

УДК 544.777

## рН-чутливі альгінатні мікрокапсули, модифіковані поліелектролітними шарами на основі хітозану та карбоксиметилцелюлози

І.С. Давідович, Г.В. Калітовська, Н.Г. Антонюк, А.Ф. Бурбан

Національний університет «Києво-Могилянська академія»  
2, вул. Сковороди, Київ, Україна

*Досліджено кінетику вивільнення модельного білкового лікарського засобу бичачого сироваткового альбуміну (БСА) з альгінатних мікрокапсул, модифікованих поліелектролітними шарами на основі хітозану та карбоксиметилцелюлози. Оцінено вплив концентрації розчинів полімерів, часу нанесення і кількості шарів на ефективність капсулювання та ступінь вивільнення БСА.*

**Ключові слова:** рН-чутливі мікрокапсули, метод “layer-by-layer”, бичачий сироватковий альбумін.

Метод “layer-by-layer”, або пошарова адсорбція протилежно заряджених поліелектролітів – перспективний спосіб отримання ультратонких плівок і мікрокапсул певної товщини, складу та структури, що широко застосовується останнім часом для різних технологічних цілей. Контроль структурних властивостей (щільності та пористості) плівок винятково важливий при виробництві біосенсорів [1, 2], в каталізі [3, 4], в оптиці (антибликові покриття [5]), для отримання біосумісних мікрокапсул [6–8] і мембран для розділення [9], оскільки структура плівок і мікрокапсул визначає коефіцієнт відбиття, швидкість молекулярної дифузії та проникність плівки відносно газів і рідин [10].

Метод пошарової адсорбції протилежно заряджених поліелектролітів широко використовується з метою розробки і вдосконалення носіїв лікарських препаратів, а саме для отримання рН-чутливих плівок і мікрокапсул.

Нанесення шарів методом “layer-by-layer”, порівняно з більш традиційними методами, має ряд переваг: простота процесу та обладнання; техніка підходить для покриття більшості поверхонь; доступність великої кількості природних і синтетичних колоїдів; можливість застосування для об'єктів з нерегулярною формою та розмірами; отримання мультишарів потрібної товщини (діапазон нм-мкм); для створення функціонального покриття (порівняно з ~ 10 % для традиційних методів) потрібна значно менша кількість колоїдів (~ 1 %) [11–14]; можливість контролю кінетики вивільнення закапсульованої речовини шляхом зміни кількості шарів і часу їх нанесення.

### Матеріали і методи досліджень.

У роботі були використані натрій альгінат (Fluka,

Японія), хітозан з молекулярною масою 400 тис. (Fluka, Японія), натрій карбоксиметилцелюлоза (Sigma Aldrich, США), бичачої сироватки альбумін (Sigma Aldrich, США), CaCl<sub>2</sub> (Міранда, Україна), неіоногенна ПАВ Tween 80 (Sigma Aldrich, США), рослинна олія.

*Отримання мікрокапсул.* Мікрокапсули формували за допомогою екструзії формувальної суміші через шприц з голкою діаметром 0,1 мм. Розчин альгінату з концентрацією 2 % з БСА краплями переносили у 0,3 М розчин кальцій хлориду, витримували протягом години і відфільтровували. Промиті водою капсули висушували на повітрі за кімнатної температури. Модифікування альгінатних мікрокапсул здійснювали за допомогою розчинів хітозану та карбоксиметилцелюлози (КМЦ) певної концентрації. Для нанесення поліелектролітних шарів (хітозану та КМЦ) було використано метод “layer-by-layer” (рис. 1).

Для цього 0,1 г альгінатних мікрокапсул занурювали на визначений час у 20 мл розчину хітозану, а після промивання дистильованою водою – у 20 мл розчину КМЦ. Потім відмивали і висушували на повітрі за кімнатної температури.

*Кінетика вивільнення БСА.* Для дослідження кінетики вивільнення білка 0,1 г сухих мікрокапсул занурювали у розчини з рН 1,6 і 6,8 та через певні

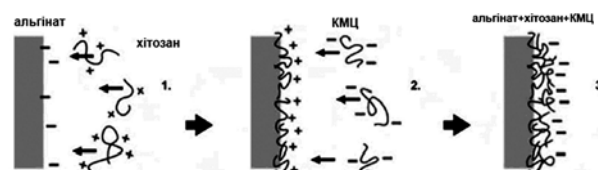


Рис. 1. Схематичне зображення нанесення шарів методом “layer-by-layer”

проміжки часу відбирали проби. Концентрацію БСА вимірювали за допомогою УФ-спектроскопії за довжини хвилі 215 нм.

