

## рН-ЧУТЛИВІ МІКРОКАПСУЛИ НА ОСНОВІ НАТРІЙ АЛЬГІНАТУ, МОДИФІКОВАНОГО L-АСПАРАГІНОВОЮ ТА L-ГЛУТАМІНОВОЮ КИСЛОТАМИ

*Натрій альгінат був модифікований L-глутаміновою та L-аспарагіновою кислотами з використанням активуючого агента утворення пептидного зв'язку ЕДАК. Хімічне прищеплення амінокислот до натрій альгінату доведено методами ІЧ-спектроскопії, ТГА та потенціометричним титруванням. Дослідження показали, що рН-чутливість модифікованих полімерів збільшується приблизно в три рази в порівнянні з немодифікованим натрій альгінатом. Мікрокапсули, одержані з гібридних полімерів, було використано для капсулювання модельного білкового лікарського засобу БСА.*

**Ключові слова:** натрій альгінат, рН-чутливість, мікроемulsionний метод, L-аспарагінова кислота, L-глутамінова кислота.

### Вступ

Протягом останніх років зростає інтерес до матеріалів, які здатні до біодеструкції. Такі матеріали потрібні для виробництва пакувальних матеріалів, у медицині тощо. З цією метою дуже широко використовуються природні полісахариди, оскільки вони доступні у великій кількості з відновлювальної рослинної сировини. Завдяки наявності різноманітних функціональних груп у ланцюгах молекул полісахаридів вони досить легко піддаються хімічному модифікуванню, внаслідок чого утворюються полімерні гібриди з потрібними функціональними властивостями. Останні дослідження зосереджено на комбінуванні полісахаридів із синтетичними полімерами, зокрема на прищепленні вінілових мономерів методом радикальної полімеризації та невінілових мономерів методом поліконденсації [1]. Однак під час цих процесів конкурентна реакція деструкції може призвести до швидкого зменшення молекулярної маси полімеру через сприйнятливості багатьох функціональних груп полісахаридів до дії кислот, лугів, відновників тощо. Це в більшості випадків призводить до низького виходу гібридного полімеру. Метою цієї роботи було модифікувати природний полісахарид натрій альгінат амінокислотами в м'яких умовах, використовуючи каталізатор утворення пептидного зв'язку ЕДАК.

### Матеріали і методи досліджень

У роботі було використано натрій альгінат з молекулярною масою 450 кДа (Fluka, Японія),

бичачий сироватковий альбумін (БСА) (Sigma-Aldrich, США),  $\text{CaCl}_2$  (Міранда, Україна). Для модифікування натрій альгінату використовували L-аспарагінову і L-глутамінову кислоти (Міранда, Україна) та 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)-карбодімід (ЕДАК) як активуючий агент утворення пептидного зв'язку (Sigma-Aldrich, США).

*Методика модифікування натрій альгінату L-аспарагіновою та L-глутаміновою кислотами.* Натрій альгінат модифікували L-аспарагіновою та L-глутаміновою кислотами методом полімераналогічних перетворень. Утворення пептидного зв'язку між карбоксильною групою  $\beta$ -D-маннууронової чи  $\alpha$ -D-гулууронової кислоти полісахариду та аміногрупою амінокислоти відбувається за допомогою ЕДАК (1-(3-диметиламінопропіл)-етилкарбодіміду-гідрохлориду) (рис. 1). Для модифікування полімеру початкові розчини реагентів (50 мл 4 % розчину натрій альгінату, 20 мл 0,05 % розчину ЕДАК та 30 мл розчину амінокислоти заданої концентрації) зливали, перемішуючи, за кімнатної температури. Для модифікування використовували різні масові співвідношення натрій альгінату до амінокислоти: 12:1, 10:1, 7:1 та 5:1. Отриманий полісахарид очищували від каталізатора, залишків амінокислот та низькомолекулярних побічних продуктів реакції на діалізній комірці непроточного типу протягом двох діб.

*Методика одержання полімерних плівок.* 10 мл розчину модифікованого натрій альгінату переносили в чашки Петрі діаметром 9 см. Плівки висушували протягом двох діб за температури

