

## Исследование влияния внешних условий на формирование карбонатных ядер, используемых для инкапсулирования лекарственных препаратов

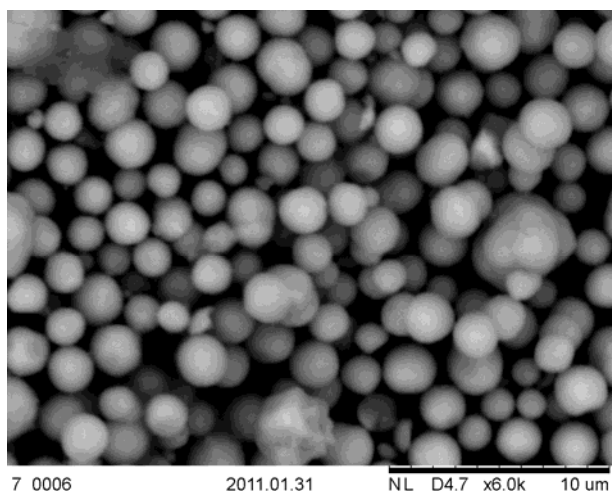
**Актуальность:** Микроинкапсулирование имеет важное значение, связанное с созданием новых физико-технических, химических и биомедицинских технологий. Микрочастицы, например, используются в качестве реакторов, контейнеров, дозаторов.[1] В фармацевтике микрокапсулы позволяют продлить пребывание БАВ в организме и сохранить их свойства под воздействием внешних факторов. Инкапсулирование, таким образом, приводит к увеличению эффективности БАВ и лекарственного средства в целом.

**Новизна:** определение оптимальных условий формирования карбонатных ядер в результате изучения влияния внешних факторов на этот процесс.

**Цель:** Нахождение оптимальных условий для формирования сферолитных карбонатных ядер.

**Задачи:**

1. Синтез микросферолитов  $\text{CaCO}_3$  при различных условиях;
2. Определение влияния скорости перемешивания, времени ультразвукового воздействия и способов промывки и сушки на размер и форму карбонатных ядер;
3. Статистическая обработка снимков, сделанных с помощью сканирующего электронного микроскопа;
4. Обработка полученного рентгendifракционного спектра;
5. Анализ результатов.



СЭМ фотография карбонатных ядер (УЗВ 5 мин)

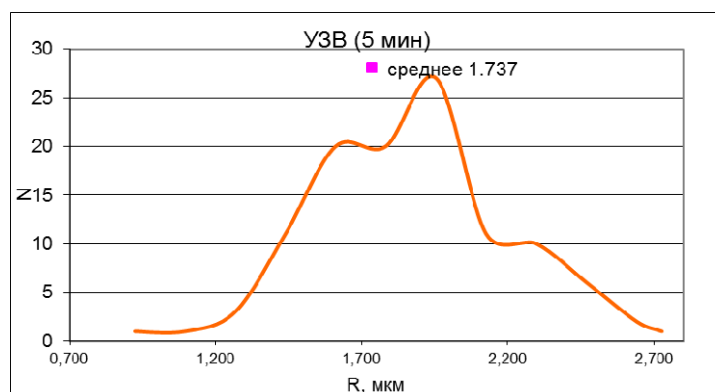


График распределения сферолитов по размерам

*В результате проведенных исследований:*

1. было определено, что сферолитные ядра образованы кристаллами фатерита;
2. было установлено, что для получения карбонатных ядер оптимального размера с минимальным размахом варьирования следует отдавать предпочтение низкой  $V$  перемешивания перед высокой;
3. было выявлено благоприятное влияние УЗВ в течение 5 мин, на форму и размер карбонатных ядер;
4. было определено, что метод градиентной промывки ацетоном с последующей сушкой при температуре  $50^\circ\text{C}$  является оптимальным в рамках методики формирования карбонатных ядер, не содержащих белки.

**Использование новых подходов, синтез и применение новых материалов для (нано)медицины, протезирования, медицинской диагностики, лечения онкологических и других заболеваний**

**Исследование влияния внешних условий на формирование карбонатных ядер, используемых для инкапсулирования лекарственных препаратов**

**Оглавление**

<b>Введение.....</b>	<b>2</b>
<b>Глава 1. Обзор литературы.....</b>	<b>3</b>
1.1. Инкапсулирование биологически активных веществ .....	3
1.1.1. Применение инкапсулирования .....	3
1.1.2. Методы инкапсулирования.....	3
1.1.3. Методы загрузки белка в полиэлектролитную микрокапсулу.....	3
1.2. Рост кристаллов .....	4
1.3. Физические методы контроля полученных структур .....	4
1.3.1. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).....	4
1.3.2. Рентгенофазовый анализ (РФА).....	5
1.4. Теоретические основы статистики.....	6
<b>Глава 2. Экспериментальная часть .....</b>	<b>7</b>
2.1. Реактивы и оборудование .....	7
2.1.1. Реактивы .....	7
2.1.2. Оборудование.....	7
2.2. Методы исследования .....	7
2.2.1. Методика формирования карбонатных ядер, не содержащих белки .....	7
2.2.2. Сканирующая электронная микроскопия.....	8
2.2.3. Рентгенофазовый анализ.....	8
2.2.4. Статистический анализ данных.....	8
<b>Глава 3. Результаты эксперимента .....</b>	<b>9</b>
3.1. Результаты статистической обработки СЭМ фотографий .....	9
3.2. Результаты РФА.....	14
<b>Выводы .....</b>	<b>16</b>
<b>Библиография.....</b>	<b>17</b>

## Введение

Разработка методов нано- и микроинкапсулирования веществ различной молекулярной массы как неорганической, так и органической природы с помощью различных физико-химических подходов имеет важное прикладное значение, связанное с созданием новых физико-технических, химических и биомедицинских технологий, основанных на использовании нано- и микрочастиц в качестве реакторов, контейнеров, дозаторов, сенсоров, зондов и т.д. [1, с.1041]. В связи с этим инкапсулирование биологически активных соединений представляет большой научный и практический интерес.

Наибольшее внимание заслуживает предложенный недавно метод включения белков в полиэлектролитную микрокапсулу, основными составляющими которого являются предварительное формирование ядра капсулы в виде микросферолита  $\text{CaCO}_3$  с включённым в него белком и последующая послойная сорбция полиэлектролита на такое ядро. Окончательной стадией инкапсулирования белка является удаление  $\text{CaCO}_3$  из капсулы добавлением ЭДТА<sup>1</sup> или другого хелатного агента. [6, с.1962; 7, с.918]

Карбонат кальция существует в различных полиморфных модификациях, которые различаются как по строению кристаллической решётки, так и по форме кристаллов. Например, кальцит имеет ромбоэдрическую форму, арагонит и фатерит – игольчатую, часто образуя шаровидную (оолитовую) структуру [11, с.4]

Целью данного исследования являлось нахождение максимально благоприятных условий для формирования сферолитных карбонатных ядер в процессе осаждения в реакции хлорида кальция и карбоната натрия.

Для этого должны были быть решены следующие задачи:

6. Синтез микросферолитов  $\text{CaCO}_3$  при различных условиях;
7. Определение влияния скорости перемешивания ( $v$ ), времени ультразвукового воздействия (УЗВ) и способов помывки и сушки на размер и форму карбонатных ядер;
8. Статистическая обработка снимков, сделанных с помощью сканирующего электронного микроскопа;
9. Обработка полученного рентгendifракционного спектра;
10. Анализ полученных результатов.

