C_{\text{практ.}}$) до теоретично можливого ($C_{\text{теор.}}$):

$$E = \frac{C_{\text{практ.}}}{C_{\text{теор.}}} \cdot 100\%.$$

Методика дослідження кінетики вивільнення α -амілази. Для дослідження кінетики вивільнення ферменту 0,1 г сухих мікрокапсул занурювали у розчини з рН 1,8 та 6,8 і через певні відрізки часу відбирали проби. Концентрацію α -амілази вимірювали за допомогою УФ-спектроскопії при довжині хвилі 215 нм.

Активність α -амілази визначали за ступенем конверсії крохмалю. Ступінь конверсії крохмалю (%) розраховували за формулою:

$$\alpha = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \cdot 100,$$

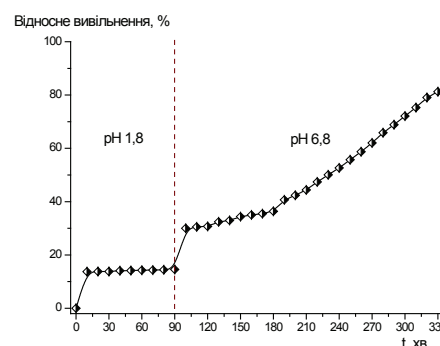
де C_0 – початкова концентрація крохмалю; C_t – концентрація крохмалю у час t .

Аналіз та узагальнення результатів

Мікрокапсулювання α -амілази методом екструзії.

На першому етапі досліджень було одержано альгінатні мікрокапсули матричного типу з α -амілазою. Ефективність капсулювання ферменту становить 59,2 %, що є характерним для мікрокапсул, одержаних методом екструзії. Капсулювання 100 % лікарського засобу є складним завданням, що обумовлено тривалим часом гелеутворення в розчині хлориду кальцію, протягом якого відбувається часткове вимивання водорозчинних ліків з полімерної матриці. Вміст α -амілази в одержаних капсулах дорівнює 118 мг/г капсул.

Дослідження кінетики вивільнення α -амілази з мікрокапсул дозволяє зробити висновок, що одержані мікрокапсули є рН-чутливими, оскільки співвідношення ступеня вивільнення ферменту в нейтральному і кислому середовищі становить 4,6 (рис. 2).

Рис. 2. Кінетика вивільнення α -амілази у кислому та нейтральному середовищах з альгінатних мікрокапсул, одержаних методом екструзії

З кінетичної кривої видно, що за перші 10 хв спостерігається стрімке вивільнення амілази у кислому середовищі, яке у подальшому залишається сталим протягом 90 хв на рівні 14,5 %. Такі кінетичні параметри задовольняють вимогам до систем контрольованого вивільнення лікарських засобів, оскільки втрата білка у середовищі шлунку не перевищує 20 %. При перенесенні мікрокапсул у нейтральне середовище спостерігаємо стрибкоподібну залежність вивільнення лікарського

засобу від часу, оскільки збільшується ступінь набрякання альгінатної матриці мікрокапсул. Через 3 години спостерігаємо зміну кута нахилу кінетичної кривої, що свідчить про збільшення швидкості вивільнення амілази. Це можна пояснити руйнуванням зв'язків альгінату натрію з кальцієм за наявності більш сильного комплексоутворювача у розчині – фосфат-іонів. Отже, фермент вивільнятиметься до повного розчинення мікрокапсул.

Активність вивільненої α -амілази досліджували за ступенем конверсії крохмалю і порівнювали з активністю нативного ферменту (рис. 3).

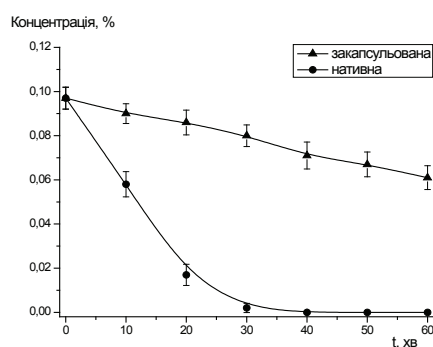


Рис. 3. Кінетика конверсії крохмалю нативною α -амілазою та після введення у мікрокапсули, одержані методом екструзії

Для порівняння активності ферменту розраховували ступінь конверсії крохмалю за 30 хв. Для нативної амілази при концентрації ферменту 0,118 % це значення становить 98%, тоді як для амілази після капсулювання – 17,5 %. Отже, активність ферменту зберігається на 18 %. Варто зауважити, що активність нативної α -амілази при pH 1,8 знижується до 0, оскільки у цих умовах відбувається денатурація ферменту.

Мікрокапсулювання α -амілази мікро-емульсійним методом. Мікроемульсійний метод дозволяє отримувати мікрокапсули із значно меншим розміром, а отже більшою площею поверхні. Ефективність капсулювання α -амілази мікроемульсійним методом становить 82 %, що можна пояснити утворенням щільного шару емульгатора на поверхні капсул. Це значно підвищує ступінь капсулювання порівняно з методом екструзії, однак, призводить до зниження сумарного ступеня вивільнення α -амілази до 60 % (рис. 4). Для цього методу характерне менш рівномірне вивільнення ферменту від часу перебування мікрокапсул у кислому та нейтральному середовищах.

