

УДК 544.777

Давідовіч І. С., Венгель К. Г., Антонюк Н. Г., Бурбан А. Ф.

рН-ЧУТЛИВІ МІКРОКАПСУЛИ НА ОСНОВІ СУМІШІ АЛЬГІНАТ- К-КАРРАГІНАНУ ДЛЯ КОНТРОЛЬОВАНОГО ВИВІЛЬНЕННЯ ТЕРАПЕВТИЧНИХ ПЕПТИДІВ

За допомогою мікроемulsionного методу одержано мікрокапсули на основі суміші натрій альгінату та к-каррагінану. Досліджено вплив співвідношення полісахаридів, вмісту модельного лікарського засобу БСА та концентрації формувальної суміші на характеристики мікрокапсул і кінетику вивільнення білка.

Ключові слова: рН-чутливі мікрокапсули, мікроемulsionний метод, натрій альгінат, каррагінан, бичачий сироватковий альбумін.

Вступ

Одним із найскладніших завдань у розвитку пептидної фармакології є запобігання фізичній та хімічній нестійкості білків у кислому середовищі. Такі специфічні властивості білків є ос-

новною причиною їхнього введення в людський організм шляхом ін'єкцій.

Питання кислотного каталізу пептидів у шлунку, їхнє протеолітичне розкладання потребують вирішення для забезпечення ефективної

доставки препарату в нижні відділи шлунково-кишкового тракту [1]. Одним із шляхів подолання цієї проблеми є капсулювання білкових лікарських засобів. На особливу увагу заслуговує розробка рН-чутливих мікрокапсул на основі природних полісахаридів.

Матеріали та методи

Для дослідження використовували чисті для аналізу реактиви: альгінат натрію (Fluka, Японія), к-карагінан (Fluka, Данія), бичачої сироватки альбумін (Sigma Aldrich, США), CaCl₂ (Міранда, Україна), етиловий спирт, фуксин, нейногенна ПАВ Tween 80 (Sigma Aldrich, США), рослинна олія.

Методика одержання альгінат-к-карагінанових гідрогелів. Порошкоподібні альгінат та к-карагінан потрібної маси розчиняли при перемішуванні у дистильованій воді протягом доби при нагріванні до 80 °С до утворення гомогенних розчинів. Після чого їх охолоджували до кімнатної температури, зливали та знову перемішували до однорідної консистенції. Таким чином були сформовані розчини зі співвідношенням альгінат-к-карагінан 1:0, 3:1, 1:1, 1:3. Одержані суміші полімерів в об'ємі 10 мл за допомогою дозатора перенесли в чашки Петрі. Гідрогелі висушували протягом 2 діб при температурі 37 °С. Після висушування полімерну плівку занурювали в 100 мл 0,3 М розчину CaCl₂ на годину. Після зшивання плівки промивали дистильованою водою кілька разів і висушували при 37 °С протягом доби до сталої маси.

Набрякання та деструкцію гідрогелів досліджували гравіметричним методом. Ступінь набрякання (деструкції) у % розраховували за формулою:

$$\alpha = \frac{W_n - W_c}{W_c} \cdot 100$$

Параметри сітки зшитих гідрогелів визначали згідно з рівноважною теорією набрякання Пепаса і Райта [2]. Для цього визначали масу незшитої плівки, плівки після зшивання і набрякання до рівноважного стану.

Молекулярну масу між вузлами зшивки (M_c) вираховували з даних рівноважного набрякання, використовуючи рівняння Флорі-Ренера:

$$\frac{1}{M_c} = \frac{1}{M_n} - \frac{\bar{v}}{v_1} \left[\ln(1 - v_{2s}) + v_{2s} + \chi v_{2s}^2 \right] v_{2r} \left[(v_{2s}/v_{2r})^{1/3} - \frac{1}{2} (v_{2s}/v_{2r}) \right]$$

де \bar{M}_n – середня молекулярна маса альгінату перед зшиванням (400 000); \bar{v} – специфічний об'єм альгінату (1,142 см³/г) [3]; v_1 – молярний об'єм води (18,1 см³/моль); v_{2r} – об'ємна частка зшитого полімеру у релаксованому стані; v_{2s} – об'ємна частка зшитого полімеру в гідрогелі у рівноваж-

ному стані; χ – параметр Флорі взаємодії полімер-розчинник для системи альгінат/вода (0,738).