Исследования проводились в два этапа. На первом этапе лабораторные работы по синтезу микросферолитов и обработка результатов проводились в Институте высокомолекулярных соединений РАН (г. Санкт-Петербург) под руководством к.х.н. н.с. Смирнова М.А. и к.х.н. н.с. Сударевой Н.Н.. Материалы исследований были представлены на конференции «Ученые будущего», проведенной совместно корпорацией Интел и МГУ им. М.В. Ломоносова в рамках 5-го Фестиваля науки 8-10 октября 2010 г.

Настоящие исследования проведены автором на базе химико-экологической лаборатории проектного института ОАО «Ленморниипроект» под руководством Цветкова А.В. (зам. генерального директора ООО «Спецоснастка СПб») и научного консультанта д.х.н., профессора, зам. декана факультета наук о материалах МГУ, члена-корреспондента РАН Гудилина Е.А..

---

<sup>1</sup> Этилендиаминтетрауксусная кислота

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Инкапсулирование биологически активных веществ

#### 1.1.1 Применение инкапсулирования

Инкапсулирование играет важную роль в фармацевтике, позволяя продлить пребывание БАВ в организме (замедление выведения и метаболизма), сохранить их свойства под воздействием кислорода, УФ – облучения и перепадов температуры, изолировать компоненты, которые нейтрализуют друг друга. Таким образом, инкапсулирование приводит к увеличению эффективности БАВ и лекарственного средства в целом. [9, с.1]

В косметологии инкапсулирование предотвращает окисление применяемого активного соединения на воздухе и его разрушение прямыми солнечными лучами. [8, с.7]

#### 1.1.2 Методы инкапсулирования

Известны три метода, применяемые при инкапсулировании: распыление, эмульсионный метод и метод послойного нанесения (обмотки).

Метод распыления подразумевает использование специального шприца с отверстием диаметром менее 1 мм. Примером применения этого метода является опыт, заключающийся в прикапывании водного раствора хитозана в водный раствор додецилсульфата натрия (ДСН) и получении микрокапсул размером порядка 1 мкм, стенки которых состоят из полиэлектrolитного комплекса (ПАВ-ПЭК). Если раствор хитозана содержит активные соединения (например, ферменты), то при смешивании с раствором ДСН он образует электростатический комплекс на границе раздела фаз, толщина которого растет с увеличением времени контакта; таким образом, образуется устойчивая капсула с активными соединениями внутри. Недостатком метода распыления является сложность получения капсул маленького размера.

Эмульсионный метод заключается в инкапсуляции белка с помощью техники приготовления эмульсии водной фазы, содержащей хитозан и ферменты, в масляной фазе (декан). В результате образуются капли диаметром порядка 200 мкм, которые осаждаются в фазе, содержащей ДСН. Нерастворимый ПАВ-ПЭК формируется на границе раздела фаз, что приводит к возникновению микрокапсул.

Послойная обмотка полиэлектролитами – *полиэлектrolитная адсорбция (ПЭА)* – наиболее трудоемкий и «ювелирный» метод из всех перечисленных, однако он позволяет получить микрокапсулы оптимального размера. Полиэлектrolитные микрокапсулы формируются в результате поочередной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на микрочастицы ядра и их последующего разрушения.

#### 1.1.3 Методы загрузки белка в полиэлектrolитную микрокапсулу

В настоящее время имеется ряд подходов к загрузке белка в полиэлектrolитные микрочастицы (ПЭМ). Первый из них был предложен в 1999 г. [4, с.813] Он включает в себя стадию образования микроагрегатов белка в процессе его высаливания и последующую стадию поочередной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на эти микроагрегаты. Включение фермента в ПЭМ составляло ~ 70% от количества агрегатов белка, но его активность была заметно снижена и зависела от ряда факторов. Основным недостатком этого метода состоит в том, что содержащиеся фермент микрочастицы имеют неправильную форму и их размер невозможно проконтролировать.

Позднее был предложен метод включения белка непосредственно в полые полиэлектrolитные нано- и микрокапсулы, в оболочках которых для проникновения белка специально создавались «поры» (оболочка разрыхлялась) путем добавления органического растворителя, изменения солевого состава и pH среды. Количество включенного таким способом в капсулу белка составляло менее 10%, и при этом его большая часть сосредотачивалась в оболочке микрокапсулы. [5, с.125]

Третий, наилучший из предложенных, метод заключается во включении белков в ядро полиэлектролитной микрокапсулы. В качестве ядра используются составные микросферолинты  $\text{CaCO}_3$ -белок, поочередная адсорбция на поверхности которых проводится в растворах полиэлектролитов. За каждым шагом адсорбции следует трехкратная промывка, необходимая для удаления неадсорбированных молекул полимеров. Частицы отделяются от супернатанта центрифугированием. После нанесения необходимого числа слоев полиэлектролитов карбонатная основа растворяется в ЭДТА в течение 12 часов. [8, с.9]

## **1.2 Рост кристаллов**

Твёрдое тело, характеризующееся закономерным расположением атомов и молекул, образующих трехмерно-периодическую пространственную укладку – кристаллическую решетку, обычно называют кристаллом. В кристалле атомы или молекулы «заморожены» вокруг энергетически наиболее выгодных пространственных позиций, соответствующих минимумам их потенциальной энергии в решётке. Энергия такого взаимодействия за счёт различных связей больше энергии тепловых колебаний.

Для образования новой фазы, составляющей материал, необходима движущая сила, связанная с отклонением системы от равновесного состояния.

Величины  $\Delta G$  (изобарно - изотермический потенциал),  $\Delta F$  (изохорно – изотермический потенциал),  $\Delta \mu$  (химический потенциал), характеризующие меру отклонения системы от равновесия, являются движущей силой процесса получения любого материала.

Рост кристаллов – самопроизвольный гетерогенный процесс, происходящий тогда, когда в системе на стадии образования зародышей уже сформирована граница раздела между исходной и новой фазами. Непременным условием является наличие движущей силы, то есть отклонение системы от состояния термодинамического равновесия, что приводит к такому перераспределению компонентов между питающей средой и растущим кристаллом, которое ведет в конечном итоге к увеличению его размера или изменению его формы.

Кристалл при росте приобретает ту или иную форму в результате взаимодействия между процессами тепло- и массопереноса, а также кинетическими явлениями на поверхности раздела фаз. Часто наблюдаемые отклонения от предсказываемой формы при кристаллизации, как правило, связаны с изменением анизотропии роста кристаллов в неравновесных условиях, то есть с проявлением различных механизмов и скоростей роста различных граней кристалла, а также их различной зависимостью от пересыщения над различными гранями.

При некоторых условиях равновесная форма кристалла не образуется, и возникают другие, неравновесные формы кристаллов, к которым относятся, в частности, дендриты и сферолиты.

Один из типов сферолитов – сферокристаллы – образуется из молекулярно-тонких волокон, радиально распространяющихся из одного центра. Подобная ситуация возникает, когда при большом пересыщении маточной фазы локально возник зародыш, который «разветвился» на быстро растущие нити в условиях, когда развитие плоских граней нестабильно именно из-за большого пересыщения. Поскольку каждая нить кинетически находится в одних и тех же условиях, образуется наиболее изотропная и симметричная форма – окружность или шар (трехмерный сферолит). Обычно рост сферолита происходит практически моментально, что подтверждает неравновесность этого кристаллического образования. [12, с.3-90].

