

ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ № 1 2014
СЕРЫЯ ХІМІЧНЫХ НАВУК

УДК 54.057+547.917+544.77.051

А. Н. КРАСКОВСКИЙ, К. С. ГИЛЕВСКАЯ, В. И. КУЛИКОВСКАЯ, В. Е. АГАБЕКОВ

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ ПЕКТИНАТА КАЛЬЦИЯ

Институт химии новых материалов НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 10.06.2013)

Разработка новых форм доставки лекарств и других биологически активных веществ является важной и актуальной проблемой современной фармакологии. В настоящее время ведущие мировые фармацевтические компании, помимо создания новых лекарственных веществ, уделяют все большее внимание разработке способов получения новых и улучшения имеющихся лекарственных форм на основе известных соединений, для которых доказан терапевтический эффект. Это обусловлено низкой селективностью действия многих лекарств и, следовательно, высокой токсичностью препаратов для организма. Для решения этой проблемы действующее вещество может быть заключено в полимерную матрицу, в частности, в полисахаридные гидрогели, которые считаются хорошими потенциальными носителями различных лекарств, обеспечивающими постоянный и длительный терапевтический эффект [1, 2]. Они подвержены биодegradации и малотоксичны.

Одна из перспективных форм доставки лекарств – это полисахаридные микро- и наночастицы [3, 4]. Использование таких микро- и наноконтейнеров для капсулирования биологически активных веществ позволит получать лекарственные формы с улучшенной растворимостью в биологических жидкостях, контролируемым временем поступления в организм (быстродействующие препараты или пролонгированного действия), высокой стойкостью при хранении и т. д. Перспективным способом получения биополимерных наночастиц является ионотропное гелеобразование [5]. Данный метод основан на диффузии ионов-осадителей в растворы биополимеров. При этом сетка стабильного геля образуется за счет взаимодействия макромолекул полианиона с поливалентными ионами металлов, образующими координационные связи с гидроксильными группами и электростатически связанными с двумя карбоксильными группами одной молекулы биополимера, или за счет взаимодействия макромолекул поликатиона с двувалентными полианионами (триполифосфат, пирофосфат, сульфат). Данный метод прост в практической реализации, не требует сложного дорогостоящего оборудования и позволяет получать наночастицы в водных растворах без использования токсичных сшивающих агентов и органических растворителей.

В качестве структурного материала полимерных наночастиц можно использовать природный нетоксичный биодegradируемый и биосовместимый полисахарид пектин, который под действием ионов кальция образует стабильные гели [6]. Пектин также обладает биоадгезивными свойствами к тканям желудочно-кишечного тракта, следовательно, наночастицы на его основе могут быть использованы для целевой доставки лекарственных веществ в кишечник [7, 8]. Следует отметить, что в настоящее время пектин широко используется в пищевой промышленности в качестве стабилизатора для формирования и сохранения консистенции, текстур и формы пищевых продуктов (добавка E440).

Цель данной работы – синтез наночастиц пектината кальция и изучение возможности эффективного включения в них высокомолекулярных биологически активных веществ (на примере белка бычьего сывороточного альбумина).

Экспериментальная часть. В работе были использованы следующие реактивы и материалы: полиэтиленимин (ПЭИ, $M \sim 75000$, Sigma-Aldrich), пектин амидированный (степень этерификации

32%, степень амидирования 18%, Herbstreith&Fox), полиоксиэтиленсорбитан моноолеат (Твин 80), бычий сывороточный альбумин (БСА, $M \sim 64000$, $pI = 4,7-5,0$, Sigma-Aldrich), флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ, Sigma-Aldrich).

Синтез наночастиц пектината кальция. К 10 мл раствора $CaCl_2$ (10 мг/мл) при постоянном перемешивании на магнитной мешалке через капельную воронку в течение 20–30 мин добавляли 10 мл раствора амидированного пектина (1 мг/мл). Полученные наночастицы пектината кальция отделяли от маточного раствора центрифугированием и дважды промывали водой.

В процессе синтеза варьировали pH и ионную силу раствора полисахарида, наличие стабилизатора (Твин 80).

