



УДК 54.03: 661.12.01/.09

ПОЛУЧЕНИЕ СУБМИКРО- И/ИЛИ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ СУБСТАНЦИИ КАРНОЗИНА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЕЕ СТРУКТУРЫ

М.А. ХАЛИКОВА
Д.А. ФАДЕЕВА
Н.Н. ПОПОВ
Е.Т. ЖИЛЯКОВА
О.О. НОВИКОВ
О.А. ВАНХИН

*Белгородский
 государственный
 национальный
 исследовательский
 университет*

e-mail: khalikova@mail.ru

В статье приведены результаты исследований субстанции карнозина до и после измельчения: исходные частицы карнозина представляют собой продолговатые элементы различной длины с неровной поверхностью, по мере увеличения времени измельчения порошка карнозина меняется и форма его частиц: из продолговатых элементов, характерных для неизмельченных фракций, форма становится пластинчатой при режиме измельчения 15 минут и равноосной для режимов измельчения 30 и 45 минут. Изучено распределение микрочастиц карнозина.

Ключевые слова: карнозин, субмикроструктурирование, микрочастицы.

Введение. В своем докладе за круглым столом, организованным РОСНАНО, «Качественные доклинические исследования в России» руководитель лаборатории лекарственной токсикологии НИИ фармакологии РАМН, член-кор. РАМН А. Дурнев подчеркнул: «Перспектива широкого применения наночастиц в области разработки и производства лекарственных средств требует создания принципиально новых подходов к доклинической оценке безопасности их применения» [1].

Чтобы разработать адекватные подходы к прогнозу риска влияния наночастиц (НЧ) различной природы на здоровье человека, необходимо обязательно изучать фундаментальные закономерности проявления биологических эффектов этих частиц. Исследование наиболее общих закономерностей проявления биологических и токсических эффектов НЧ в зависимости от их формы, размера, исходного материала, площади поверхности, заряда и других физико-химических особенностей строения считается одним из актуальнейших вопросов нанотоксикологии. Не менее важны исследования, определяющие дозы, пути введения и концентрации наночастиц в области органа-мишени, продолжительность их воздействия [2].

Кроме того, особо значимый аспект изучения токсикологии НЧ – оценка возможных отдаленных эффектов, которые не манифестируют в краткосрочной перспективе. Это, прежде всего, влияние на геном, иммунитет, внутриутробное и постнатальное развитие потомства. Сведения по таким вопросам в сегодняшних научных публикациях практически отсутствуют.

Следует констатировать, что до настоящего времени не существует действенной системы оценки безопасности для макроорганизма применяемых в официальной медицине ксенобиотиков с измененными физико-химическими свойствами. Кроме того, чрезвычайно перспективным представляется сам подход к приобретению нового спектра лекарственных агентов за счет существующего набора биологически активных соединений. И это достижимо с помощью методов нанотехнологии и механохимии, о чем свидетельствуют предварительные исследования коллектива [3, 4].

Целью данного фрагмента комплексных целевых исследований измененных физико-химических и фармакологических свойств ряда фармацевтических субстанций явилось получение лабораторного образца субмикро- и/или наноструктурированной субстанции карнозина и экспериментальное подтверждение изменения его структуры.

Для получения субмикроструктурированной субстанции карнозина было необходимо решить несколько текущих задач:

- определить форму и размер частиц субстанции до субмикроструктурирования и после;
- выбрать режим измельчения;



– определить показатели изменения характеристик.

Рабочая гипотеза состояла в том, что процесс субмикроструктурирования приведет к уменьшению частиц исследуемой субстанции, в результате чего могут сформироваться новые технологические и фармакологические свойства карнозина.

Материалы и методы. В работе использовали шаровую вибрационную мельницу МЛ-1 с измельчающими элементами или мельницу Retsch RS200 (результаты измельчения сопоставимы), растровый электронно-ионный микроскоп Quanta 200 3D с увеличением до 10000X (табл. 1) (ЦКП НИУ «БелГУ» «Диагностика структуры и свойств наноматериалов»).

Таблица 1

**Увеличение электронного микроскопа
при изучении субстанции карнозина**

Время измельчения, мин				
0	5	15	30	45
5000X	5000X	5000X	5000X	5000X

Интервалы измельчения выбирались с учетом предварительных экспериментов и их физико-химических свойств: карнозин — вещество, представляющие собой дисперсионную фазу со средним размером 18-22,4 мкм, растворимое в воде; интервалы измельчения — 5, 15, 30 и 45 минут — объясняются тем, что в течение 5-минутного измельчения устанавливалась способность порошков к измельчению, которая не менялась и в течение 10 минут. Далее частицы разукрупнялись и последующий режим измельчения производился с временным «шагом» 15 минут.

