

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИСЛОЙНЫХ КАПСУЛ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И СОЛЕЙ АЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ ФОСФОЛИПИДНЫХ МИЦЕЛЛ

Манаенков О.В., доцент, Сидоров А.И., профессор,

Молчанов В.П., доцент

кафедра Биотехнологии и химии

Тверской государственной технической университет

e-mail: ovman@yandex.ru

В работе представлен способ получения капсул с оболочками на основе хитозана и кальциевой или бариевой соли альгиновой кислоты, содержащих фосфолипидные мицеллы. Капсулы могут использоваться при создании систем доставки лекарств орального применения, средств вакцинации и т.д.
A method of obtaining capsules with coats based on chitosan and alginic acid calcium or barium salts containing phosphatidylcholine micelles is described. These capsules can be used to create oral drug delivery systems, means of vaccination, etc.

Ключевые слова: альгинаты, хитозан, полисахаридная матрица, гидрогель, фосфолипидные мицеллы, системы доставки лекарств.

Key words: alginates, chitosan, polysaccharide matrix, hydrogel, phospholipid micelles, drug delivery systems.

Полисахариды природного происхождения (альгинаты, хитозан, пектин и т.п.) всё чаще находят применение для создания так называемых систем доставки лекарств направленного действия. Это различные микросферы и микрокапсулы на основе полисахаридных гидрогелей, которые изначально считались хорошими потенциальными носителями различных лекарств, обеспечивающие постоянный и длительный терапевтический эффект. Полисахаридные гидрогели подвержены биодegradации, малотоксичны до и после degradation, не являются антигенами.

Альгинаты – соли альгиновой кислоты – были впервые выделены более 100 лет назад из бурых водорослей Стэнфордом [1]. Альгиновые кислоты являются полиуронидами, т.е. полисахаридами, молекулы которых построены из остатков уроновых кислот. В составе альгиновых кислот были найдены *D*-маннуриновая и *L*-гулуриновая кислоты (рис. 1).

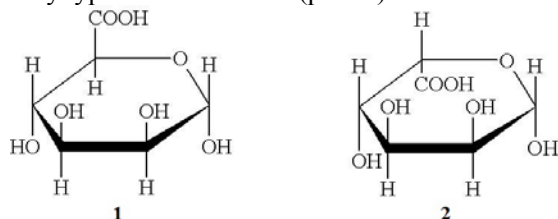


Рис. 1. Химическая структура *D*-маннуриновой (1) и *L*-гулуриновой кислот (2).

С помощью частичного гидролиза и выделения соответствующего дисахарида было установлено, что остатки обеих уроновых кислот входят в состав одной и той же молекулы полимера. Молекулы альгиновых кислот линейны и построены из остатков β -*D*-маннуриновой (М-блок) и α -*L*-гулуриновой кислот (G-блок), находящихся в пиранозной форме и связанных 1 $\rightarrow$ 4-связями [2]. Координация G-блоков с бивалентными катионами металлов (например, с кальцием) приводит к

кооперативному связыванию друг с другом разных молекул полимера, следствием чего является образование иотропных гелей (рис. 2) [2, 3].

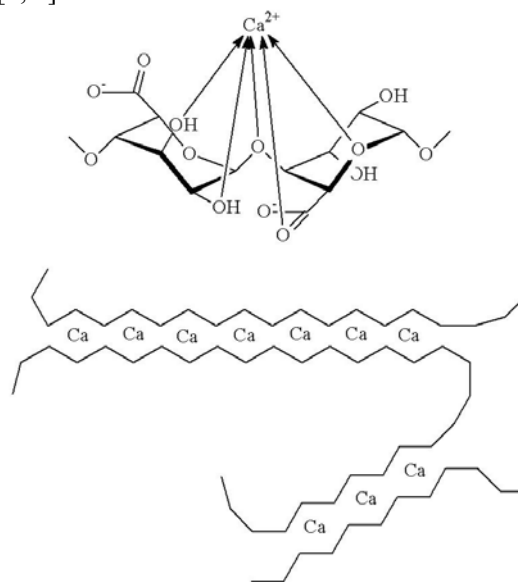


Рис. 2. Координация ионов кальция с остатками α -*L*-гулуриновой кислоты в молекуле альгината и кооперативное связывание полимерных цепей альгинатов с участием этих ионов при гелеобразовании.