## **1.3 Физические методы контроля полученных структур**

### **1.3.1 Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)**

Анализ полученных в результате эксперимента мелкокристаллических структур и микроагрегатов возможен только визуальным способом, для чего требуется большое увеличение и высокое разрешение. Средний размер образующихся частиц лежит в диапазоне от 1

до  $9 \text{ мкм}^2$ , увеличения 200-250X оптических микроскопов недостаточно для их визуализации, поэтому применяется СЭМ.

В технологии СЭМ изображение формируется сигналами, которые генерируются последовательно по мере того, как тонко сфокусированный пучок электронов сканирует поверхность образца. При сканирующей электронной микроскопии объект исследуется в отражённом свете, поэтому СЭМ позволяет в подробностях разглядеть поверхность исследуемого объекта.

По сравнению с оптическими микроскопами электронные микроскопы обладают на много большей разрешающей способностью. Электроны, которые используются в электронной микроскопии, имеют длины волн в 100 000 раз меньше видимого света, однако их предел разрешения ограничен свойствами магнитных линз и составляет несколько ангстрем, что лишь в тысячу раз лучше, чем у оптических микроскопов. [14]

Электроны, испускаемые электронной пушкой, ускоряются до энергии 2-40 кэВ<sup>3</sup> и фокусируются в узкий пучок на образце. Этот пучок перемещается по образцу отклоняющими катушками с током.

В результате взаимодействия между электронным пучком и образцом возникают низкоэнергетичные вторичные электроны, которые регистрируются детектором вторичных электронов. Каждый акт столкновения сопровождается появлением электрического сигнала на выходе детектора.

Таким образом, сканируя электронным пучком поверхность объекта, можно получить карту рельефа анализируемой зоны.

### 1.3.2 Рентгенофазовый анализ (РФА)

РФА обладает возможностью давать характеристику кристаллическим фазам и основан на дифракции рентгеновских лучей на кристаллической решетке вещества. Для проведения рентгенофазового анализа неизвестного вещества (идентификации вещества) требуется набор надежных справочных стандартов кристаллических фаз, представленных совокупностью величин  $d(hkl)$ <sup>4</sup> и  $I(hkl)$ <sup>5</sup> - «рентгендифракционных спектров».

Основные преимущества рентгенографического анализа заключаются в том, что исследуется само твердое тело в неизменном состоянии и результатом анализа является непосредственно определение вещества или его составляющих.

Рентгеновские лучи исследуют кристалл, то есть само соединение, более того, в случае полиморфных тел рентгеновские лучи дают возможность различить отдельные модификации, свойственные данному веществу (сера ромбическая и моноклинная, CaCO<sub>3</sub> - кальцит или арагонит). Именно эта возможность РФА актуальна для данной работы.

На практике наибольшее распространение получил рентгеновский порошковый метод.

Каждое кристаллическое вещество характеризуется своей решеткой, определенным химическим составом и определенным распределением атомов по элементарной ячейке решетки. Геометрия решетки определяет собой набор межплоскостных расстояний. Индивидуальность атомов и их распределение определяет интенсивность дифрагированных лучей, таким образом, дифракционная картина является как бы своеобразным «паспортом» химического соединения, его «дактилоскопическим отпечатком», по которому можно установить, какому из уже известных ранее соединений соответствует полученная рентгенограмма. Метод рентгеновского фазового анализа называют иногда методом рентгеновской дактилоскопии. [13, с. 2-11]

---

<sup>2</sup> В данной работе карбонатные ядра имели размеры 0,6-3,5 мкм

<sup>3</sup> Килоэлектронвольт

<sup>4</sup> Расстояние между параллельными атомными плоскостями в кристалле

<sup>5</sup> Интенсивность отражения рентгеновских лучей

## 1.4 Теоретические основы статистики

В ряде случаев для обработки результатов экспериментов применяется анализ эмпирических распределений непрерывной величины, которые мы получаем, производя наблюдения над каким-либо признаком совокупности объектов или опытов, количественное выражение которого в некоторых единицах может в принципе непрерывно изменяться (варьироваться). К числу таких признаков относится, например, диаметр микросферолитов  $\text{CaCO}_3$ , измеряемый в мкм.

Если расположить данные в порядке возрастания значений варьирующего признака, то они будут представлять собой вариационный ряд.

Разность между крайними значениями ряда называется размахом варьирования или шириной распределения.

Размах варьирования, следовательно, определяется соотношением:

$$R = x_{max} - x_{min} \quad (1)$$

где  $x_{max}$  - наибольшее значение варьируемого признака в выборке;  
 $x_{min}$  - наименьшее значение варьируемого признака в выборке

Однако при изучении непрерывных величин приходится прибегать к большому числу наблюдений. В этих случаях имеющиеся в выборке значения подвергаются группировке: шкала интересующего нас признака подразделяется на некоторое число интервалов (разрядов), и затем рассматривают не отдельные значения величины, а группы значений, попавших в последовательно расположенные интервалы.

Число таких интервалов ( $e$ ) при числе наблюдений порядка 200-300 и более рекомендуется брать в пределах от 10 до 20. При предполагаемом нормальном распределении часто берут число интервалов, равное 12. Ширина каждого интервала (шаг разбиения) будет равна:

$$\Delta x = \frac{R}{e} \quad (2)$$

При слишком большом числе интервалов картина будет искажена случайными зигзагами частот, слишком малочисленных при узких промежутках. При слишком малом числе интервалов будут сглажены и затушеваны характерные особенности распределения. [3, с.109-116].

## Глава 2. Экспериментальная часть

### 2.1 Реактивы и оборудование

#### 2.1.1 Реактивы

- $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- Ацетон

#### 2.1.2 Оборудование

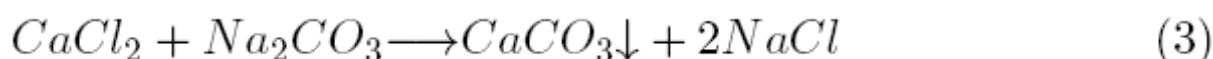
- Весы аналитические (AR-2140)
- Дозатор (Ленпипет)
- Фильтр Шотта №16
- Магнитная мешалка (Leki MS1)
- УЗВ-ванна (Сапфир 2.8)
- Сушильный шкаф (Binder)
- Сканирующий электронный микроскоп (Hitachi TM-3000)
- Рентгеновский дифрактометр (RINT 2000)

### 2.2 Методы исследования

#### 2.2.1 Методика формирования карбонатных ядер, не содержащих белки

Экспериментальная часть работы была выполнена в химико-экологической лаборатории ОАО «Ленморниипроект» под руководством ведущего инженера Капковой И.А.

За основу методики формирования карбонатных ядер был взят способ, описанный в работе Д. В. Володкина, А. И. Петрова и др.[2, с.3398-3406], в который внесли некоторые изменения. Для получения ядер брали эквивалентный объем водного раствора  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  концентрации 0,33М, быстро приливали при перемешивании к водному раствору  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  той же концентрации. Перемешивание продолжалось 30 с, скорость варьировалась. Затем суспензию образовавшихся частиц подвергали воздействию ультразвука в течение различного количества времени: от 0 до 10 минут, после чего реакция шла ещё 15 минут. В результате реакции получался нерастворимый  $\text{CaCO}_3$ , который выпадал в осадок, и раствор  $\text{NaCl}$ . См. формулу (3).



Полученный осадок  $\text{CaCO}_3$  отфильтровывали на фильтре Шотта (№16) .

Промывку и сушку ядер осуществляли тремя способами:

1) промывали 150 мл воды до нейтрального значения рН, сушили в течение 1,5 часов в сушильном шкафу при  $70^\circ\text{C}$  до постоянного веса.

