Научная статья
Original article
УДК 606

СИНТЕЗ КАРРАГИНАН-ХИТОЗАНОВЫХ МИКРОЧАСТИЦ НА ОСНОВАНИИ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ОПТИМАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ КАРРАГИНАНА И ХЛОРИДА КАЛЬЦИЯ

SYNTHESIS OF CARRAGEENAN-CHITOSAN MICROPARTICLES BASED ON CERTAIN OPTIMAL CONCENTRATIONS OF CARRAGEENAN AND CALCIUM CHLORIDE

Попова Анна Андреевна, бакалавр, Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, (125480 Россия, г. Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20) тел. +7(977) 114 62 30, popovstvo@gmail.com

Anna A. Popova, Bachelor's degree, D. I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology, (20 Geroyev Panfilovtsev str., Moscow, 125480 Russia) tel. +7(977) 114 62 30, popovstvo@gmail.com

Аннотация. В статье рассмотрены методы определения оптимальных концентраций каррагинана и хлорида кальция для синтеза каррагинан-хитозановых микрочастиц. Исследование производилось, учитывая пероральный способ введения в организм конечных лекарственных средств. На этом основании был установлен основной критерий-допустимый размер микрочастиц.

Abstract. The article discusses methods for determining the optimal concentrations of carrageenan and calcium chloride for the synthesis of carrageenan-chitosan microparticles. The study was carried out taking into account the oral method of

administration of final drugs into the body. On this basis, the main criterion was established-the permissible size of microparticles.

Ключевые слова: каррагинан, хитозан, хлорид кальция, электролитный комплекс, микрочастицы, препарат.

Key words: carrageenan, chitosan, calcium chloride, electrolyte complex, microparticles, medication.

Введение

Введение в организм лекарственных средств пероральным способом является самым простым для пациента. Также он дает возможность принимать большие дозы лекарства. Однако, у этого способа имеются свои недостатки, такие как низкая биодоступность для ряда действующих веществ, воздействие агрессивных лекарственных препаратов на ЖКТ (в частности, это характерно для антибиотиков) [1], разрушение биологических веществ белковой природы под действием ферментов ЖКТ и его агрессивной среды [1,2], низкая проницаемость слизистой кишечника для высокомолекулярных соединений [2] и сравнительно медленное терапевтическое действие препарата при данном пути введения [1]. В рамках современной биотехнологии процесс промышленного производства препаратов на белковой основе и их широкое применение в терапевтической практике [3]. Благодаря новым изобретениям становятся доступны новые системы пероральной доставки лекарств.

Существуют различные подходы, применяющиеся в разработке систем для пероральной доставки лекарственных препаратов. В частности, для адресной доставки препаратов предлагают использовать нано- и микрокапсулы с мукоадгезивными свойствами [2,3]. Среди полимеров, использующихся для синтеза данных микрочастиц, предпочтительно применять pH-зависимые, способные к гелеобразованию биополимеры, меняющие свою структуру в зависимости от показателя кислотности среды. Микрокапсулы, полученные из соединений с вышеперечисленными свойствами, способны обеспечить защиту действующего вещества (или от действующего вещества) в среде желудка и

обеспечить его высвобождение в кишечнике [3]. Данными свойствами обладают такие полисахариды, как альгинат, пектин, каррагинан, ксилан и др [4]. Перечисленные биополимеры нетоксичны, биосовместимы и биодеградируемы, что делает микрочастицы, в состав которых входят данные полисахариды, перспективными в качестве пероральных систем доставки лекарственных соединений [4]. Для придания наночастицам мукоадгезивных свойств используются комплексы перечисленных полимеров с хитозаном [4]. Хитозан – биоразлагаемый нетоксичный полисахарид, состоящий из случайно связанных β-(1-4) D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозаминов (с преобладанием остатков первого мономера в составе). Данный биополимер способен образовывать с вышеупомянутыми полисахаридами стабильные полиэлектролитные комплексы и за счет своих мукоадгезивных свойств способен увеличивать время пребывания и количество действующего вещества в месте адсорбции, создавая градиент концентрации, ведущий к быстрой абсорбции молекул белка через слизистую кишечника [3].