Ефективність капсулювання розраховували за формулою [15]:

$$E = \frac{C_{\text{практ.}}}{C_{\text{теор.}}} \cdot 100. \quad (1)$$

Параметри сітки зшитих гідрогелів визначали згідно з рівноважною теорією набрякання Пеппаса і Райта [16]. Для цього визначали масу незшитої плівки, плівки після зшивання та набрякання до рівноважного стану.

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

$$\frac{1}{M_c} = \frac{1}{M_n} - \frac{\bar{v}_1}{v_{2r}} \left[ \frac{\ln(1-v_{2s}) + v_{2s} + \chi v_{2s}^2}{(v_{2s}/v_{2r})^{1/3} - 1/2(v_{2s}/v_{2r})} \right], \quad (2)$$

де  $\bar{M}_n$  – середня молекулярна маса альгінату перед зшиванням (400 000);  $\bar{v}$  – специфічний об’єм альгінату (1,142 см<sup>3</sup>/г) [17];  $v_1$  – молярний об’єм води (18,1 см<sup>3</sup>/моль);  $v_{2r}$  – об’ємна частка зшитого полімеру у релаксованому стані;  $v_{2s}$  – об’ємна частка зшитого полімеру в гідрогелі в рівноважному стані;  $\chi$  – параметр Флорі взаємодії полімер-розчинник для системи альгінат/вода (0,738).

Значення  $v_{2r}$  та  $v_{2s}$  розраховували за формулами [18]:

$$v_{2s} = \frac{W_d / \rho_p}{W_d / \rho_p + (W_e - W_d) / \rho_s} \quad (3)$$

та

$$v_{2r} = \frac{W_d / \rho_p}{W_d / \rho_p + (W_r - W_d) / \rho_s}, \quad (4)$$

де:  $W_d$  – маса сухого гелю;  $W_r$  – маса релаксованого гелю;  $W_e$  – маса гелю у рівноважному набряклому стані;  $\rho_p$  і  $\rho_s$  – густина альгінатного полімеру (0,876 г/см<sup>3</sup>) та води відповідно.

Густина зшивки гідрогелю розраховували таким чином [19]:

$$v_e = \frac{\rho_p}{M_c}. \quad (5)$$

### Результати дослідження та їх обговорення.

Вплив часу нанесення шарів на ефективність капсулювання та кінетику вивільнення БСА. Обираючи умови отримання багат шарових структур, важливо знати час формування адсорбційних шарів [20].

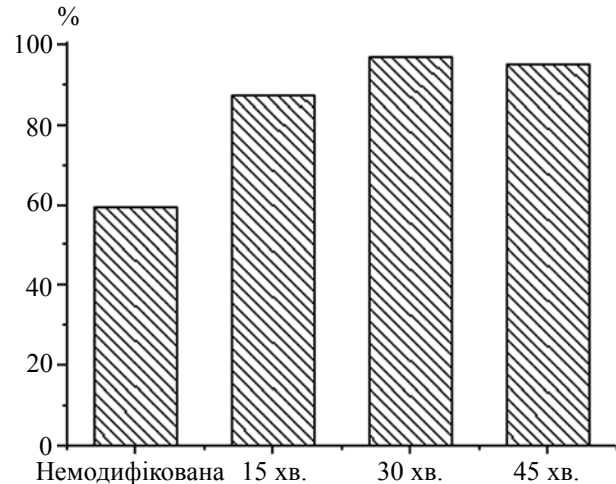


Рис. 2. Ефективність капсулювання БСА альгінатними мікрокапсулами за різного часу нанесення поліелектролітних шарів

За даними різних авторів, він коливається від 5 хв. [21, 22] до 12 год. [23].

