

РАЗРАБОТКА ЛЕЦИТИНОВЫХ МЕМБРАН КАК МОДЕЛЕЙ

Н.Ш. Кайшева

д.фарм.н., профессор, кафедра фармацевтической и токсикологической химии,
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Волгоградского государственного медицинского университета
E-mail: caisheva2010@yandex.ru

А.Ш. Кайшев

к.фарм.н., вед. специалист,
Межрегиональное управление Росалкогольрегулирования по Северо-Кавказскому федеральному округу
E-mail: kaishev2010@yandex.ru

В.А. Карпенко

к.фарм.н., доцент, кафедра фармации, факультет последипломного образования,
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Волгоградского государственного медицинского университета

А.Б. Саморядова

к.фарм.н., доцент, кафедра фармацевтической и токсикологической химии,
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Волгоградского государственного медицинского университета

В качестве моделей биологических мембран предложены плотные бумажные фильтры марки «синяя лента» различного диаметра (5–20 см) с соответствующей рабочей площадью (15–300 см²), позволяющие проводить диализ различных объемов растворов и по диаметру пор (0,35–0,40 нм) соответствующие диаметрам пор биологических мембран. Экспериментально подобраны оптимальные условия обработки бумажных фильтров лецитином. Показано, что лецитиновые мембраны обладают устойчивостью к процессам гниения, деструкции, окисления, а также варьированием площади рабочей поверхности и скорости диализа, длительностью хранения и использования, возможностью изготовления по мере необходимости, простотой изготовления, доступностью используемых материалов и реактивов.

Ключевые слова: биологические мембраны, лецитин, диализ, полисахариды.

Биологическую доступность лекарственных веществ (ЛВ) из лекарственных форм часто изучают методом диализа, эффективность использования которого определяется, главным образом, выбором подходящей мембраны. По методу изолированных органов (метод *in situ*) «диализными» мембранами служат натуральные пленки: париетальный (наружный) лист брюшины животных, переживающая кожа животных, стенка желудка и кишечника, яичная оболочка [1, 2], которые в свежее выделенном состоянии позволяют получить объективное представление о биологической доступности испытываемых ЛВ. Однако их использование ограничено необходимостью забоя животных, очень маленькой рабочей поверхностью, быстрой подверженностью процессам окисления и гниения, влиянием продуктов разложения компонентов мембран на испытываемые растворы ЛВ (помутнение, выделение коллоидных осадков), трудоемкостью отделения мембран от мышечного, кожного слоя [1, 2]. Во избежание перечисленных нежелательных явлений, натуральные мембраны должны быть всегда свежее выделенными. Чаще в качестве мембран используют пленки из полимерных материалов: целлофана, поливинилхлорида,

полиамида, ацетилцеллюлозы [3], лишенные недостатков, свойственных биологическим мембранам, но приводящие к недостоверным результатам из-за отсутствия влияния процессов растворения, взаимодействия, метаболизма ЛВ, происходящих в белково-липидном слое биологических мембран.

Учитывая, что основу биологических мембран составляют ненасыщенные фосфолипиды и холестерин [4], а подобным по химическому строению комбинированным соединением является лецитин (фосфатидилхолин) – сложный эфир глицерина, этерифицированного насыщенными или ненасыщенными жирными кислотами и фосфорной кислотой, в свою очередь, связанной с холином [5], представляется возможной перспектива разработки на основе лецитина модельных мембран.

Ц е л ь р а б о т ы – создание на основе лецитина модельных мембран, близких по функциональным свойствам к биологическим мембранам, но в отличие от них обладающих оптимальными технологическими параметрами (большой рабочей поверхностью, длительным сроком хранения и использования, упрощенностью и доступностью изготовления).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для изготовления моделей биологических мембран служили наиболее плотные бумажные фильтры марки «синяя лента» разного диаметра (5–20 см) с соответствующей рабочей площадью (15–300 см²), позволяющие проводить диализ различных объемов растворов. Выбор фильтров обусловлен диаметром пор (0,35–0,40 мкм), соответствующим диаметрам пор биологических мембран [6, 7]. В качестве мембран, предназначенных для сравнительной оценки изготавливаемых моделей, служили целлофановые пленки и наиболее крупная из биологических мембран – париетальный лист брюшины крысы.