2) после промывки водой до нейтрального значения рН осуществляли промывку 30 мл ацетона, затем сушили течение 30 минут в сушильном шкафу при  $50^\circ\text{C}$  до постоянного веса.

3) после промывки водой до нейтрального значения рН осуществляли градиентную промывку ацетоном, используя по 10 мл его водных растворов увеличивающейся концентрации - 30%, 50% и 100%.<sup>6</sup> Затем сушили в сушильном шкафу при  $50^\circ\text{C}$ .<sup>7</sup>

После достижения постоянного веса ядра хранили в закупоренной емкости при комнатной температуре.

<sup>6</sup> Далее – градиентная промывка ацетоном

<sup>7</sup> Данная методика была разработана в лаборатории ИВС РАН



### **2.2.2 Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)**

Сканирующая электронная микроскопия проводилась на геологическом факультете СПбГУ к.г.-м.н. Янсон С.Ю. Для получения СЭМ фотографий использовался прибор ТМ-3000 производства Hitachi с возможностью увеличения до 30 000 раз.

### **2.2.3 Рентгенофазовый анализ (РФА)**

Рентгенофазовый анализ был выполнен на факультете наук о материалах МГУ им. Ломоносова. Для получения рентгендифракционных спектров использовался прибор RINT 2000 производства Rigaku.

### **2.2.4 Статистический анализ данных**

После измерения с помощью программы CorelDRAW 14 на СЭМ фотографиях размеров ядер, полученных в процессе проведения опытов в различных условиях, был выполнен статистический анализ в программе Microsoft Excel с использованием методики, описанной в разделе 1.4. По результатам для каждого случая были построены круговые диаграммы фракционного состава образцов и графики распределения сферолитов по размерам.

## Глава 3. Результаты эксперимента

### 3.1 Результаты статистической обработки СЭМ фотографий

Выполненные ранее научные исследования показали, что оптимальный результат при инкапсулировании белков достигается, если форма карбонатных ядер максимально близка к сферической, а их размер находится в интервале от 1,0 мкм до 2,0 мкм. На первом этапе исследований в лаборатории ИВС РАН размер полученных карбонатных ядер колебался в пределах 3-6 мкм в среднем на разных стадиях эксперимента. На настоящем этапе удалось получить ядра размером 1,2-2,3 мкм в среднем.

Для получения возможности сравнения результатов эксперимента с неким эталоном первоначально был проведён синтез карбонатных ядер при нормальных условиях (средняя  $v$  перемешивания, время ультразвукового воздействия – 0 с, промывка водой и сушка при комнатной  $t^0$ ) (рисунок 3).

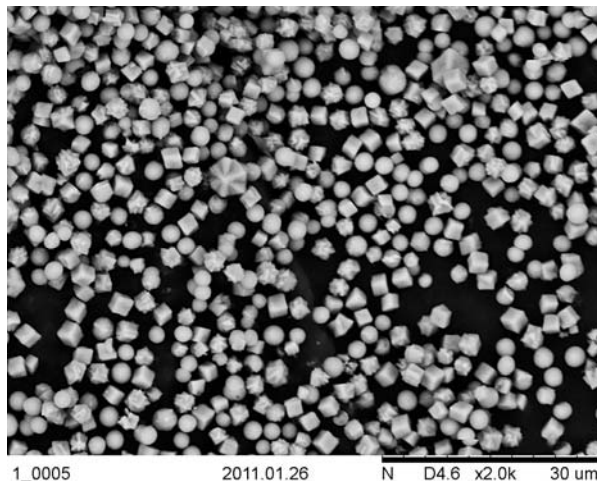
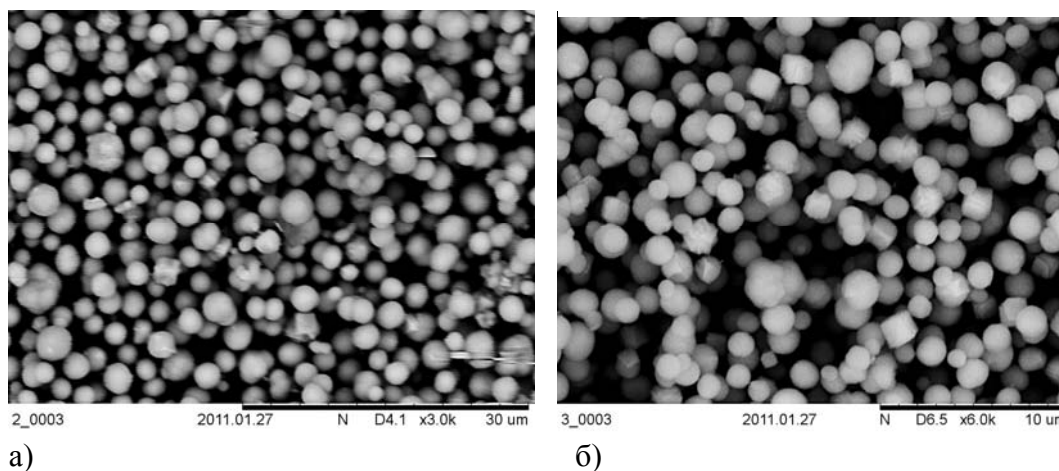


Рисунок 3 – СЭМ фотография карбонатных ядер, полученных при нормальных условиях

В результате опыта, в основном, образовались ромбоэдрические кристаллы и сферолитные агломераты  $\text{CaCO}_3$ , что является показателем неудачно подобранных условий формирования ядер.

#### Изучение влияния скорости перемешивания раствора.

В опытах, направленных на изучение влияния скорости перемешивания раствора на процесс формирования карбонатных ядер, значение указанного параметра варьировалось от минимально до максимально возможного. Результаты опытов приведены на рисунках 4-6.



а)

б)

Рисунок 4 – СЭМ фотографии: а) низкая  $v$  перемешивания; б) высокая  $v$  перемешивания