Значення v_{2r} та v_{2s} розраховували за формулами [4]:

$$v_{2s} = \frac{W_d / \rho_p}{W_d / \rho_p + (W_e - W_d) / \rho_s} \quad i$$

$$v_{2s} = \frac{W_d / \rho_p}{W_d / \rho_p + (W_r - W_d) / \rho_s}$$

де W_d – маса сухого гелю; W_r – маса релаксованого гелю; W_e – маса гелю у рівноважному набрякломому стані; ρ_p і ρ_s – густина альгінатного полімеру (0,876 г/см³) та води, відповідно.

Густину зшивання гідрогелю розраховували за формулою [5]:

$$v_e = \frac{\rho_p}{M_c}$$

де ρ_p – густина альгінату, M_c – молекулярна маса гідрогелю між вузлами зшивки.

Методика отримання мікрокапсул мікроемульсійним методом. Розчин суміші натрій альгінату та к-карагінану у співвідношеннях 1:0, 1:1, 3:1, 1:3 і бичачої сироватки альбуміну з концентраціями 0,2 %, 0,5 %, 1 % додавали до 150 мл рослинної олії, що містила 2,2 г нейногенної поверхнево-активної речовини Tween-80. Перемішування проводили на механічній мішалці протягом 10 хв при 1200 об/хв. Після чого для забезпечення процесу зшивання додавали 30 мл 0,3 М розчину хлориду кальцію. Час подальшого перемішування становив 30 хв. Відстоювали годину для затвердіння мікрокапсул, промивали дистильованою водою та етиловим спиртом, відфільтровували на ультрафільтраційній комірі непроточного типу Amicon 8200 (Millipore, США) під тиском 3 атм.

Ефективність мікрокапсулювання визначали за відношенням реального вмісту БСА у капсулах ($C_{\text{практ.}}$) до теоретично можливого ($C_{\text{теор.}}$):

$$E = \frac{C_{\text{практ.}}}{C_{\text{теор.}}} \cdot 100\%$$

Для дослідження кінетики вивільнення БСА 0,1 г сухих мікрокапсул занурювали у розчини з рН 1,6 та 6,8 і через певні відрізки часу відбирали проби. Концентрацію білка вимірювали за допомогою УФ-спектроскопії при довжині хвилі 215 нм.

Аналіз та узагальнення результатів

Дослідження кінетики набрякання та деструкції гідрогелів. Набрякання гідрогелів на

основі альгінат-карагінану у різних співвідношеннях подібний до набрякання альгінатних матриць (рис. 1). Введення до 50 % карагінану незначно підвищує ступінь набрякання гідрогелів у кислому та лужному середовищах. Однак при співвідношенні альгінат-карагінан 1:3 відбувається стрімке зростання ступеня набрякання, що можна пояснити великою молекулярною масою між вузлами зшивок та відповідно низькою густиною зшивання (див. табл. 1).

