УДК 532.517: 577.115

ПРИМЕНЕНИЕ ГИДРОДИНАМИЧЕСКОЙ КАВИТАЦИИ В ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ ПОЛУЧЕНИЯ ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОСТРУКТУР

Авдеева Л.Ю., Иваницкий Г.К.

Институт технической теплофизики НАН Украины, Киев, Украина

АННОТАЦИЯ

Обсуждается возможность использования роторных кавитационных реакторов в технологии производства липосомных препаратов. Анализируются структурные особенности липосом – замкнутых нанокапсул, поверхность которых образована фосфолипидными мембранными бислоями, а также величины энергии связи в этих структурах. Известно, что липосомы применяются сейчас как эффективное средство транспортировки микродоз биоактивных веществ и лекарственных препаратов, заключенных в их объеме, к клеткам живых организмов. Результаты аналитического и экспериментального исследования доказывают, что использование роторно-пульсационных аппаратов при масштабном производстве липосомных препаратов может обеспечить высокую производительность и существенное снижение удельных энергетических затрат по сравнению с известными акустическими и гидромеханическими методами.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие нанотехнологий, позволяющих проводить и контролировать процессы на молекулярном и атомном уровнях, открывает широкие перспективы создания материалов с уникальными физическими, химическими и биофизическими свойствами. В последние годы подобные материалы эффективно используются в энергетике, информационных технологиях, материаловедении, биологии, медицине, других областях [1-4]. С этой точки зрения несомненный научный и практический интерес представляют наноструктуры, образованные молекулами фосфолипидов.

Фосфолипиды относятся к группе амфифильных органических соединений, молекулы которых содержат гидрофильную и гидрофобную части и, находясь в воде или водных растворах, обладают способностью к самоорганизации с образованием замкнутых бислойных мембранных оболочек сферической формы - липосом. Гидрофобные части молекул фосфолипида находятся внутри бислоя, так что внутренняя и внешняя поверхности бислоя гидрофильны. При образовании липосомы, в середину везикулы захватывается часть дисперсной среды. Таким образом, во внутренний водный объем липосомы можно включать различные лекарственные средства, пептиды, ферменты, нуклеиновые кислоты, что обеспечивает возможность практического использования липосом в качестве транспортных средств их доставки в определенные органы и клетки [3-5]. Полупроницаемая бислойная мембрана липосомы (толщиной порядка 4 нм) предохраняет препарат от действия неблагоприятных внешних факторов и, вместе с тем, не позволяет вводимому препарату превысить допустимую концентрацию при действии на живой организм. Липосома, в сущности, является наноконтейнером, из которого препарат постепенно высвобождается в нужных дозах в течение заданного промежутка времени.

Очевидно, что дисперсии липосом заданного размера и структуры, необходимые для решения конкретных задач, не могут образовываться самопроизвольно. Технологические приемы получения липосом с заданными параметрами требуют организации контролируемого динамического или акустического воздействия с использованием разного рода механических диспергирующих устройств или ультразвуковых генераторов [4-6]. Существующие сегодня методы получения липосом малопроизводительны и чрезвычайно энергозатратны, и их

© Авдеева Л.Ю., Иваницкий Г.К.

использование оправдано лишь при решении узких специальных задач, для которых нужно создание небольшого количествами продукта, например, для проведения фундаментальных биофизических исследований.

Сегодня фосфолипидные наноструктуры применяют в фармакологии, медицине и косметической промышленности. Однако, они являются перспективными и для пищевой промышленности, сельского хозяйства, а также при решении различного рода экологических проблем. Таким образом, создание липосомных препаратов переходит в стадию крупномасштабного производства, требующего высоко-производительного оборудования с малыми энергетическими затратами.

В данной работе на основе результатов экспериментального и аналитического исследования показана возможность и перспективность использования кавитационных реакторов роторного типа при создании высокоэффективных технологий для промышленного производства липосомых препаратов широкого назначения.