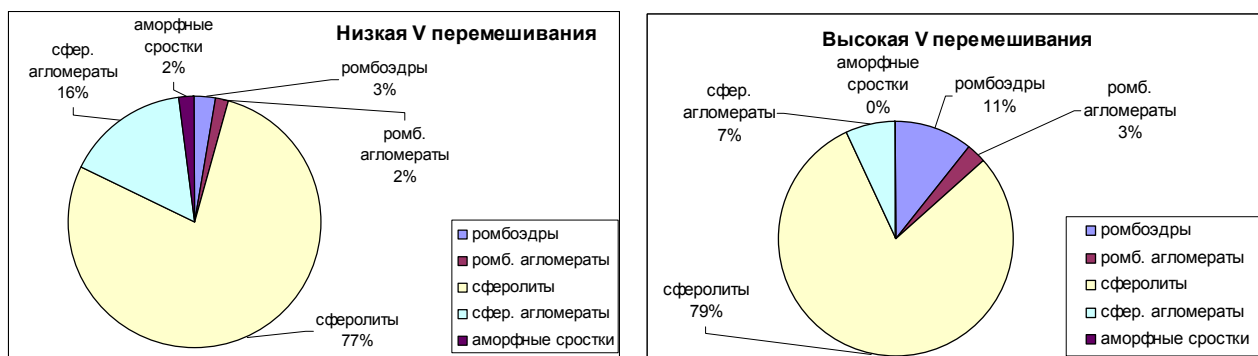


Рисунок 5 – Круговые диаграммы фракционного состава образцов

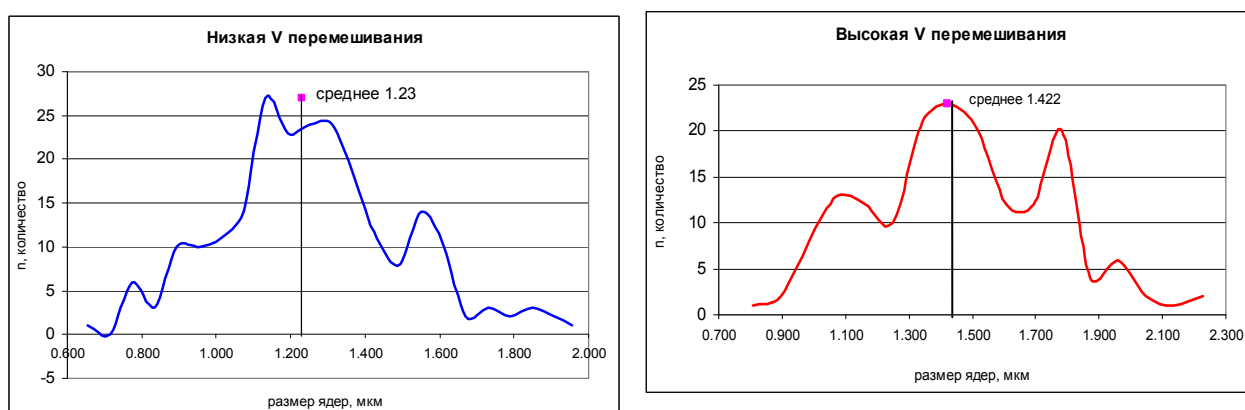


Рисунок 6 – Графики распределения сферолитов по размерам

Анализ результатов проведенных опытов показал, что  $v$  перемешивания раствора влияет на форму и размер ядер, однако оптимальную скорость подобрать очень сложно.

Если скорость перемешивания низкая, то образуется значительное количество сферолитных агломератов, а не отдельных сферолитов, зато средний размер ядер, а также размах варьирования размеров ядер довольно малы, что отвечает задачам эксперимента. На графике распределения, за исключением главного пика, высоких скачков больше нет, но кривая неидеальна, так как наблюдаются незначительные второстепенные пики. Из-за низкой скорости перемешивания, вероятно, не хватило энергии на одновременное образование всех зародышей кристаллов  $\text{CaCO}_3$ , а потому они появлялись «порциями», что и повлекло за собой «лишние» скачки на графике.

Если скорость перемешивания высокая, то образуется большее, чем в первом случае, количество ромбоэдров, средний размер ядер, а также размах варьирования размеров ядер выше, чем при низкой скорости. На графике распределения присутствуют три ярко выраженных пика. Высокая скорость перемешивания раствора, видимо, повлекла за собой выделение избыточной энергии, что, в свою очередь, явилось причиной для неодновременного образования зародышей микросферолитов.

### Изучение влияния ультразвукового воздействия (УЗВ).

В ходе эксперимента УЗВ на процесс образования карбонатных ядер оказывалось в течение 30 с, 5 мин и 10 мин.

Ультразвуковое воздействие в течение 30 с не дало желаемого результата (рисунок 7).

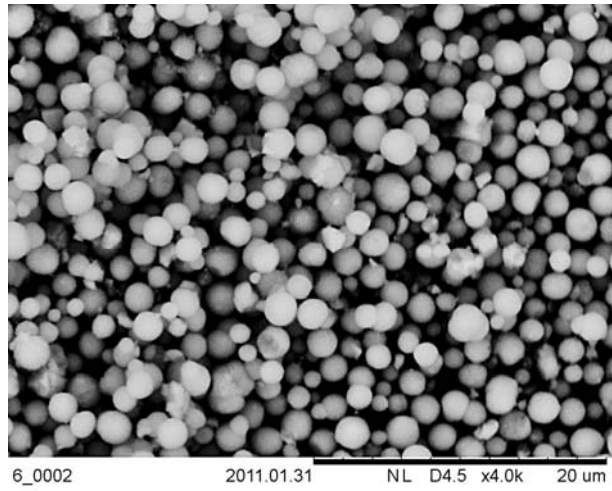


Рисунок 7 – СЭМ фотография: УЗВ 30 с

На фотографии видно большое количество сферолитных агломератов и обломков. Это указывает на то, что применение УЗВ в течение 30 с неблагоприятно влияет на форму образующихся карбонатных ядер.

Более подробно рассматривались опыты со временем УЗ воздействия равным 5 мин и 10 мин. Их результаты представлены на рисунках 8-10.