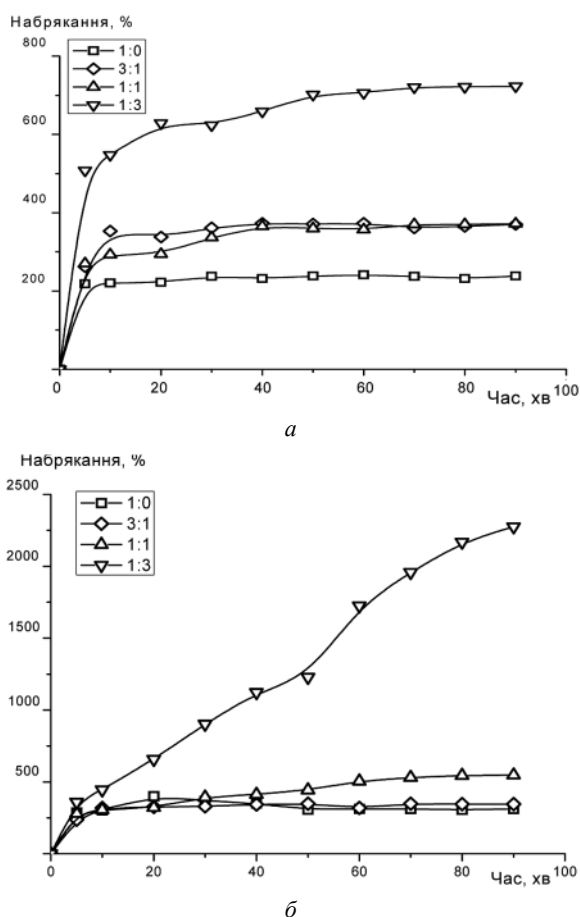


Рис. 1. Кінетика набрякання гідрогелів на основі суміші альгінату та карагінану у різних співвідношеннях: а – рН 1,6; б – рН 6,8

За співвідношенням набрякання рН 6,8/рН 1,6 можна зробити висновки про рН-чутливість одержаних гідрогелів. Так, при додаванні 25 % карагінану спостерігається втрата рН-чутливості (рН 6,8/рН 1,6=0,94). Однак при подальшому збільшенні вмісту сульфатованого полісахариду відбувається підвищення рН-чутливості порівняно з альгінатною матрицею. Високий ступінь набрякання досліджених зразків можна пояснити іонізацією кислотних груп у полімерній матриці. За рахунок дисоціації кислотних груп і напливу протийонів концентрація йонів у внутрішній сітці більша, ніж у зовнішньому середовищі. Це спричинює різницю осмотичних тисків, внаслідок чого розчинник проникає у гід-

рогель. У кислому середовищі ступінь набрякання нижчий, ніж у нейтральному через трансформації $-COO^-$ груп у $COOH$ -групи, оскільки рКа альгінату близько 3,2. Водневі зв'язки між недисоційованими карбоксильними групами альгінату обумовлюють полімер-полімерні взаємодії, які домінують над взаємодіями полімер-розчинник, тому ступінь набрякання у кислому середовищі зменшується [6].

Таблиця 1. Характеристики гідрогелів

Альгінат-карагінан	M_c	Густина зшивки, моль/дм ³	Співвідношення набрякання рН 6,8/рН 1,6
1:0	698	1,26	1,31
3:1	1425	0,61	0,94
1:1	6787	0,13	1,47
1:3	11608	0,08	3,15

Збільшення молекулярної маси між зшивками та відповідно зменшення густини зшивання можна пояснити утворенням взаємопроникної сітки між ланцюгами альгінату і карагінану, що призводить до зменшення ймовірності знаходження поруч двох ланцюгів альгінату натрію для комплексоутворення.

На початкових стадіях деструкції гідрогелів із високим вмістом натрій альгінату (1:0, 3:1) відбувається вимивання його низькомолекулярних фракцій, подальша втрата маси пов'язана з руйнуванням зшивок із йонами кальцію і деструкцією альгінату. При співвідношеннях 1:1 та 1:3 також спостерігається вимивання низькомолекулярних фракцій на початкових стадіях деструкції, після чого відсоток втрати маси усталюється завдяки структуруванню ланцюгів к-карагінану йонами калію, що наявні у буферному розчині (див. рис. 2).