Получение бычьего сывороточного альбумина с флуоресцентной меткой (БСА-ФИТЦ). К 20 мл раствора БСА в карбонатном буфере (10 мг/мл) медленно по каплям при постоянном перемешивании на магнитной мешалке добавляли 1 мл раствора флуоресцеин изотиоцианата в диметилсульфоксиде (1 мг/мл). Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 2 ч. Очистку БСА-ФИТЦ от несвязанного красителя проводили с помощью гель-проникающей хроматографии на колонке Sephadex G-25, элюент – фосфатный буфер. Степень прививки составляла 1,1 мкг ФИТЦ/1 мг БСА.

Включение БСА-ФИТЦ в наночастицы. Включение БСА-ФИТЦ в наночастицы пектината кальция проводили *in situ* в процессе их синтеза по следующим схемам.

Схема 1. К 2,5 мл раствора БСА-ФИТЦ добавляли 5 мл раствора амидированного пектина (1 мг/мл). Затем эту смесь через капельную воронку в течение 20–30 мин добавляли к 2,5 мл $CaCl_2$ (20 мг/мл).

Схема 2. К 2,5 мл раствора БСА-ФИТЦ добавляли 5 мл раствора амидированного пектина (1 мг/мл). Затем к этой смеси через капельную воронку в течение 20–30 мин добавляли 2,5 мл $CaCl_2$ (20 мг/мл).

Схема 3. К 2,5 мл раствора БСА-ФИТЦ добавляли 2,5 мл $CaCl_2$ (20 мг/мл). Затем к этой смеси через капельную воронку в течение 20–30 мин добавляли 5 мл раствора амидированного пектина (1 мг/мл).

Полученные наночастицы пектината кальция, содержащие БСА-ФИТЦ, отделяли от маточного раствора центрифугированием при 4000 об/мин в течение 30 мин и дважды промывали дистиллированной водой. С целью определения условий максимальной эффективности включения белка варьировали концентрацию БСА-ФИТЦ, pH и ионную силу раствора пектина.

Эффективность включения (ЭВ) БСА-ФИТЦ в пектинатные наночастицы рассчитывали по формуле:

$$\text{ЭВ (\%)} = (1 - C_1/C_0) 100,$$

где C_0 и C_1 – концентрация БСА-ФИТЦ в супернатанте и исходном растворе соответственно.

Для определения концентрации БСА-ФИТЦ в супернатанте регистрировали интенсивность флуоресценции при длине волны 530 нм ($\lambda_{\text{ex}} = 495$ нм) на спектрофлуориметре Solar (РБ) и рассчитывали C_1 (БСА-ФИТЦ) по калибровочной кривой.

Морфологию наночастиц изучали методами атомно-силовой (АСМ) и просвечивающей электронной (ПЭМ) микроскопии. АСМ-изображения получали на сканирующем зондовом микроскопе MultiMode III (Veeco, США). Условия сканирования: скорость – 3–5 Гц; кантилевер из нитрида кремния с константой жесткости 0,12 Н/м. Плотность информации составляла 512×512 точек. Изображения обрабатывали используя программное обеспечение «Nanoscope 5.31r1». Для АСМ-исследований наночастицы пектината кальция адсорбировали из водного раствора в течение 15 мин на поверхность предварительно очищенной и гидрофилизированной кремниевой подложки с подслоем ПЭИ, затем ее многократно промывали дистиллированной водой и сушили на воздухе.

ПЭМ-изображения получали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-100 CX (Япония). Для этого наночастицы пектината кальция адсорбировали из водных растворов на подслое поливинилформала, нанесенного на медную сеточку, и сушили при комнатной температуре.

Результаты и их обсуждение. Наночастицы пектината кальция формировали методом ионотропного гелеобразования. В качестве сшивающего агента для пектина были выбраны катионы

Ca^{2+} , так как они являются биосовместимыми, нетоксичными и, согласно [3], обладают высокой желирующей способностью по отношению к таким полисахаридам, как альгинаты и пектины. Кроме того, катионы Ca^{2+} в отличие от Mg^{2+} и Mn^{2+} способствуют формированию более мелких частиц [3].