В данной работе в качестве структурного полимера был использован каррагинан –высокомолекулярный линейный гидрофильный полисахарид, состоящий из повторяющихся дисахаридных галактозо-3,6-ангидрогалактозных (3,6- AG) фрагментов (сульфатированных и несульфатированных), которые соединены чередующимися а-(1,3) и β-(1,4) гликозидными связями.

Целью данной работы является определение наилучшего соотношения концентраций исходных растворов каррагинана, хитозана и хлорида кальция для синтеза каррагинан-хитозановых микрочастиц, эффективных при включении в них терапевтических молекул.

Материалы и методы

Объектами данного исследования являлись: хитозаан низкомолекулярный (200 кДа) со степенью диацетилирования 85%, производства компании Sigma-Aldrich; каррагинан Bengel MBF-2000 (производства компании Shemberg Филлипины), степень сульфатирования 25%; лиофилизат доксорубицина

гидрохлорида для приготовления раствора для внутрисосудистого и внутрипузырного введения, производства фармацевтического предприятия «Тева».

Для синтеза каррагинан-хитозановых микрочастиц к 58,8 мл раствора каррагинана 0,00925% (массовых) и pH 4,3 по каплям со скоростью 0,125 мл/мин с помощью перистальтического насоса добавляли 3,75 мл раствора хлорида кальция 22 мМ при постоянном перемешивании на магнитной мешалке (скорость перемешивания 800 об/мин). Из-за низких концентраций структурообразующих компонентов в результате смешения данных растворах образуется прегель. К нему при постоянном перемешивании с помощью перистальтического насоса со скоростью 0,42 мл/мин по каплям добавляли 12,5 мл раствора хитозана 0,07% (массовых) и pH 4,6. После полного прокапывания растворов для стабилизации микрочастиц готовую суспензию микрочастиц перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 минут со скоростью 800 об/мин. Выделение микрочастиц из раствора проводили методом центрифугирования со скоростью 7000 об/мин в течении 40 минут. Для получения микрочастиц, нагруженных веществом (в данной работе в качестве активного соединения использовался доксорубицин), его добавляли в раствор каррагинана до прокапывания.

Размер и дзетта-потенциал полученных микрочастиц определяли с помощью сканирующего электронного микроскопа JEOL 1610LV с энергодисперсионным спектрометром для электронно-зондового микроанализа SSD X-Max Inca Energy (JEOL, Япония; Oxford Instruments, Великобритания).

Полноту включения хитозана в полиэлектролитные комплексы определяли методом ИК-спектроскопии надосадка, осуществлявшимся на ИК-Фурье спектрометре с приставкой НПВО и дополнительным оборудованием Nicolet 380 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) [5].

Емкость каррагинан-хитозановых микрочастиц по доксорубицину определяли путем измерения остаточного количества доксорубицина в надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования суспензии. Концентрацию доксорубицина устанавливали, определяя оптическую плотность пробы при длине волны 475 нм [6].

Результаты и обсуждения

Главными критериями, по которым проводилась первичная оценка полученных каррагинан-хитозановых микрочастиц являлись их размер (разрешенные размеры препарата для перорального введения до 1000 мкм) [7], дзетта-потенциал, характеризующий их тенденцию к слипанию (порог слипания |30-33| мВ), а также полнота связывания хитозана с микрочастицами.

На первом этапе необходимо было определить оптимальную концентрацию исходного раствора структурообразующего полисахарида (каррагинана) для синтеза микрочастиц. Для данной цели проводили серию приготовления каррагинан-хитозановых микрокапсул, варьируя исходные концентрации раствора каррагинана при постоянных значениях концентраций растворов хлорида кальция (18 мМ) и хитозана (0,07 % массовых). Измеряли размер полученных микрочастиц и их дзетта-потенциал. Результаты измерения представлены в таблице 1.