Для пропитки фильтров использовали соевый лецитин в форме геля (ООО «Фарминдустрия», Россия), содержащий в качестве фосфолипидов фосфатидилхолин (20%), фосфатидилэтаноламин (14%), фосфатидилинозитол (21%) и фосфатидилсерин (5,9%). Кроме того, в составе лецитина имеются соевое масло (34%), высшие жирные кислоты (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, арахидоновая, линолевая, омега-3 и омега-6), сложные эфиры, витамины (Е, В₁, В_с, В₂, В₅, В₆, В₉, В₁₂, А, РР, D), стерин и стеролы.

При экспериментальном подборе оптимальных условий изготовления модельных мембран было изучено влияние природы, концентрации и температуры растворителя на растворимость лецитина, количественный расход растворителя и продолжительность обработки бумажных фильтров. Критериями выбора оптимальных условий являлись растворимость лецитина при температуре 20 °С (объем в миллилитрах растворителя для растворения 1 г лецитина) и ее категория [8], а также визуальный контроль однородности светло-желтой окраски фильтров.

В качестве испытуемых ЛВ использовали полисахариды: свекловичный пектин (ООО «Марс», г. Нальчик) – олигомер со степенью полимеризации 18, соответствующий требованиям ВФС 42-3433-99 [9], и натрия альгинат (Опытно-водорослевый комбинат, г. Архангельск) – полимер со степенью полимеризации 518, соответствующий требованиям ГОСТ 26185-84 [10].

Степень диализа, или долю прошедшего через мембрану ЛВ относительно исходного количества ЛВ [7], оценивали через различные мембраны, используя способность полисахаридов к поглощению в УФ-области спектра в характерных максимумах: 292 нм для пектина [11], 225 нм для

натрия альгината [12]. Измеряемыми параметрами являлись: A_1 и A_2 – оптическая плотность соответственно диализуемого раствора и диализата на определенный момент диализа; τ – продолжительность диализа в часах.

Степень диализа (d) и приведенную степень диализа (d' , ч⁻¹) полисахаридов рассчитывали соответственно по формулам [7]

$$d = A_2 / (A_1 + A_2), \quad d' = d / \tau.$$

В работе использовали традиционное аппаратное оформление [3] с применением стеклянной трубки (длиной 15 см, диаметром 3,5 см), с одной стороны закрытой мембраной, края которой зафиксированы на трубке резинкой. Через специальное приспособление (картонную пластинку с отверстием) стеклянную трубку опускали в химический стакан вместимостью 100 мл, содержащий 50 мл изотонического (0,154 М) раствора натрия хлорида, на такую глубину, чтобы мембрана едва касалась растворителя. Прибор термостатировали (37±0,5 °С, 2 ч), далее в трубку вносили 20 мл водного раствора полисахарида (3,125 мМ пектина или 0,111 мМ натрия альгината), опускали трубку в стакан на такую глубину, чтобы уровни растворов в трубке и стакане были примерно одинаковыми, снова термостатировали (37±0,5 °С). Периодически содержимое трубки и стакана перемешивали. Отбор проб диализата (раствора, прошедшего через мембрану в стакан) по 5 мл проводили через определенные интервалы времени от начала диализа (2, 6, 10, 24 ч) с немедленным возвращением взятого объема растворителя. Оптическую плотность исходного диализуемого раствора и отобранных проб диализата измеряли на спектрофотометре «СФ-56 М» в кюветах с толщиной слоя раствора 1 см.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментального подбора оптимального режима получения модельных мембран на основе лецитина приведены в табл. 1–5.