ФОРМИРОВАНИЕ ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОСТРУКТУР

В жидкокристаллическом состоянии молекулы фосфолипидов самоорганизуются с образованием замкнутых мембранных оболочек, что соответствует минимальному значению энергии Гиббса ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S < 0$). В зависимости от состава и способа получения, фосфолипиды образуют следующие наноструктуры: либо крупные многослойные липосомы (с диаметром d =0,5 10 мкм), либо крупные (d =150 500 нм) или мелкие (d =25 100 нм) однослойные липосомы [4,5]. Размер липосомы и количество у нее липидных слоев определяют величину объема захвата – объем водной фазы, содержащей биоактивные компоненты, которую удерживает и транспортирует липосома [5]. Крупные однослойные липосомы имеют большой объем захвата - 8÷14 дм^3 воды на 1 моль фосфолипида, тогда как у многослойных - всего 1÷4 дм^3/моль. В некоторых случаях, несмотря на очень небольшой объем захвата (0,2÷1,5дм^3/моль), предпочтительны мелкие липосомы, способные проникать внутрь живой клетки, а также пролонгировать действие биоактивных препаратов за счет длительного пребывания в организме [4,5,7].

Механизмы самосборки липосом изучены недостаточно и рассматриваются лишь в рамках гипотез. В процессе самосборки в водной дисперсии набухшего фосфолипида образуются крупные агрегации [5,6]. При слабом механическом воздействии эти агрегации распадаются на многослойные липосомы, которые состоят из нескольких десятков и даже сотен липидных бислоев толщиной 4 нм, разделенных водными промежутками толщиной 5÷20 нм. Липосомы в агрегациях связаны слабыми ван-дерваальсовыми силами с энергией связи порядка 1÷5 кДж/моль. Это в 50÷100 раз меньше энергии внутримолекулярных связей в молекуле липида [8].

При достаточно сильном акустическом или механическом воздействии на многослойные липосомы, благодаря разрушению внешних слоев, образуются однослойные липосомы, размер которых тем меньше, чем выше интенсивность воздействия [3-5, 7]. Устойчивость многослойных и однослойных липосом при внешних воздействиях определяется энергией водородных связей, ионными, ион-дипольным, гидрофобным взаимо-действиями. Энергия связей этих взаимодействий не превышает 40 кДж/моль, причем энергия связи между слоями тем меньше, чем дальше слои удалены от центра липосомы. При получении однослойных липосом требуемого размера уровень динамического воздействия должен соответствовать величине энергии разрушаемых связей. Более сильные воздействия (повышение частоты и/или интенсивности ультразвука) ведут к разрыву мембранного бислоя и разрушению однослойных липосом, что требует преодоления энергии связи свыше 100 кДж/моль. Акустическая или гидромеханическая обработка липосомных структур сопровождается процессами самосборки разрушенных липосом и последующей их коагуляцией, что в совокупности определяет средний размер частиц липосомной суспензии. Размеры и форма липосом зависят от состава липидной дисперсии, способа получения липосом, pH-среды и многих других факторов [3,5]

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОМНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Существующие методы получения фосфолипидных наноструктур требуют проведения совокупности сложных и длительных химических биохимических, гидромеханических и термических процессов. На первом этапе осуществляется выпаривание раствора фосфолипида в органическом растворителе (хлороформе, этаноле и т.п.) до образования на стенках сосуда пленки, которую затем переносят в водную среду, содержащую биоактивные компоненты. При встряхивании полученной водной дисперсии фосфолипида в течении длительного времени (30-45 мин) образуется взвесь многослойных липосом с широким распределением частиц по размерам. Другие способы включают детергентную обработку, упаривание с обращением фаз, введением эфира, а также лиофилизацию и методы замораживания-оттаивания [3,4,9].