Распределение по размерам микрочастиц изучалось с помощью лазерного дифракционного анализатора размера частиц «Analysette 22 NanoТес». В анализаторах, определяющих распределение частиц по размерам посредством лазерной дифракции, используется физический принцип рассеяния электромагнитных волн. Конструкция состоит из лазера, через измерительную ячейку направленного на детектор. При помощи диспергирующего устройства частицы подаются в измерительную ячейку и проходят сквозь лазерный луч. Свет, рассеянный пропорционально размеру частиц, посредством линзы фокусируется на детектор. По распределению рассеянного света при помощи комплексной математики рассчитывают распределение частиц по их размерам. В результате получают объемные доли, соответствующие эквивалентным диаметрам при лазерной дифракции.

Вместе с тем, изучение распределения частиц по размерам проводилось путем анализа фотографий частиц веществ, полученных с помощью растрового электронно-ионного микроскопа Quanta 200 3D. Расчет среднего размера частиц, распределения частиц по размерам и построение гистограмм осуществлялось в программе Microsoft Office Excel 2007.

Микроскопия требует выбора оптимального увеличения, которое строго индивидуально для каждого образца, так как при большем увеличении изображение становится нечетким и малоконтрастным, с пониженной разрешающей способностью; при меньшем увеличении изображение объекта, несмотря на четкость и повышенный контраст, становится настолько мелким, что элементы объекта практически неразличимы. Поэтому для объективного анализа распределения по размерам частиц образцов исследуемых лекарственных веществ были отобраны фотографии, сделанные при таком увеличении микроскопа, которое позволяло по масштабной линейке на снимке без затруднений определить как максимальный, так и минимальный размер частиц исследуемого образца. Увеличение микрофотографий, по которым определялось распределение частиц лекарственных веществ по размерам, представлено в табл. 1.

На рис. 1-10 представлены электронные микрофотографии изучаемых образцов, полученные с помощью электронного микроскопа.

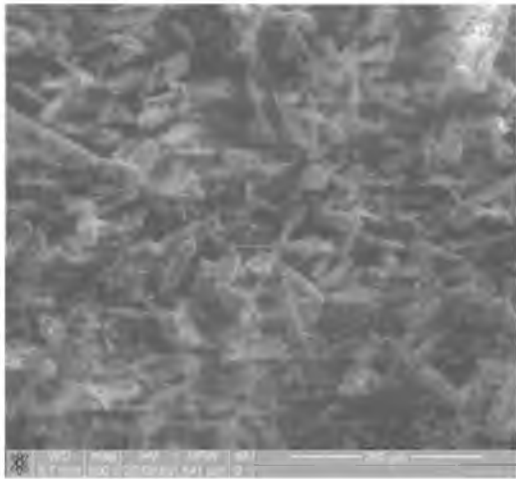


Рис. 1. Микрофотография исходной субстанции карнозина



Рис. 2. Микрофотография исходной субстанции карнозина (крупный план)

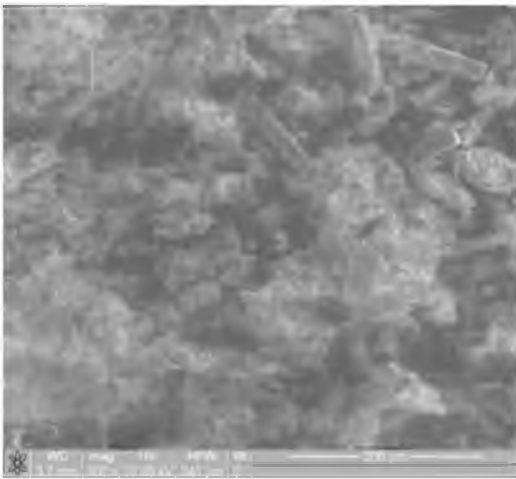


Рис. 3. Микрофотография субстанции карнозина после 5 минут измельчения



Рис. 4. Микрофотография субстанции карнозина после 5 минут измельчения (крупный план)

