

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»
(СГУ)**

Кафедра физики полупроводников

**Управление адсорбцией веществ в ватеритные частицы с помощью
хелатирования**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 2 курса 202 группы

направления 11.04.04 «Электроника и нанoeлектроника»

факультета нано- и биомедицинских технологий

Шамсутдиновой Елизаветы Сергеевны

Научный руководитель

к.ф.-м.н., доцент

должность, ученая степень, ученое звание

подпись, дата

М.В. Ломова

инициалы, фамилия

Консультант

инженер КФП

должность, ученая степень, ученое звание

подпись, дата

Е.С. Прихожденко

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой

д.ф.-м.н., профессор

должность, ученая степень, ученое звание

подпись, дата

А.И. Михайлов

инициалы, фамилия

Саратов 2020

ВВЕДЕНИЕ

Микро- и наноразмерные оболочки (капсулы), позволяющие провести инкапсуляцию различных веществ внутрь их объема, представляет интерес с научной, медицинской и технологической точек зрения. Капсулы, созданные путем последовательной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на поверхность ядра, имеют легко изменяемые и управляемые свойства, что обуславливает перспективы их широкого применения.

Исходя из работы [1] одно из наиболее важных свойств полиэлектролитных микрокапсул, определяющим их применение, является проницаемость их оболочек, которая может зависеть от многих факторов – ее состава, толщины, заряда диффундирующих соединений, условий микроокружения, а также от используемого материала ядра.

Микрокапсулы используются для систем адресной доставки лекарственных средств [2, 3, 4], для создания вакцин [5], а также в сельскохозяйственной деятельности [6]. Перспективными являются антибактериальные микрокапсулы, которые можно вводить в определенное место и обеспечить постепенное высвобождение действующего вещества, что уменьшает токсическое действие на организм. Также с помощью микрокапсул создаются новые диагностические методы (для анализа крови и мочи) [7].

Также микрокапсулы активно исследуются для создания электронных чернил [8]. Авторы данной работы инкапсулировали пурпурные, желтые и голубые суспензии с белым пигментом для реализации многоцветного электрофоретического дисплея. В работе [9] авторы исследовали микрокапсулы с TiO_2 и увеличивали износостойкость оболочки с помощью реакции глутаральдегидами и аминогруппами в желатине. Данные микрокапсулы оказались стабильными во время вакуумной сушки и легко наносились на поверхность подложек в силу своей гибкости. Также была построена электрофоретическая ячейка дисплея.

Целью данной работы является модификация поверхности квазисферических пористых микрочастиц карбоната кальция с помощью хелатирования ЭДТА ионов кальция и изучение влияния обработки микрочастиц на их сорбционную емкость.

Общая характеристика темы.

Данная работа представляет собой методику увеличения сорбционной емкости ватеритных микроразмерных частиц карбоната кальция с помощью хелатирования ЭДТА.

Актуальность темы.

Частицы карбоната кальция активно используют как растворяемые и нерастворяемые основы для создания микрокапсул. Преимущества данных частиц в низкой токсичности, биodeградируемости, биосовместимости, дешевизне получения, а также возможности управления размером и формой частиц, что также обуславливает их применение в регенеративной медицине, доставке лекарственных средств и широком спектре средств личной гигиены [10].

При капсулировании вещества часто используется адсорбция вещества во внутреннюю полость микрокапсул. Из этого следует, что ядро должно иметь сильно развитую поверхность, большое количество пор для увеличения полезной емкости микроносителей. В данной работе представлен один из возможных способов увеличения количества полезного вещества внутри носителя.

Исследуемая структура

Помимо ватеритных частиц карбоната кальция, в качестве растворимых микрочастиц для получения микрокапсул используют разнообразные коллоидные частицы органической и неорганической природы. Сюда входят частицы на основе меламинаформальдегидных смол и полистирольного латекса, кристаллов органических красителей, а также частицы на основе неорганических соединений, таких как карбонаты металлов, диоксида кремния, белковые агрегаты, клеточные структуры. Основное требование, предъявляемое к материалу ядер – простота растворения и выведения из объема капсулы.