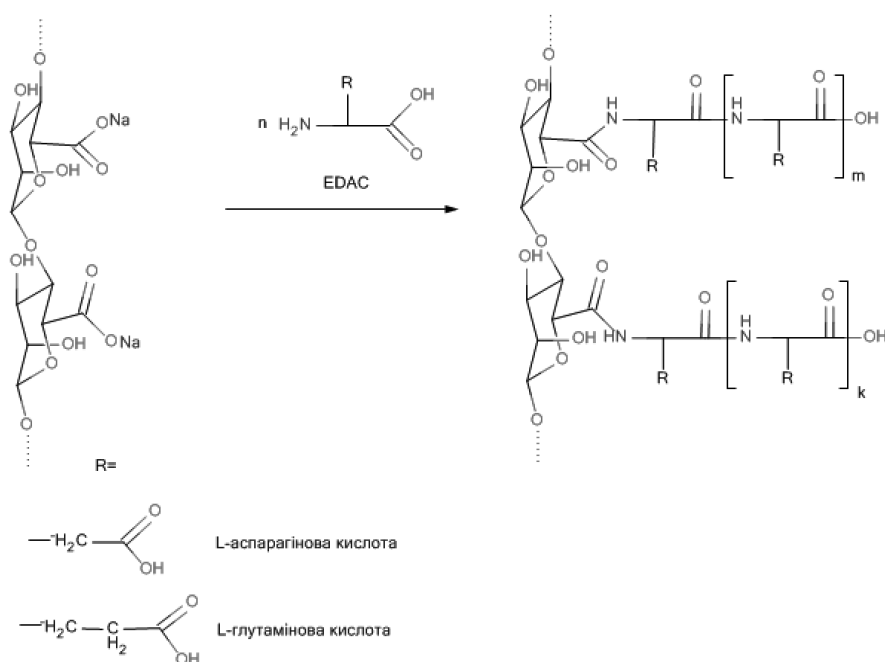


Рис. 2. Схема прищеплення наночастинок магнетиту до поверхні целюлозної мембрани

37 °С. Після висушування полімерну плівку занурювали в 100 мл 0,3 М розчину  $\text{CaCl}_2$  на 1 годину. Після зшивання плівки промивали дистильованою водою декілька разів і висушували при 37 °С протягом доби до сталої маси.

**Методика дослідження кінетики набрякання полімерних плівок.** Кінетику набрякання плівок було досліджено гравіметричним методом: висушені зразки полімерних плівок занурювали в 5 мл розчину з рН 1,8 чи 6,8. Кожні 10 хвилин проводили зважування досліджуваних зразків плівок. Ступінь набрякання розраховували за таким рівнянням:

$$\alpha = \frac{W_t - W_0}{W_0},$$

де  $\alpha$  – ступінь набрякання;

$W_t$  – маса набряклої плівки;

$W_0$  – маса сухої плівки.

**Методика визначення карбоксильних груп у полісахаридах.** Вміст карбоксильних груп у полісахаридах визначали кислотно-основним титруванням. На першому етапі карбоксильні групи переводили в Na-форму. Розчин полісахариду очищували від надлишку NaOH на діалізній комірці непроточного типу протягом двох діб. 10 мл 1 % розчину полісахариду заливали 20 мл 0,01 н розчином HCl на одну добу. Залишок кислоти, що не прореагував, відтитрували 0,001 н розчином NaOH. Вміст карбоксильних груп (A) в ммоль-екв/г розраховували за формулою:

$$A = \frac{(V_0 - V_1) \cdot V_t \cdot C_t}{V_a \cdot m},$$

де  $V_0$  – об'єм титранту, використаний на титрування 20 мл 0,01 н HCl;

$V_1$  – об'єм титранту, використаний на титрування HCl, що не прореагувала з карбоксильними групами;

$V_t$  – об'єм проби розчину полісахариду;

$C_t$  – концентрація титранту;

$V_a$  – об'єм аликвоти;

$m$  – маса полісахариду.

**ІЧ-спектроскопія полісахаридних плівок.** ІЧ-спектри поглинання в діапазоні частот 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  записували на спектрометрі IRAffinity-1 (SHIMADZU, Японія). Для запису спектра використовували 50 сканувань з роздільною здатністю 8  $\text{cm}^{-1}$ .

**Термогравіметричний аналіз плівок.** Термогравіметричний аналіз (ТГА) використовували для дослідження процесів деструкції полімерів з одночасним контролем температури зразка, зміни його маси, швидкості зміни маси та ентальпії. ТГА проводили з використанням дериватографа Q-1500 D system F. Paulik, J. Paulik, L. Erdey в інтервалі температур від 20 до 700 °С в атмосфері повітря з одночасним видаленням газоподібних продуктів деструкції. Швидкість підвищення температури становила 10 град/хв. Вага зразків дорівнювала 50 мг.

*Одержання мікрокапсул мікроемульсійним методом.* Розчин модифікованого натрій альгінату концентрацією 2,0 % з вмістом БСА (0,2 %) додавали краплями до суміші 160 мл рослинної олії та 4,4 г поверхнево-активної речовини Tween-80 [2]. Перемішували на механічній мішалці протягом 10 хв зі швидкістю обертання 1200 об/хв, потім додавали 30 мл 0,3 М розчину кальцій хлориду, продовжуючи перемішування. Для затвердіння мікрокапсул отриману емульсію залишали відстоюватися протягом 60 хв. Одержані мікрокапсули відфільтровували на ультрафільтраційній комірці непроточного типу Amicon 8200 (Millipore, США) під тиском 3 атм, промивали дистильованою водою та етиловим спиртом до відсутності ПАР у промивній рідині.

