

УДК 619:615.37

Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор
Красочко И.А., доктор ветеринарных наук, профессор
Капуцкий Ф.Н., доктор химических наук, профессор*
Зубец О.В., научный сотрудник*
Аладьева Т.А., аспирант*

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», г. Минск

**Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», г. Минск*

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА АДЬЮВАНТОВ И СОРБЕНТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Резюме

Приведены методы оценки параметров качества модифицированных полисахаридов на основе целлюлозы и альгината натрия. Проводили испытания по следующим показателям: определение содержания влаги, определение карбоксильных групп барий-ацетатным методом, анализ на тяжелые металлы, ИК-спектроскопия, определение зольного остатка, фазового состояния, определение сорбционной способности по метиленовому голубому.

Summary

Methods of estimating the parameters of quality of modified polysaccharides cellulose-based and sodium alginate. Tests were carried out on the following indicators: definition of the maintenance of humidity, definition of carboxyl groups barium - an acetate method, the analysis on heavy metals, infrared spectroscopy, definition of the cinderly rest, phase a condition, determination of sorptivity ability on methylene blue.

Поступила в редакцию 02.04.2013 г.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы при конструировании вакцин начали широко применять экологически безопасные адьюванты на основе биополимеров – хитозана, целлюлозы и других полисахаридов растительного происхождения. Их отличает безвредность для организма, высокая биологическая активность и сорбционная емкость.

Особенно перспективным является возможность применения в качестве адьювантов для инактивированных вакцин модифицированной микрокристаллической целлюлозы. Микрокристаллическая целлюлоза применяется достаточно широко в фармацевтической промышленности в качестве добавки, играющей роль наполнителя и загустителя таблеток, капсул, мазей, различных лекарственных средств, а также и в других специальных рецептурах. В то же время микрокристаллическая целлюлоза не содержит ионогенных групп, имеющих

в природных полисахаридах, и в силу этого не проявляет в достаточной степени присущих им положительных качеств: повышенная гидрофильность, гелеобразование, способность химически связывать различные катионы. Однако эти недостатки можно устранить путем отбора и модификации природных полимеров с целью повышения их сорбционных свойств. Для этого имеется возможность применения в качестве сорбента для вакцин (адьюванта) ряда природных полимеров, таких как альгинаты, а также модифицированной микрокристаллической целлюлозы [1].

Поскольку микрокристаллическая целлюлоза не содержит функциональных групп, то она имеет неизбирательную и относительно невысокую сорбционную активность. Напротив, пектины и альгинаты представляют собой природные полиэлектролиты, имеющие в своем составе карбоксильные группы, и по этой причине

являются весьма эффективными сорбентами. Проведение модификации целлюлозы с целью придания ей полиэлектролитных свойств позволит увеличить сорбционную активность и повысить избирательность природного полимера [2]. Поэтому представляется вполне обоснованным использование модифицированных полисахаридов (целлюлозы) для использования их в качестве сорбентов и адьювантов при конструировании вакцин.

Цель настоящих исследований – протестировать разрабатываемые полисахаридные композиции на предмет пригодности для создания на их основе адьювантов и сорбентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали следующие материалы и реагенты: древесная белая целлюлоза (ГОСТ 3914-89), альгинат натрия ТУ-15-544-83, азотная кислота ГОСТ 4461-77 марки «ч.д.а.», соляная кислота ГОСТ 3118-77 марки «х.ч.», уксусная «ледяная» кислота ГОСТ 61-75 марки «х.ч.», гидроксид натрия ГОСТ 4328-77 марки «ч.д.а.», натрий двууглекислый ГОСТ 4201-79 марки «ч».

Для создания готовой формы адьюванта – энтеросорбента – были приготовлены два образца: композиция из природных полимеров, представляющая собой двухкомпонентную систему, состоящую из микрокристаллической целлюлозы и альгината натрия. Один из компонентов – микрокристаллическую целлюлозу – получали по традиционной схеме: гидролизом нативной древесной целлюлозы в кислой среде до порошкового состояния, затем полученный продукт отделяли на полипропиленовом фильтре и тщательно отмывали дистиллированной водой до нейтральной pH промывных вод. После промывки материал высушивали в сушильном шкафу при температуре 105°C в течение 3 – 4 часов. При этом высушенная микрокристаллическая целлюлоза представляла собой неоднородную массу слипшихся при сушке агрегатов частиц. В определенных пропор-

циях данный продукт смешивали с альгинатом натрия (кремовый порошковый продукт, состоящий из чешуек различного размера 1 – 3 мм). Полученную смесь помещали в лабораторную мельницу для размолла твердых материалов «ИКА» и после непродолжительной, но интенсивной обработки получали однородную по цвету и составу порошковую массу.