Для получения наночастиц методом ионотропного гелеобразования использовали пектин со степенью этерификации (СЭ) 32% и амидирования 18%. Это обусловлено особенностями гелеобразования различных типов пектинов. Так, высокоэтерифицированные пектины (СЭ > 50 %) образуют гель только в кислой среде и при высоком содержании сухих веществ (> 50 %), а низкоэтерифицированные (СЭ < 50 %) – в присутствии ионов кальция в широком диапазоне рН независимо от содержания сухих веществ [9]. Однако на процесс гелеобразования низкоэтерифицированного пектина очень сильное влияние оказывает концентрация ионов кальция [9]. Чтобы уменьшить чувствительность к ионам двухвалентных металлов, в молекулу полисахарида вводят амидные группы. При формировании геля амидированного пектина ионы кальция «связывают» карбоксильные группы двух смежных пектиновых цепочек. Дополнительная стабилизация геля осуществляется за счет водородных связей, а также гидрофобного взаимодействия между метокси-группами (рис. 1).

Ионная сила и рН реакционной смеси влияют на степень ионизации макромолекул полисахарида, а следовательно, на процесс гелеобразования и формирование наночастиц.

Снижение значения рН с 5,0 до 2,3 приводит к уменьшению среднего диаметра сформированных наночастиц пектината кальция в ~4 раза (рис. 2, а, б; табл. 1). Такое влияние рН может быть обусловлено изменением степени ионизации макромолекул низкометоксилированного пектина. В кислой среде подавляется диссоциация карбоксильных групп полисахарида, что приводит к уменьшению электростатического отталкивания между ними и способствует сближению пектиновых цепей и формированию трехмерной сетки пектинового геля, согласно «egg-box» модели (рис. 1). Дополнительная стабилизация геля происходит за счет водородных связей между недиссоциируемыми карбоксильными группами. В результате формируются наночастицы пектината кальция меньшего диаметра и более однородные по размерам.

Введение низкомолекулярного электролита (NaCl) в раствор пектина незначительно влияет на диаметр формируемых гелевых частиц (рис. 2, а, в; табл. 1): в этих условиях наблюдается его уменьшение на ~30 %. Наличие хлорида натрия в реакционной смеси приводит к экранированию зарядов макромолекул пектина, что обуславливает снижение отталкивания между ними и формирование более плотной сетки геля.

Синтез наночастиц пектината кальция в присутствии стабилизатора (1 мас.% Твин 80) приводит к уменьшению их среднего диаметра в ~2 раза (табл. 1). Следует отметить, что в присутствии Твин-80, как и в случае синтеза в кислой среде, наблюдается формирование более однородных по размерам наночастиц (рис. 2, а, г; табл. 1).

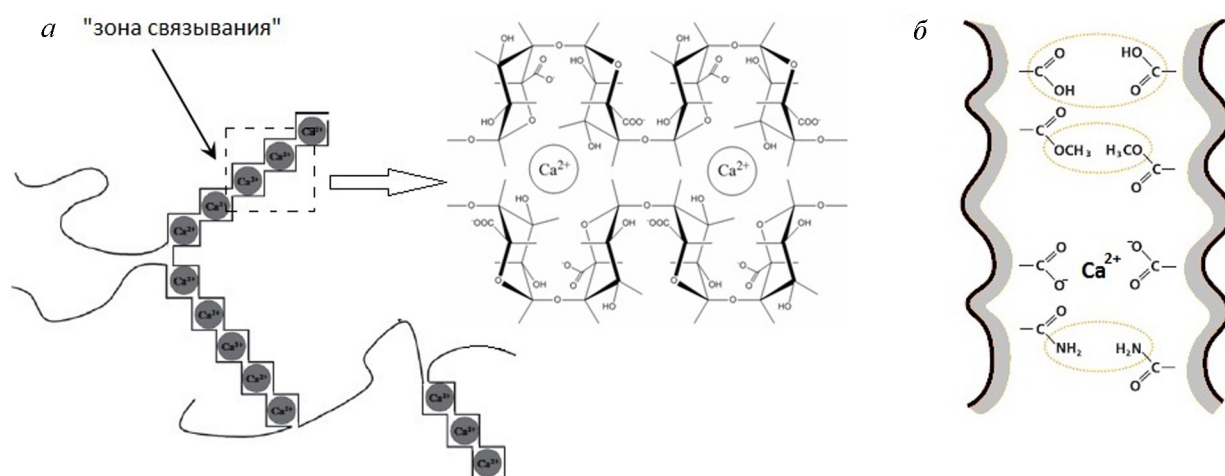


Рис. 1. Схематические изображения «egg box» модели формирования геля низкометоксилированного пектина (а) и связей (б), за счет которых он образуется