На следующем этапе для получения однослойных липосом заданного размера проводится диспергирование липосомной суспензии с применением методов ультразвуковой обработки, экструзии, гомогенизации в клапанных гомогенизаторах и прессах Френча, центрифугирования, или иных способов активного механического воздействия. Очень мелкие однородные липосомы получают, например, путем экструзии через поликарбонатный мембранный фильтр с размерами пор 0.2 мкм и последующей стерилизующей фильтрацией через мембраны с размерами пор 0.22÷0.45 мкм [5].

Основным недостатком этих методов, используемых в биохимических и микробиологических исследованиях, является чрезвычайно высокие затраты энергии на единицу продукта и низкая производительность.

Кавитационную обработку липидной суспензии с помощью УЗ-генераторов обычно проводят в небольших емкостях ($V < 1$ дм^3) в течении 3÷10 мин. При этом высвобождается большое количество тепла, которое необходимо отводить для предотвращения окислительных реакций. Используются промышленные ультразвуковые генераторы высокой мощности, работающие на строго заданных стандартных частотах (20, 35 и 40 кГц). Это приводит к чрезмерному уменьшению среднего диаметра липосом и объема захвата. Так в работе [9] отмечается, что при использовании УЗ-генератора с частотой 40 кГц для получения однородной суспензии липосом средний диаметр частиц части составлял 8-15 нм, а объем захвата 0,06÷0,1 дм^3/моль. Отсутствие информации о механизме кавитационного воздействия на липосомы затрудняет возможность рекомендации оптимальных режимов обработки липомавльных суспензий с использованием акустических методов.

При использовании клапанных гомогенизаторов, прессов Френча или других экструзионных методов, общепризнанным механизмом диспергирования считается действие сдвиговых напряжений в узких каналах (d <1 мкм). Благодаря высоким давлениям на входе в экструдер (20÷200 МПа) достигаются чрезвычайно большие значения скорости сдвига (5÷8·10^6 с$^{-1}$). При использовании экструзионных методов для достижения нужного уровня диспергирования проводится многократная рециркуляция липидной суспензии в аппарате. Оценка эффективности экструзионных и акустических методов получения липосомных препаратов показывает, что динамические кавитационные параметры при ультразвуковой обработке с частотой 40 кГц эквивалентны давлениям на входе в клапанный гомогенизатор порядка 300-400 МПа.

В [6] рассматриваются принципы разработки технологии получения липосом размером 150÷200 нм с применением трехплунжернорго клапанного гомогенизатора, работающего под давлением 50÷70 МПа при номинальной мощности 15 кВт. Производительность аппарата в этой технологии при трехкратной рециркуляции составляет 150 л/сутки.

Проведенный анализ показал, что на сегодняшний день отсутствуют методы и технологии, позволяющие организовать масштабное производство липосомных препаратов, прежде всего, для их использования в пищевой промышленности, в сельском хозяйстве и в других отраслях, где примение этих фосфолипидных структур представляется перспективным.

© Авдеева Л.Ю., Иваницкий Г.К.

АНАЛИЗ КАВИТАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ В РОТОРНО - ПУЛЬСАЦИОННОМ АППАРАТЕ

Представляется перспективной разработка технологии приготовления липосомных суспензий с использованием аппаратов роторного типа. Существующие роторно - пульсационные аппараты (РПА) отличаются разнообразием конструкций, габаритных размеров, а также широким спектром воздействий на обрабатываемые среды. Аппараты такого типа успешно применяются в различных отраслях промышленности, в частности, для создания водотопливных эмульсий, экстрагирования лекарственных веществ из растительного сырья, приготовления витаминных препаратов и т.п. [10]. Эффективность этих аппаратов обусловлена возможностью инициирования в них явлений кавитации, сравнимых по интенсивности с теми, которые создаются при ультразвуковой обработке [11]. Локальные значения сдвиговых напряжений в кавитационной зоне выше, чем в узких каналах клапанных гомогенизаторов и других экструзионных устройств. Вместе с тем, выбор конструкции геометрических параметров и режимов работы аппарата позволяет контролировать уровень интенсивности, что важно в технологиях получения фосфолипидных наноструктур.