Второй образец получали совмещением полисахаридных компонентов в водной среде при интенсивном механическом воздействии на систему. Поскольку альгинат натрия хорошо набухает в воде и образует коллоидный вязкий раствор, то его вливали в суспензию микрокристаллической целлюлозы, а затем смесь диспергировали в высокооборотистом лабораторном гомогенизаторе Waring Blender. Приготовленный однородный пастообразный образец помещали на поддон и сушили в сушильном шкафу при температуре 105°C в течение 5 – 6 часов. Затем высушенный материал размалывали в мельнице до получения однородного порошкового продукта. В результате таких операций получали продукт, частицы которого имеют ядро, нерастворимое в воде, но зато покрытое высокомолекулярным компонентом, хорошо набухающим в водной среде и содержащим функциональные группы (карбоксилатные).

Оценку качества полученных композиций проводили по следующим показателям:

- определение содержания влажности;
- определение карбоксильных групп барий-ацетатным методом;
- анализ на тяжелые металлы;
- ИК-спектральный анализ;
- определение зольного остатка;
- фазовое состояние;
- определение сорбционной способности по метиленовому голубому.

Для определения содержания влажности в опытных образцах исследования проводили следующим образом.

Точные навески образцов (1 г) высушивали при температуре 105 – 110°C до постоянной массы в течение 4 – 5 часов,

затем пробы выдерживали в эксикаторе над осушителем P₂O₅. Взвешивали их на аналитических весах и определяли влажность (%) исследуемых образцов по формуле:

$$W = 100\% - \frac{m_1 \times 100\%}{m}, \text{ где} \quad (1)$$

m₁ – масса навески высушенного образца, г;
m – масса навески испытуемого образца, г.

Для определения карбоксильных групп барий-ацетатным методом [3] в коническую колбу (емкостью 100 мл) с пришлифованной пробкой вносили 0,2 г точно взвешенного образца и заливали 50 мл свежеприготовленного раствора Ba(CH₃COO)₂ концентрации 0,2 н. Колбу с содержимым выдерживали 24 часа при комнатной температуре, время от времени встряхивая. Параллельно в тех же условиях ставили холостой опыт. Индикатором при титровании служил фенолфталеин. Расчет карбоксильных групп (масс.%) проводили по формуле:

$$A = \frac{(a - b) \times n \times 45 \times 10 \times V_2}{g \times 100 \times V_a}, \text{ где} \quad (2)$$

n – нормальность щелочи;
g – навеска сухого образца;
V₂ – объем исследуемого раствора (мл);
V_a – объем аликвоты (мл).

Анализ на тяжелые металлы проводили на атомно-эмиссионном спектрометре IRIS Intrepid II XDL DUO. Для количественного определения элементов использовали следующие аналитические линии: Cd (2288 нм), Cr (2677 нм), Fe (2599 нм), Mn (2576 нм), Pb (2203 нм), Co (2286 нм). В качестве эталона использовали ICP multi-element standard solution IV (23 элемента в разбавленной азотной кислоте) 1000 мг/л, производство фирмы Merck, Германия.

ИК-спектры исследуемых образцов получали методами инфракрасной спектроскопии пропускания на спектрофотометрах Specord-75 IR и на ИК-Фурье спектрофотометре Excalibur 3100 (Varian, USA). Прибор позволяет проводить регистрацию ИК-спектров и передачу результатов измерений на ЭВМ, в которой реализуются

процессы математической обработки спектральной информации.

Параметры регистрации ИК-спектров:
– спектральная область: 4000–350 см⁻¹;
– щелевая программа: 4;
– интервал дискретизации: 1 см⁻¹;
– количество сканирований: 20.