Було також перевірено біокаталітичну актив-

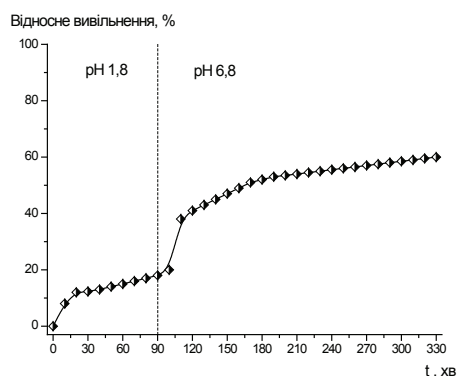


Рис. 4. Кінетика вивільнення α -амілази у кислому та нейтральному середовищах з альгінатних мікрокапсул, одержаних мікроемульсійним методом

ність α -амілази (рис. 5). Ступінь конверсії крохмалю після перебування мікрокапсул у середовищах шлунку та кишківника становив 22 %. Якщо порівнювати отримане значення зі значенням взаємодії крохмалю з нативною амілазою, то побачимо, що після перебування її в кислому середовищі цей фермент був повністю зруйнований.

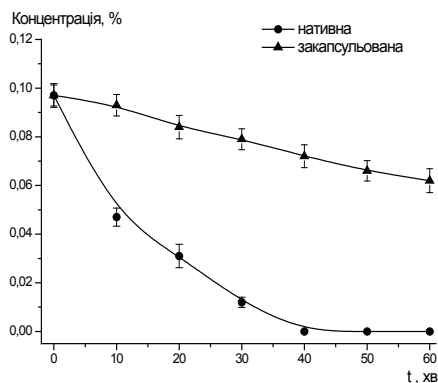


Рис. 5. Кінетика конверсії крохмалю нативною α -амілазою та після введення у мікрокапсули, одержані мікроемульсійним методом

Мікрокапсулювання α -амілази методом «layer-by-layer». На наступному етапі було вирішено ввести фермент не у матрицю полімеру, а у вигляді поліелектролітного шару методом «layer-by-layer». Темплатом слугували альгінатні мікрокапсули без ферменту, одержані методом екструзії. Як позитивно заряджений поліелектроліт використовували хітозан, у той же час амілаза виступала негативно зарядженим поліелектролітом при pH 6,0. Встановлено, що ефективність капсулювання ферменту в цих умовах становить 59,8 %, однак, вміст амілази зменшується до 24 мг/г мікрокапсул.

Дослідивши кінетику вивільнення ферменту,

варто зауважити, що рН чутливість цих капсул збільшується, оскільки співвідношення ступеня вивільнення у нейтральному і кислому середовищах становить 5,5 (рис. 6).

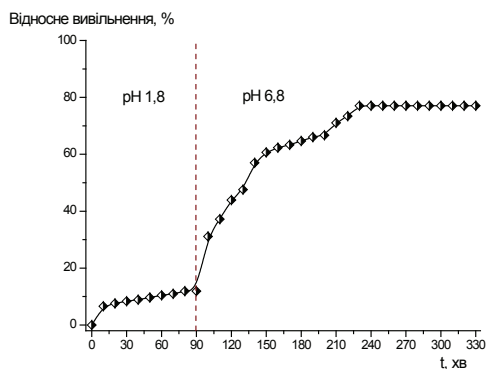


Рис. 6. Кінетика вивільнення α -амілази у кислому та нейтральному середовищах з альгінатних мікрокапсул, модифікованих методом LBL

Після нанесення поліелектролітних шарів ступінь вивільнення ферменту у нейтральному середовищі залишається сталим, однак спостерігається зменшення ступеня вивільнення α -амілази у кислому середовищі. Форма кінетичної кривої у кислому середовищі практично не відрізняється від такої для немодифікованих мікрокапсул. Однак у нейтральному середовищі спостерігається більш швидке вивільнення ферменту, яке через 4 години виходить на плато. Це свідчить, що деяка частина ферменту міцно зв'язується з хітозаном і не може вивільнитися повністю.

Кінетичні криві конверсії крохмалю подібні попереднім (рис. 7).

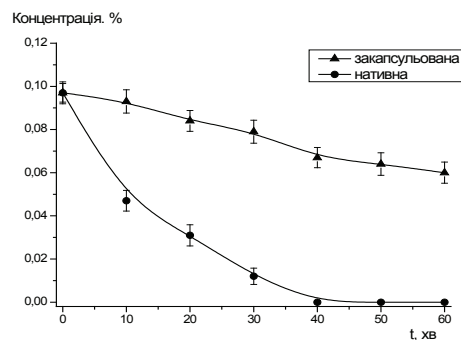


Рис. 7. Кінетика конверсії крохмалю нативною α -амілазою та після нанесення поліелектролітних шарів

Для нативної α -амілази при концентрації ферменту 0,02 % ступінь конверсії крохмалю становить 87,6 %, тоді як для α -амілази після капсулювання — 18,6 %. Отже, активність ферменту зберігається на 21 %.