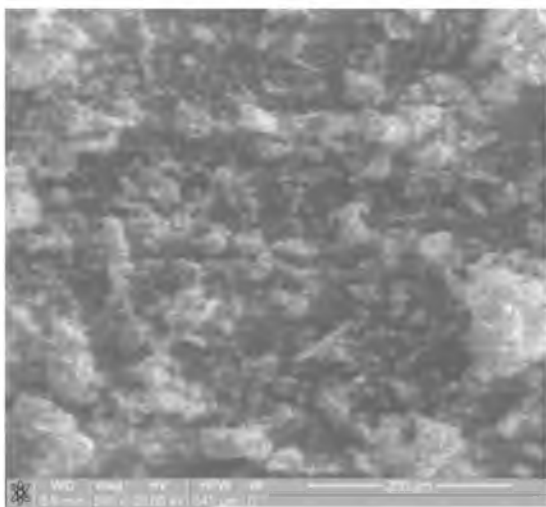


Рис. 5. Микрофотография субстанции карнозина после 15 минут измельчения

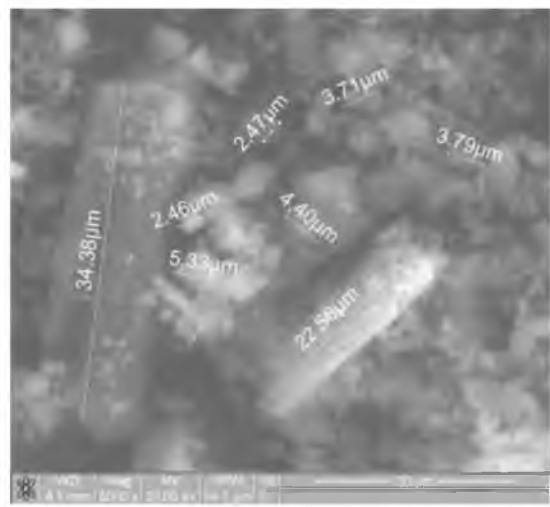


Рис. 6. Микрофотография субстанции карнозина после 15 минут измельчения (крупный план)

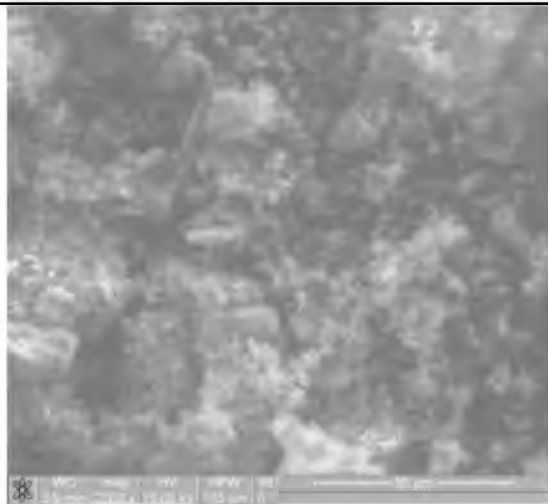


Рис. 7. Микрофотография субстанции карнозина после 30 минут измельчения

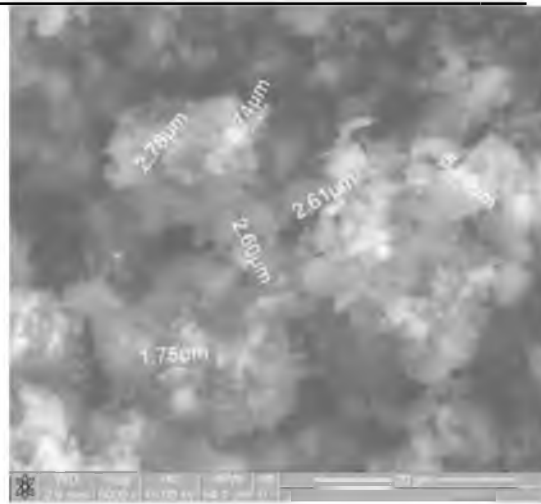


Рис. 8. Микрофотография субстанции карнозина после 30 минут измельчения (крупный план)