Концентрация каррагинана, % массовые	Диаметр микрочастиц, нм	Дзетта-потенциал микрочастиц, мВ
0,046	500-600	-(37±4)
0,053	500-600	-(35±3)
0,072	600-700	-(32±2)
0,087	600-700	-(33±2)
0,098	1000-1100	-(28±2)

Таблица 1. Характеристики каррагинан-хитозановых микрочастиц, синтезированных с использованием растворов каррагинана с различными концентрациями при постоянных концентрациях растворов хитозана (0,07 % массовых) и хлорида кальция (18 мМ)

Из представленных данных видно, что максимально допустимых размеров микрочастицы достигают при концентрации раствора каррагинана 0,087 % массовых, однако данные микрочастицы обладают дзетта-потенциалом, близким к

порогу слипания. Исходя из этого за оптимальную концентрацию раствора, при котором синтезированные полисахаридные микрочастицы имеют максимально допустимые размеры и не обладают тенденцией к слипанию принимаем 0,072 %.

Следующим этапом стало определение оптимальной концентрации раствора связующего вещества (хлорида кальция) для синтеза микрочастиц. Для данной цели проводили серию приготовления каррагинан-хитозановых микрокапсул, варьируя исходные концентрации раствора хлорида кальция при постоянных значениях концентраций растворов каррагинана (0,072 % массовых) и хитозана (0,07 % массовых). Проводили измерения размера и дзетта-потенциала синтезированных микрочастиц. Результаты измерений представлены в таблице 2.

Концентрация $CaCl_2$, мМ	Диаметр микрочастиц, нм	Дзетта-потенциал микрочастиц, мВ
18	500-600	-(28±3)
20	500-600	-(34±4)
22	600-700	-(35±4)
24	700-800	-(37±5)
26	800-900	-(31±3)

Таблица 2. Характеристики каррагинан-хитозановых микрочастиц, синтезированных с использованием растворов хлорида кальция с различными концентрациями при постоянных концентрациях растворов каррагинана (0,072 % массовых) и хитозана (0,07 % массовых)

По представленным данным видно, что увеличение концентрации исходного раствора хлорида кальция ведет к увеличению дзетта-потенциала каррагинан-хитозановых микрочастиц, то есть снижается их тенденция к слипанию. Все синтезированные микрочастицы имеют допустимый диапазон значений дзетта-потенциала. Максимальный размер микрочастицы достигают при концентрациях растворов 24 и 26 мМ. Повышение концентрации связующего вещества приводит

к увеличению их размера. Можно предположить, что это происходит вследствие того, что лишь небольшая часть хитозана смогла связаться в комплекс с микрочастицами.

Полнота включения хитозана в полиэлектролитный комплекс является одним из ключевых критериев оценки синтезируемых микрочастиц. Для его определения были сняты ИК-спектры супернатантов, полученных после отделения микрочастиц. Отдельно был снят ИК-спектр раствора, полученный в результате разбавления 25 мл хитозана 0,07 %. Результаты представлены на рис.1-3.