Таблица 1. Влияние природы растворителя на растворимость лецитина при температуре 20 °С

Растворитель	Растворимость, мл	Категория растворимости
Вода	3000	Очень малорастворим
Этанол 95%	30	Растворим
Тетрахлорметан	900	Малорастворим
Диэтиловый эфир	800	Малорастворим
Петролейный эфир	900	Малорастворим

Таблица 2. Влияние концентрации этанола на растворимость лецитина при температуре 20 °С

Концентрация этанола, %	Растворимость, мл	Категория растворимости
70	55	Умеренно растворим
80	40	Умеренно растворим
90	35	Умеренно растворим
95	30	Растворим

Таблица 3. Влияние температуры этанола 95%-ного на растворимость лецитина

Температура этанола 95%-ного, °С	Растворимость, мл	Концентрация лецитина, %	Категория растворимости
20	30	3,3	Растворим
40	25	4,0	Растворим
60	20	5,0	Растворим
78	16	6,3	Растворим

Таблица 4. Расход 6,3%-ного спиртового раствора лецитина для пропитки бумажных фильтров

Диаметр фильтра, см	Площадь фильтра, см ²		Расход 6,3%-ного спиртового раствора лецитина на 10 фильтров, мл
	общая	рабочая	
5,0	19,6	15,0	80
10,0	78,5	50,0	100
20,0	314,0	300,0	130

Таблица 5. Влияние продолжительности обработки бумажных фильтров 6,3%-ным спиртовым раствором лецитина на однородность окраски фильтров

Продолжительность обработки фильтров, ч	Однородность светло-желтой окраски фильтров
6	Неравномерная
12	Неравномерная
24	Неравномерная
48	Равномерная

Приведенные данные свидетельствуют о следующих оптимальных условиях изготовления лецитиновых мембран:

из испытанных полярных и неполярных растворителей наибольшую растворимость лецитина обеспечивает кипящий этанол 95%-ный (коэффициент растворимости лецитина составляет 6,3 г/100 мл 95%-ного спирта);

расход 6,3%-ного спиртового раствора лецитина для полного погружения в раствор и пропитки 10 бумажных фильтров «синяя лента» диаметром 5,0–20,0 см и рабочей площадью 15,0–300,0 см² составляет 80–130 мл;

оптимальная продолжительность обработки бумажных фильтров 6,3%-ным спиртовым раствором лецитина составляет 48 ч, что подтверждается однородной светло-желтой окраской фильтров, присущей лецитину.

С учетом подобранных оптимальных условий методику получения лецитиновых мембран можно конкретизировать примером. В колбу вместимостью 250 мл, соединенную с обратным холодильником, вносят 100 мл этанола 95%-ного, содержимое колбы нагревают до температуры кипения спирта, затем в колбу вносят 6,3 г лецитина и продолжают нагревание до полного растворения лецитина. Полученный раствор лецитина (желтого цвета) охлаждают до температуры 20 °С, переливают в чашку Петри и погружают в него 10 бумажных фильтров «синяя лента» диаметром 10 см, чашку закрывают крышкой и выдерживают в течение 48 ч. Фильтры вынимают, освобождают от остатков спирта деаэрацией.

Полученные лецитиновые мембраны представляют собой фильтры с воскообразной поверхностью и равномерной по всей поверхности светло-желтой окраской; рабочая площадь одного фильтра составляет 50,0 см².

Сравнительные результаты определения степени диализа при различной его продолжительности через различные мембраны на примере водных растворов полисахаридов приведены в табл. 6.

Таблица 6. Степень диализа полисахаридов через различные мембраны

τ, ч	Целлофан		Париетальный лист брюшины крысы		Лецитиновые мембраны	
	d	d', ч ⁻¹	d	d', ч ⁻¹	d	d', ч ⁻¹
Пектин						
2	0,088	0,044	0,080	0,040	0,077	0,039
6	0,259	0,043	0,228	0,038	0,223	0,037
10	0,423	0,042	0,364	0,036	0,360	0,036
24	0,993	0,041	0,856	0,036	0,848	0,035
Среднее	–	0,043	–	0,038	–	0,037
Натрия альгинат						
2	0,060	0,030	0,049	0,025	0,052	0,026
6	0,174	0,029	0,145	0,024	0,155	0,026
10	0,289	0,029	0,238	0,024	0,253	0,025
24	0,684	0,029	0,565	0,024	0,580	0,024
Среднее	–	0,029	–	0,024	–	0,025

Приведенные данные свидетельствуют о сопоставимости результатов, полученных с применением лецитиновых мембран и париетального листа брюшины крысы при диализе как пектина, так и натрия альгината: средние значения приведенной степени диализа различаются на 2,7 и 4,0% соответственно. При использовании целлофановых пленок различия с париетальным листом брюшины крысы по средним значениям приведенной степени диализа пектина достигают 11,6%, натрия альгината – 17,2%; завышенные результаты объясняются инертным характером мембран.