В работе [1] также говорится о трех полиморфных модификациях карбоната кальция: кальцит, арагонит и ватерит, имеющие гексагональную, орторомбическую и ромбоэдрическую кристаллические структуры, соответственно. Кристаллы CaCO_3 имеют типичную форму: кальцит – кубические кристаллы, арагонит – игольчатые структуры, ватерит – сферы. Термодинамическая стабильность данных форм уменьшается в ряду от кальцита к ватериту. Условия внешней среды, такие как pH, температура, и ионная сила раствора, оказывают большое влияние на процесс кристаллизации карбоната кальция. В результате так называемого «механизма растворения» образовавшиеся кристаллы ватерита могут растворяться с переходом в кристаллы кальцита в силу большей термодинамической стабильности последнего. Таким образом, в водной среде через некоторое время ватерит полностью переходит в кальцит. Кристаллизация карбоната кальция происходит при непосредственном сливании эквимольных растворов хлорида кальция CaCl_2 и карбоната натрия Na_2CO_3 . На первой стадии образуются наночастицы аморфного карбоната кальция. Затем из агрегатов полученных наночастиц в местах образования центров роста начинается формирование микрочастиц карбоната кальция. Доставка ионов для их роста осуществляется за счет растворения первичных наночастиц. Образующиеся в результате микрочастицы имеют сферическую пористую форму и размер порядка нескольких микрон.

Оборудование и методика измерений

Основой эксперимента являлось хелатирование ЭДТА ионов кальция. ЭДТА в определенных дозах используют в фармацевтике, медицине, стоматологии.

При создании микрокапсул на основе карбоната кальция ЭДТА обычно используют как растворитель ядра на последнем этапе, после нанесения полиэлектролитных микрокапсул. Но если взять меньшую концентрацию, кислоты будет недостаточно для полного растворения ядра, что обеспечивает появление глубоких пор за счет хелатирования. Ион этилендиаминтетрауксусной кислоты с ионом металла образует до шести связей через атомы кислорода карбоксильных групп и атомы азота. Структурная формула внутрикомплексной соли катиона кальция с Na-ЭДТА представлена на рисунке 1.

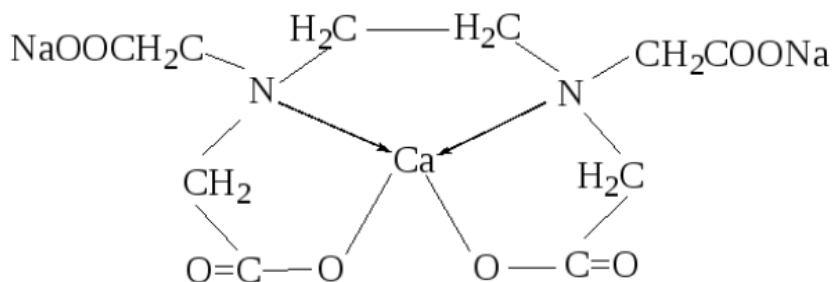


Рисунок 1 – Хелатирование ЭДТА иона кальция [11]

Также в результате исследования структуры карбоната кальция использовались термошейкер TS-100 (рисунок 2, а) для обработки ватеритных частиц карбоната кальция с помощью ЭДТА, конфокальный микроскоп Leica TCS SP8 X (рисунок 2, б) для определения среднего диаметра полученных частиц CaCO₃, сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) для изучения морфологии поверхности и спектрофотометр Synergy H1 (рисунок 2, в) для изучения влияния обработки ватеритных микрочастиц с помощью ЭДТА на сорбционную емкость самих частиц.



Рисунок 2 – Thermo Shaker TS-100 (а), микроскоп Leica TCS SP8 X (б), спектрофотометр Synergy H1 (в)

Эксперимент

В данной работе мы использовали свойство комплексообразования ЭДТА с ионами металлов, что должно увеличивать эффективную поверхность ватеритных частиц карбоната кальция, то есть образуются глубокие поры. Увеличение данного параметра, как предполагалось, должно увеличивать количество адсорбированного вещества внутрь CaCO_3 .

Эксперимент представлял собой растворение синтезированных частиц карбоната кальция в кислотной среде ЭДТА. Концентрация кислоты использовалась в диапазоне от 0.01 М до 0.1 М, pH около 7. Частицы с начальным размером ~ 5 мкм заливали раствором ЭДТА и оставляли при постоянном интенсивном перемешивании на 45 минут. Схема эксперимента изображена на рисунке 3.