Хитозан представляет собой аминополисахарид (рис. 3) – аморфно-кристаллический полимер, белый порошок без запаха и вкуса, нерастворимый в воде и обычных органических растворителях. Хитозан обладает высокой плотностью положительных зарядов, растворим в разбавленных органических и некоторых неорганических кислотах. Хитозан образует гель с многовалентными анионами, в частности, с альгинатами [4, 5].

Все эти полисахариды используются при конструировании систем доставки лекарств,

обладающих различными свойствами, из которых одним из важнейших является способность защитить иммобилизованное в полисахаридной матрице лекарственное вещество от воздействия деструктивных факторов. Особенно важным это становится при использовании лекарств пептидной природы, которые в среде желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) подвергаются активному ферментативному расщеплению.

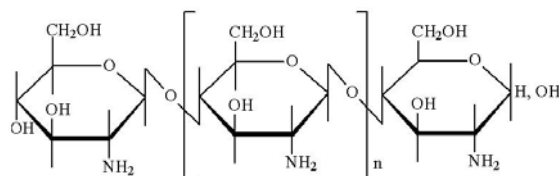


Рис. 3. Химическая структура хитозана.

К настоящему времени разработано и продолжает разрабатываться значительное количество липосомальных лекарственных препаратов различного применения, в частности, липосомальные формы пептидных препаратов и вакцин [6–11]. Иммобилизация фосфолипидных мицелл и липосом в полисахаридных матрицах может сыграть важную роль при конструировании лекарственных препаратов перорального применения, особенно если действующее вещество является белком или пептидом. Матрицы на основе альгинатов и хитозана, в силу своих физико-химических особенностей, наиболее предпочтительны. Полисахаридный гидрогель, в котором предлагается иммобилизовывать фосфолипидные мицеллы, не подвергается ферментативному расщеплению в верхних отделах ЖКТ и не растворяется в кислой среде желудка. В слабощелочной среде кишечника происходит медленное растворение гидрогеля. Скорость растворения зависит от

состава матрицы. Изменяя состав, можно контролировать скорость высвобождения фосфолипидных мицелл и, соответственно, заключенного в них лекарственного вещества на определенных участках кишечника, в частности там, где происходит активное всасывание [12–14].

Целью данного исследования являлась разработка методики получения капсул на основе солей альгиновой кислоты и хитозана различной вязкости, предназначенных для иммобилизации фосфолипидных мицелл и обладающих способностью высвобождать последние на определенных участках ЖКТ.

Результаты и обсуждение

Альгинаты и хитозан, используемые в работе, относятся к некрахмальным полисахаридам, которые в большинстве своем являются пребиотиками. Они неизменными перемещаются в толстый кишечник, где подвергаются частичному или полному гидролизу ферментами кишечной микрофлоры [15]. Таким образом, данные некрахмальные полисахариды не подвергаются ферментативному воздействию в верхних отделах желудочно-кишечного тракта (в желудке и тонком кишечнике). Следовательно, при моделировании сред этих отделов ЖКТ, ферментной составляющей можно пренебречь. Вместе с тем, в процессе последовательного прохождения желудка, двенадцатиперстной кишки и тонкого кишечника полисахариды растворяются. Хитозан набухает в кислой среде желудка, альгинаты сравнительно быстро растворяются в щелочной среде тонкого кишечника. Таким образом, в толстый кишечник данные полисахариды поступают уже в виде гидроколлоидов. Из этого следует, что важнейшим фактором, влияющим на растворение полисахаридных матриц, является pH среды. В табл. 1 указаны составы сред, использовавшихся в экспериментах.

Таблица 1. Состав и pH сред, имитирующих условия различных участков ЖКТ человека.