Отже, на першому етапі досліджень було отримано альгінатні мікрокапсули матричного типу з модельним лікарським засобом БСА, які потім вкривали шарами хітозану та КМЦ. Ефективність капсулювання БСА для немодифікованих мікрокапсул становить 59,2 %, що характерно для мікрокапсул, отриманих методом екструзії, оскільки процес гелеутворення у розчині хлориду кальцію достатньо тривалий, і протягом цього часу відбувається часткове вимивання водорозчинних ліків з полімерної матриці. Однак, нанесення поліелектролітних шарів приводить до підвищення введення БСА у полімерну матрицю до 95–97% (рис. 2). Це можна пояснити утворенням поліелектролітного комплексу на поверхні капсул, а також наявністю позитивно зарядженого шару хітозану, що не дає змоги проходити негативно зарядженим молекулам білка.

З кінетичних кривих вивільнення білка з отриманих мікрокапсул за рН 1,6 видно, що нанесення поліелектролітних шарів знижує ступінь вивільнення БСА від 45 до 5 %, що задовольняє вимогам до систем контрольованої доставки ліків до кишківника (рис. 3). Збільшення часу нанесення поліелектролітних шарів майже не впливає на ступінь вивільнення ліків, однак приводить до більш рівномірного та пролонгованого вивільнення. З нахилу кінетичних кривих можна зробити висновок про те, що істотно знижується швидкість дифузії БСА з полімерної матриці, оскільки при збільшенні часу нанесення поліелектролітів можливе утворення товстого шару.

Для немодифікованих мікрокапсул у нейтральному середовищі через 3 год. спостерігаємо зміну кута нахилу кінетичної кривої, що свідчить про збільшення швидкості вивільнення БСА (рис. 4). Це можна пояснити руйнуванням зв’язків альгінату натрію з

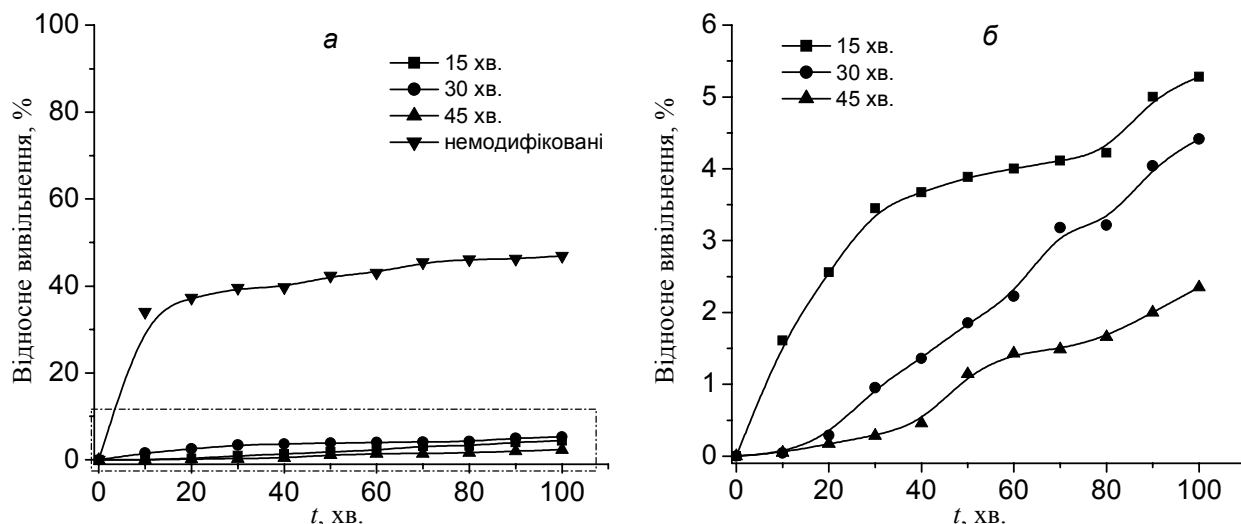


Рис. 3. Кінетика вивільнення БСА за pH 1,6 з альгінатних мікрокапсул за різної тривалості нанесення шарів: концентрація хітозану і КМЦ – 0,2 %; кількість шарів – 1

кальцієм за наявності більш сильного комплексоутворювача у розчині фосфат-іонів. Отже, вивільнення білка відбувається не тільки за рахунок дифузії, а також через ерозію полімерної матриці. Нанесення поліелектролітного шару знижує ступінь вивільнення БСА у середовищі кишківника. Кінетичні криві стають лінійними, що відповідає нульовому порядку кінетики вивільнення. Це покращує фармакокінетику ліків, оскільки вони будуть вивільнятися більш рівномірно протягом певного часу. Однак, для модифікованих мікрокапсул спостерігається швидше вивільнення БСА, яке через 150 хв. виходить на плато, оскільки утворений на поверхні поліелектролітний комплекс нерозчинний. Зокрема, вивільнення білка відбувається тільки за рахунок дифузії.