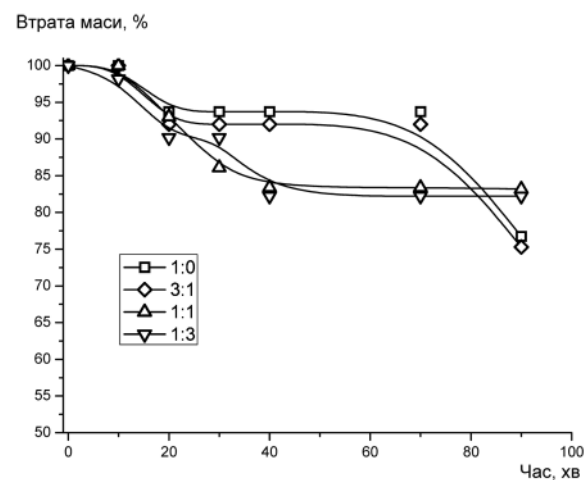


Рис. 2. Кінетика деструкції гідрогелів на основі суміші альгінату та карагінану у різних співвідношеннях

Дослідження впливу співвідношення альгінат-карагінан на кінетику вивільнення БСА з мі-

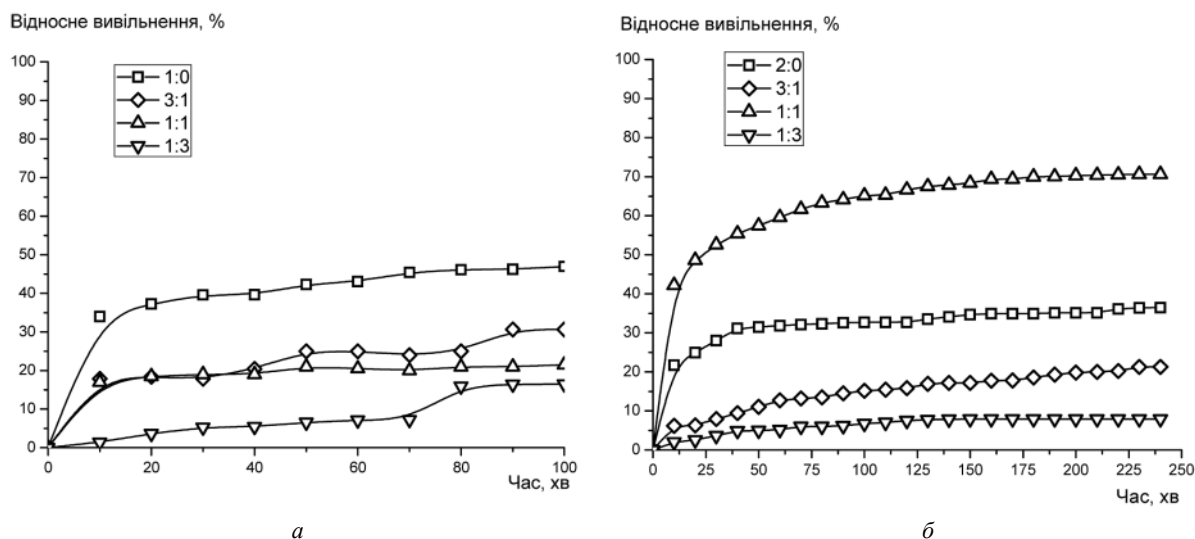


Рис. 3. Кінетика вивільнення БСА з мікрокапсул при різному співвідношенні альгінат-к-каррагінан при рН 1,6 (а) та рН 6,8 (б)

крокапсул. Мікрокапсули одержано на основі суміші альгінат-к-каррагінан при їх різному співвідношенні. Досліджено вплив зміни співвідношення полімерів на кінетику вивільнення БСА із отриманих мікрокапсул (рис. 3). Встановлено, що при збільшенні вмісту к-каррагінану досягається 100 % ефективність капсулювання ліків (табл. 2) та зменшується ступінь їх вивільнення у кислому середовищі через сильні електростатичні взаємодії між позитивно зарядженим білком і негативно зарядженими сульфогрупами к-каррагінану. При рН 6,8 ступінь вивільнення білка зростає, що характерно для матриць на основі альгінату, які у фосфатному буфері деструктують через вимивання йонів кальцію та зв'язування їх із фосфат-аніонами. Отже, для створення систем контрольованого вивільнення потрібно вибирати оптимальне співвідношення альгінат-к-каррагінан для забезпечення захисту білкових засобів у шлунку і для запобігання стрімкого вивільнення їх у кишківнику.