Участок ЖКТ	Значение pH	Модельный раствор
«Желудок»	1.0	0.1 н. раствор соляной кислоты
«Двенадцатиперстная кишка»	6.0	Фосфатный буфер
«Тонкий кишечник»	7.4	Фосфатный буфер

Для определения оптимального состава альгинатного гидрогеля был изучен процесс растворения капсул на основе Са-альгината, Ва-альгината и Al-альгината в указанных средах. На рис. 4 показаны результаты этих экспериментов. Как видно из представленных снимков, все три типа матриц устойчивы в кислой среде. В среде фосфатного буфера с pH 6.0 капсулы на основе Са-альгината не претерпели значительных изменений, имел место лишь не-

значительный набор массы за счет набухания. В буфере с pH 7.4 Са-альгинатные капсулы растворились приблизительно за 20 мин. Ва-альгинатные капсулы оказались устойчивыми во всех использованных средах. Худшие результаты показали капсулы на основе Al-альгината. За 30 мин нахождения в среде фосфатного буфера с pH 6.0 капсулы потеряли форму, началось их частичное растворение. В фосфатном буфере с pH 7.4 капсулы полностью растворились за 3–5 мин.

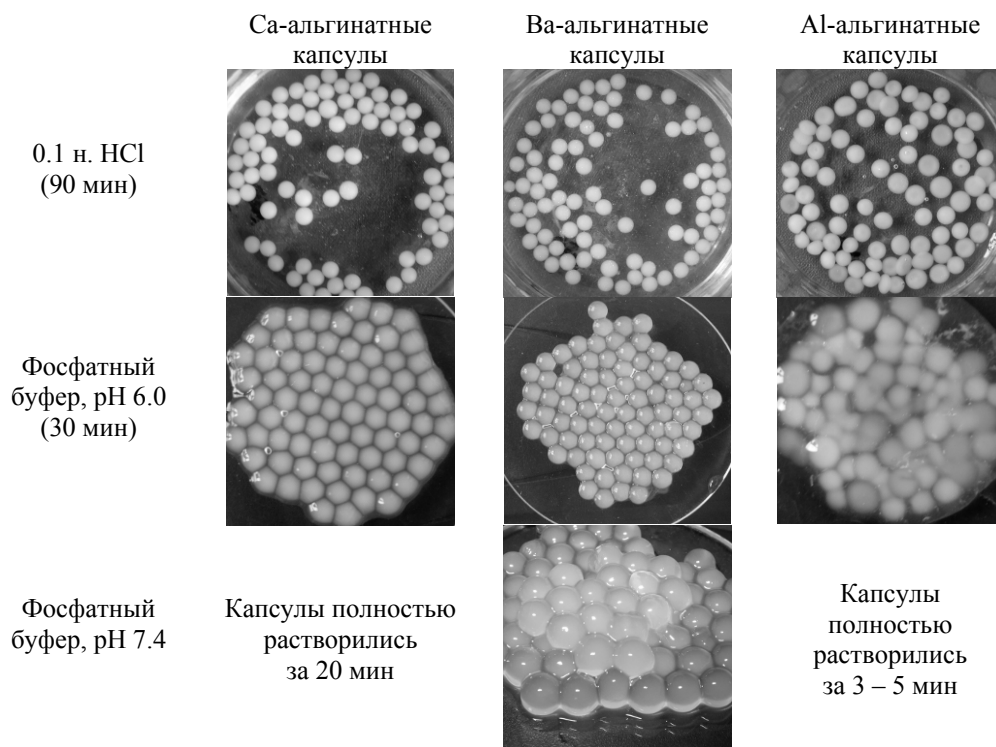


Рис. 4. Фотографии капсул на основе альгинатов на разных стадиях эксперимента.

Таким образом, было показано, что при использовании катионов алюминия в качестве сшивающего агента устойчивость гидрогеля к растворению резко ухудшается. Al-альгинатные капсулы при формировании принимают не сферическую, а двояковыпуклую форму. В связи с этим Al-альгинатная матрица не может рассматриваться в качестве основы для носителя фосфолипидных мицелл, поэтому в дальнейших исследованиях она не использовалась.