Образцы исследуемых веществ для ИК-спектроскопического исследования готовили по методу прессования таблеток с КВг. Тонко измельченные порошкообразные образцы предварительно высушивали в вакуумном сушильном шкафу при температуре 50⁰С, а затем тщательно перемешивали в агатовой ступке с сухим бромистым калием и запрессовывали в таблетки при давлении порядка 8·10⁸Па. Параллельно проводили также запись спектров водорастворимых полимеров, нанесенных и высушенных в виде пленки на подложку KRS-5.

Определение зольного остатка в исследуемых образцах

Образцы высушивали и растирали до порошкообразного состояния, после взвешивания на аналитических весах навески помещали в фарфоровые тигли. Тигли с образцами прокаливали в муфельной печи (SNOL 6,7-1300) с электронным управлением электрического обогрева. Температура прокаливания составляла 800⁰С. По истечении 2-х часов тигли извлекали, оставляли остывать до комнатной температуры в эксикаторе с осушителем, после чего взвешивали на аналитических весах.

Зольность исследуемых образцов определяли по формуле:

$$A = \frac{m_1 \times 100}{m}, \text{ где} \quad (3)$$

m₁ – масса зольного остатка, г;
m – масса навески испытуемого образца, г.

Фазовое состояние образцов оценивали рентгенодифракционным методом. Рентгенограммы объектов исследования записывали на дифрактометре Дрон 2.0 и на дифрактометре HZG-4 (CuK_α-излучение, Ni-фильтр) при скорости

сканирования сцинтилляционного счетчика квантов 1 град/мин. Образцы для съемки в виде плоских дисков одинаковой массы готовили методом холодного прессования.

Для определения сорбционной способности по метиленовому голубому определяли с помощью фотоэлектроколориметра КФК-2УХЛ 4.2 ($\lambda=540$ нм, зеленый светофильтр, чувствительность 2. Для этого навеску препарата массой 0,3 г, в расчете на воздушно-сухой исследуемый материал, заливали 50 мл водного раствора красителя заданной концентрации (от 0,4 до 3,4 г/л). Растворы имели рН = 6. По истечении трех часов (период установления сорбционно-десорбционного равновесия) сорбент отделяли от раствора центрифугированием. Далее проводили необходимое (количественно контролируемое) разбавление раствора и определение его оптической плотности. По предварительно построенному калибровочному графику зависимости оптической плотности раствора от его концентрации определяли равновесную концентрацию метиленового голубого и рассчитывали величину сорбции по формуле:

$$A = \frac{(C_0 - C_r)}{g} V, \text{ где} \quad (4)$$

C_0 – начальная концентрация метиленового голубого (мг/л),

C_r – равновесная концентрация метиленового голубого (мг/л),

V – исследуемый объем (л),

g – навеска сухого вещества (г).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Приготовленные композиты из природных полимеров представляли собой двухкомпонентные системы, состоящие из твердой фазы (микrokристаллическая целлюлоза) и растворимого компонента – альгината натрия. Микrokристаллическая целлюлоза не обладает выраженными ионоселективными свойствами, однако, благодаря порошковой форме она имеет развитую удельную поверхность. С целью увеличения сорбционных свойств данного продукта вводили второй компонент – альгинат натрия, имеющий высокое содержание карбоксильных групп.

При оценке параметров качества разрабатываемых материалов были получены следующие результаты.

На рисунке 1 приведены ИК-спектры микrokристаллической целлюлозы и окисленной микrokристаллической целлюлозы.