С целью изучения возможности применения кавитационных реакторов роторного типа для получения однослойных липосом с заданными параметрами выполнены экспериментальные и аналитические исследования

В исследованиях использовался разработанный в Институте технической теплофизики НАН Украины роторно-пульсационный аппарат цилиндрического типа, состоящий из двух статоров и вращающегося между ними ротора с внутренним радиусом R_{rot1}=35 мм и внешним R_{rot2} =38 мм. Ширина кольцевых зазоров между ротором и статорами δ=0,2 мм. На поверхностях статоров и ротора размещены n=24 щелевых отверстия шириной a=3 мм, высотой h=25 мм и глубиной l =3 мм, которые взаимно перекрываются при вращении ротора. Номинальные значения угловой скорости ротора ω– 314 , 472 и 628 рад/с. При ω= 628 рад/с величина сдвиговой скорости в зазорах $G_\delta = \omega \bar{R}_{rot}/\delta$ составляет 10^5 $с^{-1}$, что для воды соответствует напряжениям сдвига $p_\delta \propto 100$Па. Такой уровень напряжений сдвига обеспечивает разрушение супрамолекулярных структур, связанных ван-дер-ваальсовскими силами, в том числе агрегаций мицелл и липосом [5,6].

Однако действию сдвиговых напряжений внутри зазоров подвергается лишь малая часть обрабатываемой жидкости. Основной поток проходит через каналы ротора и статоров, в которых, среди прочих факторов гидродинамического воздействия [10,11], наиболее эффективным является кавитация. Причина возникновения кавитации заключается в периодическом изменении площади сечения канала $S(\tau)$ от $S_{\max} = ah$ до $S_{\min} = \delta H$ с частотой $f = \omega n/2\pi$. За один периода пульсаций давление в зоне сужения падает ниже уровня давления насыщения и затем возрастает до начального уровня. При выполнении этого условия в кавитационной зоне за время $\Delta\tau = 1/f \propto 400 \div 800$ мкс формируется, растет и схлопывается совокупность пузырьков кавитационного кластера.

Вследствие действия центробежных сил, возникающих при вращении ротора, жидкость перемещается в радиальном направлении через щелевые каналы под действием разности давлений $\Delta p = \rho\omega^2\left(R_{rot2}^2 - R_{rot1}^2\right)/2$. Решение задачи неста-ционарного течения жидкости в каналах РПА заданной геометрии проводится с использованием уравнения механической энергии в форме интеграла Лагранжа-Коши с учетом диссипативных потерь на путевых и местных сопротивлениях. Коэффициенты гидравлических сопротивлений являются постоянными уравнения за исключением двух гидравлических сопротивлений «задвижки» $\zeta_{\text{var}} = f(\tau)$ в зонах перекрытия отверстий, величина которых зависит от площади проходного сечения и определяет мгновенные значения скорости и давлений в каналах ротора и статора.

Скорость течения в каналах аппарата

$$v(\tau) = \sqrt{\frac{\omega^2\left(R_{rot2}^2 - R_{rot1}^2\right)}{Z + 2\zeta_{\text{var}}(\tau)}},$$

где Z - сумма всех постоянных гидравлических сопротивлений. Сопротивление $\zeta_{\text{var}} = f(\tau)$ определяем из эмпирического соотношения

$\zeta_{\text{var}} = (1/K - 1)^2$,

где $K(\tau) = 0{,}7\, S(\tau)/S_{\max} + 0{,}23\left(S(\tau)/S_{\max}\right)^2$.

В результате решения рассчитываются давления в критических зонах каналах – на границе ротора и статоров, где возникают кавитационные эффекты.

На рис.1 представлена расчетная зависимость изменения во времени давления на входе во внешний статор, где возникают наиболее сильные кавитационные эффекты. Расчет выполнен для скорости вращения ротора ω=628 рад/с.