*Методика вивчення кінетики вивільнення БСА з мікрокапсул у кислому та нейтральному середовищі.* Дослідження кінетики вивільнення БСА з мікрокапсул проводили при рН 1,8 та 6,8, що відповідають кислотно-лужному балансу середовищ шлунка та кишківника. Для цього 0,2 г мікрокапсул почергово витримували в 10 мл 0,01 н хлороводневої кислоти та фосфатного буфера. Сумарний час вивільнення становив 5 год. Вимірюючи оптичну густину розчину при 215 нм, контролювали кількості вивільненого білка. Ступінь вивільнення білка було розраховано відносно попередньо визначеної закапсульованої кількості у відсотках.

*Визначення ефективності мікрокапсулювання БСА.* Ефективність мікрокапсулювання визначали за відношенням реального вмісту БСА у капсулах ( $C_{\text{практ.}}$ ) до теоретичного ( $C_{\text{теор.}}$ ):

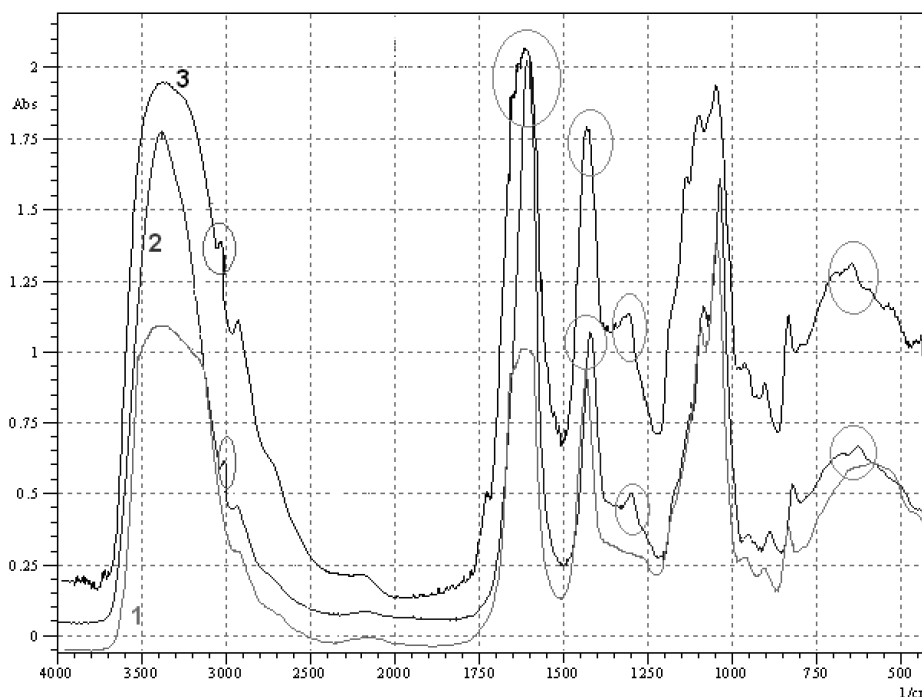
$$E = \frac{C_{\text{практ.}}}{C_{\text{теор.}}} \cdot 100\%$$

Для визначення реального вмісту БСА наважку мікрокапсул масою 0,2 г суспендували у 10 мл фосфатного буфера (рН 6,8) за допомогою ультразвуку протягом 60 хв. Концентрацію БСА в розчині визначали за допомогою УФ-спектрометра LAB Intech при довжині хвилі 215 нм.