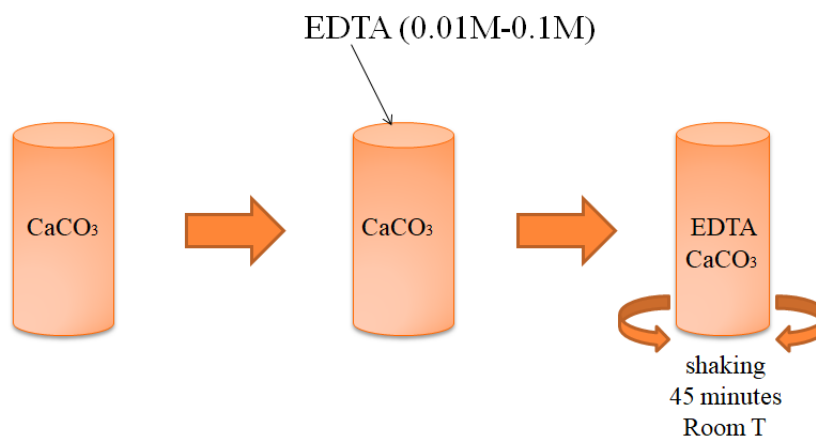


Рисунок 3 – Схема эксперимента

Затем частицы промывали и исследовались на конфокальном микроскопе Leica TCS SP8 X, а затем в графической программе Image J для оценки размера частиц. Был измерен средний диаметр для каждого из образцов CaCO_3 , результаты измерения представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Значения диаметров для образцов CaCO_3 (использовались образцы с разными значениями ЭДТА при обработке и разными масштабами, выборками)

ЭДТА, М	Мин-ое значение диаметра частиц для каждой выборки, мкм	Среднее мин-ое значение диаметра частиц для каждой выборки, мкм	Стандартное отклонение от мин-го диаметра из выборки	Макс-ое значение диаметра частиц для каждой выборки, мкм	Среднее макс-ое значение диаметра частиц для каждой выборки, мкм	Стандартное отклонение от макс-го диаметра из выборки
0	0,72	0,78	$\pm 0,05$	5,14	5,25	$\pm 0,12$
	0,85			5,43		
	0,77			5,19		
0,02	0,96	0,83	$\pm 0,09$	5,12	4,82	$\pm 0,32$
	0,81			4,34		
	0,72			5,01		
0,04	1,14	1,07	$\pm 0,09$	4,21	4,9	$\pm 0,46$
	1,13			5		
	0,94			5,49		
0,06	0,36	0,41	$\pm 0,05$	2,8	2,78	$\pm 0,22$
	0,38			2,45		
	0,48			3,09		
0,08	0,38	0,35	$\pm 0,03$	3,16	3,23	$\pm 0,04$
	0,36			3,24		
	0,30			3,28		
0,1	0,35	0,31	$\pm 0,05$	2,95	2,51	$\pm 1,2$
	0,34			3,87		
	0,23			0,71		

Для характеристики поверхности использовался сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) с высоким разрешением.

На рисунке 4 представлены фотографии со сканирующего электронного микроскопа с увеличением в 50 кх.