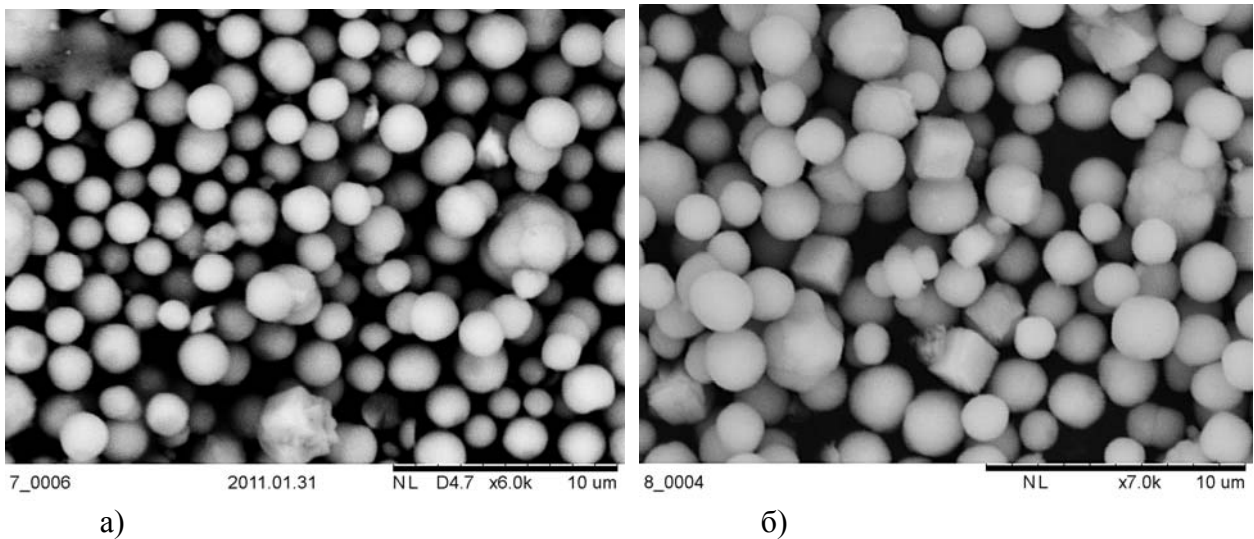


Рисунок 8 – СЭМ фотографии: а) УЗВ 5 мин; б) УЗВ 10 мин

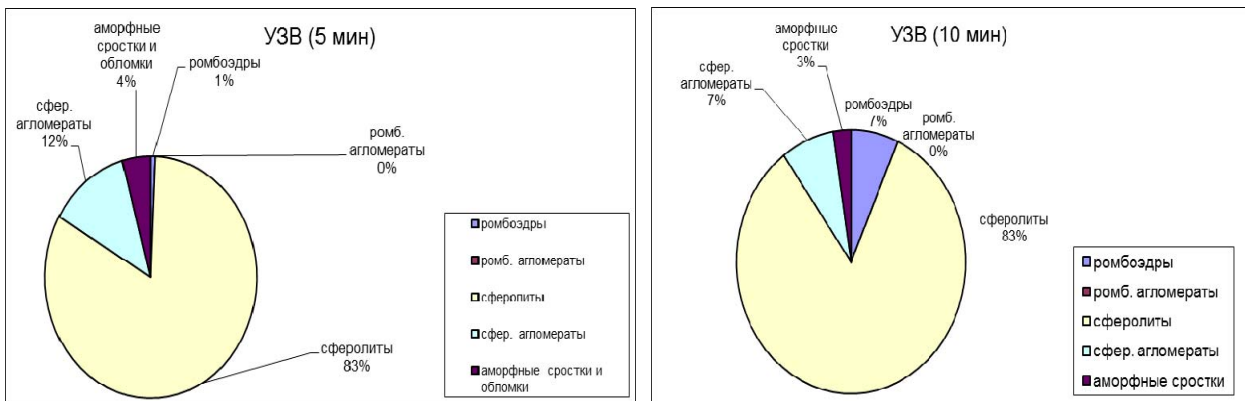


Рисунок 9 – Круговые диаграммы фракционного состава образцов

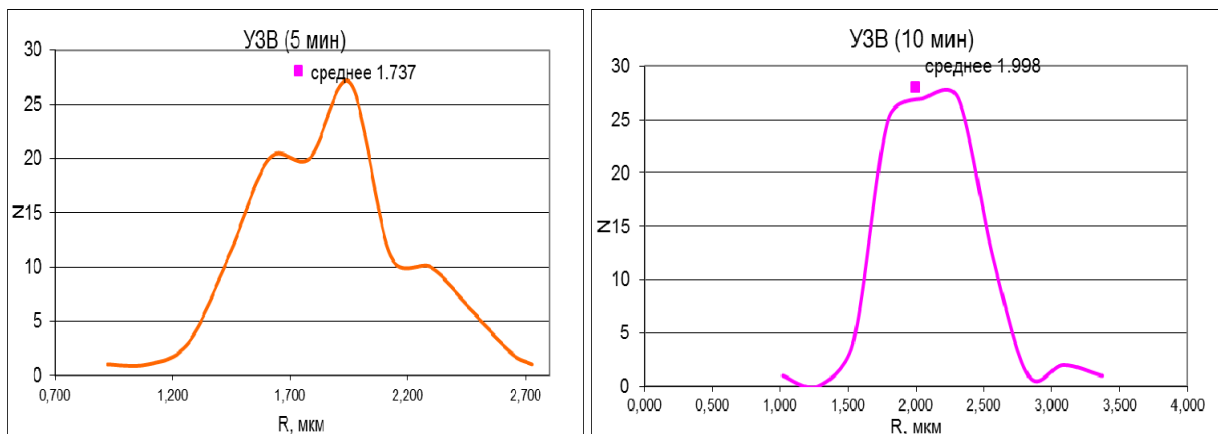


Рисунок 10 – Графики распределения сферолитов по размерам

На основании проведённых опытов можно сделать предварительный вывод о том, что УЗВ оказывает существенное влияние на форму и размер микросферолитов.

Если время УЗВ равно 5 мин, то, несмотря на значительное количество получившихся сферолитных агломератов, результат этого воздействия может расцениваться как положительный: ромбоэдров и обломков почти нет, а варьирование размеров сферолитов невелико. График распределения, в целом, близок к идеальному, так как двумя второстепенными пиками, соответствующими размерам ядер 1,782 мкм и 2,298 мкм, можно пренебречь, учитывая их сглаженность. Вышеперечисленное, скорее всего, указывает на то, что зародыши кристаллов  $\text{CaCO}_3$  возникли и начали расти практически одновременно.

Если время УЗВ равно 10 мин, то образуется меньшее, чем в предыдущем опыте, количество сферолитных агломератов при существенном росте числа ромбоэдров, что не позволяет расценивать результат опыта как однозначно положительный. Форма графика распределения фактически идеальна, что говорит об одновременном возникновении и росте зародышей микросферолитов, однако, следует отметить, заметное увеличение среднего размера ядер по сравнению с результатом УЗ воздействия в течение 5 мин.

#### Изучение влияния способов промывки и сушки.

В процессе эксперимента изучалась зависимость формы и размера ядер от трех способов промывки и сушки.

В первом опыте полученные карбонатные ядра промывались водой, а потом сушились в сушильном шкафу при  $t=70^{\circ}\text{C}$  (рисунок 11).

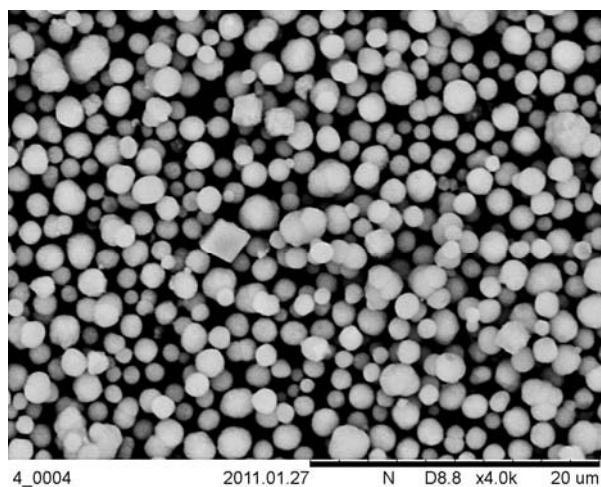


Рисунок 11 – СЭМ фотография: промывка водой, сушка при  $70^{\circ}\text{C}$

На фотографии отчетливо видно значительное количество сферолитных агломератов и отдельных ромбоэдров, что является следствием неудачно подобранных условий.

Второй опыт включает в себя промывку ацетоном (100%) с последующей сушкой в сушильном шкафу при  $t=50^{\circ}\text{C}$  (рисунок 12).

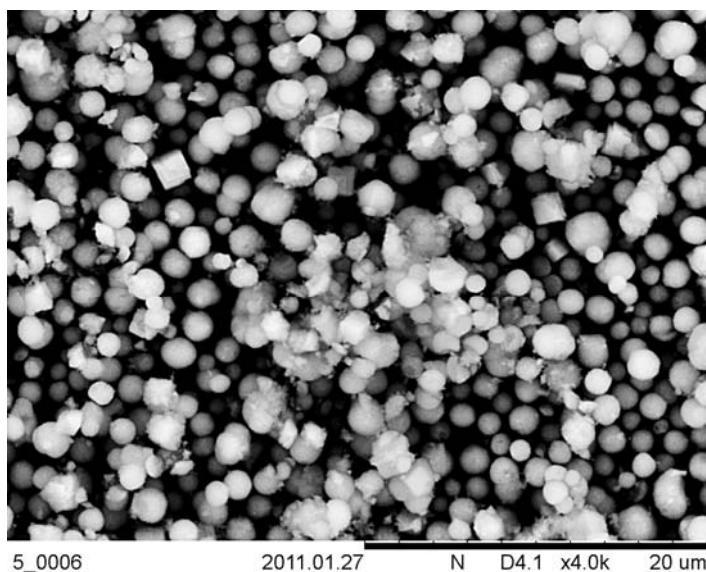


Рисунок 12 – СЭМ фотография: промывка ацетоном (100%) и сушка при  $t=50^{\circ}\text{C}$

На фотографии разнообразные агломераты, ромбоэдры и осколки в общей массе преобладают над сферолитами, что говорит о невозможности получения желаемого результата в указанных условиях.

