

УДК 547.458.88

DOI: 10.31040/2222-8349-2020-0-1-61-66

**ПОЛУЧЕНИЕ И РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГИДРОГЕЛЕЙ
НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ПЕКТИНА****© Р.Р. Вильданова, Акиене Ндзанга Вивьен Фарец,
С.П. Иванов, А.В. Султанбаев, Н.Н. Сигаева**

Смешением при комнатной температуре водных растворов хитозана, используемого в качестве поликатиона и пектина, выполняющего роль полианиона, а также их модифицированных производных (хитозана – сукцинат, пектина – диальдегид), получены гидрогели. Время гелеобразования гидрогелей колеблется от нескольких секунд до получаса и более в зависимости от условий образования и молекулярных характеристик используемых полимеров. Показано, что получение гидрогелей обусловлено формированием интерполиэлектrolитного комплекса за счет взаимодействия аммонийных групп хитозана и карбоксилатных групп пектина, а также ковалентных связей между функциональными группами их модифицированных производных. Подобраны условия получения гидрогеля во всем объеме раствора без отделения дисперсионной среды. При смешении растворов варьировались их исходные концентрации, мольные соотношения, pH-дисперсионной среды и молекулярные массы используемых хитозана и пектина. В зависимости от молекулярных масс полимеров гидрогель образуется либо при (2–4)-кратном избытке пектина, либо 8-кратном избытке хитозана. Исследованием реологических свойств найдены зависимости вязкости растворов исходных полимеров и гидрогелей от величины напряжения сдвига при различных температурах и условий их получения. Реологические кривые имеют вид кривых течения неньютоновских жидкостей. На кривых течения выявлено наличие пределов текучести, значения которых у гидрогелей, образованных сливанием растворов модифицированных полимеров в несколько раз больше, чем у гелей, полученных за счет формирования интерполиэлектrolитного комплекса. Методом ВЭЖХ исследована диффузия из геля цитостатика – цисплатина, лекарственного препарата, применяемого в онкологии. Показано его пролонгированное высвобождение из разработанной полимерной матрицы в физиологический раствор и дистиллированную воду. Это делает возможным увеличение предельно допустимой дозы цитостатика и успешное применения гидрогелей на основе хитозана и пектина в качестве лекарственной формы для мягкого и эффективного действия лечебного средства.

Ключевые слова: биополимеры, гидрогель, пектин, реология, цисплатин, хитозан.

Введение. Разработка биоразлагаемого гидрогелевого материала с использованием биосовместимого сырья является актуальной задачей в современной медицине и смежных областях. Использование гидрогелей дает возможность контролируемой доставки лекарственного препарата непосредственно в орган-мишень и снижения его токсичности за счет постепенного высвобождения из гидрогеля [1–11]. Преимуществами гидрогелей на основе

биополимеров является их собственная биологическая активность, биосовместимость и биоразлагаемость.

Известно [12], что согласно механизму гелеобразования гидрогели делятся на два класса: физические и химические. Оба типа гелей имеют свои преимущества и недостатки. Полученные путем образования химических связей полимерных цепей гидрогели обладают достаточно высокой механической прочностью

ВИЛЬДАНОВА Регина Рафаиловна – к.х.н., Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,
e-mail: gip@anrb.ru

АКИЕНЕ НДЗАНГА Вивьен Фарец, Уфимский Институт химии УФИЦ РАН, e-mail: vakiene@mail.ru

ИВАНОВ Сергей Петрович – к.х.н., Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,
e-mail: ivanov_sp@anrb.ru

СУЛТАНБАЕВ Александр Валерьевич, ГАУЗ Республиканский клинический онкологический диспансер, e-mail: sova@rambler.ru

СИГАЕВА Наталия Николаевна – д.х.н., Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,
e-mail: gip@anrb.ru

и упругостью. Однако в тех случаях, когда проявление высокой механической прочности не требуется, например, при наружном применении, можно получать их только за счет формирования интерполиэлектролитного комплекса (ИПЭК), который представляет собой продукт взаимодействия противоположно заряженных полиэлектролитов. При определенных условиях такие комплексы способны формировать гидрогели.

В большинстве случаев для получения химически сшитых гидрогелей проводится предварительная модификация полимеров введением функциональных групп, способных участвовать в реакциях сшивания, либо для закрепления лекарственного препарата на полимерной матрице с помощью ковалентных или ионных связей. При этом в некоторых случаях используются достаточно токсичные кросс-линкеры, что недопустимо для гидрогелей медицинского назначения. Поэтому методы получения гидрогелей без использования кросс-линкеров, за счет образования поперечных связей между комплементарными функциональными группами полимеров наиболее перспективны.