Отже, час нанесення півшарів має вплив на проникність оболонок, оскільки для капсул з 15-хвилинною модифікацією притаманне більш швидке

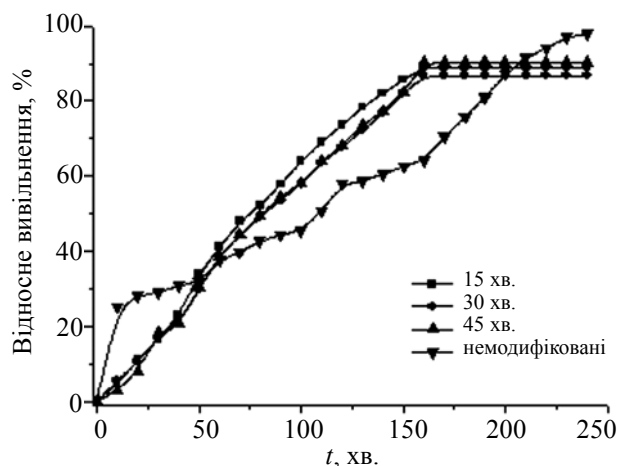


Рис. 4. Кінетика вивільнення БСА за pH 6,8 з альгінатних мікрокапсул за різної тривалості нанесення шарів: концентрація хітозану і КМЦ – 0,2%; кількість шарів – 1

вивільнення у кислому середовищі, ніж для тих, які вкривали напівшарами протягом 30 і 45 хв. Це, передусім, пов'язане з різною густиною зшивання полімеру та молекулярною масою між зшивками ( $M_c$ ).

Збільшення густини зшивання при нанесенні поліелектролітів можна пояснити утворенням на поверхні мікрокапсул щільного поліелектролітного комплексу, що приводить до зниження ступеня набрякання. Отже, густина зшивання зростає зі збільшенням тривалості нанесення поліелектролітних шарів, а  $M_c$  між зшивками навпаки зменшується. Це пояснює зміни швидкості дифузії частинок БСА крізь оболонку модифікованих альгінатних мікрокапсул.

*Вплив концентрації розчинів поліелектролітів на ефективність капсулювання та кінетику вивільнення БСА.* При модифікуванні мікрокапсул методом «layer-by-layer» концентрація розчинів поліелектролітів істотно впливає як на товщину утвореного шару, так і на його структуру. Зменшення концентрації розчину хітозану та КМЦ у 4 рази призводить до зниження ефективності капсулювання майже удвічі, що можна пояснити утворенням менш щільного шару на поверхні капсул (рис. 5).

При зменшенні концентрації розчинів поліелектролітів, і, відповідно, товщини півшарів, спостерігається збільшення ступеня вивільнення БСА у кислому середовищі (рис. 6a). Однак, цей параметр не впливає на ступінь вивільнення білка за pH 6,8

Таблиця. Вплив часу нанесення півшару на густину зшивки полімеру

Час нанесення півшару, хв.	Густина зшивки, моль/дм <sup>3</sup>	$M_c$
0	0,12	7300
15	0,22	4003
30	1,44	625
45	2,32	378

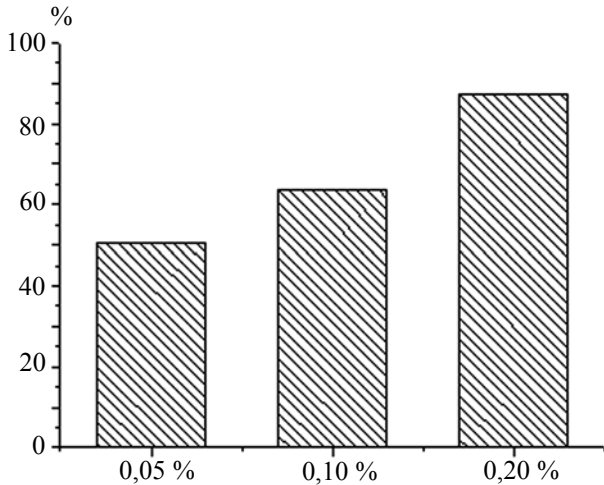


Рис. 5. Ефективність капсулювання БСА альгінатними мікрокапсулами за різної концентрації розчинів поліелектролітів