В третьем способе применялась градиентная промывка ацетоном с последующей сушкой в сушильном шкафу при  $50^{\circ}\text{C}$ . Результаты данного опыта представлены на рисунках 13-15.

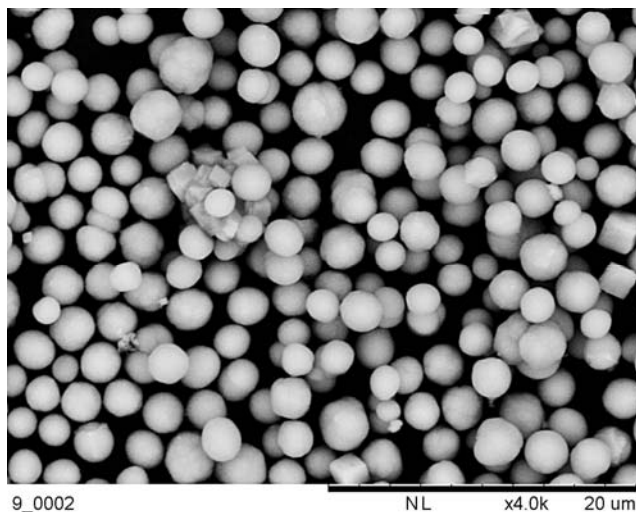


Рисунок 13 – СЭМ фотография: градиентная промывка ацетоном и сушка при  $50^{\circ}\text{C}$

На фотографии в общей массе преобладают сферолиты (90%), что говорит о максимальном приближении к желаемому результату

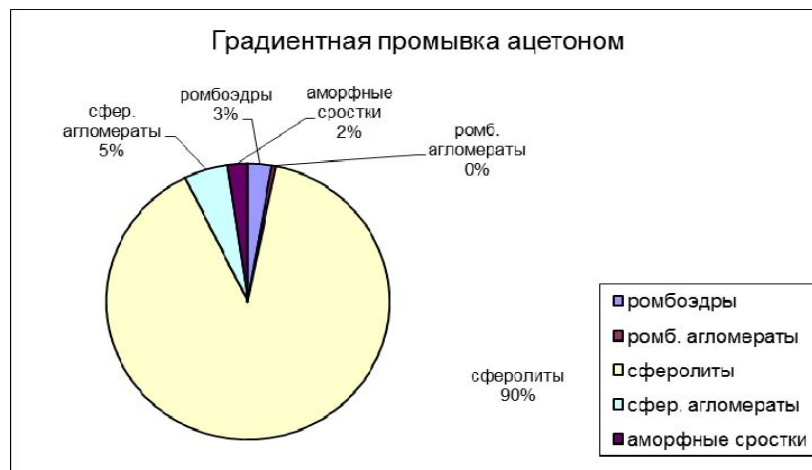


Рисунок 14 – Круговая диаграмма фракционного состава образца

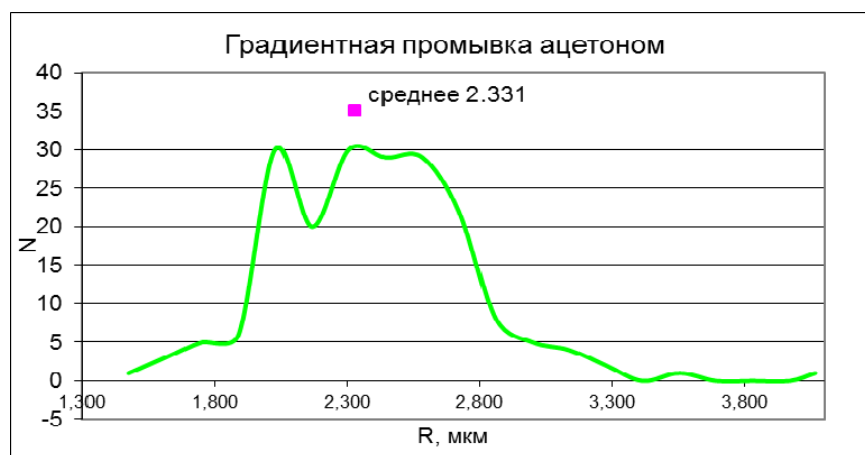


Рисунок 15 – График распределения сферолитов по размерам

На графике распределения четко выделяются две фазы образования зародышей кристаллов  $\text{CaCO}_3$ . Различие в размерах полученных в каждую фазу карбонатных ядер не является критическим, хотя их средний размер превышает оптимальный для инкапсулирования.

Проведенный эксперимент позволяет говорить о третьем способе промывки и сушки как наиболее предпочтительном в рамках методики формирования карбонатных ядер, не содержащих белки..

### 3.2 Результаты РФА

Карбонат кальция в природе встречается практически повсеместно в виде трех полиморфных модификаций – кальцита, арагонита и фатерита.

Кальцит – самая стабильная модификация – относится к тригональной сингонии и чаще всего кристаллизуется в виде ромбоэдров. Следующая полиморфная модификация – арагонит – относится к ромбической сингонии и имеет игольчатую форму кристаллов. В природе именно арагонит слагает сферолитовые агрегаты как минерального («гороховый камень»), так и биологического происхождения (жемчуг).

Фатерит – самая нестабильная модификация – относится к гексагональной сингонии и часто имеет кристаллы игольчатого габитуса [15].

Чтобы определить фазовый состав полученного в результате реакции карбоната кальция был проведен рентгенофазовый анализ образца, представленного на рисунке 8,б.

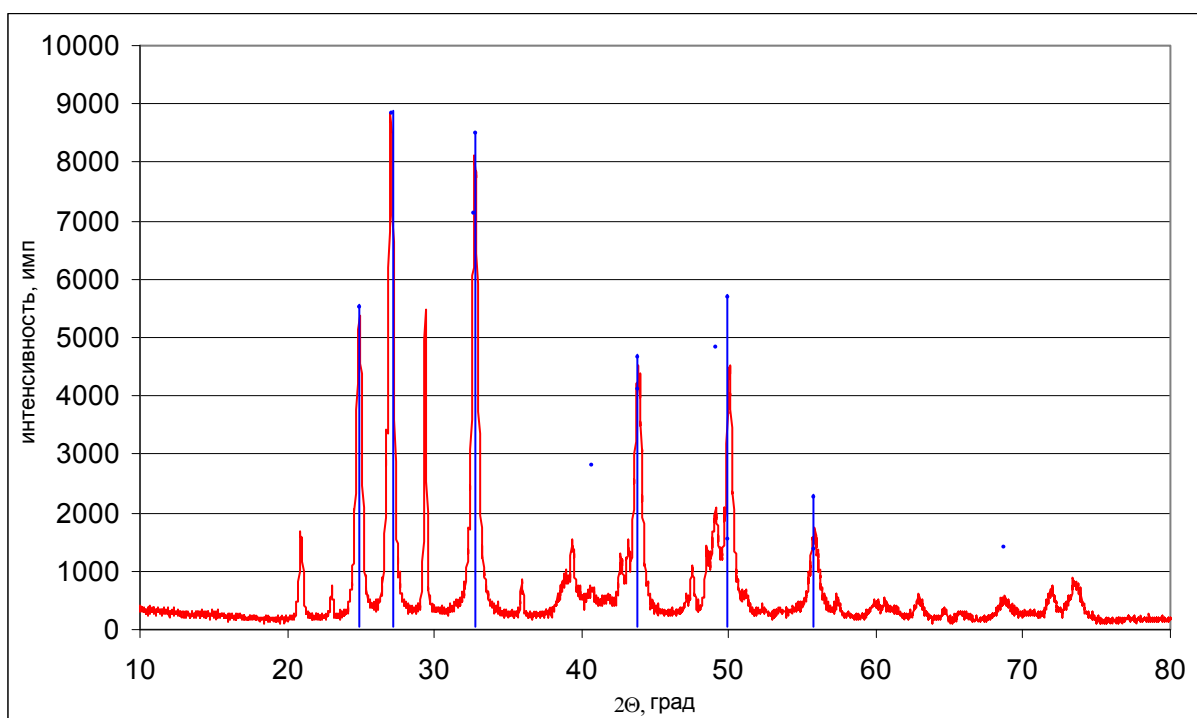


Рисунок 16 – Кривая рентгенофазового анализа образца, красная линия – кривая образца, синии – линии фатерита из карточки 33-268