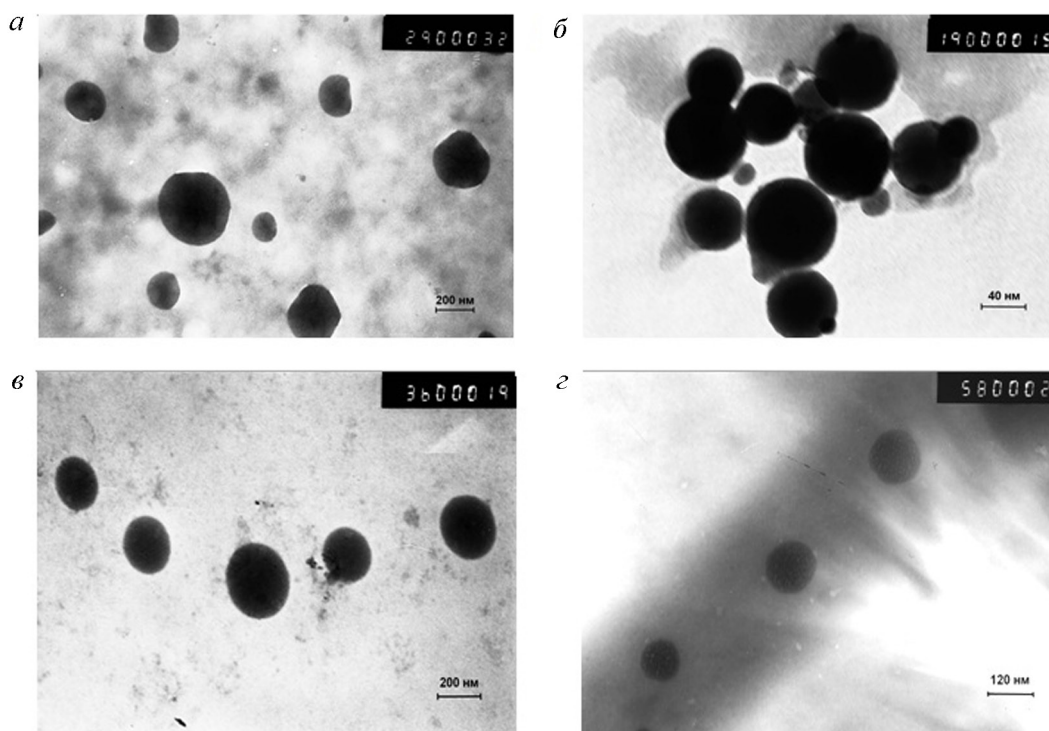


Рис. 2. ПЭМ-изображение наночастиц пектината кальция, синтезированных в водных средах при pH 5,0 (а) и 2,3 (б), в 0,1 М NaCl (в) и в присутствии Твин 80 (г)

Т а б л и ц а 1. Средний диаметр наночастиц пектината кальция (по данным ПЭМ-анализа)

Условия синтеза	Диаметр, нм
pH 5,0, H ₂ O	260±100
pH 2,3, H ₂ O	60±15
pH 5,0, 0,1 М NaCl	180±120
pH 5,0, 1 мас.% Твин 80	125±25

Синтезированные наночастицы пектината кальция имеют отрицательный заряд, так как они адсорбируются только на положительно заряженную поверхность (рис. 3). Для наночастиц в высушенном состоянии характерна плоская круглая форма: соотношение высота к диаметру составляет 1:3 (рис. 3).

Включение бычьего сывороточного альбумина, меченного флуоресцеином (БСА-ФИТЦ), в наночастицы пектината кальция проводили *in situ* в процессе их синтеза. При получении наночастиц пектината кальция в присутствии низкомолекулярного электролита (0,1 М NaCl) или при pH 2,3 все изученные схемы синтеза приводят к одинаковой эффективности включения белка (табл. 2). При pH 5,0 наиболее эффективное включение белка происходит при проведении синтеза по схеме 1, когда раствор пектина с БСА-ФИТЦ добавляют к сшивающему агенту (табл. 2). Так как при этом значении pH макромолекулы белка незаряжены ($pI = 4,7-5,0$), то в наночастицы включается только то его количество, которое «задержалось» в формируемой трехмерной сетке пектинового геля и, вероятно, более эффективно это происходит при добавлении раствора полисахарида, содержащего БСА-ФИТЦ, к CaCl₂.