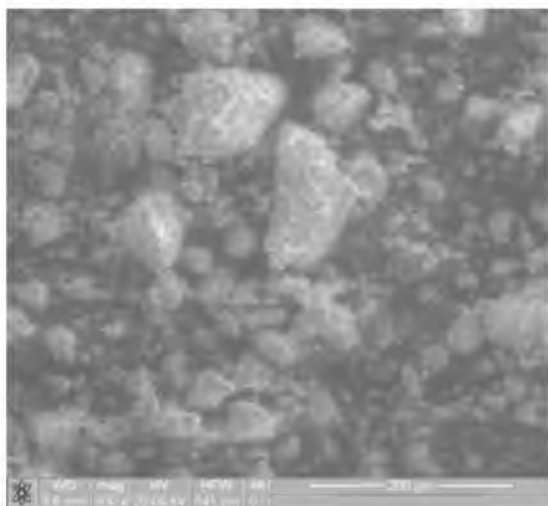


Рис. 9. Микрофотография субстанции карнозина после 45 минут измельчения

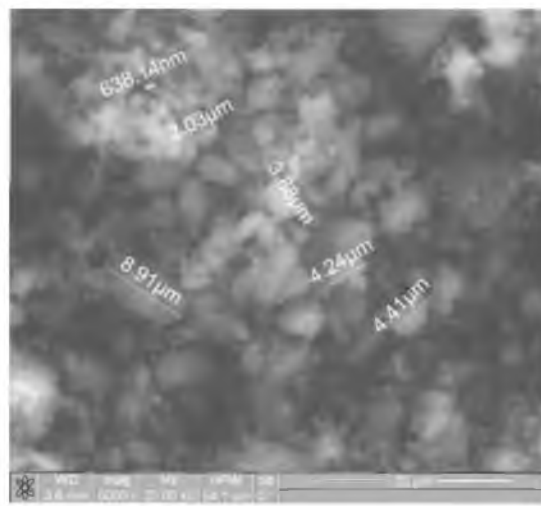


Рис. 10. Микрофотография субстанции карнозина после 45 минут измельчения (крупный план)

Как видно из рис. 1, 2, исходные частицы карнозина представляют собой продолговатые элементы различной длины с неровной поверхностью.

Как видно из микрофотографий рис. 3-10, по мере увеличения времени измельчения порошка карнозина меняется и форма его частиц: из продолговатых элементов, характерных для неизмельченных фракций, форма становится пластинчатой при режиме измельчения 15 минут и равноосной для режимов измельчения 30 и 45 минут.

На рис. 11-15 представлены гистограммы распределения микрочастиц порошка неизмельченного и измельченного карнозина.

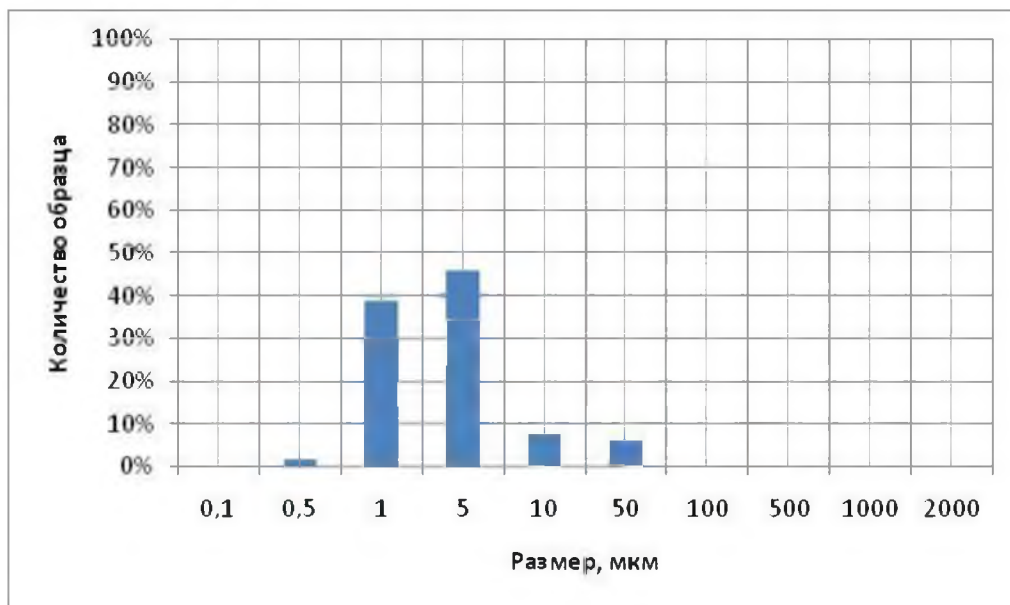


Рис. 11. Распределение по размерам микрочастиц порошка неизмельченного карнозина

Как видно из рис. 11, порошок карнозина неизмельченный состоит в основном из фракций с размером частиц 0,8-1,2 мкм и 3,0-7,0 мкм — 38% и 46% соответственно. Около 2% составляют фракции с размером частиц 0,3-0,8 мкм, а крупных фракций с размером частиц 8,0-12,0 мкм и 35,0-65,0 — 8% и 6% соответственно.

При анализе гистограммы распределения по размерам микрочастиц порошка карнозина, измельченного в течение 5 минут, представленной на рис. 12, установлено, что фракций с размером частиц 0,8-1,2 мкм и 3,0-7,0 мкм — практически поровну по 41%. Однако увеличивается количество более мелкой фракции, около 10% с размером частиц 0,3—0,8 мкм, и уменьшается количество крупных фракций с размером частиц 8,0-12,0 мкм и 35,0-65,0 — 6% и 2 % соответственно. Таким образом, уже в течение 5 минут происходит уменьшение частиц порошка карнозина в целом.