Затем необходимо было сравнить полученные здесь данные с данными из сборников рентгенограмм. Для этого сначала следовало определить интенсивность линий в % ( $I, \%$ ) и далее межплоскостные расстояния ( $d_{(hkl)}, \text{Å}$ ), соответствующие каждому суммарному углу падения и отражения рентгеновских лучей ( $2\theta$ ). Для определения ( $I, \%$ ) использовалась формула (4), а для определения ( $d_{(hkl)}$ ) – формула 5.

$$x = \frac{I \cdot 100\%}{I_{max}} \quad (4)$$

$$d_{(hkl)} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} \quad (5)$$

где  $d_{(hkl)}$  - межплоскостное расстояние в кристалле;  $\lambda$  - длина волны излучения;  $\theta$  - угол падения рентгеновского луча

В результате были получены данные, приведённые в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты обработки РФА

Фатерит (VATERITE)		Арагонит		Кальцит (CALCITE)		Образец 8	
d(hkl), Å	I/I <sub>0</sub> *100, %%	d(hkl), Å	I/I <sub>0</sub> *100, %%	d(hkl), Å	I/I <sub>0</sub> *100, %%	d(hkl), Å	I/I <sub>0</sub> *100, %%
3.29422	100	3.39558	100	3.03555	100	3.30	100.00
2.73314	95.9	1.97688	77.3	1.87532	29.7	2.73	94.90
2.7337	80.4	3.27275	57.4	2.28463	28	3.03	62.08



1.82365	64.4	2.70032	53.6	1.9124	21.9	3.57	59.14
3.57626	62.4	2.37175	42.3	2.09443	17	1.82	50.07
1.85599	54.7	1.74208	34.6	3.85478	16.5	2.06	46.84
2.06427	52.7	1.88174	34.1	2.4948	13.6		
2.065	46.6						
2.21761	31.8						
1.64761	25.7						
1.82349	17.6						
1.36685	15.8						
1.64711	15.6						
1.14759	13.2						
4.240							
1.13982							
3.29521							
1.1395							
3.71305							
1.74906							

пики кальцита

пики фатерита

Конфигурации пиков,  $I$ ,  $d_{(hkl)}$  и угол  $2\theta$  совпадают с образцами 33-268 (фатерит) и частично 24-27 (кальцит) из картотеки Объединённого комитета порошковых дифракционных стандартов (JCPDS).

Таким образом, основной фракцией в рассматриваемом образце является фатерит с примесью кальцита, арагонит не присутствует вовсе.

Такой фазовый состав образца, по-видимому, можно объяснить правилом ступеней Освальда: первой при переходе от аморфного к кристаллическому состоянию будет образовываться фаза с менее устойчивой (метастабильной) формой, т.е. фатерит.

## Выводы

В результате проведенных исследований:

- было подтверждено, что сферолитные ядра образованы кристаллами фатерита;
- было установлено, что для получения карбонатных ядер оптимального размера с минимальным размахом варьирования следует отдавать предпочтение низкой  $V$  перемешивания перед высокой;
- было выявлено благоприятное влияние УЗВ в течение 5 мин, на форму и размер карбонатных ядер;
- было определено, что метод градиентной промывки ацетоном с последующей сушкой при температуре  $50^{\circ}\text{C}$  является оптимальным в рамках методики формирования карбонатных ядер не содержащих белки.
- на втором этапе исследований средний размер карбонатных ядер оказался значительно меньшим, чем на первом, и составил 1,2-2,3 мкм при оптимуме 1,0-2,0 мкм.

В целом, второй этап исследований полностью подтвердил результаты первого этапа в части влияния внешних условий на процесс формирования карбонатных ядер.

## Библиография

1. **Б.И. Сухоруков, С.А. Тихоненко, Е.А. Сабурова, А.В. Дубровский, Ю.Н. Дыбовская, Л.И. Шабарчина** Инкапсулирование белков в полиэлектролитные микрокапсулы и проблемы разработки ферментного микродиагностикума // Биофизика 52 (6). 2007. С. 1041-1048
2. **Dmitry V. Volodkin, Alexander I. Petrov, Michelle Prevot, and Gleb V. Sukhorukov** Matrix Polyelectrolyte Microcapsules: New System for Macromolecule Encapsulation // Langmuir 20 (8). 2004. С. 3398-3406
3. **Н.В. Смиров, И.В. Дунин-Барковский** Краткий курс математической статистики для технических приложений // Физматгиз. 1959. С. 109-116
4. **М.Е. Бобрешова, Е.А. Сабурова, Г.Б. Сухоруков** Биофизика. 2000. 44 (5). С. 813
5. **Y. Lvov, A.A. Antipov, A. Mamedov** Nanoletters 1 (3). 2001. С. 125
6. **D.V. Volodkin, N.I. Larionova, G.B. Sukhorukov** Biomacromolecules 5 (5). 2004. С. 1962
7. **A.I. Petrov, D.V. Volodkin, G.B. Sukhorukov** Biotechnol 21 (3). 2005. С. 918
8. **Е.В. Попова** Выпускная работа на тему «Исследование процесса формирования микрокапсулированных белковых форм методами сканирующей электронной и конфокальной микроскопии» // СПб: 2010
9. **Т.Н. Бородина, Е.А. Марквичева, Л.Д. Румш, С.М. Кунижев, Г.Б. Сухоруков** Использование полиэлектролитных микрокапсул с целью разработки систем адресной доставки биологически-активных веществ на примере иммобилизации химотрипсина // 2007
10. **Р. Фуллман** Рост кристаллов // Квант, С. 16-22
11. **Р.Т. Минуллина** «Инкапсуляция живых клеток микроорганизмов в биомитирующие оболочки карбоната кальция // С. 4
12. **Е.А. Гудилин, А.А. Елисеев** Процессы кристаллизации в химическом материаловедении // М.: 2006. С. 3-90
13. **Г.А. Кузнецова** Качественный рентгенофазовый анализ // Иркутск. 2005. С. 2-11
14. Электронная микроскопия – важнейший инструмент нанотехнологий [**Электронный ресурс**]: [http://portal.vttech.ru/files/Publication1\\_1228471143.pdf](http://portal.vttech.ru/files/Publication1_1228471143.pdf)
15. Минералогическая энциклопедия, под ред. К.Фрея, перевод с англ., Ленинград, «Недра», 1985 г., с. 95-99.

Настоящая работа была представлена:

- на Конкурсе научных проектов учащихся 9-11 классов «Ученые будущего» корпорации Intel и Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова в рамках V Фестиваля науки МГУ 8-10 октября 2010 г (диплом 1 степени и включение в команду России в качестве наблюдателя на финал Intel ISEF 2011)
- на XXI конференции Аничкова лицея (поощрение в числе лучших работ в секции химия и биология)