Акустическое воздействие на жидкость в каналах данного РПА осуществляется с частотой в f интервале 1,2÷2,4 кГц и интенсивностью I в интервале от 10 до 50 Вт/см^2. Эти значения соответствуют интенсивности стандартных ультразвуковых генераторов, которые используются при получении липосом. Однако частоты этих генераторов (обычно 20 кГц и 44 кГц), на порядок превышают частоту колебания давления в РПА.

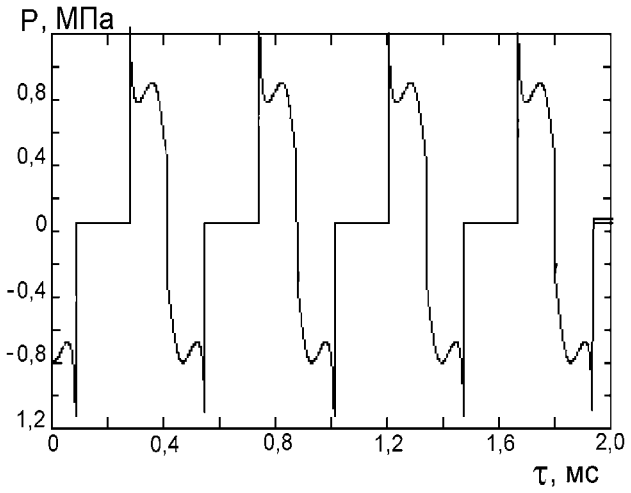

Рис.1 Изменение давления в жидкости на входе во II статор

Представленная на рис.1 расчетная зависимость изменения давления за один цикл колебания, как на стадии понижения, так и на стадии возрастания, аппроксимируется аналитическим выражением

$$p_\infty = p_2 + \frac{p_1 - p_2}{2}\left(1 + \cos\frac{\pi\tau}{\Delta\tau}\right). \qquad (1)$$

Амплитуды давления p_1 и p_2, а также время сброса давления $\Delta\tau_1$ и время его возрастания $\Delta\tau_2$ определяются в ходе решении задачи о течении жидкости в канале. Значения этих параметров в кавитационных зонах зависят от скорости вращения ротора и от геометрии аппарата.

Выбор рациональной конструкции РПА и режимов его работы позволяет контролировать уровень кавитационного воздействия. Уравнения (1) с заданными параметрами p_1, p_2, $\Delta\tau_1$ и $\Delta\tau_2$ используются в модели динамики кавитационного кластера для численного расчета динамического и термического воздействия на дисперсные структуры по схеме, рассмотренной в работе [12].

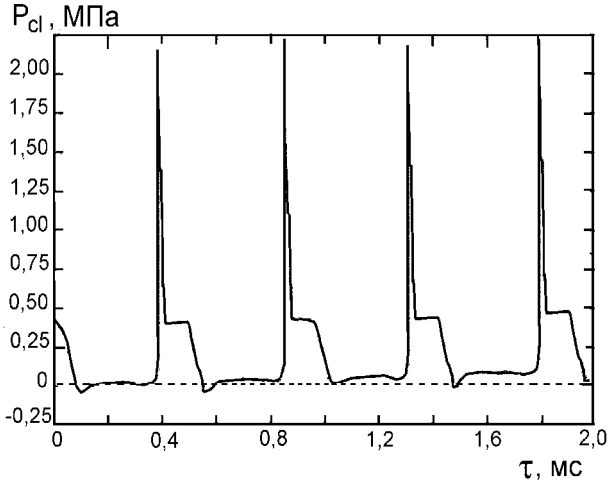

Рис.2 Изменение давления внутри кавитационного кластера в каналах РПА за четыре периода колебаний

При периодическом изменении давления в критических зонах РПА в течение одного периода колебаний формируются, растут и схлопываются кавитационные кластеры с выделением мощного акустического импульса. На рис.2 показано как меняется давление внутри пузырькового кластера за четыре периода колебаний при тех же режимных параметрах, что и на рис.1. Амплитуды акустического импульса, излучаемого кавитационным кластером на стадии схлопывания, значительно выше амплитуды пульсаций давления в каналах аппарата, показанных на рис.1.