Са-альгинатная матрица устойчива в кислой среде и в фосфатном буфере при pH 6.0. В этих средах выход инкапсулированных фосфолипидных мицелл может быть обусловлен только диффузионными процессами, тогда как при pH более 7.0 скорость выхода будет лимитироваться скоростью растворения (эро-

зии) капсул. Ва-альгинатная матрица в силу своих физико-химических особенностей устойчива во всех трех средах. Данный факт объясняется тем, что катионы бария связываются с остатками маннуроновой кислоты (М-блоками), входящими в состав альгинатов, практически столь же эффективно, как и с остатками гулууроновой кислоты (G-блоками) [16]. В результате связь между соседними макромолекулами альгината становится прочнее, как и вся структура гидрогеля в целом.

Матрицы на основе кальциевой и бариевой соли альгиновой кислоты применялись в дальнейшем в качестве основы для приготовления хитозан-альгинатных капсул. Хитозан различной вязкости вводился в их состав для увеличения стойкости в щелочных средах.

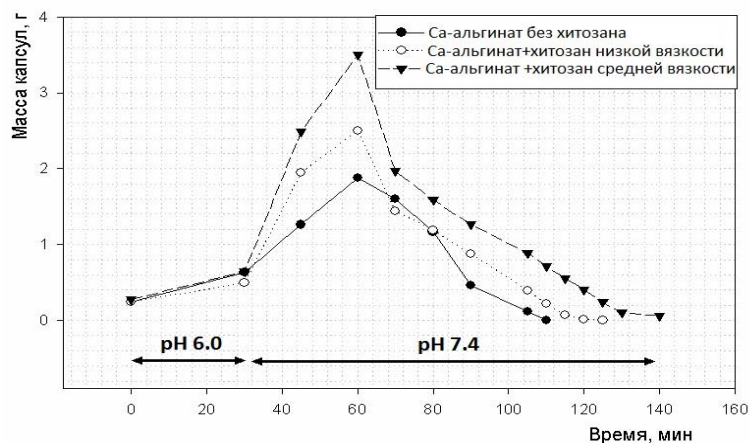


Рис. 5. Профили изменения массы капсул на основе Са-альгината и хитозана различной вязкости в фосфатном буфере с pH 6.0 (до 30-й минуты) и 7.4 (до полного растворения).

На рис. 5 представлены профили изменения массы капсул на основе Са-альгината и хитозана различной вязкости в фосфатных буферах с pH 6.0 и 7.4. В соляной кислоте изменение массы капсул не происходило или происходило на незначительную величину. Набухание капсул (увеличение массы за счет набора жидкости) начинает происходить в среде фосфатного буфера с pH 6.0. Увеличение массы довольно незначительно, но резко возрастает при помещении капсул в среду фосфатного буфера с pH 7.4. В дальнейшем происходит постепенное снижение массы капсул за счет растворения полисахаридов и потери набранной жидкости. Как видно из графиков, быстрее всего (приблизительно за 110 мин) растворяются капсулы на основе чистого альгината кальция. Матрица с добавлением хи-

тозана низкой вязкости растворяется приблизительно за 125 мин; хитозана средней вязкости – приблизительно за 140 мин.

Иммобилизацию фосфолипидных мицелл в полислойные капсулы на основе кальций(барий)-альгината и хитозана различной вязкости осуществляли по методике, приведенной в «Экспериментальной части». Для изучения процесса высвобождения фосфолипидных мицелл из полислойных капсул высушенные капсулы последовательно помещали в среды, указанные в табл. 1.

Эксперименты по исследованию выхода фосфолипидных мицелл из хитозан-альгинатных капсул показали, что на профиль выхода влияет не только вязкость хитозана, но и природа сшивающего катиона. Результаты исследований отображены на рис. 6 и 7.