### Результати та обговорення

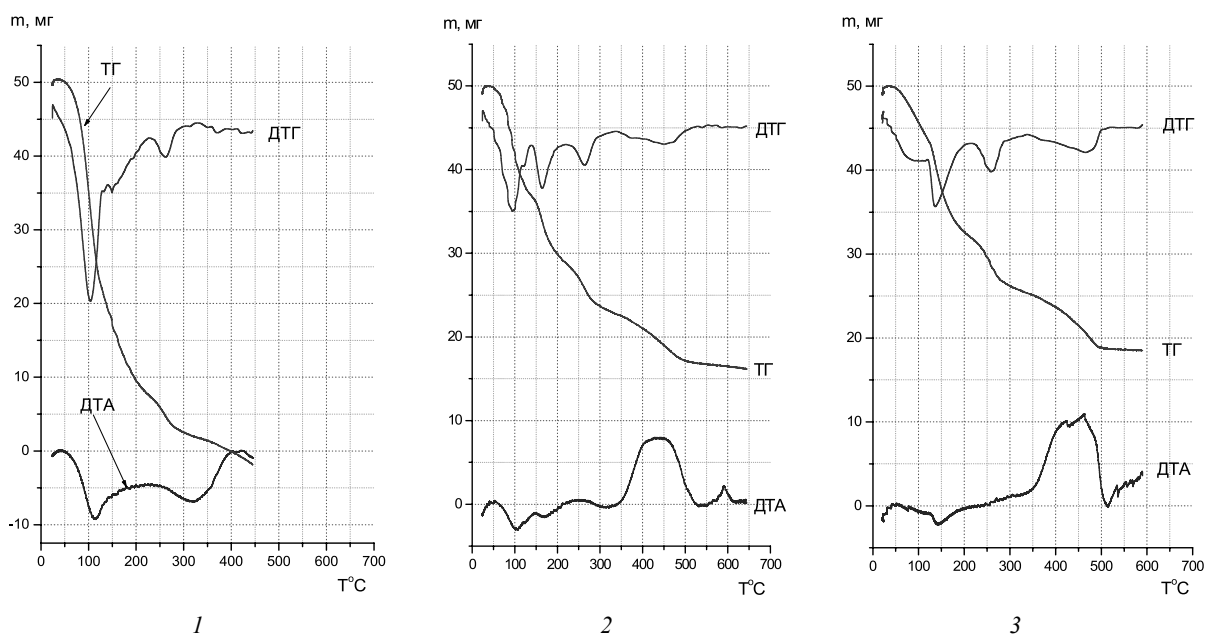
У результаті досліджень було отримано плівки та мікрокапсули з натрій альгінату, модифікованого L-аспарагіною та L-глутаміною кислотами. Плівки прозорі зі слабким коричневим відтінком, крихкі в сухому стані, досить міцні та еластичні у зшитому і набряклому стані.

*Дослідження плівок методом ІЧ-спектроскопії* проводили для підтвердження прищеплення амінокислот до натрій альгінату. Одержані ІЧ-спектри (рис. 2) свідчать про утворення пептидного зв'язку в процесі модифікування полісахариду. Так, на спектрах 2 і 3 спостерігається уширення смуг при 3300–3100  $\text{cm}^{-1}$ ,



**Рис. 2.** ІЧ-спектри плівок на основі полісахаридів:

- 1 – немодифікований натрій альгінат;
- 2 – натрій альгінат, модифікований L-аспарагіною кислотою;
- 3 – натрій альгінат, модифікований L-глутаміною кислотою



**Рис. 3.** Дериватографічні криві (ДТА – диференціальний термічний аналіз, ТГ – термогравіометрична крива, ДТГ – диференціальна термогравіометрична крива):  
 1 – натрій альгінат; 2 – натрій альгінат, модифікований L-аспарагіновою кислотою;  
 3 – натрій альгінат, модифікований L-глутаміновою кислотою

які відповідають за симетричні валентні коливання N-H. Смуга  $3060\text{ cm}^{-1}$  зумовлена деформаційними коливаннями N-H у площині пептидної групи. В області частот  $1700\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$  потрібно виділити сильні смуги поглинання Амід I та Амід II. Перша відповідає за валентні коливання груп C=O амідного зв'язку і має максимум при  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Смуга Амід II, зумовлена деформаційними коливаннями N-H, спостерігається при  $1450\text{ cm}^{-1}$ . На спектрах також спостерігається смуга поглинання Амід III при  $1310\text{ cm}^{-1}$ , яка відповідає за валентні C-N і плоскі деформаційні коливання N-H. Смуги при  $750\text{--}600\text{ cm}^{-1}$  – це Амід IV і V, які зумовлені неплоскими деформаційними коливаннями зв'язків C=O і N-H відповідно [3].

*Титриметрично* встановлено, що модифікування натрій альгінату L-аспарагіновою та L-глутаміновою кислотами приводить до збільшення кількості карбоксильних груп у 4,0–4,5 рази, оскільки ці амінокислоти містять COOH-групу в бічному ланцюзі. Вміст кислотних груп у немодифікованому натрій альгінаті становить  $1,8 \pm 0,42$  ммоль-екв/г, тоді як після прищеплення L-аспарагінової та L-глутамінової кислот –  $8,3 \pm 0,37$  та  $7,3 \pm 0,29$  ммоль-екв/г полімеру відповідно.

*Термогравіометричний аналіз.* За допомогою термогравіометричного аналізу досліджено стійкість плівки до термоокисної деструкції. Втрата маси в діапазоні температур від 50 до 150 °C відповідає вивільненню вільної та зв'язаної води з немодифікованого натрій альгінату (рис. 3:1).