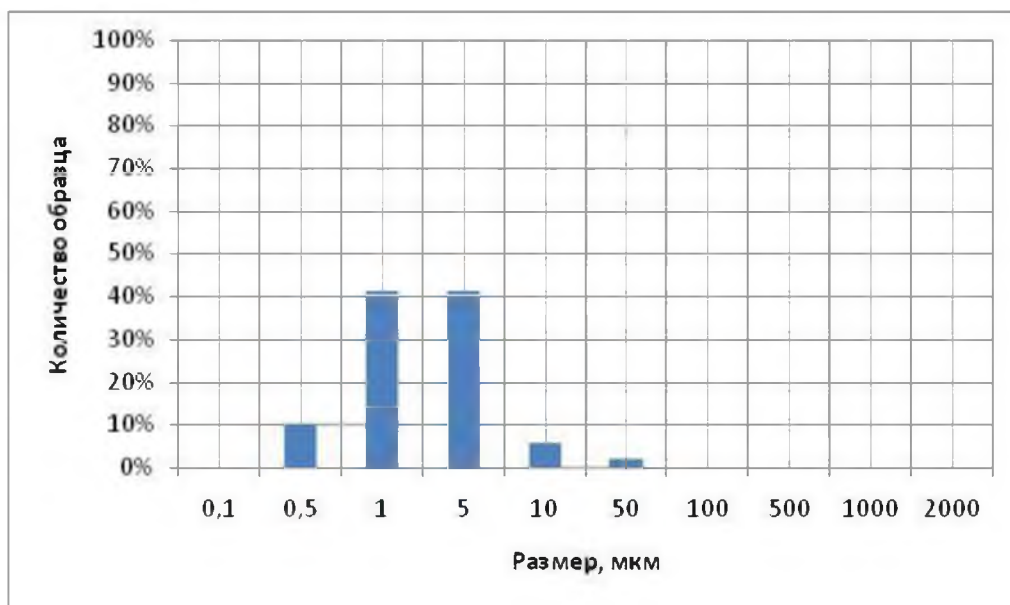


Рис. 12. Распределение по размерам микрочастиц порошка карнозина, измельченного в течение 5 минут

При анализе гистограммы распределения по размерам микрочастиц порошка карнозина, измельченного в течение 15 минут, представленной на рис. 13, установлено, что



количество фракций с размером частиц 0,8-1,2 мкм увеличивается до 48%, а количество частиц фракции с размером 3,0-7,0 мкм постепенно уменьшается до 38%. Также идет постепенное увеличение количества частиц фракции с размером частиц 0,3-0,8 мкм и составляет около 12%, количество крупных фракций с размером частиц 8,0-12,0 мкм и 35,0-65,0 — уменьшается до 1% для обеих фракций. Таким образом, при измельчении в течение 15 минут также наблюдается тенденция к уменьшению размеров частиц порошка карнозина.

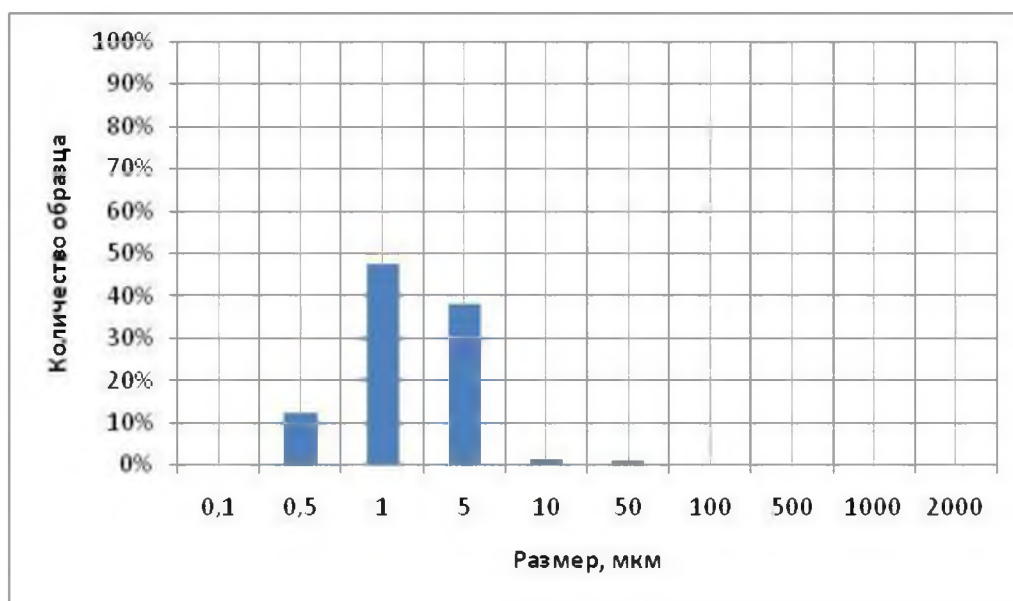


Рис. 13. Распределение по размерам микрочастиц порошка карнозина, измельченного в течение 15 минут