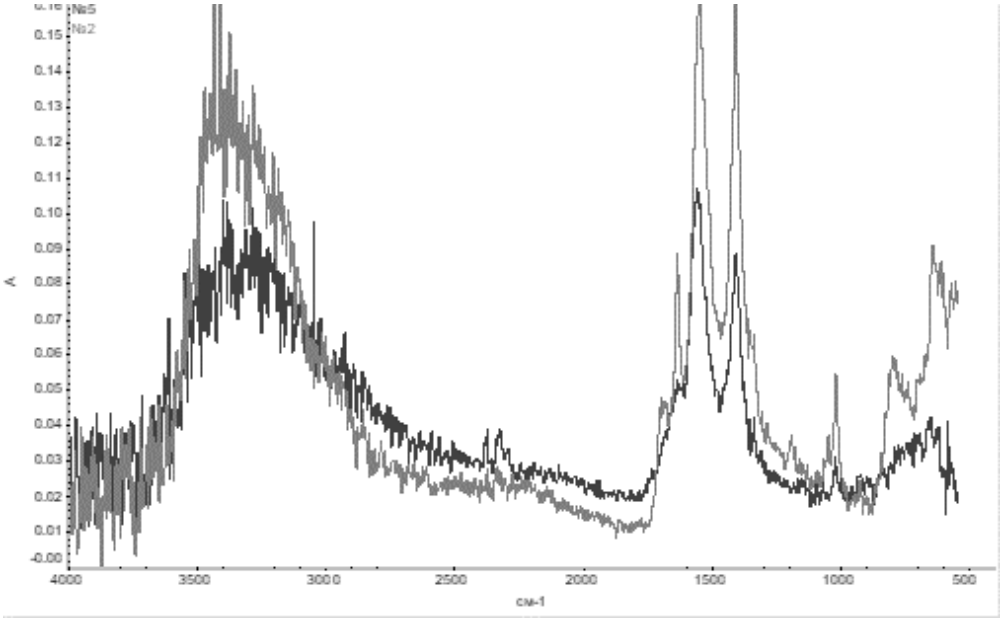

Рис.1 – Спектр супернатанта после отделения микрочастиц в сравнении с раствором хитозана с исходной концентрацией; концентрации растворов для синтеза: каррагинана 0,072 % массовых, хитозана 0,07 % массовых, $CaCl_2$ 20 мМ

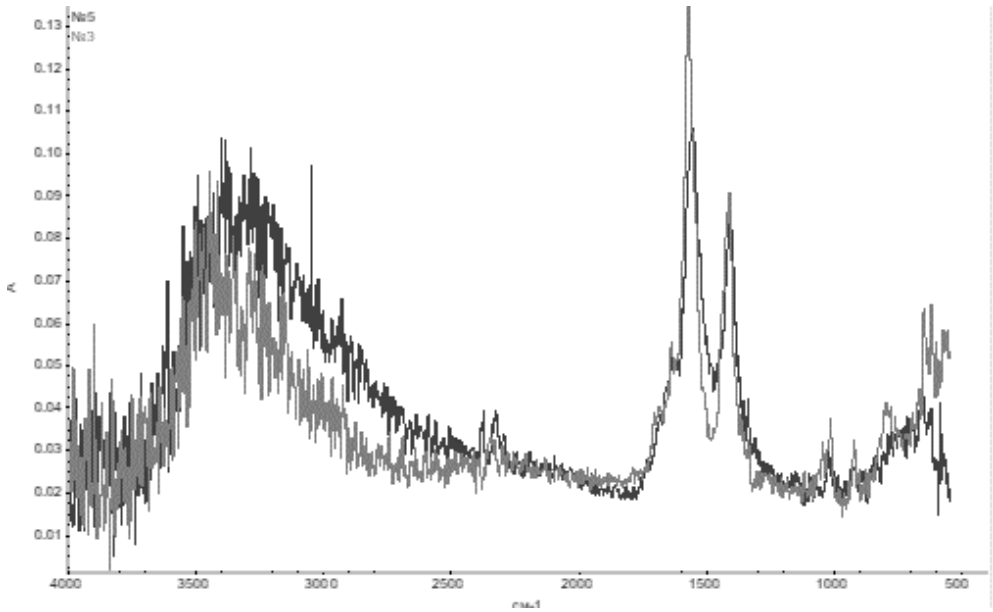

Рис.2 – Спектр супернатанта после его отделения от микрочастиц в сравнении с раствором хитозана с исходной концентрацией; концентрации растворов для синтеза: каррагинана 0,072 % массовых, хитозана 0,07 % массовых, $CaCl_2$ 22 мМ