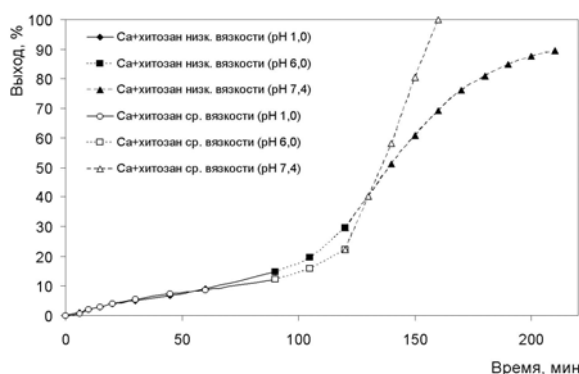


Рис. 6. Выход фосфолипидных мицелл из капсул на основе Са-альгината и хитозана низкой и средней вязкости при различных значениях pH.

Введение в состав альгинатных капсул хитозана улучшает их характеристики, так как хитозан является поликатионитом и с повышением pH резко теряет способность к растворению. Кроме того, на процесс эрозии капсул оказывает влияние слоистая структура капсул. В кислой среде изменений в капсулах не происходит по причине наличия на их внешней поверхности слоя альгината кальция, который устойчив при значениях $\text{pH} < 7.0$. Растворение этого слоя начинается в фосфатном буфере при pH 6.0. В ходе этого обнажается слой хитозан-альгината, и процесс растворения замедляется (см. рис. 5). Таким образом, становится возможным контролировать выход инкапсулированных фосфолипидных мицелл на разных участках ЖКТ. С этой целью при формировании альгинатного гидрогеля были использованы образцы хитозана разной вязкости (разной молекулярной массы) в комбинации с катионами кальция и бария в качестве сшивающих агентов.

Из полученных данных видно, что наиболее предпочтительна комбинация Са-альгината и хитозана низкой вязкости. Такие

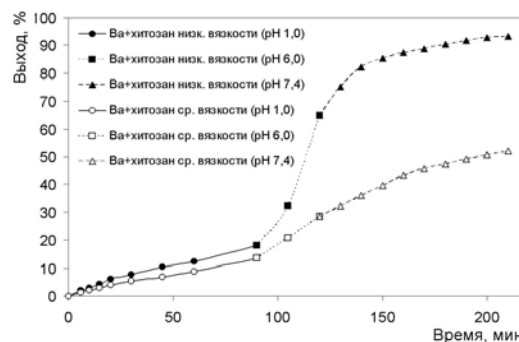


Рис. 7. Выход фосфолипидных мицелл из капсул на основе Ва-альгината и хитозана низкой и средней вязкости при различных значениях pH.

капсулы растворяются в среднем за 210 – 215 мин (при последовательной смене сред). Высвобождение фосфолипидных мицелл из таких капсул резко усиливается в фосфатном буфере и в дальнейшем протекает достаточно равномерно. По всей видимости, лимитирующим фактором в этом процессе является диффузия мицелл, а не эрозия матрицы. Противоположная картина наблюдается при использовании хитозана средней вязкости. В данном случае очевидна зависимость количества высвобожденных фосфолипидных мицелл от скорости растворения капсул.

При использовании комбинации Ва-альгината и хитозана низкой вязкости профиль выхода мицелл сходен с таковым для Са-альгината. В случае введения в состав матрицы хитозана средней вязкости выход мицелл из капсул обусловлен только диффузионным процессом, так как растворения капсул не наблюдалось. За 200 мин выход составил приблизительно 50%.

С помощью фотонно-корреляционной спектроскопии было показано, что структурных

изменений с фосфолипидными мицеллами, после их инкапсулирования и выхода из капсул, не происходит.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

- для создания матриц-носителей препаратов на основе фосфолипидных мицелл лучше использовать в качестве основы кальциевую или бариевую соль альгиновой кислоты. Некоторыми исследователями [17] отмечается, что Ва-альгинат предпочтительнее, так как ионы кальция могут оказывать дестабилизирующее действие на фосфолипидную мембрану;

- введение в состав матриц хитозана различной вязкости, в соответствии с методикой получения капсул со слоистой структурой, позволяет замедлить растворение капсул в кислых или щелочных средах и оказывает влияние на профиль выхода инкапсулированных фосфолипидных мицелл;

- комбинирование разных альгинатных гидрогелей и хитозана разной вязкости позволяет получать матрицу с определенными свойствами, что в перспективе может обеспечить пролонгированное высвобождение и адресную доставку лекарственного препарата, загруженного в фосфолипидные мицеллы.