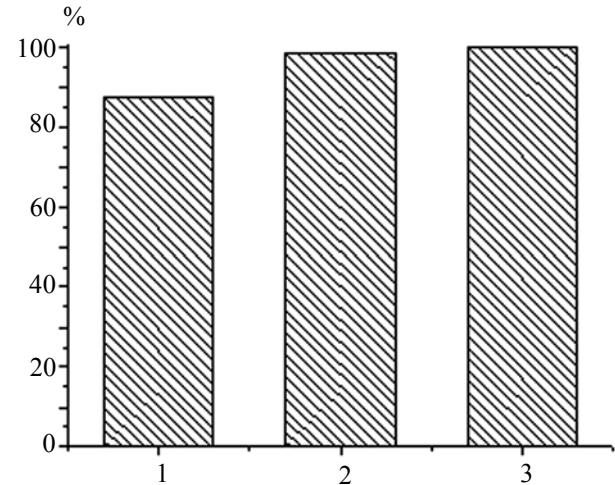


Рис. 7. Ефективність капсулювання БСА альгінатними мікрокапсулами за різної кількості поліелектролітних шарів

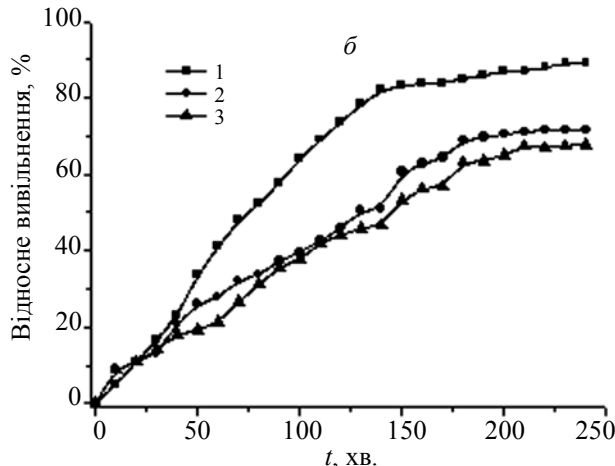
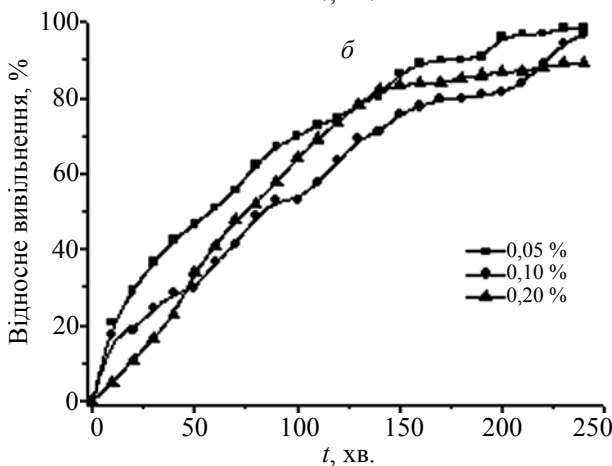
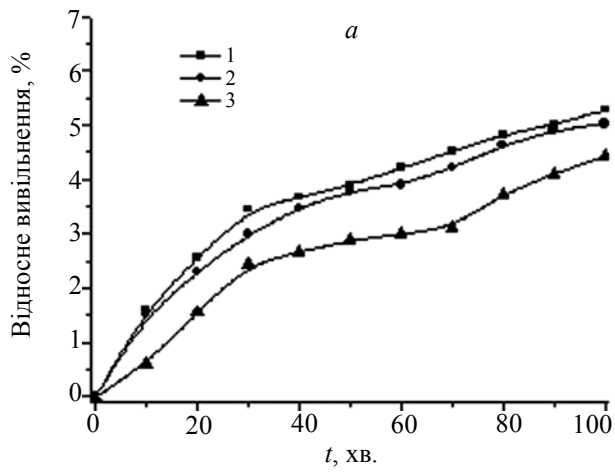
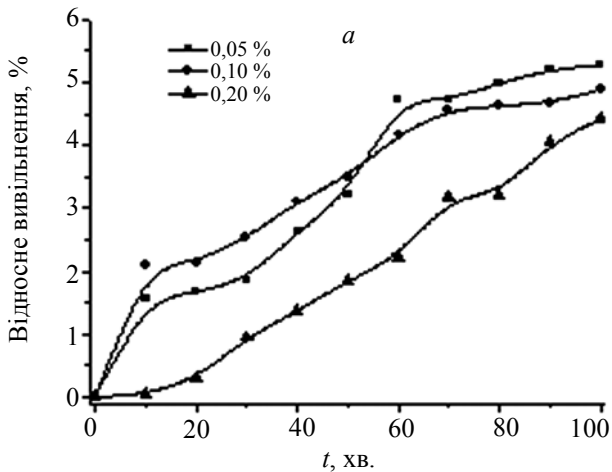