Наиболее простым способом получения гидрогелей за счет формирования ИПЭК является смешение растворов двух полимеров, содержащих функциональные группы, способные взаимодействовать между собой, например, аммонийные у поликатиона и карбоксилатные у полианиона. В связи с этим целью данной работы было определение условий получения на основе ИПЭК гидрогелей хитозана в качестве поликатиона и пектина, выполняющего роль полианиона и химически сшитых гидрогелей на основе модифицированных хитозана (сукцинат) и пектина (диальдегид). А также выявление влияния ряда факторов на свойства полученных гидрогелей с целью оценки возможности их дальнейшего использования в качестве пролонгаторов действия лекарственных препаратов.

Экспериментальная часть. В экспериментах использовали хлорид хитозана (ХТЗ) и сукцинат хитозана (СХТЗ) «Биопрогресс» ($M_n=30 \times 10^3$; 50×10^3 ; $M_z=120 \times 10^3$), цитрусовый пектин (ЦП, $M_z=70 \times 10^3$) «Herbstreirh&FoxKG» и яблочный пектин (ЯП, $M_z=26 \times 10^3$) «UnipectineXPP 240», цитостатики: препарат цисплатин Pt(NH)₂Cl₂ – раствор 1 мг/мл в физиологической жидкости (Филиал Научпроф ФГБУ “РОНЦ им. Н.Н. Блохина” Минздрава

России, Москва). M_z – это молекулярная масса, полученная методом седиментационного равновесия (среднеседиментационная молекулярная масса), а M_n – это молекулярная масса, полученная методом вискозиметрии (средневязкостная молекулярная масса).

Готовили растворы хитозана, пектина и их модифицированных производных в воде, физиологическом растворе, фосфатном буфере (рН=7.4) различных концентраций, моль/звеньев/л (далее моль/л): пектин от 2.75×10^{-3} до 4.4×10^{-1} , хитозан 5.5×10^{-3} до 4.4×10^{-1} . Смешивали растворы хитозана и пектина (П) в различных соотношениях при комнатной температуре. За образованием гидрогеля наблюдали по потере текучести системы визуально. Гели с цисплатином получали сливанием растворов полимеров в 1% растворе цисплатина в физиологической жидкости. Модификацию пектина осуществляли окислением периодатом натрия, в ходе которого часть вицинальных гидроксильных групп макромолекул переходит в альдегидные [13, 14]. Степень модификации ЯП рассчитывали сравнением интегральных интенсивностей сигналов протонов метильной группы ацетамидного фрагмента и суммы сигналов протонов гидратированной формы альдегида, используя спектры ЯМР ¹H. Модификацию хитозана ($M_z=150 \times 10^3$) проводили янтарным ангидридом [13, 14]. Степень модификации (СМ, %) сукцината хитозана оценивали с помощью нингидринного анализа и кислотно-основного титрования. Количественный анализ диффузии цисплатина проводился на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 со спектрофотометрическим диодно-матричным детектором. Использовали колонку с фазой Pursuit XRs C18 250×4.6 мм, 5 мкм, а в качестве подвижной фазы – элюент состава ацетонитрил: вода = 20:80 (объемн. %). Скорость потока составляла 1 мл/мин. Детектирование проводилось при длине волны 215 нм. Анализы выполнены на оборудовании РЦКП «Агидель» УФИЦ РАН.

Результаты и их обсуждение. При смешении растворов различных концентраций и соотношений ХТЗ и цитрусового ($M_z=70 \times 10^3$) или яблочного пектина в нейтральной среде, воде или фосфатном буфере формируется ИПЭК. Структура ИПЭК подтверждена данными ИК-спектроскопии. В спектре комплекса наблюдаются изменения в области 1550–1800 см⁻¹, которые обусловлены взаимодействием

вием аммонийных групп хитозана и карбоксилатных групп пектина. При использовании ЦП в диапазоне концентраций обоих полиэлектролитов от 5.5×10^{-2} до 11.0×10^{-2} моль/л образуется гидрогель во всем объеме системы. При этом необходим (2–4)-кратный избыток пектина. Замена ЦП на яблочный ($M_z=26 \times 10^3$) приводит к тому, что формирование гидрогеля имеет место только при использовании раствора хитозана концентрации 4.40×10^{-1} моль/л. Видимо, это обусловлено небольшой ММ яблочного пектина ($M_z=26 \times 10^3$) по сравнению с цитрусовым ($M_z=70 \times 10^3$). При этом гидрогель образуется во всем объеме системы только при добавлении раствора пектина к раствору хитозана, взятого в 8-кратном избытке. При увеличении содержания хитозана плотность сетки увеличивается, наблюдается постепенный синерезис дисперсионной среды и выпадение осадка ИПЭК.