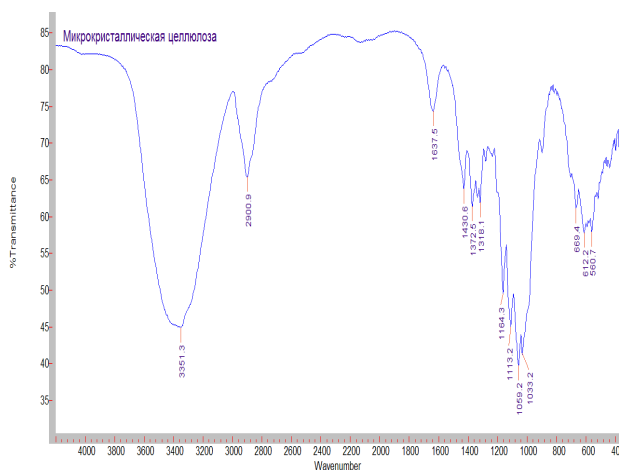


Рисунок 1 – ИК-спектры микrokристаллической целлюлозы

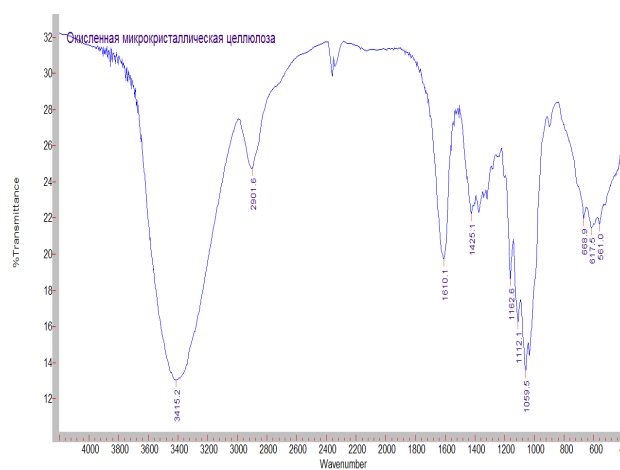


Рисунок 2 – ИК-спектр окисленной микrokристаллической целлюлозы

Содержание карбоксильных групп, определенное химическим методом, составило 4,5%. На зарегистрированной дифрактограмме полученного образца наблюдается структурная организация, присущая нативному полимеру – целлюлозы-I. Об этом свидетельствует положение дифракционных максимумов при углах дифракции $2Q \sim 16$ град. и $2Q \sim 22,6$ град. Сохранение кристаллической фазы свидетельствует о том, что процесс окисления целлюлозы протекает преимущественно на поверхности кристаллитов [4].

Другим источником природных полимеров для приготовления вакцин, на наш взгляд, могут служить водоросли (каррагинан, ламинарин и др.). Они содержат полисахариды, имеющие в своем составе карбоксильные и сульфогруппы, и поэтому отличаются хорошим набуханием в воде и повышенными сорбционными свойствами.

В частности, на нашем на рынке широко представлен альгинат натрия производства Архангельского водорослевого

комбината. Альгинаты широко используются как в пищевой промышленности, так и для медицинских целей в качестве наполнителей, загустителей, имеют высокие сорбционные показатели. В силу того, что альгинаты имеют высокое содержание карбоксильных групп, они могут быть достаточно привлекательным источником для получения адьювантов.

Образец коммерческого альгината натрия проанализировали на содержание карбоксильных групп. Для этого натриевую соль переводили в кислую форму, обрабатывая ее слабым раствором соляной кислоты. После нескольких последовательных операций – обработки природного полимера кислотой и промывки его дистиллированной водой – соль была переведена в Н-форму. Полноту перехода определяли с помощью ИК-спектроскопии. При этом на ИК-спектре исследуемого образца наблюдается смещение максимума пика поглощения из области $\sim 1630 \text{ см}^{-1}$ (карбоксилат-ион) в область $\sim 1730 \text{ см}^{-1}$ (карбоксильная группа), что показано на рисунках 3 и 4 [5].

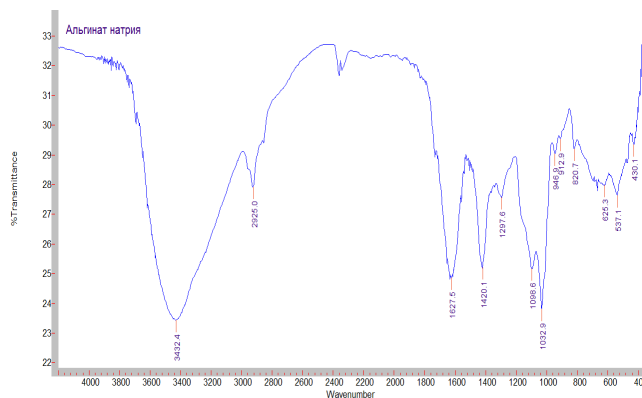


Рисунок 3 – ИК-спектр альгината натрия

В полученной альгиновой кислоте барий-ацетатным методом определили содержание карбоксильных групп. Таким образом, было найдено, что в исследуемом препарате содержится до 24,7% карбоксильных групп. С помощью атомно-эмиссионного анализа было показано, что в сходном материале присутствуют как тяжелые металлы, так и мышьяк. Это связано с