Следует отметить, что для всех изученных схем синтеза максимальная эффективность включения БСА-ФИТЦ наблюдается в кислой среде. Так, например, при соотношении в реакционной смеси пектин:БСА-ФИТЦ = 1:1 эффективность включения белка при pH 2,3 в 2,5–6,2 раза выше, чем при pH 5,0 (табл. 2). Это может быть связано с зарядами макромолекул белка и полисахарида. В кислой среде БСА-ФИТЦ заряжен положительно и включение белка может происходить не только за счет механического внедрения его макромолекул в трехмерную сетку геля, но и за счет

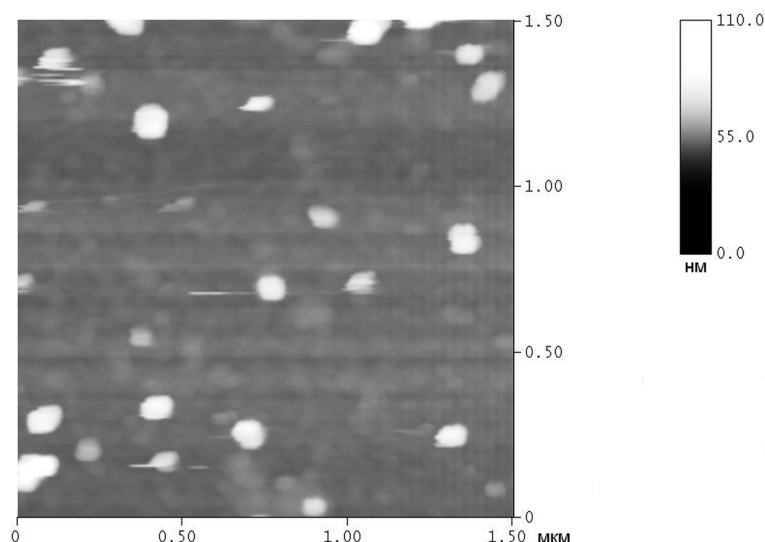


Рис. 3. АСМ-изображение наночастиц пектината кальция, адсорбированных на подслое полиэтиленimina

электростатического взаимодействия с карбоксильными группами пектина. Действительно, из разбавленных растворов включается не менее 99 % БСА-ФИТЦ. При увеличении концентрации белка в реакционной смеси происходит снижение эффективности его включения (табл. 2). Это обусловлено, по-видимому, достижением максимальной емкости наночастиц пектината кальция по белку. Так, максимальное количество БСА-ФИТЦ в синтезированных наночастицах достигает 0,54–0,58 мг/ 1 мг пектина уже при исходном массовом соотношении полисахарид:белок в реакционной смеси 1:1 и не изменяется при дальнейшем повышении концентрации белка (табл. 3).

Т а б л и ц а 2. Влияние условий синтеза на эффективность включения БСА-ФИТЦ в наночастицы пектината кальция

Концентрация в реакционной смеси, мг/мл			Эффективность включения белка, %								
			Схема 1			Схема 2			Схема 3		
			H ₂ O		0,1 M NaCl	H ₂ O		0,1 M NaCl	H ₂ O		0,1 M NaCl
CaCl ₂	Пектин	БСА-ФИТЦ	pH 5,0	pH 2,3	pH 5,0	pH 5,0	pH 2,3	pH 5,0	pH 5,0	pH 2,3	pH 5,0
5,0	0,5	1,0	22,6±0,5	27,4±0,5	22,3±1,0	10,6±0,7	27,8±0,6	20,5±0,03	11,2±3,3	29,0±1,1	22,2±0,02
5,0	0,5	0,5	21,9±3,0	53,7±2,0	19,0±0,8	8,8±0,1	54,0±1,1	19,1±0,2	12,3±0,1	57,5±0,9	21,1±0,03
5,0	0,5	0,1	< 1,0	99,5±0,1	< 1,0	< 1,0	99,6±0,1	< 1,0	2,7±1,2	99,3±0,2	< 1,0