Як видно з кривої ТГ, для натрій альгінату характерні дві стадії піролізу. Перша – за температури 150–250 °C, втрата маси при цьому зумовлена деструкцією карбоксильних груп і виділенням  $\text{CO}_2$  [4]. На другій стадії (250–400 °C) відбувається деполімеризація полісахариду і формування карбонізованого залишку у вигляді  $\text{CaCO}_3$  [5]. Зразок повністю розкладається при 400 °C. Для натрій альгінату, модифікованого амінокислотами (рис. 3:2 і 3:3), з'являється третя стадія піролізу (450–500 °C), яка супроводжується утворенням  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  та  $\text{CaO}$  [6]. Так, для зразків 2 та 3 характерне зменшення вмісту вільної та зв'язаної води, 24 і 16 % відповідно, у порівнянні з немодифікованим полісахаридом (50 %), що свідчить про зниження гігроскопічності полімерів після прищеплення амінокислот. Це явище можна пояснити різним значенням  $pK_a$  карбоксильних груп у полімерах: для натрій альгінат  $pK_a$  дорівнює 3,2; для L-аспарагінової кислоти – 3,9 та L-глутамінової кислоти – 4,3. Підвищення значення  $pK_a$  знижує здатність COOH-групи до дисоціації і, отже, зменшує можливість електростатично утримувати молекули води. Модифікування натрій альгінату амінокислотами також підвищує термічну стійкість полісахаридів до 500 °C. Отже, збільшення стадій піролізу та зсув деяких піків кривих ДТГ свідчать про утворення нових ковалентних зв'язків, що підтверджує дані ІЧ-спектроскопії про утворення пептидних зв'язків та прищеплення амінокислот до натрій альгінату.

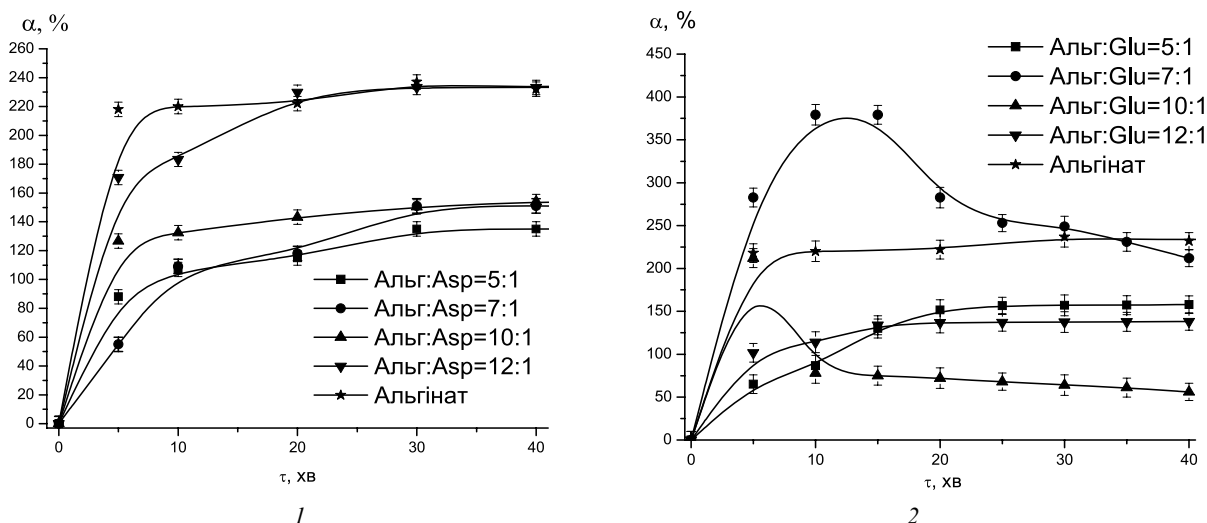


Рис. 4. Кінетика набрякання плівок на основі натрій альгінату, модифікованого L-аспарагіною (1) та L-глутаміною (2) кислотами в різних співвідношеннях полісахарид:амінокислота при рН 1,8

*Кінетика набрякання плівок.* Дослідження кінетики набрякання проводили за фізіологічних значень рН шлунка та кишківника. У кислому середовищі введення L-аспарагінової кислоти у співвідношеннях 5:1, 7:1 і 10:1 знижує ступінь набрякання полісахариду в порівнянні з немодифікованим натрій альгінатом приблизно у два рази (рис. 4:1). Тоді як при співвідношенні 12:1 ступінь набрякання полімеру не змінюється. Зниження ступеня набрякання спостерігається і при введенні L-глутамінової кислоти у співвідношеннях 12:1, 10:1 і 5:1 (рис. 4:2). При співвідношенні натрій альгінат : L-глутамінова кислота 7:1 одержані плівки нестійкі і через 15 хвилин починають розчинятися в хлоридній кислоті.