Процес мікрокапсулювання ферменту дає змогу не тільки отримувати високі показники відносного вивільнення, а й зберігати активність α -амілази після перебування в агресивному середовищі шлунку.

Порівнюючи характеристики та властивості одержаних мікрокапсул, можна сказати, що усі методи придатні для капсулювання білкових засобів при одержанні систем контрольованої доставки (табл. 1).

Отже, ступінь вивільнення при рН 1,8 не перевищує 20 %, що відповідає вимогам до систем контрольованої доставки ліків. Ступінь вивільнення ферменту для мікрокапсул у кислому і нейтральному середовищах практично однаковий для різних методів у межах похибки.

Таблиця 1. Параметри кінетики вивільнення та характеристики мікрокапсул

Метод	Розмір, мкм	Ступінь вивільнення, %			ЕК, %	Вміст білка, мг/г	Збереження активності ферменту, %
		рН 1,8	рН 6,8	Сумарний			
Екструзії	1100	14,6	66,7	81,2	59,2	118	18
Мікро-емульсійний	78	18,1	42,1	60,2	82,0	200	22
«Layer-by-layer»	800	11,9	65,2	77,1	59,8	24	21

Висновки

Під час досліджень було одержано альгінатні рН-чутливі мікрокапсули з α -амілазою за допомогою мікроемульсійного методу та методів екструзії й «layer-by-layer». Досліджено кі-

нетику вивільнення ферменту при рН середовищ шлунку та кишківнику. Показано, що характеристики та властивості одержаних мікрокапсул задовольняють вимогам до систем контрольованого вивільнення лікарських засобів.

COMPARISON OF α -AMYLASE MICROENCAPSULATION IN ALGINATE MICROCAPSULES

Sodium alginate microcapsules with α -amylase were obtained by extrusion, microemulsion and "layer-by-layer" methods. Kinetics of enzyme release from microcapsules in acidic and neutral environments was investigated.

Key words: microencapsulation, microemulsion method, extrusion method, "layer-by-layer" method, sodium alginate, α -amylase.

Матеріал надійшов 20.01.2013

УДК 678.745.3:544.725.7:542.816

Потворова Н. В., Вакулюк П. В., Фуртат І. М., Бурбан А. Ф.

ІММОБІЛІЗАЦІЯ ЙОДУ НА ПОВЕРХНІ МОДИФІКОВАНИХ N-ВІНІЛПІРОЛІДОМ ПОЛІАКРИЛОНІТРІЛЬНИХ МЕМБРАН

*Розроблено методику іммобілізації йоду на поверхню поліакрилонітрильних (ПАН) мембран, попередньо модифікованих УФ-ініційованою прищепленою полімеризацією N-вінілпіролідону до поверхні. Досліджено транспортні, функціональні та антибактеріальні властивості отриманих мембран. Наявність прищепленого полівінілпіролідону (ПВП) підтверджено ІЧ-спектроскопічними дослідженнями та зміною гідрофільності поверхні мембран. Встановлено, що мембрани з отриманим на поверхні комплексом полівінілпіролідон- I_3 характеризуються тривалою бактерицидною дією щодо грамнегативних бактерій *Escherichia coli* HB 101.*

Ключові слова: поліакрилонітрильні мембрани, іммобілізація йоду, УФ-ініційована прищеплена полімеризація, бактерицидна активність.

Вступ

Мембранна технологія широко та успішно застосовується у таких галузях промисловості, як медицина, фармацевтика, водопідготовка, очищення стічних вод, опріснення води. Перевагою згаданої технології є її висока ефективність, простота у використанні, економічність та екологічність [1].

Поліакрилонітрильні (ПАН) мембрани також інтенсивно використовуються у мембранній технології в процесах розділення компонентів та фракціонування завдяки поєднанню механічної міцності, хімічної та фізичної стійкості. Крім того, ПАН мембрани виявляють біосумісність, завдяки чому широко використо-

вуються для гемодіалізу [2].

Тривала експлуатація мембрани та різна природа розчинів, які фільтрують, призводить до колонізації поверхні цих мембран мікроорганізмами. Останні формують на поверхні мембрани біоплівку, яка призводить до зменшення проникності мембран через блокування пор та спричиняє вторинне забруднення очищеної води продуктами метаболізму мікроорганізмів. Тому, для запобігання біоабрудненню поліакрилонітрильних мембран важливим є розроблення методів модифікування їхньої поверхні антибактеріальними реагентами [3].

Антибактеріальною активністю характеризується значна кількість природних та синтетичних сполук, однак тільки деякі з них мо-