Таблиця 2. Характеристики мікрокапсул при різному співвідношенні полісахаридів

Альгінат : каррагінан	Ефективність капсулювання, %	Сумарний ступінь вивільнення, %
1:0	60,8	83,4
3:1	98,0	51,9
1:1	100,0	92,2
1:3	94,5	24,4

Ступінь вивільнення БСА у нейтральному середовищі чітко корелює із вмістом к-каррагінану у формувальній суміші, що можна пояснити проходженням двох паралельних процесів: структурування к-каррагінану у середовищі з йонами калію та руйнування координаційних зв'язків альгінат-Са²⁺ у фосфатному буфері, що призво-

дить до зміни механізму вивільнення білка з мікрокапсул.

Дослідження впливу вмісту БСА у полімерній матриці на кінетику його вивільнення з мікрокапсул. У мікрокапсули з альгінату та к-каррагінану у співвідношенні 1:1 було введено відповідно 10, 25, 50 масових відсотків БСА. Встановлено, що при підвищенні кількості білка в мікрокапсулах ємність суміші полімерів щодо БСА зменшується, що пояснюється нестачею вільних активних центрів для зв'язування білка. Отже, як видно з наведеної діаграми, максимальна ефективність процесу капсулювання забезпечується введенням 10 % БСА (рис. 4).

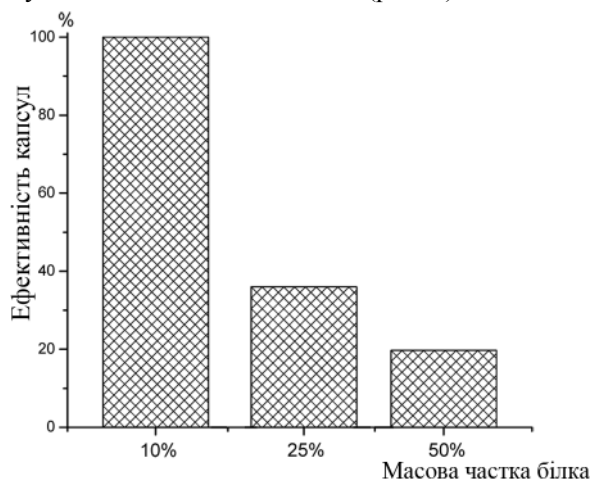


Рис. 4. Ефективність капсулювання БСА при різному вмістові білка у полімерній матриці

З кінетичних залежностей видно, що збільшення вмісту БСА у мікрокапсулах майже не впливає на кінетику його вивільнення у кислому середовищі (рис. 5). У нейтральному середовищі спостерігається зниження ступеня вивільнення білка зі збільшенням його вмісту, що можна