Рис. 6. Кінетика вивільнення БСА за рН 1,6 (а) та 6,8 (б) з альгінатних мікрокапсул за різної концентрації нанесених поліелектролітів: час модифікування – 15 хв; кількість шарів – 1

Рис. 8. Кінетика вивільнення БСА за рН 1,6 (а) та 6,8 (б) з альгінатних мікрокапсул за різної кількості поліелектролітних шарів і концентрації нанесених поліелектролітів: час нанесення півшару – 15 хв; концентрація хітозану і КМЦ – 0,2%

(рис. 6б). При модифікуванні мікрокапсул 0,05%-вими розчинами поліелектролітів спостерігаємо майже 100 % вивільнення БСА, що характерно для немодифікованих мікрокапсул. Отже, можна припустити, що полімер повністю не вкриває поверхню капсул.

фікованих мікрокапсул. Отже, можна припустити, що полімер повністю не вкриває поверхню капсул.

З отриманих результатів можна зробити висновок про те, що зниження концентрації розчинів полімерів недоцільне, оскільки спостерігається збільшення втрати лікарського засобу як на стадії отримання мікрокапсул, так і при вивільненні у середовищі шлунка.

*Вплив кількості поліелектролітних шарів на ефективність капсулювання і кінетику вивільнення БСА.* Нанесення різної кількості шарів на носії лікарських засобів є одним із ефективних способів впливу на вивільнення ліків. Так, при нанесенні двох і більше шарів спостерігаємо збільшення ефективності капсулювання до 100 % (рис. 7).

Кількість нанесених поліелектролітних шарів істотно не впливає на кінетику вивільнення білка у кислому середовищі. За pH 6,8 спостерігаємо сповільнення вивільнення БСА при нанесенні вже другого

шару. При нанесенні третього шару ступінь вивільнення модельного лікарського засобу залишається незмінним. Отже, наносити більше двох поліелектролітних шарів недоцільно (рис. 8).

#### **Висновки.**

Модифікування полісахаридних мікрокапсул методом «layer-by-layer» перспективне для модифікування альгінатних мікрокапсул, оскільки, незначно змінюючи параметри процесу, можна легко варіювати проникність поліелектролітної оболонки мікрокапсул, таким чином контролюючи ефективність капсулювання та кінетику вивільнення лікарських засобів білкової природи. Нанесення поліелектролітних шарів покращує pH-чутливість мікрокапсул, знижуючи ступінь вивільнення БСА у кислому середовищі приблизно у 10 разів, порівняно з немодифікованими мікрокапсулами.