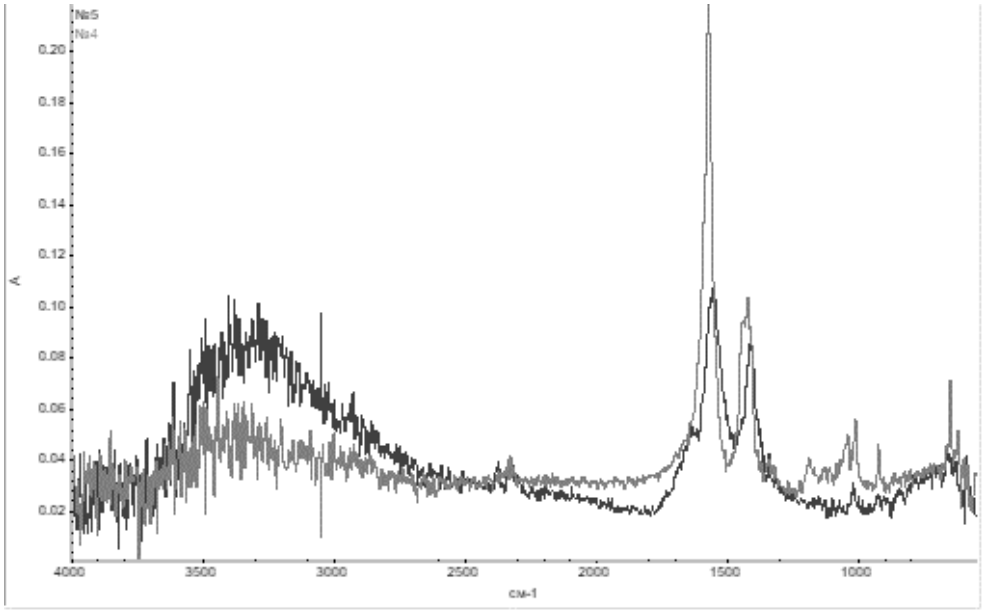

Рис.3 – Спектр супернатант после его отделения от микрочастиц в сравнении с раствором хитозана с исходной концентрацией; концентрации растворов для синтеза: каррагинана 0,072 % массовых, хитозана 0,07 % массовых, $CaCl_2$ 26 мМ

Из рисунков видно, что хитозан, действительно, не связался с микрочастицами и почти весь остался в надосадочной жидкости. Предположим, что это связано с особенностью строения молекулы каррагинана. Молекула имеет много реакционных групп, следовательно, идет связывание с кальцием и хитозаном (образование полиэлектролитного комплекса). Делаем вывод, что изменение концентрации $CaCl_2$ не влияет на связывание.

Таким образом по вышеустановленным критериям оптимальными условиями для синтеза микрочастиц являются следующие исходные растворы: 58,8 мл раствора каррагинана 0,072 % массовых, 17,5 мл раствора хитозана 0,07 % массовых и 3,75 мл раствора хлорида кальция 20 мМ. За оптимальную концентрацию $CaCl_2$ принимаем стандартную- 18 Мм.

Заключение:

1. Были получены каррагинан-хитозановые микрочастицы, диаметр которых составлял 600-700 нм. Был измерен дзетта-потенциал микрочастиц. Он

составлял -(33±2) мВ, что свидетельствует об отсутствии у микрочастиц тенденций к слипанию. Спектр надосадка микрочастиц свидетельствовал о включении большей части хитозана в полиэлектролитный косплекс.

2. Было подобрано оптимальное соотношение концентраций структурных компонентов в исходных растворах для синтеза микрочастиц: раствор каррагинана - 0,072% весовых; раствор хитозана - 0,07 % массовых; раствор $CaCl_2$ - 18 мМ. Установлено, что установленные первоначально критерии для оценки оптимальных условий синтеза микрочастиц не дают гарантии их эффективности и высокой емкости по терапевтических препаратам.