ВЫВОДЫ

1. Получены лецитиновые мембраны путем пропитывания плотных мелкопористых (диаметр пор 0,35–0,40 нм) бумажных фильтров «синяя лента» диаметром 5,0–20,0 см в 6,3%-ном растворе лецитина в этаноле 95%-ном в течение 48 ч.
2. Включение в состав фильтров с диаметром пор, соответствующим порам биологических мембран, лецитина (фосфатидилхолина) – соединения, подобного главным компонентам биологических мембран, позволяет рассматривать лецитиновые мембраны как модели биологических мембран. Это подтверждено результатами определения приведенной степени диализа на примере полисахаридов (пектина, натрия альгината) через париетальный лист брюшины крысы и лецитиновые мембраны, отличающимися на 2,7–4,0%. Со-

поставимость результатов диализа через лецитиновые мембраны с биологическими мембранами, использование изотонического раствора натрия хлорида и физиологической температуры (37 °С) позволяют максимально моделировать условия *in vivo* при изучении биологической доступности ЛВ.

3. В отличие от биологических мембран, лецитиновые мембраны не требуют забоя животных и трудоемкого отделения мембранного слоя, отличаются устойчивостью к процессам гниения, деструкции, окисления, возможностью варьирования площадью рабочей поверхности в пределах 15–300 см² (у самых крупных биологических мембран 1,8 см²), объемами диализуемых растворов и скоростью диализа, возможностью изготовления по мере необходимости, простотой изготовления, длительностью хранения и использования, доступностью и малым расходом используемых материалов и реактивов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Камышников В.С., Волотовская О.А., Ходюкова А.Б. и др. Методы клинических исследований. М.: Медпресс-информ. 2016. С. 532–538.
2. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. Минск: Медицина. 1982. С. 222–227.
3. Гроссман В.А. Фармацевтическая технология. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2014. С.19–20.
4. Сафонова О.А., Макеева А.В., Попова Т.Н. Большой практикум по биохимии. Воронеж: ООО «Полиграф Центр». 2011. С. 372–384.
5. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: Пер. с англ. М.: Мир. 1991. С. 256–257.

6. Коростелев П.П. Лабораторная техника химического анализа. М.: Химия. 1981. С. 111–112.
7. Бабко А.К., Шкаравский Ю.Ф., Кулик В.И. Изучение молибденовых гетерополикомплексов методом диализа // Украинский химический журнал. 1968. № 1. С. 80–83.
8. Государственная фармакопея Российской Федерации: в 3 т. Изд. 13-е. М. 2015.
9. Временная фармакопейная статья ВФС 42-3433-99 «Пектин». Утв. приказом МЗ РФ № 363 от 08.10.1999.
10. ГОСТ 26185-84 «Водоросли морские, травы морские и продукты их переработки. Методы анализа».
11. Патент № 2116075 (РФ). Способ получения медицинского очищенного пектина / Н.Ш. Кайшева. 27.07.98.
12. Патент № 2197249 (РФ). Способ получения медицинского очищенного альгината натрия / Н.Ш. Кайшева., В.А. Компанцев. 27.01.03.

Поступила 21 января 2017 г.