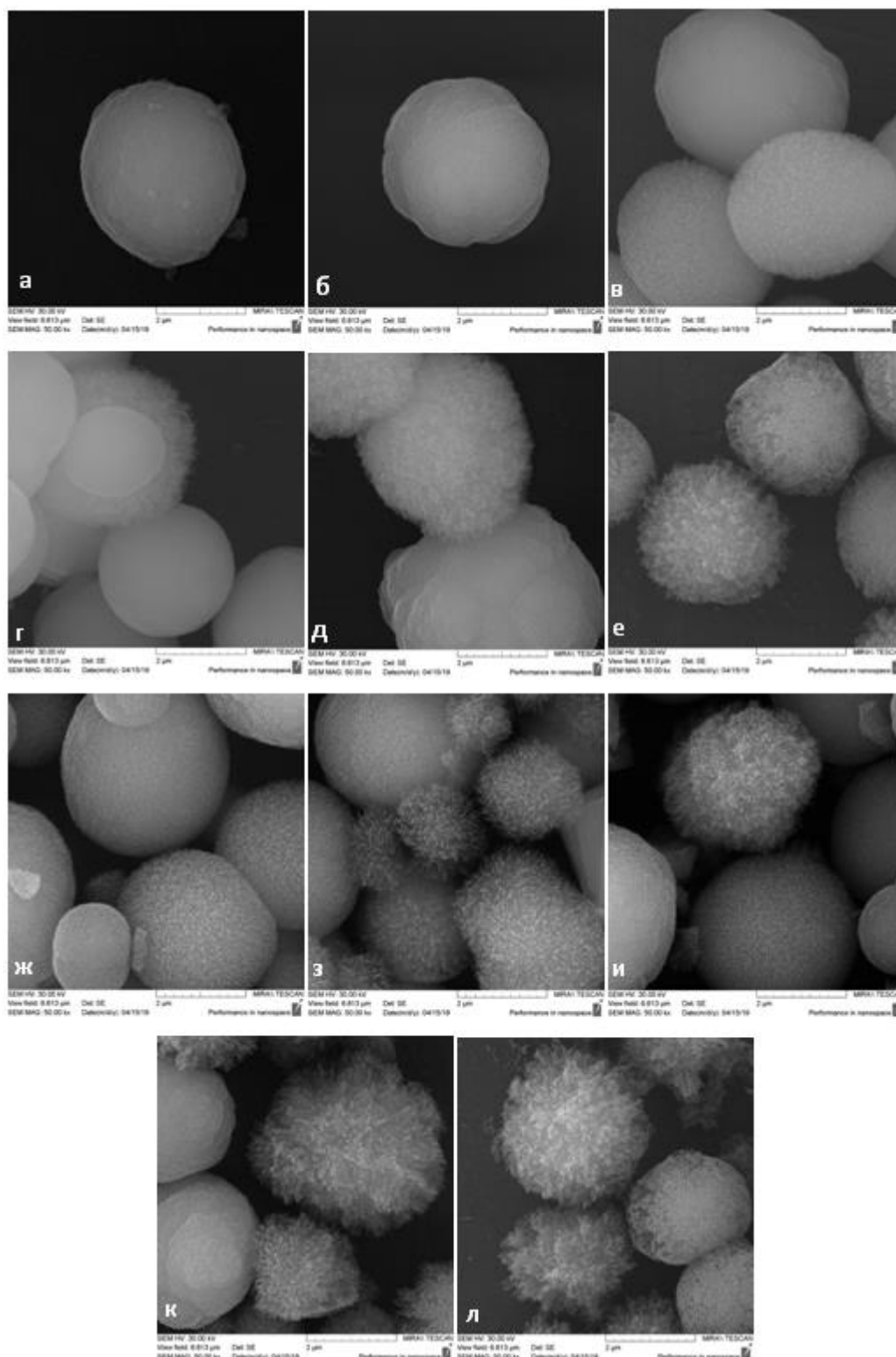


Рисунок 4 – СЭМ изображения кристаллов ватерита CaCO_3 до обработки с помощью ЭДТА (а), с концентрацией ЭДТА 0.003М (б), 0.006М (в), 0.009М (г), 0.012М (д), 0.015М (е), 0.06М (ж), 0.07М (з), 0.08М (и), 0.09М (к), 0.1 М (л)

Из фотографий на рисунке 4 видно, что с увеличением концентрации ЭДТА, наблюдается большее количество пор на ядрах карбоната кальция, поверхность карбоната кальция становится более развитой.

После исследования частиц на конфокальном микроскопе и на СЭМ на полученные сферические частицы карбоната кальция был адсорбирован белок BSA (бычий сывороточный альбумин), который перед этим был химически соединен с флуорохромом TRITC (тетраметилродамин-5(6)), применяемым при морфологических исследованиях. Данные действия проводились для того, чтобы изучить эффективность адсорбции белка BSA на поверхность полученных пористых частиц.

Частицы подвергались физической адсорбции [12] путем погружения их в раствор с белком BSA, после чего замораживались для лучшей адсорбции. Данный способ загрузки белка был выбран исходя из статьи [13], в которой говорится об увеличении плотности загрузки вещества в поры суб- и микрочастиц при заморозке/разморозке. Затем полученный раствор размораживали и отправляли на центрифугу. После чего собирали супернатант (надосадочная жидкость), который затем отправлялся на исследования эффективности адсорбции.

Эффективность адсорбции исследовалась на аппарате Synergy H1.