Литература

1. Кравченко И.А. Способы введения лекарственных препаратов в организм/ И.А. Кравченко: Астропринт, 2009. – 82 стр.
2. Michael Goldberg, Challenges for the oral delivert of macromolecules/ Michael Goldberg, Isabel Gomez-Orellana// Nature Publishing Group – 2003. – Vol. 2. – p. 289 – 295
3. Kyeongsoon Park, Oral protein delivery: Current status and future prospect/ Kyeongsoon Park, Ick Chan Kwon, Kinam Park// Reactive & Functional Polymers. – 2011. – 71. – p. 280-287
4. Микро- и наночастицы из альгината и хитозана для трансмуказальной доставки белка/ Е.А. Киржанова, М.А. Печенкин, Н.Б. Демина*, Н.Г. Балабушевич// Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия – 2016. – Т. 57. – № 2. – стр. 103 – 111.
5. Васильев А. В., Гриненко Е. В., Щукин А. О. Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений. СПб.: СПбГЛТА, 2007. 29 с.
6. Транспортная форма противоопухолевых препаратов доксорубицина и мелфалана на основе аполипопротеина А-I плазмы крови/ Р.А. Князев, Н.В. Трифонова, Л.М. Поляков// Журнал "Современные проблемы науки и образования". – 2016. – № 6.
7. Российская Федерация. Министерство здравоохранения. Об утверждении правил изготовления и отпуска лекарственных препаратов для медицинского

применения аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность N 751н от 26.10.2015 г.

8. Ильина А. В. и др. Получение микрочастиц на основе хитозана и исследование их взаимодействия с интерфероном //Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44. – №. 2. – С. 250-254.
9. Киржанова Е. А. и др. Микро-и наночастицы из альгината и хитозана для трансмукозальной доставки белка //Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2016. – Т. 57. – №. 2.
10. Губина-Вакулик Г. И., Ткаченко А. С., Орлова М. А. Морфологическое состояние тонкого кишечника при длительном употреблении пищевой добавки каррагинан //Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Т. 3. – №. 2.

Literature

1. Kravchenko I. A. Methods of introducing drugs into the body/ I. A. Kravchenko: Astroprint, 2009. - 82 p.
2. Michael Goldberg, Challenges for the oral delivert of macromolecules/ Michael Goldberg, Isabel Gomez-Orellana// Nature Publishing Group – 2003. – Vol. 2. – p. 289 – 295
3. Kyeongsoon Park, Oral protein delivery: Current status and future prospect/ Kyeongsoon Park, Ick Chan Kwon, Kinam Park// Reactive & Functional Polymers. – 2011. – 71. – p. 280-287
4. Micro-and nanoparticles from alginate and chitosan for transmucasal protein delivery / E. A. Kirzhanova, M. A. Pechenkin, N. B. Demina*, N. G. Balabushevich// Bulletin of the Moscow University. Ser. 2. Chemistry-2016. - Vol. 57. - No. 2. - pp. 103-111.
5. Vasiliev A.V., Grinenko E. V., Shchukin A. O. Infrared spectroscopy of organic and natural compounds. St. Petersburg: SPbGLTA, 2007. 29 p.

6. Transport form of antitumor drugs doxorubicin and melphalan based on apolipoprotein A-I of blood plasma/ R. A. Knyazev, N. V. Trifonova, L. M. Polyakov / / Journal "Modern problems of science and education". - 2016. - No. 6.
7. Russian Federation. Ministry of Health. About the approval of the rules for the manufacture and release of medicines for medical use by pharmacy organizations, individual entrepreneurs who have a license for pharmaceutical activity N 751n of 26.10.2015
8. Ilyina A.V. et al. Obtaining microparticles based on chitosan and studying their interaction with the interferon //Applied Biochemistry and microbiology. 2008, Vol. 44, no. 2. - p.250-254.
9. Kirzhanova E. A. et al. Micro - and nanoparticles from alginate and chitosan for transmucosal protein delivery //Vestnik Moskovsky universitet. Series 2.Chemistry. - 2016. - Vol. 57. -№. 2.
10. Gubina-Vakulik G. I., Tkachenko A. S., Orlova M. A. morphological state of the small intestine during prolonged use of the food supplement carrageenan //Bulletin of problems of biology and medicine. - 2014. - Vol. 3. - no. 2.

© Попова А.А., 2021. Научно-образовательный журнал для студентов и преподавателей «StudNet» №9/2021.