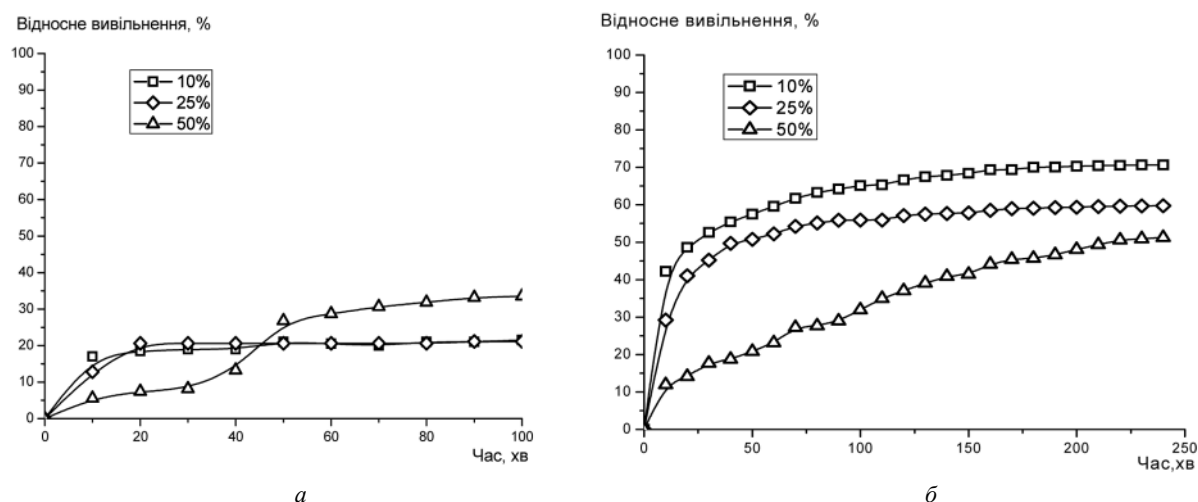


Рис. 5. Кінетика вивільнення білка з мікрокапсул на основі суміші альгінат-к-карагінан (1:1) при рН 1,6 (а) та рН 6,8 (б) при різному вмісті БСА

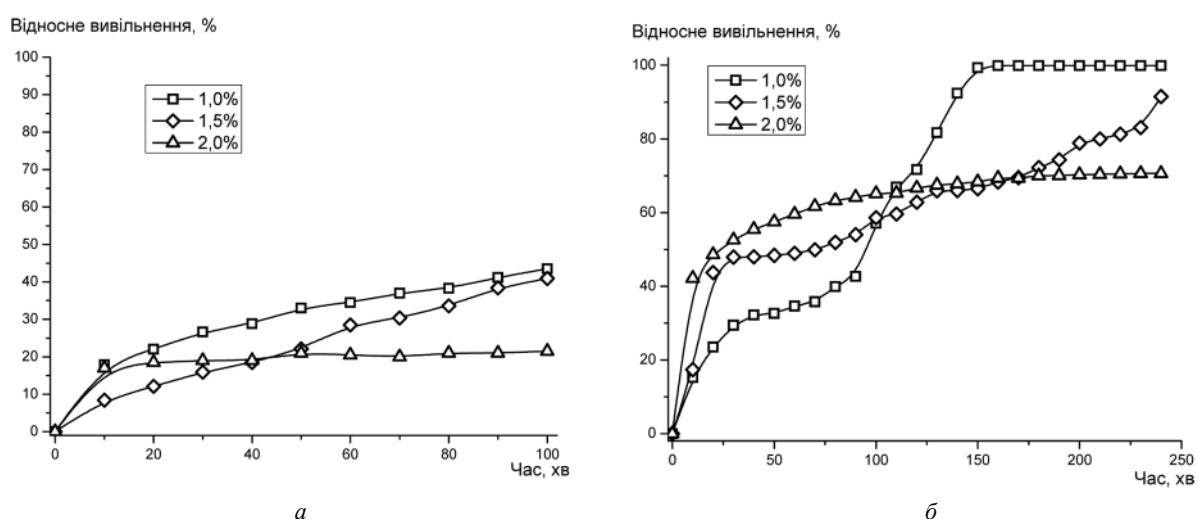


Рис. 6. Кінетика вивільнення білка з мікрокапсул на основі суміші альгінат-к-карагінан (1:1) при рН 1,6 (а) та рН 6,8 (б) при різній концентрації формувальної суміші

пояснити взаємодіями полімер–лікарський засіб. Сумарна кількість виділеного модельного лікарського засобу бичачої сироватки альбуміну майже не залежить від вмісту введеного білка.