Під час модифікування натрій альгінату амінокислотами підвищується стійкість плівок до деструкції у фосфатному буфері. Так, плівка

на основі натрій альгінату в присутності сильно-го комплексоутворювача фосфат-йона починає розчинятися через руйнування комплексу між карбоксильними групами та  $Ca^{2+}$ . Для плівок з модифікованого альгінату таке явище не спостерігається. Можна зробити припущення, що бічні ланцюги амінокислот та наявні в них атоми Нітрогену з частковим позитивним зарядом створюють стеричні та електростатичні перешкоди для підходу фосфат-йона до комплексу. Найбільший ступінь набрякання при рН 6,8 характерний для плівок альгінат-L-аспарагінова кислота у співвідношенні 10:1 та альгінат-L-глутамінова кислота – 5:1 (рис. 5).

рН-чутливість одержаних плівок оцінювали за співвідношенням максимальних ступенів набрякання при рН 6,8 та 1,8. Для всіх плівок, окрім плівки на основі альгінат-L-глутамінової

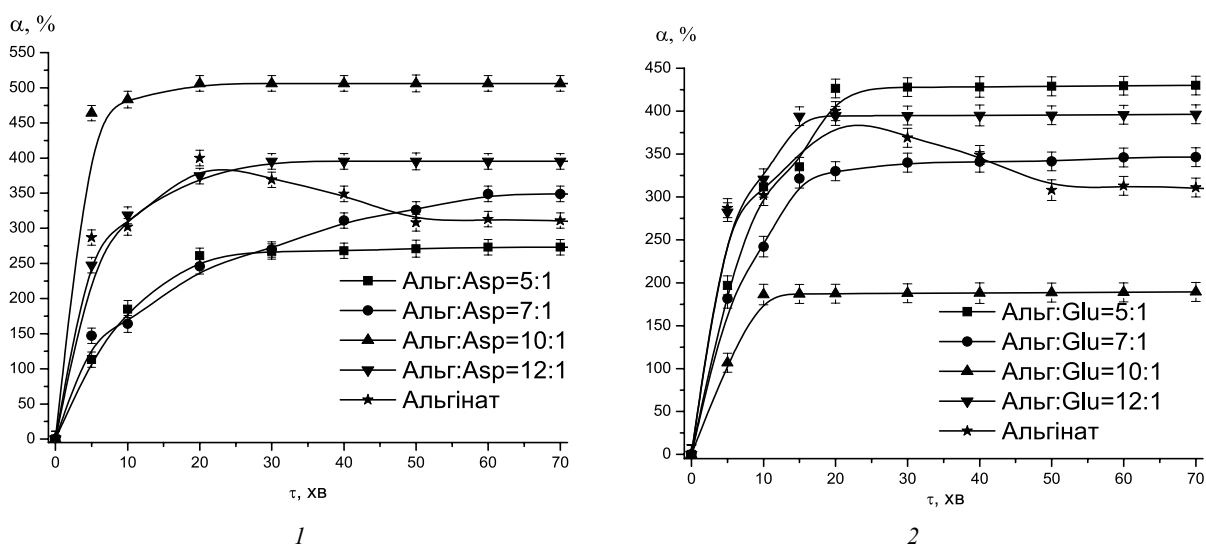


Рис. 5. Кінетика набрякання плівок на основі натрій альгінату, модифікованого L-аспарагіною (1) та L-глутаміною (2) кислотами в різних співвідношеннях полісахарид:амінокислота при рН 6,8