Аминогруппы цисплатина способны взаимодействовать с карбоксильными группами пектина. Как следует из данных работы [15], при этом образуется комплекс состава 1:5. Проведенные УФ-исследования показали, что использованные в данной работе образцы полимеров формируют комплекс состава 1:4, т.е. на четыре звена макромолекулы пектина приходится 1 молекула цисплатина. Таким образом, введение цисплатина влияет на условия формирования гидрогеля – наименьшее время гелеобразования – 0.5 ч соответствовало гидрогелям, полученным смешением раствора ЦП 55×10^{-3} моль/л и раствора хитозана концентрации 4.40×10^{-1} моль/л.

При смешении избытка раствора сукцината хитозана и раствора окисленного пектина образуется гидрогель. Формирование гидрогеля обусловлено, с одной стороны, образованием ковалентных азометиновых связей $-C=N-$, с другой – взаимодействиями карбоксильных групп пектина и непромодифицированных аминогрупп сукцината хитозана [13].

Наличие пространственной сетки в полученных системах оказывает влияние на проявляемые структурно-механические свойства. Поскольку именно эти свойства определяют возможность практического использования в тех или иных целях гидрогелей, было проведено их исследование.

На рис. 1 и 2 приведены изменения вязкости растворов исходных полимеров при изменении скорости сдвига. Видно, что при

увеличении градиента скорости в результате разрушения структуры растворов полимеров их вязкости снижаются. Область наибольшей ньютоновской вязкости отсутствует, что имеет место для неразбавленных растворов жесткоцепных полимеров.

Значения эффективных вязкостей раствора цитрусового пектина больше, по сравнению с яблочным, ввиду его большей молекулярной массы (ММ). При достижении скорости сдвига $1-10 \text{ с}^{-1}$, вязкость растворов полимеров уменьшается до предельного значения и остается постоянной, что соответствует значению наименьшей ньютоновской вязкости.

Таким образом, растворы данных образцов полиэлектролитов, хитозана и пектина, относятся к неньютоновским жидкостям.

Смешение растворов хитозана и пектина приводит к существенному увеличению вязкости системы (рис. 3). При малых скоростях сдвига видно, что вязкость гидрогеля на основе ЦП примерно в 4 раза больше по сравнению с гидрогелями на основе ЯП. При увеличении температуры от 20 до 40°C (кривые 2 и 3) имеет место уменьшение значения вязкости. Для гидрогелей на кривых течения появляется предел текучести. У гелей на основе ЯП – 4 Па, на основе ЦП – 12 Па. Таким образом, на основании исследования реологических свойств гидрогелей показано, что их течение подчиняется закону Бингама, т.е. данные системы являются пластическими.

При разработке лекарственной формы в виде геля, важным показателем является скорость высвобождения лекарственного препарата из геля, что можно смоделировать диффузией в воду. Полученные результаты диффузии цисплатина из геля во времени приведены на рис. 4. Видно, что основная масса препарата (до 50%) высвобождается из геля в течение 4–5 часов. Выделение остального цисплатина далее протекает медленно. Это делает возможным увеличение предельно допустимой дозы цитостатика и успешное применения гидрогелей на основе хитозана и пектина в качестве лекарственной формы для мягкого и эффективного действия лечебного средства.

Работа выполнена по программе ФНИ государственных академий на 2019–2021 гг. (госзадание № АААА-А20-120012090024-5 и № АААА-А20-120012090029-0).