Дослідження впливу концентрації полімерної суміші на кінетику вивільнення БСА. При зменшенні концентрації формувальної суміші ефективність капсулювання залишається близькою до 100 %, отже, при цьому збільшується масовий вміст білка в мікрокапсулах. Однак зменшення концентрації негативно впливає на кінетику вивільнення білка у кислому середовищі (рис. 6, а), оскільки спостерігається втрата БСА до 40 %. При нейтральному рН для мікрокапсул, отриманих з 2 %-го розчину полімеру, спостерігається дві ділянки на кінетичній кривій: на першому етапі – стрімке нелінійне вивільнення БСА, а потім чітко виражену лінійну ділянку кінетичної кривої, яка відповідає кінетиці нульового порядку (рис. 6, б). Стосовно мікрокапсул, одержаних із розчинів із меншою концентра-

цією, то в них друга стадія вивільнення відсутня, однак спостерігається стрімке вивільнення на кінцевому етапі, що можна пояснити швидшою деградацією полімерної матриці при вищому вмісті лікарського засобу.

Висновки

Оптимальним співвідношенням альгінат-к-карагінану для одержання рН-чутливих мікрокапсул, які відповідають вимогам до систем контрольованого вивільнення, є 1:1, що підтверджується:

- сферичністю одержаних мікрокапсул;
- ступенем вивільнення БСА в середовищі шлунку на рівні 20 %;
- збільшенням ступеня вивільнення БСА в нейтральному середовищі у 4 рази порівняно з кислим;
- ефективністю капсулювання близько 100 %;
- сумарним ступенем вивільнення білка 97 %.

1. George M. pH sensitive alginate–guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs / M. George, T. E. Abraham // International Journal of Pharmaceutics. – 2007. – Vol. 335. – P. 123–129.
2. Peppas N. A. Drug diffusion and binding in ionizable interpenetrating networks from poly (vinyl alcohol) and poly (acrylic acid) / N. A. Peppas, S. L. Wright // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 1998. – Vol. 46. – P. 15–29.
3. Boobtheekul T. Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution / T. Boobtheekul, H. J. Kong, D. J. Mooney // Biomaterials. – 2005. – Vol. 26. – P. 2455–2465.
4. Jao W.-Ch. Evaluation of the drug release mechanism of pH-sensitive calcium alginate hydrogels in simulated physiological fluids / W.-Ch. Jao, L.-Ch. Ho, Zh.-W. Chen // J. of China University of Science and Technology. – 2010. – Vol. 42. – P. 37–61.
5. Atta A. M. Effect of crosslinker functionality on swelling and network parameters of copolymeric hydrogels / A. M. Atta, A. Abdel-Azim // Polym. Adv. Technol. – 1998. – Vol. 9. – P. 340–348.
6. Shuibo H. pH-sensitive sodium alginate/poly(vinyl alcohol) hydrogel beads prepared by combined Ca²⁺ crosslinking and freeze-thawing cycles for controlled release of diclofenac sodium / Hua Shuibo, Ma Haizhen, Li Xun et al. // Int. J. of Biological Macromolecules. – 2010. – Vol. 46. – P. 517–523.

I. Davidovich, K. Vengel, N. Antoniuk, A. Burban

pH-SENSITIVE ALGINATE-K-CARREGEENAN MICROCAPSULES FOR CONTROLLED RELEASE OF THERAPEUTIC PEPTIDES

Microcapsules were prepared from mixture of sodium alginate and κ -carrageen by microemulsion method. The influence of polysaccharide ratio, content of model drug BSA, and molding mixture concentration on the characteristics of microcapsules and protein release kinetics was investigated.

Keywords: pH-sensitive microcapsules, microemulsion method, sodium alginate, carrageen, bovine serum albumin.

Матеріал надійшов 21.05.2012