При анализе гистограммы распределения по размерам микрочастиц порошка карнозина, измельченного в течение 30 минут, представленной на рис. 14, установлено, что количество фракций с размером частиц 0,8-1,2 мкм несколько снижается и составляет 38%, а количество частиц фракции с размером 3,0-7,0 мкм постепенно увеличивается до 56%. Также идет постепенное увеличение количества частиц фракции с размером частиц 0,3-0,8 мкм и составляет около 12%, количество крупных фракций с размером частиц 8,0-12,0 мкм и 35,0-65,0 — уменьшается до 1% для обеих фракций. Таким образом, при измельчении порошка карнозина в течение 30 минут также наблюдается тенденция к увеличению числа более мелких фракций.

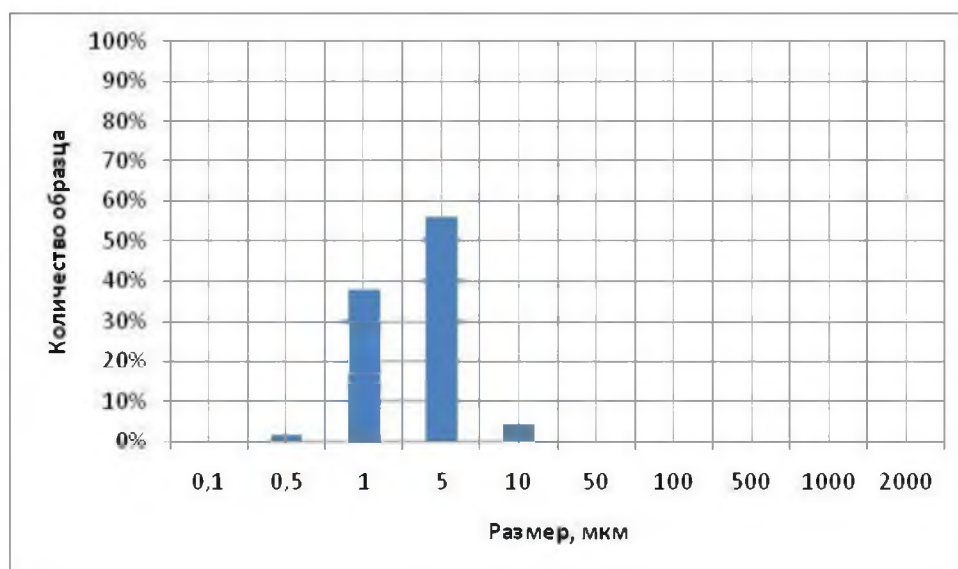


Рис. 14. Распределение по размерам микрочастиц порошка карнозина, измельченного в течение 30 минут



При анализе гистограммы распределения по размерам микрочастиц порошка карнозина, измельченного в течение 45 минут, представленной на рис. 15, установлено, что количество частиц с размером 0,8-1,2 мкм, по сравнению с измельченным порошком в течение 30 минут увеличивается и составляет 51%, а количество частиц фракции с размером 3,0-8,0 мкм постепенно уменьшается до 43%. Также идет постепенное уменьшение количества частиц фракции с размером частиц 0,3-0,8 мкм до 5%, количество крупных фракций с размером частиц 8,0-12,0 мкм остается равным 1%, а наиболее крупная фракция 35,0-65,0 мкм вообще отсутствует. Для наглядности и уточнения динамики измельчения карнозина полученные данные сведены в табл. 5.