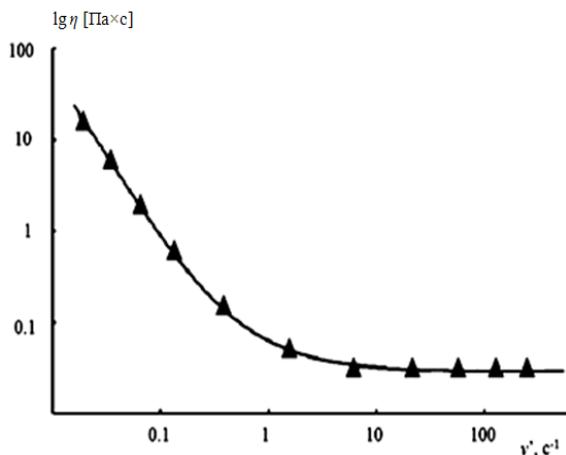


Рис. 1. Зависимость вязкости от скорости сдвига раствора хитозана в фосфатном буфере (рН = 7.4), $C_{ХТЗ}=8\%$, $T=20^\circ\text{C}$

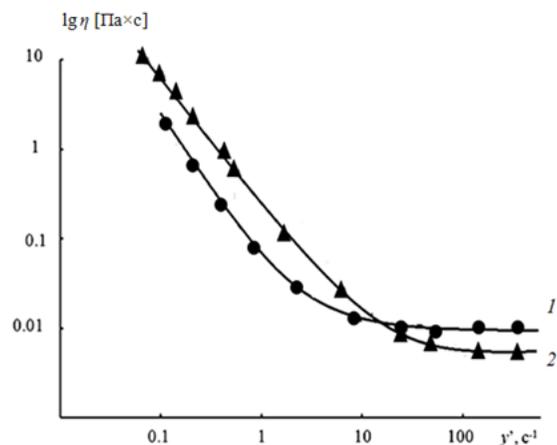


Рис. 2. Зависимость вязкости от скорости сдвига раствора пектина в фосфатном буфере (рН=7.4), $C_П=2\%$, $T=20^\circ\text{C}$: 1 – яблочный пектин ($M_z=26\times 10^3$); 2 – цитрусовый пектин ($M_z=70\times 10^3$)

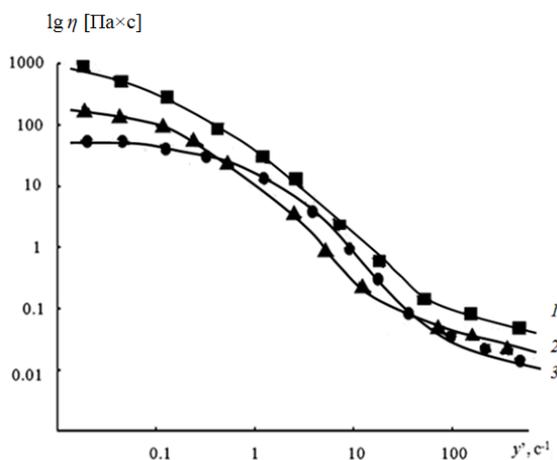


Рис. 3. Зависимость вязкости от скорости сдвига гидрогелей, полученных смешением растворов хитозана и пектина ($C_{ХТЗ}=8\%$, $C_{ЦП}=2\%$, моль ХТЗ:моль ЦП = 1:1) в фосфатном буфере (рН=7.4): 1 – цитрусовый пектин, $T=20^\circ\text{C}$; 2 – яблочный пектин, $T=20^\circ\text{C}$; 3 – яблочный пектин, $T=40^\circ\text{C}$

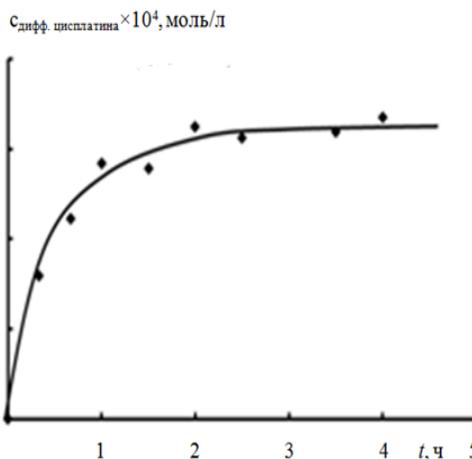


Рис. 4. Зависимость концентрации цисплатина, выделившегося из гидрогеля, полученного из 0.2 мл ХТЗ (4.40×10^{-1} моль/л) и 0.8 мл ЦП (0.55×10^{-1} моль/л), от времени

Литература

1. Patenaude M., Hoare T. Injectable, mixed natural-synthetic polymer hydrogels with modular properties // *Biomacromolecules*. 2012. V. 13, № 2. P. 369–378.
2. Tan H., Marra K.G. Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications // *Materials*. 2010. V. 3, № 3. P. 1746–1767.
3. Krayukhina M.A., Samoylova N.A., Yamskov I.A. Polyelectrolyte complexes of chitosan: Formation, properties and applications // *Russian Chemical Reviews*. 2008. V. 77, № 9. P. 799–813.