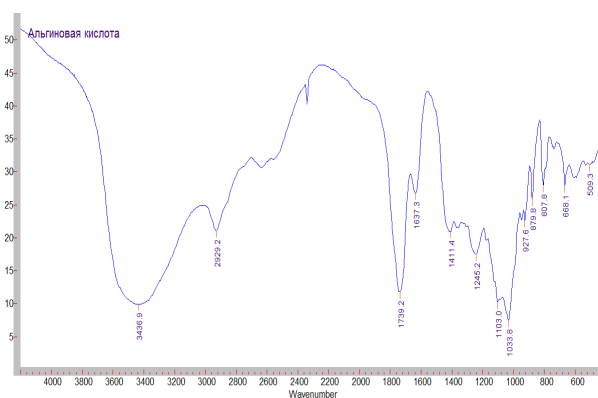


Рисунок 4 – ИК-спектр альгиновой кислоты, полученной из альгината натрия

природой самого продукта, так как в морских продуктах, как известно, зачастую имеется повышенное содержание этих элементов. В результате воздействия разбавленными растворами соляной кислоты и отмывкой дистиллированной водой конечный продукт по содержанию тяжелых металлов соответствует требованиям Фармакопеи Республики Беларусь.

Таким образом, можно получать, как альгиную кислоту, так и ее производные, пригодные для производства адьювантов.

При оценке сорбционной способности в качестве сорбата в работе было выбрано вещество, моделирующее эндогенный токсин, – краситель метиленовый голубой, который сорбируется предположительно по механизму ионного обмена. Результаты сорбции метиленового голубого из его водных растворов образцами представлены в таблице.

Таблица – Оценка сорбционной способности опытных образцов по связыванию метиленового голубого (продолжительность взаимодействия – 3 часа)

Сорбент	Величина сорбции, мг/г
Микрокристаллическая целлюлоза	0,8
Окисленная микрокристаллическая целлюлоза	63,8
Полисахаридная композиция (образец №1)	110,3
Полисахаридная композиция (образец №2)	111,5

Проведенные испытания опытных образцов на способность связывать модельный токсикант – метиленовый голубой – показали, что за 3 часа взаимодействия микрокри-

сталлическая целлюлоза способна связать всего лишь 0,8 мг красителя на грамм препарата, тогда как модифицированный образец имеет величину сорбции 63,8 мг/г, в то время как сорбционная способность приготовленных образцов №1 и №2, являющихся основой адьювантов, более чем на два порядка превосходит таковую микрокристаллической целлюлозы.

Проведенные исследования позволили отобрать полисахаридные материалы и на их основе приготовить композиции, которые оценивали по сорбционной способности связывать патогенные бактерии, вирусы и различные токсины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований по оценке качества адьюванта и энтеросорбента на основе модифицированных полисахаридов были отобраны 2 варианта полисахаридной основы:

1 Полисахаридная основа для адьювантов, приготовленная мокрым диспергированием, состоящая из микрокристаллической целлюлозы – 50% и альгината натрия – 50%;

2 Полисахаридная основа для адьювантов, приготовленная сухим диспергированием, состоящая из микрокристаллической целлюлозы – 50% и альгината натрия – 50%.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Герт, Е.В. Совмещение окислительной и гидролитической функций азотной кислоты при получении энтеросорбентов на основе карбоксилированной микрокристаллической целлюлозы / Е.В. Герт, В.И. Торгашов, О.В. Зубец, Ф.Н. Капуцкий // Химические волокна. – 2005. – №6. – С. 59–62.
- 2 Хотимченко, Ю.С. Полисорбовит / Ю.С. Хотимченко, М.В. Одинцова, В.В. Ковалев. – Томск: изд-во НТЛ. – 2001. – 132 с.
- 3 Контроль производства химических волокон / Под ред. А.Б. Пакшвера, А.А. Конкина. – М.: Химия. – 1967. – 280 с.
- 4 Иоелович, М.Я. Химия делигнификации и целлюлозы / М.Я. Иоелович, Г.П. Веверис; под ред. Г.Ф. Закиса. – Рига: Зинатне. – 1991. – 114 с.
- 5 Ермоленко, И.Н. Спектроскопия в химии окисленных целлюлоз: монография / И.Н. Ермоленко. – Минск: Изд. АН. БССР. – 1959. – 291 с.