THE DEVELOPMENT OF THE MEMBRANES FROM LECITHIN AS MODELS OF BIOLOGICAL MEMBRANES

© Authors, 2017

N.S. Kajsheva

Dr.Sc. (Pharm.), Professor, Faculty of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Pyatigorsk Medic-Pharmaceutical Institute – Branch of Volgograd State Medical University
E-mail: caisheva2010@yandex.ru

A.S. Kajshev

Ph.D. (Pharm.), Leading Specialist Inter-Regional Rosalkogolregulirovaniya Office for North Caucasian Federal District
E-mail: kaishev2010@yandex.ru

V.A. Karpenko

Ph.D. (Pharm.), Associate Professor, Department of Pharmacy, Faculty of Postgraduate Education, Faculty of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Pyatigorsk Medic-Pharmaceutical Institute – Branch of Volgograd State Medical University

A.B. Samorjadova

Ph.D. (Pharm.), Associate Professor, Faculty of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Pyatigorsk Medic-Pharmaceutical Institute – Branch of Volgograd State Medical University

As models of the biological membranes are proposed a dense paper filters of the brand «blue ribbon» of the different diameters (5–20 cm) with the corresponding working area (15–300 cm²) allowing the dialysis of different volumes of fluid, and the pore diameter (0,35–0,40 nm) corresponding to the diameters of pores of biological membranes. Experimentally, the optimum conditions for the processing of paper filters lecithin: lecithin solvent — boiling ethanol 95% (ratio of solubility of lecithin 6.3 g/100 ml ethanol 95%); flow rate at 6.3% alcohol solution of lecithin to impregnate 10 filters with a diameter of 5.0–20.0 cm — 80–130 ml; the duration of treatment of the filters with a solution of lecithin is 48 hours. Comparative evaluation of lecithin membranes held in matching cellophane and a biological membrane (parietal sheet of peritoneum of the rat), for example, polysaccharides (pectin, sodium alginate). The criterion of evaluation was the degree of dialysis, including the degree of dialysis, taking into account the duration of the process. When applying the lecithin membrane and parietal sheet of peritoneum of the rat during dialysis as pectin and sodium alginate were obtained comparable results: the average values given degree of dialysis differ 2.7% and 4.0%, respectively. When using plastic films differences with the parietal sheet of peritoneum of the rat according to the average values given degree of dialysis of pectin reach 11.6%, sodium alginate 17.2% per cent, and the high performance is attributed to the inert nature of the membranes. Along with the possibility of replacing biological membranes, lecithin membranes are resistant to the processes of decay, decomposition, oxidation, variation of the area of the working surface and speed of dialysis, duration of storage and use, the possibility of manufacturing as required, ease of manufacture, availability of materials and reagents.

Key words: *biological membranes, lecithin, a dialysis, polysaccharides.*

REFERENCES

1. Kamyshnikov V.S., Volotovskaja O.A., Hodjukova A.B. i dr. Metody klinicheskikh issledovanij. M.: Medpress-inform. 2016. S. 532–538.
2. Kolb V.G., Kamyshnikov V.S. Spravochnik po klinicheskoy himii. Minsk: Medicina. 1982. S. 222–227.
3. Grossman V.A. Farmaceuticheskaja tehnologija. M.: GJeOTAR-Media. 2014. S.19–20.
4. Safoнова O.A., Makeeva A.V., Popova T.N. Bol'shoj praktikum po biohimii. Voronezh: OOO «Poligraf Centr». 2011. S. 372–384.
5. Doson R., Jelliot D., Jelliot U., Dzhons K. Spravochnik biohimika: Per. s angl. M.: Mir. 1991. S. 256–257.
6. Korostelev P.P. Laboratornaja tehnika himicheskogo analiza. M.: Himija. 1981. S. 111–112.
7. Babko A.K., Shkaravskij Ju.F., Kulik V.I. Izuchenie molibdenovyh geteropolikompleksov metodom dializa // Ukrainskij himicheskij zhurnal. 1968. № 1. S. 80–83.
8. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii: v 3 t. Izd. 13-е. М. 2015.
9. Vremennaja farmakopejnaja stat'ja VFS 42-3433-99 «Пектин». Утв. приказом МЗ РФ № 363 от 08.10.1999.
10. ГОСТ 26185-84 «Водоросли морские, травы морские и продукты их переработки. Методы анализа».
11. Патент № 2116075 (РФ). Способ получения медицинского очищенного пектина / Н.Ш. Кайшева. 27.07.98.
12. Патент № 2197249 (РФ). Способ получения медицинского очищенного альгината натрия / Н.Ш. Кайшева., В.А. Компанцев. 27.01.03.