4. Кильдеева Н.Р., Михайлов С.Н. Гидрогели хитозана, модифицированного сшивающими реагентами // *Хитозан: сб. ст. М.*, 2013. С. 271–306.
5. Peppas N.A, Bures P., Leobandung W., Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000. V. 50, № 1. P. 27–46.
6. da Costa M.P.M., de Mello Ferreira I.L., de Macedo Cruz M.T. New polyelectrolyte complex from pectin/chitosan and montmorillonite clay // *Carbohydrate polymers*. 2016. V. 146. P. 123–130.
7. Giacomazza D., Sabatino M. A., Catena A., Leone M., San Biagio P.L., Dispenza C. Maltose-conjugated chitosans induce macroscopic gelation of

pectin solutions at neutral pH // Carbohydrate polymers. 2014. V. 114. P. 141–148.

8. Panova T.V., Bykova E.V., Rogacheva V.B., Zezin A.B., Kabanov V.A., Joosten J., Brackman J. Interaction of poly(propylenimine) dendrimers with polyanionic hydrogels // Polymer Science. A. 2004. V. 46, № 5. P. 471–484.

9. Baranovsky V.Yu., Ganey V., Barashkova I.I., Yasina L.L., Wasserman A.M. Molecular mobility in micellar complexes of a nonionic surfactant and the poly(acrylic acid)-based hydrogel // Colloid J. 2011. V. 73, № 1. P. 6–11.

10. Novoskoltseva O.A., Chernikova E.V., Rogacheva V.B., Zezin A.B. Competitive interactions in hydrogel-interpolyelectrolyte complex systems // Polymer Science. B. 2015. V. 57, № 2. P. 132–139.

11. Anurova M.N., Bakhrushina E.O., Demina N.B. Review of contemporary gel-forming agents in the technology of dosage forms // Pharmaceutical Chemistry J. 2015. V. 49, № 9. P. 627–634.

12. Татер А.А. Физико-химия полимеров. М., 2007. С. 573.

13. Vildanova R.R., Sigaeva N.N., Kukovinets O.S., Volodina V.P., Spirikhin L.V., Zaidullin I.S., Kolesov S.V. Modification of hyaluronic acid and chitosan aimed at developing hydrogels for ophthalmology // Russian J. of Applied Chemistry. 2014. V. 87, № 10. P. 1547–1557.

14. Бикбов М.М., Хуснитдинов И.И., Зайдуллин И.С., Вильданова Р.Р., Сигаева Н.Н. Доставка митомицина с и пролонгирование его действия при использовании новейших гидрогелей на основе гиалуроновой кислоты и сукцината хитозана в антиглаукомных операциях // Молекулярная медицина. 2017. Т. 15, № 1. С. 28–32.

15. Verma A.R., Sachin K. Novel hydrophilic drug polymer nano-conjugates of cisplatin showing long blood retention profile – its release kinetics, cellular uptake and bio-distribution // Current Drug Delivery. 2008. V. 5, № 2. P. 120–126.

References

1. Patenaude M., Hoare T. Injectable, mixed natural-synthetic polymer hydrogels with modular properties. Biomacromolecules, 2012, vol. 13, no. 2, pp. 369–378.

2. Tan H., Marra K.G. Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. Materials, 2010, vol. 3, no. 3, pp. 1746–1767.

3. Krayukhina M.A., Samoylova N.A., Yamskov I.A. Polyelectrolyte complexes of chitosan: Formation, properties and applications. Russian Chemical Reviews, 2008, vol. 77, no. 9, pp. 799–813.

4. Kildeeva N.R., Mikhaylov S.N. Chitosan hydrogels modified by binding reagents. Collected papers. K.G. Skryabin S.N. Mukhaylov, V.P. Varlamov. Moscow, Bioinzheneriya, 2013, pp. 271–306.

5. Peppas N.A., Bures P., Leobandung W., Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2000, vol. 50, no. 1, pp. 27–46.

6. da Costa M.P.M., de Mello Ferreira I.L., de Macedo Cruz M.T. New polyelectrolyte complex from pectin/chitosan and montmorillonite clay. Carbohydrate polymers, 2016, vol. 146, pp. 123–130.