Расчеты, выполненные в рамках модели динамики пузырькового кластера, показывают, что в кавитационных зонах исследуемого роторного аппарата уровень локальных сдвиговых скоростей достигает $4{,}6\cdot10^6$ с$^{-1}$. Это близко к величинам сдвиговых скоростей, которые реализуются в клапанных гомогенизаторах и прессах Френча, но ниже сдвиговых скоростей в зоне ультразвукового облучения при частоте генератора 20 кГц и интенсивности 10 Вт/см^2.

© Авдеева Л.Ю., Иваницкий Г.К.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объекта исследования использовался фосфолипидный комплекс, экстрагированный из сои. Водная дисперсия фосфолипидов подвергалась кавитационной обработке в РПА для получения однослойных липосом. Приготовление водной дисперсии липидов в воде и ее последующую обработку проводили при температуре 42±2°С, что выше температуры фазового перехода данного фосфолипида в жидкокристаллическое состояние.

Размер липосом, полученных при обработке водной дисперсии фосфолипидов определялся на лазерном фотон-корреляционном спектрометре “Zeta Sider-3” Malvernt Instrument, Великобритания, оборудованного He-Ne лазером ЛГН=111 (W=25 МВт, λ=633 нм). Диапазон измерения прибора - от 1 нм до 50 мкм.

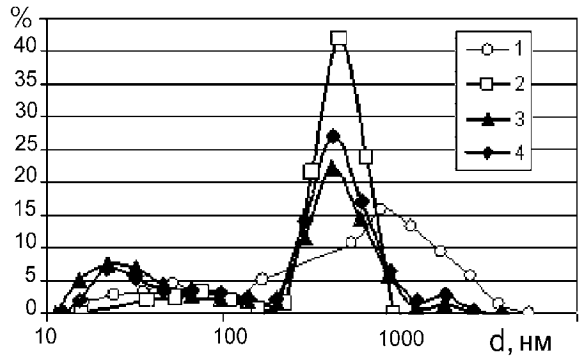

Рис.3 Распределение размеров частиц дисперсии фосфолипида в воде в зависимости от количества циклов обработки на РПА: 1 - 1 цикл, 2 - 3 цикла, 3 - 5 циклов, 4 - 7 циклов.

В экспериментальных исследованиях определялось распределение липосом по размеру и средний диаметр частиц липосомной дисперсии, полученной в результате обработке в РПА, в зависимости от количества циклов рециркуляции и скорости вращения ротора.

На рис.3 показано распределение по размеру частиц липосомной суспензии с 5% весовым содержанием фосфолипида после обработки на РПА в зависимости от степени рециркуляции при ω=628 рад/с. В результате исследований нами было установлено, что с повышением количества циклов максимум на кривой распределения смещается в сторону меньших размеров. Существенное снижение дисперсности происходит в течение первых трех циклов обработки. После третьего цикла средний диаметр частиц уменьшается от 700 нм (в первом цикле) до 420 нм. Пяти- и семикратная обработка приводит к менее выраженному снижению дисперсности - до 358 нм и 328 нм, соответственно.

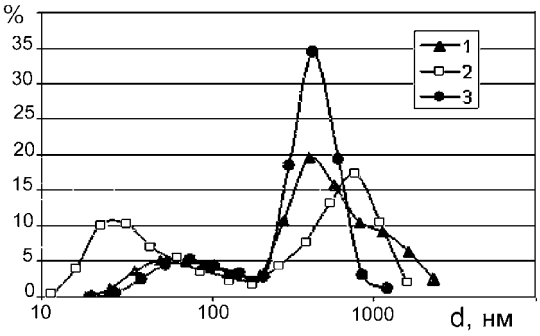

Рис.4 Распределение размеров частиц дисперсии фосфолипидов скорости вращения ротора: 1 – 315 рад/с; 2 – 472,5 рад/с, 3 – 630 рад/с.

На рис.4 показано влияние скорости вращения ротора на распределение частиц по размеру в 1% липосомной суспензии при трехкратной обработке.