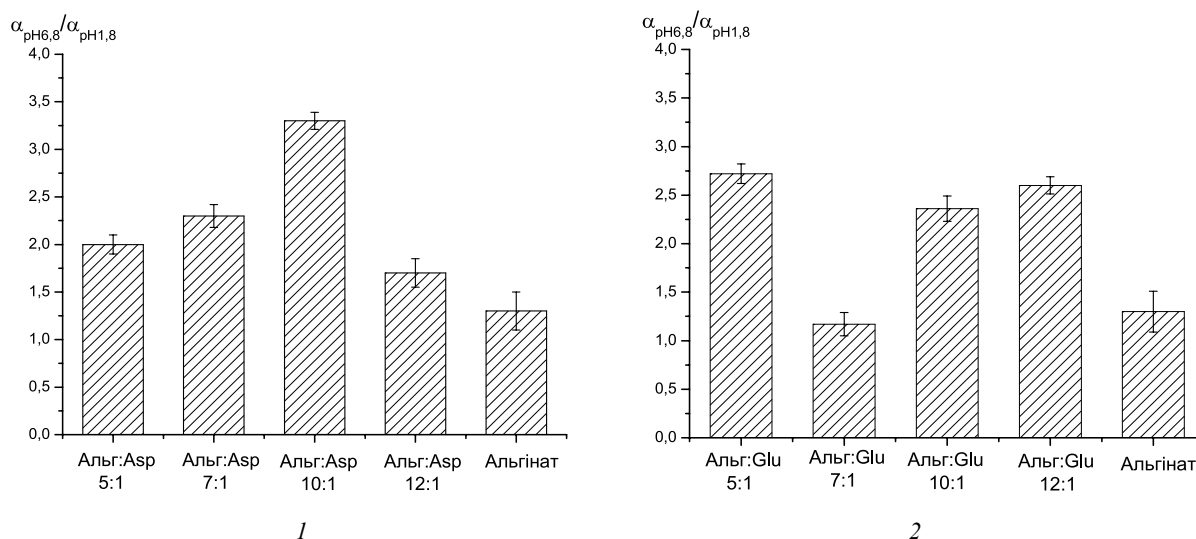


Рис. 6. рН-чутливість плівок на основі натрій альгінату, модифікованого L-аспарагіною (1) та L-глутаміною (2) кислотами в різних співвідношеннях полісахарид:амінокислота

кислоти у співвідношенні 7:1, спостерігається зростання рН-чутливості в порівнянні з немодифікованим натрій альгінатом (рис. 6). Це можна пояснити суттєвим збільшенням вмісту слабкокислотних  $\text{COOH}$ -груп у модифікованих полімерах. Найкращу рН-чутливість мають плівки зі співвідношенням альгінат-L-аспарагінова кислота 10:1 ( $\alpha_{pH6.8} / \alpha_{pH1.8} = 3,3$ ) та альгінат-L-глутамінова кислота 5:1 ( $\alpha_{pH6.8} / \alpha_{pH1.8} = 2,7$ ), які й були використані для капсулювання модельного білка.

Одержання мікрокапсул мікроемульсійним методом. З модифікованих полісахаридів мікроемульсійним методом було одержано сферичні мікрокапсули, розмір яких коливається в межах 20–100 мкм. Бичачий сироватковий альбумін (БСА) було використано як модельний білковий лікарський засіб.

БСА утримується в полімерній матриці за рахунок водневих зв'язків, а також вандерваальсівських взаємодій. Для модифікованого натрій альгінату спостерігається висока ефективність капсулювання білка на рівні 100 %, оскільки прищеплені амінокислоти сприяють збільшенню спорідненості білкових речовин до полімерної матриці натрій альгінату (табл. 1). Найвищий сумарний ступінь вивільнення ( $96,2 \pm 3,1$  %) характерний для мікрокапсул з натрій альгінату, модифікованого L-аспарагіною кислотою.

Дослідження кінетики показали, що в кислому середовищі вивільнення білка з мікрокапсул з модифікованого натрій альгінату суттєво зменшується в порівнянні з немодифікованим і становить приблизно 5 % (рис. 7:1). Ці показники відповідають вимогам до систем контрольованої доставки лікарських засобів до кишківника, тому що дають змогу запобігти дезактивації вартісних ліків під дією агресивного середовища шлунка.

У нейтральному середовищі ступінь вивільнення БСА з мікрокапсул, одержаних з модифікованого альгінату, суттєво підвищується в порівнянні з немодифікованим. Для мікрокапсул з натрій альгінату, модифікованого L-аспарагіною кислотою, характерне рівномірне вивільнення білка (рис. 7:2), що дасть змогу підтримувати рівень лікарського засобу в крові протягом деякого часу. Проте для мікрокапсул з натрій альгінату, модифікованого L-глутаміною кислотою, вивільнення БСА відбувається у дві стадії, що робить ці мікрокапсули неприйнятними у використанні як системи з регульованим вивільненням ліків.

## Висновки

Отже, було досліджено оптимальні співвідношення натрій альгінат : амінокислота для одержання гібридних полімерів із задовільними властивостями й характеристиками для отримання

Таблиця 1. Ефективність капсулювання та сумарний ступінь вивільнення БСА з мікрокапсул

Мікрокапсули	Ефективність капсулювання, %	Сумарний ступінь вивільнення, %
Альгінат	$84,0 \pm 1,8$	$81,8 \pm 2,8$
Альгінат-Asp	$100,0 \pm 1,3$	$96,2 \pm 3,1$
Альгінат-Glu	$100,0 \pm 2,1$	$86,9 \pm 2,4$