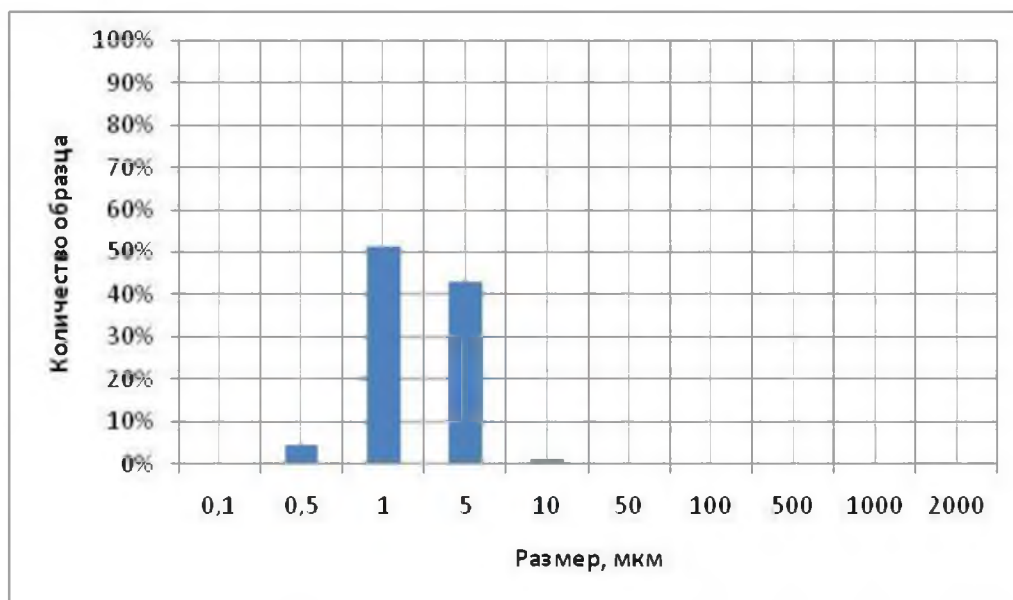


Рис. 15. Распределение по размерам микрочастиц порошка карнозина, измельченного в течение 45 минут

Таблица 2

Динамика изменения размеров частиц порошка карнозина

Время измельчения, мин	Размеры частиц, мкм/% содержания фракции				
	0,3-0,8	0,8-1,2	3,0-8,0	8-12	35-65
Неизмельченный	2	38	46	8	6
5	10	41	41	6	2
15	12	48	38	1	1
30	2	38	56	4	-
45	5	51	43	1	-

Анализируя данные табл. 2, можно сделать вывод о том, что при измельчении порошка карнозина в режиме 15 минут происходит наиболее интенсивное образование частиц мелких фракций с размером от 0,3 до 1,2 мкм, что в сумме составляет 60%. Кроме того, при таком режиме измельчения практически отсутствуют частицы крупных фракций. Поэтому именно этот режим может быть принят за технологичный. Отсутствие стабильной картины при дальнейшем измельчении предварительно можно объяснить тем, что мелкие частицы образуют конгломераты и при продолжении технологического процесса не изменяются в размерах, а только формируют группы.

Заключение. Проведена электронная микроскопия полученных образцов субмикроструктурированной субстанции карнозина. Доказано изменение структуры исходной субстанции карнозина, а именно: исходные частицы карнозина представляют собой продолговатые элементы различной длины с неровной поверхностью, по мере



увеличения времени измельчения порошка карнозина меняется и форма его частиц: из продолговатых элементов, характерных для неизмельченных фракций, форма становится пластинчатой при режиме измельчения 15 минут и равноосной для режимов измельчения 30 и 45 минут.