### **Література**

- Bertran P., Jonas A., Laschewsky A., Legras R. // *Macromol. Rapid Commun.*– 2000.– V. 21.– P. 319-348.
- Caruso F., Furlong D. N., Ariga K., Ichinose I., Kunitake T. // *Langmuir.*– 1998.– V. 14.– P. 4559-4565.
- Onoda M., Ariga K., Kunitake T. // *J. Biosci. Bioeng.*– 1999.– V. 87.– P. 69-75.
- Caruso F., Schuler C. // *Langmuir.*– 2000.– V. 16.– P. 1485-1488.
- Wu A., Yoo D., Lee J. K., Rubner M. F. // *J. Am. Chem. Soc.*– 1999.– V. 121.– P. 4883-4891.
- Sukhorukov G. B., Donath E., Lichtenfeld H., Knippel E., Knippel M., Buddle A., Mohwald H. // *Colloids Surf. A.*– 1998.– V. 137.– P. 253-266.
- Caruso F., Schuler C. // *Langmuir.*– 2000.– V. 16.– P. 9595-9603.
- Antipov A. A., Sukhorukov G. B., Lepotatti S., Radchenko I. L., Donath E. // *Colloid Surf. A.*– 2002.– V. 198.– P. 535-541.
- Levaesalmi J., McCarthy T. J. // *Macromolecules.*– 1997.– V. 30.– P. 1752-1757.
- Сергеева И. П., Ермакова Т. Б., Семенов Д. А., Соболев В. Д., Киселева О. А., Чураев Н. В. // *Коллоид. журн.*– 70, № 5.– 2008.– С. 656-662.
- Melgardt M. de Villiers, Daniel P. Otto, Schalk J. Strydom, Yuri M. Lvov // *Advanced Drug Delivery Reviews.*– 2011.– V. 63.– P. 701-715.
- Bertrand P., Jonas A., Laschewsky A., Legras R. // *Macromol. Rapid Commun.*– 2000.– V. 21.– P. 319-348.
- Becker A. L., Johnston A. P. R., Caruso F. // *Macromol. Biosci.*– 2010.– V. 10.– P. 488-495.
- Johnston A. P. R., Read E. S., Caruso F. // *Nano Lett.*– 2005.– V. 5.– P. 953-956.
- Чабан М. О., Давидович І. С., Антонюк Н. Г., Бурбан А. Ф., Білько Д. І. // *Наукові записки НаУКМА.*– 2011.– Т. 118.– С. 45-47.
- Peppas N. A., Wright S. L. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.*– 1998.– V. 46.– P. 15-29.
- Boobtheekul T., Kong H. J., Mooney D. J. // *Biomaterials.*– 2005.– V. 26.– P. 2455-2465.
- Jao W.-Ch., Ho L.-Ch., Chen Zh.-W. // *J. of China University of Sci. and Technol.*– 2010.– V. 42.– P. 37-61.
- Atta A. M., Abdel-Aziz A. // *Polym. Adv. Technol.*– 1998.– V. 9.– P. 340-348.
- Stefaan De Koker, Liesbeth J. De Cock, Pilar Rivera-Gil, Wolfgang J. Parak, Rachel Auzely Velty, Chris Vervaet, Jean Paul Remon, Johan Grooten, Bruno G. De Geest // *Advanced Drug Delivery Reviews.*– 2011.– V. 63.– P. 748-761.
- Schlenoff J. B., Dubas S. T. // *Macromolecules.*– 2001.– V. 34.– P. 592-598.
- Dubas S. T., Schlenoff J. B. // *Macromolecules.*– 1999.– V. 32.– P. 8153-8160.
- Kramer G., Estel K., Schmitt F.-J., Jacobasch H.-J. // *J. Colloid Interface Sci.*– 1998.– V. 208.– P. 302-309.

*Надійшла до редакції 24 жовтня 2012 р.*

## **pH-чувствительные альгинатные микрокапсулы, модифицированные полиэлектролитными слоями на основе хитозана и карбоксиметилцеллюлозы**

*И.С. Давидович, Г.В. Калитовская, Н.Г. Антонюк, А.Ф. Бурбан*

Национальный университет «Киево-Могилянская академия»  
2, ул. Сковороды, Киев, Украина

*Исследовано кинетику высвобождения модельного белкового препарата бычьего сывороточного альбумина (БСА) из альгинатных микрокапсул, модифицированных полиэлектролитными слоями на основе хитозана и карбоксиметилцеллюлозы. Показано влияние концентрации растворов полимеров, времени нанесения и количества слоев на эффективность капсулирования и степень высвобождения БСА.*

**Ключевые слова:** pH-чувствительные микрокапсулы, метод «layer-by-layer», бычий сывороточный альбумин.

## **pH-sensitive alginate microcapsules modified by chitosan/CMC polyelectrolyte layers**

*I. Davidovich, H. Kalitovska, N. Antoniuk, A. Burban*

*Kinetics of BSA release from alginate microcapsules modified by polyelectrolyte layers of chitosan and carboxymethyl cellulose was investigated. The influence of the polymer concentration, the application time and number of layers on the encapsulation efficiency and release degree was evaluated.*

**Keywords:** pH-sensitive microcapsules, «layer-by-layer» method, bovine serum albumin.