Экспериментальная часть

В работе использовались натриевая соль альгиновой кислоты (Fluka, BioChemika, влажность – менее 15%, pH (10 мг/мл H₂O) 6.0 – 8.0), хитозан низкой вязкости (Fluka, BioChemika, влажность – менее 10%, вязкость 1% раствора в 1% уксусной кислоте при 20°C ≤ 200 мПа·с); хитозан средней вязкости (Fluka, BioChemika, влажность – менее 10%, вязкость 1% раствора в 1% уксусной кислоте при 20°C 200 – 400 мПа·с). Для образования альгинатного гидрогеля применялись 3% растворы хлоридов кальция, бария и алюминия (ч.д.а). В качестве модельного вещества для инкапсулирования использовался препарат «Нанофосфолип» (Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН), представляющий собой стабильный при хранении лиофильно высушенный порошок фосфолипидных наночастиц (мицелл), диаметром 20-30 нм.

Получение капсул альгинатного геля проводили посредством внесения по каплям с помощью шприца с иглой 2% раствора альгината натрия в 3% растворы сшивающих агентов: хлорида кальция, хлорида бария или хлорида алюминия. Капсулы выдерживали в растворе сшивающего агента в течение 30 мин, затем отделяли на сетке, промывали дистиллированной водой и использовали в экспериментах. С целью увеличения времени растворения капсул в условиях щелочной среды в состав оптимальных матриц вводили хитозан различной вязкости (см. следующую методику).

Получение полислойных капсул на основе хитозана и кальций(барий)-альгинатов с фосфолипидными мицеллами. В 10 мл 2% раствора альгината натрия диспергируют 1.0 г фосфолипидных мицелл. Полученную дисперсию по каплям (с помощью шприца) добавляют в 1% раствор хитозана в 1% уксусной кислоте. При этом следует избегать контакта капель друг с другом в растворе альгината во избежание слипания капсул. Время нахождения формирующихся капсул в растворе хитозана составляет 30 мин. За это время происходит взаимодействие ионного характера между полисахаридами, в результате чего образуются сферические структуры с ядром из вязкого раствора альгината натрия и наружного слоя хитозан-альгинатного гидрогеля. По истечении 30 мин в раствор хитозана, содержащий капсулы, вносят навеску порошка хлорида кальция или бария в количестве, необходимом для получения 3% раствора при полном растворении реагента. После растворения CaCl₂ или BaCl₂, капсулы выдерживают в полученном растворе еще в течение 25 мин. При этом, в результате диффузии катионов кальция или бария и ионотропного кооперативного взаимодействия молекул альгинатов, происходит образование кальций (барий)-альгинатного гидрогеля в ядре капсулы с одновременным насыщением объема гидрогеля избыточным количеством катионов Ca²⁺ или Ba²⁺.

Далее капсулы извлекаются из раствора и переносятся в 0.5% раствор альгината натрия, в котором выдерживаются в течение 5 мин. В течение этого времени избыточные катионы кальция или бария выходят из капсул и реагируют с макромолекулами альгината, образуя на поверхности капсул слой кальций (барий)-альгинатного гидрогеля. Для закрепления этого слоя, капсулы повторно вносят в 3% раствор хлорида кальция или бария, в котором выдерживают в течение 10 мин. Далее капсулы извлекают из раствора, трижды промывают дистиллированной водой и сушат в сушильном шкафу при температуре 30–40°C до сохранения постоянной массы. Высушенные капсулы хранят в герметичных стеклянных или пластиковых боксах.

Изучение процесса высвобождения фосфолипидных мицелл из капсул. Высушенные капсулы последовательно помещали в среды, указанные в табл. 1. Среда предварительно нагревали в стеклянной ячейке с рубашкой до температуры 37°C. Время нахождения капсул в 0.1 н. соляной кислоте – 90 мин, в фосфатном буфере с pH 6.0 – 30 мин и фосфатном буфере с pH 7.4 – до достижения концентрационного равновесия или до полного растворения капсул. Перемешивание сред осуществляли на магнитной мешалке при минимальном

числе оборотов (не более 100 об/мин).