На рисунке 5 представлена калибровочная кривая, построенная на аппарате Synergy H1 для растворов с разной концентрацией белка BSA. На рисунке 6 представлен спектр экстинкции супернатанта от раствора с осажденными ватеритными частицами карбоната кальция после адсорбции на них белка BSA. По формуле, полученной из анализа калибровочной прямой и графика со спектрами поглощения, была оценена эффективность загрузки белка бычьего сывороточного альбумина, меченного красителем TRITC. Размер глобулы белка составляет примерно не более 10-20 нм, что не мешает белку эффективно включаться в поры ватерита карбоната кальция размером 60-80 нм.

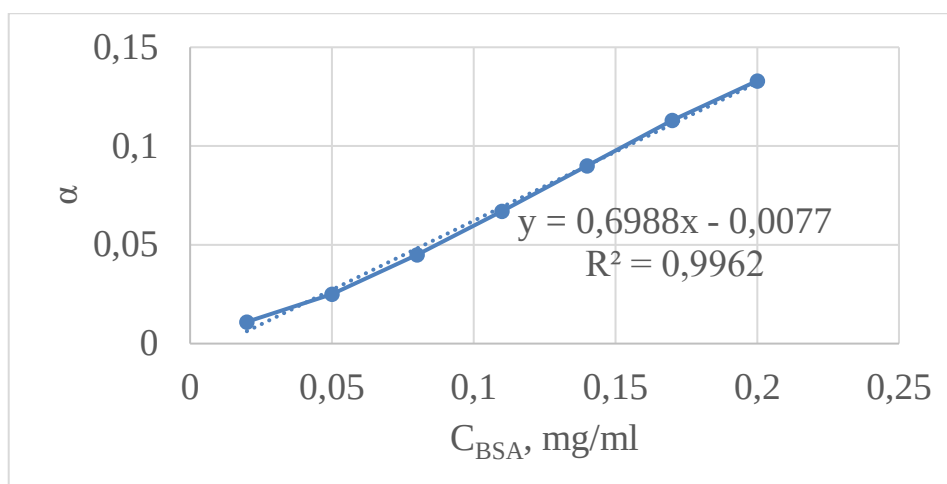


Рисунок 5 – Зависимость экстинкции белка BSA-TRITC на длине волны 556 нм от разной концентрации BSA (калибровочная кривая)