С ростом числа оборотов ротора максимум на кривой распределения смещается в область малых размеров. При этом увеличение скорости вращения оказывает неоднозначное влияние на диспергирование. Так, при ω =314 рад/с содержание липосом размером до 125 нм составляет 25,2%. При ω =472 рад/с количество таких частиц увеличивается до 43,7%. Повышение числа оборотов до 628 рад/с приводит к одновременному слипания мелких частиц в конгломераты и дроблению крупных частиц. При увеличении ω от 314 до 472 рад/с средний диаметр липосом $\bar{d}$ резко снижается (от 580 до 410 нм), а при дальнейшем увеличении скорости вращения почти не меняется (при ω=628 рад/с средний диаметр $\bar{d}$ =390 нм). Анализ результатов показал, что для приготовления липосомной суспензии со средним размером частиц 400÷500 нм достаточно трехкратной непрерывной роторной обработки при скорости вращения ω=314 рад/с.

Увеличение числа оборотов свыше 315 рад/с наряду с повышением производительности и сравнительно небольшим снижением дисперсности приводит к значительному увеличению удельных энергозатрат и к быстрому износу деталей аппарата. Данный тип РПА с мощностью 1,5 кВт позволяет производить 300÷500 литров липосомной суспензии в час.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение характеристик различных типов диспергирующих устройств, используемых для получения липосомных препаратов, по мощности, производительности, расходам электроэнергии на единицу вырабатываемой продукции, а также по интенсивности гидродинамического воздействия показало перспективность применения роторно-импульсных аппаратов в качестве кавитационных реакторов для приготовления липосомных суспензий в промышленных масштабах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ковальчук М.В. Нанотехнологии – фундамент новой наукоемкой экономики 21 века / М.В. Ковальчук //Российские нанотехнологии.– 2007. – Т.2, №1.–2.–С.6–11.
2. Суздалев И.П. Нанотехнология: физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов / И.П. Суздалев.–М.: КомКнига, 2006.–592 с.
3. Lasic D.D. Liposomes: From Physics to Applications / D.D.Lasic. //Amsterdam: Elsevier, 1993. -.242 p/
4. Gregoriadis G. Liposome Technology / Gregoriadis Gregory The School of Pharmacy University of London.- New York, London, 2007. –422 p.
5. Барсуков Л.И. Липосомы / Л.И. Барсуков // Соросововский образоват.журнал, 1998. – С.2–9.
6. Краснопольский Ю.М. Липидная технологическая платформа для создания новых лекарственных форм и транспорта активных фармацевтических субстанций / Ю.М. Краснопольский, А.Е.Степанов, В.И.Швец //Биофармацевтичекий журнал.- 2011.- Т.3, №2. - С.10-18.
7. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя. /. В.Г.Ивков, Г.Н.Берестовский . - М.: Наука, 1981. – 293 с.
8. Краснов К.С. Молекулы и химическая связь / К.С.Краснов. - М.: Высшая школа, 1977.- 280 с.
9. Кузякова Л.М. Конструирование трансдермальных липосомальных препаратов с заданными свойствами / Кузякова Л.М. // Вестн. Моск. ун-та. – сер.2.– Химия. – 2005. – Т.46, №1. – С. 74-79.
10. Промтов М.А. Исследование гидродинамических закономерностей работы роторно - импульсного аппарата / М.А.Промтов // ТОХТ. - 2001. - Т.35, №1. - С. 103 - 106.
11. Червяков В.М. Использование гидродинамических и кавитационных явлений в роторных аппаратах / В.М.Червяков, В.Г.Однолько. - М.:Машиностроение, 2008. -116 с.
12. Иваницкий Г.К.. Численное моделирование поведения пузырькового кластера в процессах гидродинамической кавитации / Г.К.Иваницкий // Современная наука: исследования, идеи, результаты, технологии. Сб. научн. статей. - №2(7). – 2011.

© Авдеева Л.Ю., Иваницкий Г.К.