Выход фосфолипидных мицелл из капсул оценивали по их концентрации в жидкой фазе. Концентрация мицелл определялась на фотоколориметре КФК-2 при длине волны 315 нм по предварительно построенной градуировочной зависимости.

Для **определения сохранности структуры фосфолипидных мицелл** при инкапсулировании и после их выхода из капсул в различных средах проводили анализ образцов методом динамического лазерного светорассеяния (фотонно-

корреляционной спектроскопии) с использованием оборудования ZetaSizer Nano (ZEN 3600). Относительная ошибка измерений составляла менее 2%. Анализ корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света осуществлялся автоматически с помощью встроенного программного обеспечения.

Работа была выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Сливкин, А. И. Полиурониды. Структура, свойства, применение (обзор) / А. И. Сливкин // Вестник ВГУ. Серия химия, биология. – 2000. – С. 30–46.
2. Усов, А. И. Альгиновые кислоты и альгинаты: методы анализа, определения состава и установления строения / А. И. Усов // Успехи химии. – 1999. – Т. 68, № 11. – С. 1051–1061.
3. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg – box model / G. T. Grant [et al.] // FEBS Lett. – 2003. – № 32 – P. 195–198.
4. Гальбрайх, Л. С. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение / Л. С. Гальбрайх // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, № 1. – С. 51–56.
5. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / Под ред. К. Г. Скрябина, Г. А. Вихорева, В. П. Варламова. – М.: Наука, 2002. – 315 с.
6. Immunogenicity of orally-delivered lipid-formulated BCG vaccines and protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection / J. Vipond [et al.] // Microbes Infect. – 2008. – № 10. – P. 1577–1581.
7. Nanotechnology in vaccine delivery / L. J. Peek [et al.] // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2008. – Vol. 60, № 8. – P. 915–928.
8. Oral vaccination with liposome-encapsulated recombinant fusion peptide of urease B epitope and cholera toxin B subunit affords prophylactic and therapeutic effects against *H. pylori* infection in BALB/c mice / W. Zhao [et al.] // Vaccine. – 2007. – Vol. 25, № 44. – P. 7664–7673.
9. Oral vaccination with modified vaccinia virus Ankara attached covalently to TMPEG-modified cationic liposomes overcomes pre-existing poxvirus immunity from recombinant vaccinia immunization / T. Naito [et al.] // J. Gen. Virol. – 2007. – Vol. 88, № 1. – P. 61–70.
10. Preparation of double liposomes and their efficiency as an oral vaccine carrier / S. Ogue [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2006. – Vol. 29, № 6. – P. 1223–1228.
11. Particulate systems as adjuvants and carriers for peptide and protein antigens / M. T. Liang [et al.] // Curr. Drug Deliv. – 2006. – Vol. 3, № 4. – P. 379–388.
12. Lipoinsulin encapsulated alginate-chitosan capsules: intestinal delivery in diabetic rats / M. Ramadas [et al.] // J. Microencapsul. – 2000. – Vol. 17, № 4. – P. 405–411.
13. Oral colon-specific drug delivery for bee venom peptide: development of a coated calcium alginate gel beads-entrapped liposome / L. Xing [et al.] // J. Control Release. – 2003. – Vol. 93, № 3. – P. 293–300.
14. Preparation and characterization of liposomes-in-alginate (LIA) for protein delivery system / C. Dai [et al.] // Colloids Surf. B. Biointerfaces. – 2006. – Vol. 47, № 2. – P. 205–210.
15. Фармакология некрахмальных полисахаридов / Ю.С. Хотимченко [и др.] // Вестник ДВО РАН. – 2005. – № 1. – С. 72–82.
16. Hydrogel-based encapsulation of biological, functional tissue: fundamentals, technologies and applications / H. Zimmermann [et al.] // Appl. Phys. – 2007. – Vol. A 89. – P. 909–922.
17. Lipid-alginate interactions render changes in phospholipid bilayer permeability / S. Cohen [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 1991. – Vol. 1063, № 1. – P. 95–102.