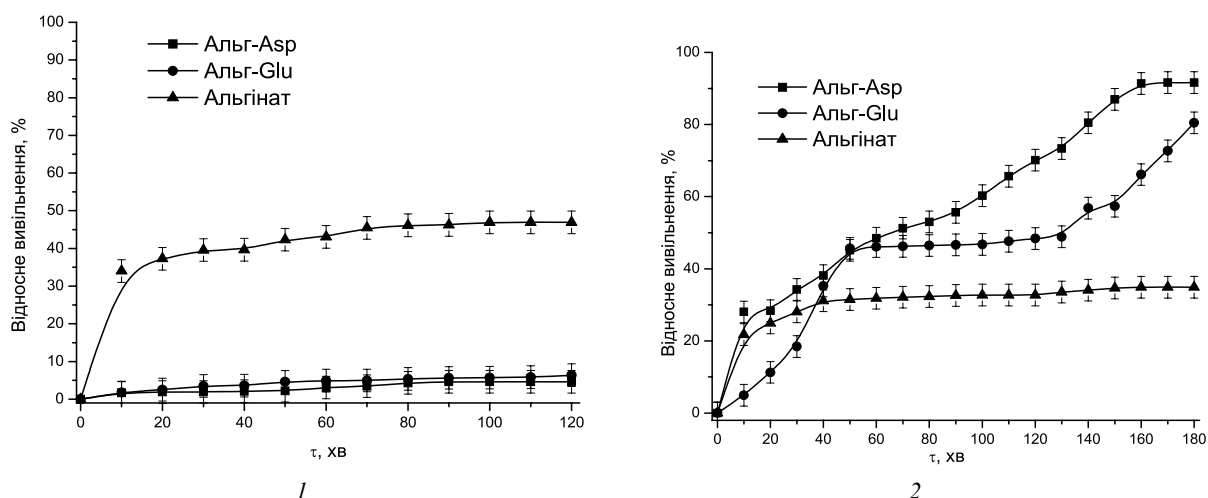


Рис. 7. Кінетика вивільнення БСА з мікрокапсул при рН 1,8 (1) та 6,8 (2)

систем контролюваного вивільнення лікарських засобів. Одержані плівки виявляють високу рН-чутливість при фізіологічних рН шлунка та кишківника. За допомогою мікроемulsійного методу одержано мікрокапсули сферичної форми

діаметром 20–100 мкм. Показано, що мікрокапсули на основі натрій альгінату, модифікованого L-аспарагіною кислотою, відповідають вимогам до систем контролюваної доставки лікарських засобів.

#### Список літератури

1. Salisu A. Chemical Modification of Marine Polysaccharide (Alginate) by Free-Radical Graft Copolymerization – a Short Review / A. Salisu, A. A. Naim, M. M. Sanagi // IOSR Journal of Applied Chemistry. – 2013. – Vol. 4, № 3. – P. 39–44.
2. Karewicz A. New bilayer-coated microbead system for controlled release of 5-aminosalicylic acid / A. Karewicz, J. Łęgowik, M. Nowakowska // Polym. Bull. – 2011. – Vol. 66. – P. 433–443.
3. Шкутина І. В. ИК спектроскопія для дослідження комплексу інсуліна-носітель / І. В. Шкутина, О. Ф. Стоянова, В. Ф. Селеменев // Вестник ВГУ. Серія: Хімія. Біологія. Фармація. – 2004. – № 1. – С. 110–113.
4. Rowbotham J. S. Copper(II)-mediated thermolysis of alginates: a model kinetic study on the influence of metal ions in the thermochemical processing of macroalgae / J. S. Rowbotham, P. W. Dyer, H. C. Greenwell // Interface focus. – 2012. – Vol. 3, № 1. – P. 1–16.
5. Sun J.-Yu. Highly stretchable and tough hydrogels / J.-Yu. Sun, X. Zhao, W. R. K. Illeperuma // Nature. – 2012. – Vol. 489. – P. 133–136.
6. Kong Q. Thermal degradation and flame retardancy of calcium alginate fibers / Q. Kong, B. Wang, Q. Ji // Chinese Journal of Polymer Science. – 2009. – Vol. 27, № 6. – P. 807–812.

I. Kolesnyk, Yu. Borodulin, N. Antoniuk, A. Burban

### pH-SENSITIVE MICROCAPSULES BASED ON SODIUM ALGinate, MODIFIED WITH L-ASPARTIC AND L-GLUTAMIC ACIDS

*Sodium alginate was modified with L-glutamic and L-aspartic acids using EDAC as activation agent for the peptide bond formation. Grafting of amino acids has been proven by IR spectroscopy, TGA method and potentiometric titration. It was shown that the pH-sensitivity of the obtained polymers increases by about three times compared to the unmodified sodium alginate. The microcapsules obtained of hybrid polymers were used for encapsulation of model protein drug BSA.*

**Keywords:** sodium alginate, pH-sensitivity, micro emulsion method, L-glutamic acid, L-aspartic acid.

Матеріал надійшов 20.04.2015