Т а б л и ц а 3. Содержание БСА-ФИТЦ в пектинатных наночастицах

Концентрация в реакционной смеси, мг/мл			Количество БСА-ФИТЦ, мг белка/ 1 мг пектина								
			Схема 1			Схема 2			Схема 3		
			H ₂ O		0,1 M NaCl	H ₂ O		0,1 M NaCl	H ₂ O		0,1 M NaCl
CaCl ₂	Пектин	БСА-ФИТЦ	pH 5,0	pH 2,3	pH 5,0	pH 5,0	pH 2,3	pH 5,0	pH 5,0	pH 2,3	pH 5,0
5,0	0,5	1,0	0,44±0,02	0,56±0,01	0,40±0,02	0,22±0,02	0,56±0,01	0,36±0,01	0,24±0,06	0,58±0,02	0,40±0,01
5,0	0,5	0,5	0,24±0,04	0,54±0,02	0,18±0,01	0,12±0,01	0,54±0,01	0,18±0,01	0,16±0,01	0,56±0,01	0,20±0,01
5,0	0,5	0,1	–	0,18±0,01	–	–	0,18±0,01	–	< 0,01	0,18±0,10	–

Включение БСА-ФИТЦ при pH 5,0 происходит значительно менее эффективно, чем при pH 2,3 (табл. 2). В этих условиях включение белка может происходить только за счет его внедрения в трехмерную сетку из переплетенных полимерных цепей, образующих гель. Дополнительный вклад в удерживание соединения в наночастицах могут вносить водородные и гидрофобные связи между макромолекулами БСА-ФИТЦ и полимерными цепями пектина. Так, изменение соотношения белок:пектин в реакционной смеси от 1:1 до 2:1 практически не влияет на эффективность

включения, а при соотношении 1:5 синтезируемые наночастицы не содержат БСА-ФИТЦ (табл. 2). Максимальное количество белка в наночастицах, которое было достигнуто при pH 5,0, составило 0,44 мг БСА-ФИТЦ/1 мг пектина (эффективность включения 20,6 %).

Необходимо отметить, что лиофилизированный порошок наночастиц, содержащих 0,44 мг БСА-ФИТЦ/1 мг пектина, после предварительного набухания его в дистиллированной воде в течение 10 сут под действием ультразвука (2 ч, 35 кГц) снова образует устойчивый коллоид.

Заключение. Таким образом, методом ионотропного гелеобразования амидированного низкометоксилированного пектина под действием катионов Ca^{2+} синтезированы наночастицы со средним диаметром от 60 до 260 нм. Уменьшение pH и введение стабилизатора в реакционную смесь приводит к снижению среднего диаметра и полидисперсности синтезируемых наночастиц. Эффективность включения бычьего сывороточного альбумина из его разбавленных растворов в наночастицы пектината кальция составляет > 99 %.

Литература

1. Morris G. A., K k M. S., Harding S. E., Adam G. G. // *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2010. Vol. 27. P. 257.
2. Lin C. C., Metters A. T. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006. Vol. 58. P. 1379.
3. Racovita S., Vaciliu S., Popa M., Luca C. // *Revue Roumaine de Chimie*. 2009. Vol. 54, N 9. P. 709.
4. Liu Z., Jiao Ya., Wang Yi., Zhou Ch., Zhang Z. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008. Vol. 60. P. 1650.
5. Vauthier Ch., Bouchemal K. // *Pharmaceutical Research*. 2009. Vol. 26, N 5. P. 1025.
6. Farrisa S., Schaich K. M., Liu L., Piergiovanni L., Yam K. L. // *Trends in Food Science and Technology*. 2009. Vol. 20. P. 316.
7. Sriamornsak P., Thirawong N., Nunthanid J., Puttipipatkachorn S. // *Proceeding of the 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*. 2006. Vol. 5. P. 93.
8. Schmidgall J., Hensel A. // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2002. Vol. 30. P. 217.
9. The Specialists for Pectin / Herbstreith&Fox Group. Neuenb rg. 39 p.

A. N. KRASKOUSKI, K. S. HILEUSKAYA, V. I. KULIKOUSKAYA, V. E. AGABEKOV

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF CALCIUM PECTINATE NANOPARTICLES

Summary

A method for synthesis of calcium pectinate nanoparticles with average diameter of 60–260 nm has been developed. It has been established that the size of calcium pectinate nanoparticles can be regulated by changing pH, ionic strength of solution and addition of stabilizer. The calcium pectinate nanoparticles loaded with BSA-FITC (up to 0,58 mg/1 mg of pectin) have been formed.