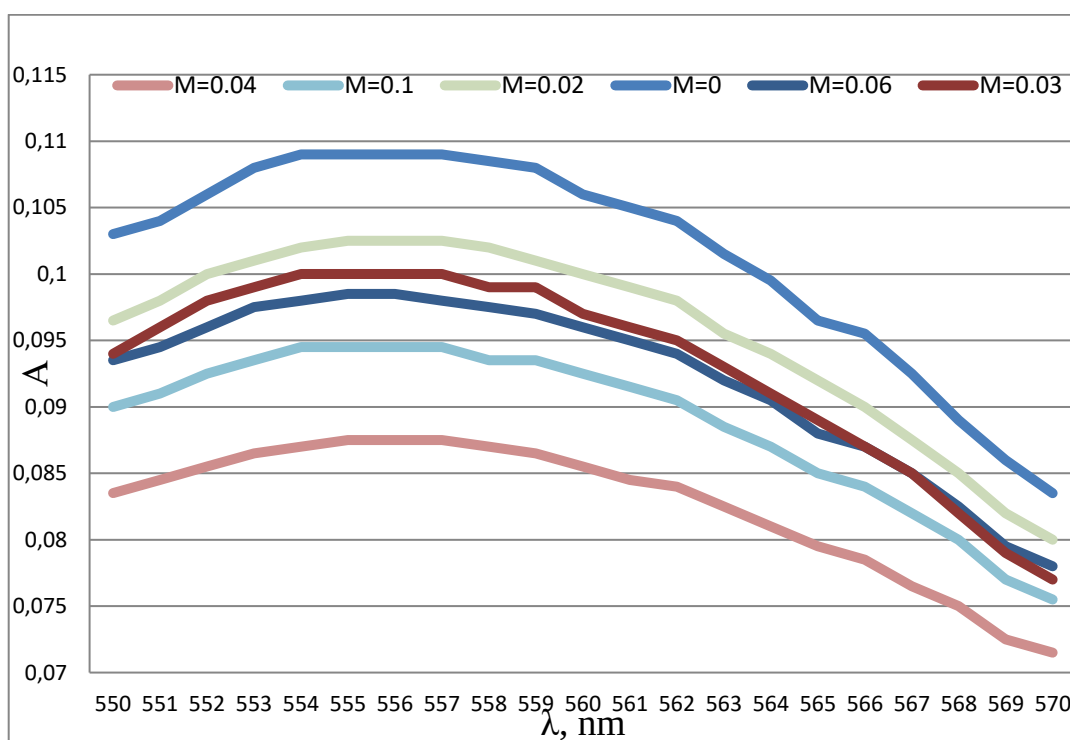


Рисунок 6 – Спектр экстинкции белка BSA из супернатанта от раствора с частицами карбоната кальция, обработанными разными концентрациями EDTA

При дальнейшей обработке данных брались средние значения коэффициента поглощения для одинаковых концентраций EDTA на пике экстинкции (556 нм). Результаты исследования поглощения на аппарате Synergy H1 показали, что средняя эффективность поглощения белка BSA с флуорохромом TRITC ватеритными частицами карбоната кальция микронного размера после обработки EDTA увеличилась в среднем на 10 % по сравнению с

частицами, которые обработке не подвергались. Результаты зависимости эффективности представлены на рисунке 7.

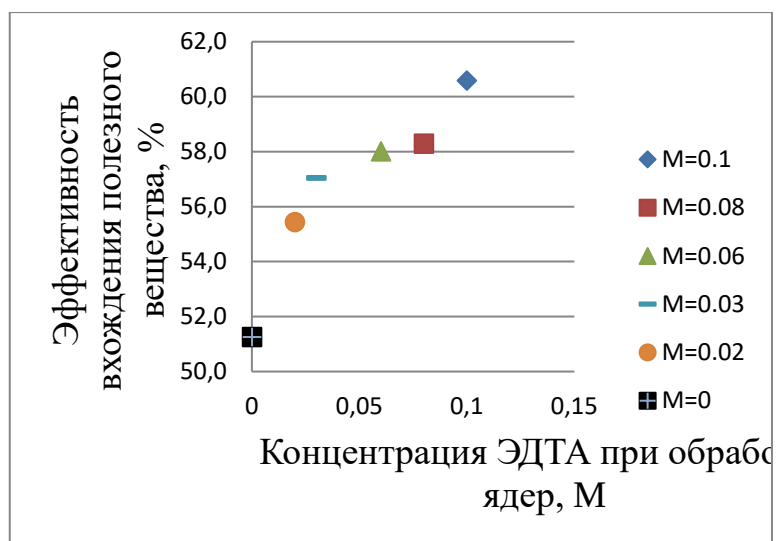


Рисунок 7 – Зависимость эффективности включения BSA в ядро карбоната кальция от концентрации EDTA при обработке ядер

Таким образом, с увеличением концентрации ЭДТА происходит увеличение сорбционной емкости, что связано с увеличением площади эффективной поверхности ввиду частичного растворения поверхности частиц карбоната кальция. Это подтверждают снимки со сканирующего электронного микроскопа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, использование данного метода для управления адсорбцией карбоната кальция с помощью ЭДТА привело к увеличению сорбционной емкости, что подтверждают как снимки со сканирующего электронного микроскопа, так и график зависимости эффективности загрузки белка BSA с TRITC в ватеритные частицы карбоната кальция от концентрации ЭДТА при обработке частиц. Это даёт возможность дальнейшего использования данных частиц для капсулирования в них различного класса веществ в больших объемах, функционализации поверхности карбоната кальция, создания высокоэффективных мультимодальных суб- и микроразмерных частиц. Как показали исследования, эффективность адсорбции белка BSA на поверхность полученных частиц увеличивается на 10 % для ватеритных частиц карбоната кальция, которые подвергались самой сильной обработке ЭДТА (0.1 М), из чего следует, что данная концентрация ЭДТА при тех же условиях является оптимальной для наших целей.

В дальнейшем планируется оценить свойства помещенного графена в ватеритные частицы карбоната кальция в связи с открытием магнитного эффекта графена при определенном расположении в пространстве [14].