Изучено распределение микрочастиц исследуемой субстанции. Так, порошок карнозина неизмельченный состоит в основном из фракций с размером частиц 0,8-1,2 мкм и 3,0-7,0 мкм — 38% и 46% соответственно. Около 2% составляют фракции с размером частиц 0,3-0,8 мкм, а крупных фракций с размером частиц 8,0-12,0 мкм и 35,0-65,0 — 8% и 6% соответственно. При анализе гистограммы распределения по размерам микрочастиц порошка карнозина, измельченного в течение 5 минут, установлено, что фракций с размером частиц 0,8-1,2 мкм и 3,0-7,0 мкм — практически поровну по 41%. Однако увеличивается количество более мелкой фракции, около 10% с размером частиц 0,3-0,8 мкм, и уменьшается количество крупных фракций с размером частиц 8,0-12,0 мкм и 35,0-65,0 — 6% и 2% соответственно. Таким образом, уже в течение 5 минут происходит уменьшение частиц порошка карнозина в целом. При анализе гистограммы распределения по размерам микрочастиц порошка карнозина, измельченного в течение 15 минут, установлено, что количество фракций с размером частиц 0,8-1,2 мкм увеличивается до 48%, а количество частиц фракции с размером 3,0-7,0 мкм постепенно уменьшается до 38%. Также идет постепенное увеличение количества частиц фракции с размером частиц 0,3-0,8 мкм и составляет около 12%, количество крупных фракций с размером частиц 8,0-12,0 мкм и 35,0-65,0 уменьшается до 1% для обеих фракций. Таким образом, при измельчении в течение 15 минут также наблюдается тенденция к уменьшению размеров частиц порошка карнозина. При анализе гистограммы распределения по размерам микрочастиц порошка карнозина, измельченного в течение 30 минут, установлено, что количество фракций с размером частиц 0,8-1,2 мкм несколько снижается и составляет 38%, а количество частиц фракции с размером 3,0-7,0 мкм постепенно увеличивается до 56%. Также идет постепенное увеличение количества частиц фракции с размером частиц 0,3-0,8 мкм и составляет около 12%, количество крупных фракций с размером частиц 8,0-12,0 мкм и 35,0-65,0 уменьшается до 1% для обеих фракций. Таким образом, при измельчении порошка карнозина в течение 30 минут также наблюдается тенденция к увеличению числа более мелких фракций. При анализе гистограммы распределения по размерам микрочастиц порошка карнозина, измельченного в течение 45 минут, установлено, что количество частиц с размером 0,8-1,2 мкм, по сравнению с измельченным порошком в течение 30 минут, увеличивается и составляет 51%, а количество частиц фракции с размером 3,0-8,0 мкм постепенно уменьшается до 43%. Также идет постепенное уменьшение количества частиц фракции с размером частиц 0,3-0,8 мкм до 5%, количество крупных фракций с размером частиц 8,0-12,0 мкм остается равным 1%, а наиболее крупная фракция 35,0-65,0 мкм вообще отсутствует. Следовательно, при измельчении субстанции карнозина в режиме 15 минут происходит наиболее интенсивное образование частиц мелких фракций с размером от 0,3 до 1,2 мкм, что в сумме составляет 60%. Кроме того, при таком режиме измельчения практически отсутствуют частицы крупных фракций. Поэтому именно этот режим может быть принят за технологичный. Отсутствие стабильной картины при дальнейшем измельчении предварительно можно объяснить тем, что мелкие частицы образуют конгломераты и при продолжении технологического процесса не изменяются в размерах, а только формируют группы.

Таким образом, доказано изменение структуры исходной субстанции карнозина. Изучено распределение микрочастиц исследуемой субстанции. Далее планируется исследование физико-химических и фармакологических свойств изучаемой субстанции карнозина с измененной структурой.

Работа выполнена в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 гг., Государственный контракт № 14.740.11.0119 от 08.09.2010 г. «Комплексные фармакологические и технологические исследования ряда субмикроструктурированных (наноструктурированных) фармацевтических субстанций с доказанными измененными физико-химическими свойствами».

Литература

1. Нанолечения нуждаются в новых процедурах доклинических испытаний /Фармацевтический вестник. – Режим доступа: <http://www.pharmvestnik.ru/text/9350.html>
2. Кузив, Т. Наночастицы: безопасны ли они? / Т.Кузив // Медицинская газета. – №31. – 25 апреля 2008 г. – Режим доступа: <http://www.mgzt.ru/article/844/>
3. Жилиякова, Е.Т. Изучение физико-химических и технологических характеристик натрий карбоксиметилцеллюлозы с целью создания пролонгированных лекарственных форм с жидкой дисперсионной средой /Е.Т. Жилиякова, Н.Н. Попов, М.Ю.Новикова и др.// Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – 2011. – №4 (99). – Вып. 13/2. – С.109-117.
4. Кочкаров, В.И. Изучение острой и хронической токсичности растворов декстранов, полученных из супрамикроструктурированной субстанции /В.И. Кочкаров, О.О.Новиков, Е.Т. Жилиякова и др.// Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – 2010. – №22 (93). – Вып. 12/2. – С.10-14.

GETTING THE LABORATORY SAMPLE OF SUBMICRO AND/OR NANOSTRUCTURED SUBSTANCE OF CARNOSINE AND EXPERIMENTAL CONFIRMATION OF CHANGES ITS STRUCTURE

M.A. KHALIKOVA
D.A. FADEEVA
N.N. POPOV
E.T. ZHILYAKOVA
O.O. NOVIKOV
O.A. VANKHIN

*Belgorod National Research
University*

e-mail: khalikova@bsu.edu.ru

The results of studies of substance carnosine before and after grinding: the initial particle carnosine are elongated elements of different lengths with a rough surface, with increasing milling time and powder carnosine changes its shape particles of elongated elements characteristic of the factions, uncomminuted form becomes lamellar under the regime of grinding 15 minutes, and equiaxed for grinding modes 30 and 45 minutes. The distribution of the microparticles carnosine was investigated.

Keywords: carnosine, submicrostructuring, microparticles