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Климов Б.Н., Штыков С. Н., Горин Д. А. и др. Физико-химия наноструктурированных материалов // Под редакцией проф. Климова Б.Н. и проф. Штыкова С.Н. 2009. С.217.

2 Демина П.А., Дегтярева Е.В., Кузьмичева Г.М., Букреева Т.В. Полиэлектrolитные микрокапсулы, модифицированные наноразмерным диоксидом титана, для адресной доставки лекарственных средств // Вестник МИТХТ им. М.В. Ломоносова – М.; 2014. Т. 9. № 4. С. 76-79.

3 Васильева Э.А., Миргородская А.Б., Ибрагимова А.Р., Богданова Л.Р., Зуев Ю.Ф., Захарова Л.Я. Полиэлектrolитные микрокапсулы, содержащие липазу *Candida Rugosa* // Физико-химия полимеров: синтез, свойства и применение. Изд. Тверь. 2015. №15. С. 126-131.

4 Gusliakova O., Atochina-Vasserman E., Sindeeva O., Sindeev S., Pinyaev S., Pyataev N., Revin V., Sukhorukov G., Gorin D., Gow A. Use of submicron vaterite particles serves as an effective delivery vehicle to the respiratory portion of the lung // *Frontiers in Pharmacology*. 2018. V. 9.

5 Selina O.E., Markvicheva E.A., Belov S.Yu., Vlasova N.N., Balysheva V.I., Churin A.I., Bartkoviak A., Sukhorukov G.B. Biodegradable microcapsules with entrapped DNA for development of new DNA vaccines // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2009. Т. 35. № 1. P. 103-110.

6 Литвишко В.С., Литвишко О.В. Микрокапсулирование пестицидов на основе полиуретанов // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук – М.; 2016. № 6-1. С. 50-53.

7 [Электронный ресурс] URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=14927> (дата обращения 12.05.2019) Степанова Э.Ф., Ким М.Е., Мурзагулова К.Б., Евсеева С.Б. Микрокапсулы: перспективы использования в современной фармацевтике // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 5.

8 Chul Am Kim, Meyoung Ju Joung, Seong Deok Ahn, Gi Heon Kim, Seung-Youl Kang, In-Kyu You, Jiyoung Oh, Hey Jin Myoung, Kyu Ha Baek, Kyung Soo Suh Microcapsules as an electronic ink to fabricate color electrophoretic displays / *Synthetic Metals*, V. 151, I. 3, 2005, P. 181-185.

9 Jung Kun Song, Ho Chun Kang, Kwang Sok Kim, In-Joo Chin Microcapsules by Complex Coacervation for Electronic Ink / *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, V. 464, I. 1, 2007, P. 263-269.

10 Daria B. Trushina, Tatiana V. Bukreeva, Mikhail V. Kovalchuk, Maria N. Antipina CaCO_3 vaterite microparticles for biomedical and personal care applications / *Materials Science and Engineering: C*, V. 45, 2014, P. 644-658.

11 URL: <https://studfiles.net/preview/5246053/page:2/> (дата обращения 12.05.2019) Гомельский государственный медицинский университет. Аналитическая химия. StudFiles. Объем 176130 байтов. (Последнее изменение страницы: 2 февраля 2016 года)

12 Alexander I. Petrov, Dmitry V. Volodkin, Gleb B. Sukhorukov Protein—Calcium Carbonate Coprecipitation: A Tool for Protein Encapsulation // *Biotechnology Progress*. 2008. № 3.

13 Sergei V. German, Marina V. Novoselova, Daniil N. Bratashov, Polina A. Demina, Vsevolod S. Atkin, Denis V. Voronin, Boris N. Khlebtsov, Bogdan V. Parakhonskiy, Gleb B. Sukhorukov, Dmitry A. Gorin High-efficiency freezing-induced loading of inorganic nanoparticles and proteins into micron- and submicron-sized porous particles // *Scientific Reports* 8, 17763 (2018).

14 Jingcheng Li, Sofia Sanz, Jesus Castro-Esteban, Manuel Vilas-Varela, Niklas Friedrich, Thomas Frederiksen, Diego Peña, Jose Ignacio Pascual Uncovering the Triplet Ground State of Triangular Graphene Nanoflakes Engineered with Atomic Precision on a Metal Surface // *Phys. Rev. Lett.* 124, 177201 (2020).