7. Giacomazza D., Sabatino M. A., Catena A., Leone M., San Biagio P. L., Dispenza C. Maltose-conjugated chitosans induce macroscopic gelation of pectin solutions at neutral pH. Carbohydrate polymers, 2014, vol. 114, pp. 141–148.

8. Panova T. V., Bykova E. V., Rogacheva V. B., Zezin A. B., Kabanov V. A., Joosten J., Brackman J. Interaction of poly(propylenimine) dendrimers with polyanionic hydrogels // Polymer Science, A, 2004, vol. 46, no. 5, pp. 471–484.

9. Baranovsky V.Yu., Ganey V., Barashkova I.I., Yasina L.L., Wasserman A.M. Molecular mobility in micellar complexes of a nonionic surfactant and the poly(acrylic acid)-based hydrogel. Colloid Journal, 2011, vol. 73, no. 1, pp. 6–11.

10. Novoskoltseva O.A., Chernikova E.V., Rogacheva V.B., Zezin A.B. Competitive interactions in hydrogel-interpolyelectrolyte complex systems. Polymer Science, B, 2015, vol. 57, no. 2, pp. 132–139.

11. Anurova M.N., Bakhrushina E.O., Demina N.B. Review of contemporary gel-forming agents in the technology of dosage forms. Pharmaceutical Chemistry Journal. 2015, vol. 49, no. 9, pp. 627–634.

12. Tager A.A. Physical chemistry of polymers. A.A. Askadsky (ed.). Fourth edition. Moscow, Nausny mir, 2007. 573 p.

13. Vildanova R.R., Sigaeva N.N., Kukovinets O.S., Volodina V.P., Spirikhin L.V., Zaidullin I.S., Kolesov S.V. Modification of hyaluronic acid and chitosan aimed at developing hydrogels for ophthalmology. Russian Journal of Applied Chemistry, 2014, vol. 87, no. 10, pp. 1547–1557.

14. Бикбов М.М., Хуснитдинов И.И., Зайдуллин И.С., Вильданова Р.Р., Сигаева Н.Н. Mitomycin delivery and prolongation of its action using advanced hydrogels based on hyaluronic acid and chitosan succinate in glaucoma surgery. Molekulyarnaya meditsina, 2017, vol. 15, no. 1, pp. 28–32.

15. Verma A.R., Sachin K. Novel hydrophilic drug polymer nano-conjugates of cisplatin showing long blood retention profile – its release kinetics, cellular uptake and bio-distribution. Current Drug Delivery, 2008, vol. 5, no. 2, pp. 120–126.



FORMATION AND RHEOLOGICAL PROPERTIES OF HYDROGELS BASED ON CHITOSAN AND PECTIN

© R.R. Vil'danova¹, Akiene Ndzanga Vivien Faretz¹,
S.P. Ivanov¹, A.V. Sultanbaev², N.N. Sigaeva¹

¹Ufa Institute of Chemistry – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,
69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

²City Ufa Republican Clinical Oncology Center,
73/1, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

By mixing at room temperature aqueous solutions of chitosan, used as a polycation and pectin, which acts as a polyanion, as well as their modified derivatives (chitosan – succinate, pectin – dialdehyde), hydrogels are obtained. The gelation time of hydrogels varies from several seconds to half an hour or more, depending on the formation conditions and molecular characteristics of the polymers used. It was shown that the preparation of hydrogels is due to the formation of an interpolyelectrolyte complex due to the interaction of ammonium groups of chitosan and pectin carboxylate groups, as well as covalent bonds between the functional groups of their modified derivatives. The conditions for obtaining a hydrogel in the entire volume of the solution without separation of the dispersion medium are selected. When the solutions were mixed, their initial concentrations, molar ratios, pH dispersion medium, and molecular weights of the chitosan and pectin used were varied. Depending on the molecular weights of the polymers, a hydrogel is formed either at (2 – 4) – a multiple excess of pectin, or an 8-fold excess of chitosan. By studying the rheological properties, the dependences of the viscosity of the solutions of the starting polymers and hydrogels on the shear stress at various temperatures and the conditions for their preparation were found. Rheological curves are in the form of flow curves of non-Newtonian fluids. The flow curves revealed the presence of yield strengths, the values of which for hydrogels formed by merging solutions of modified polymers are several times greater than for gels obtained by the formation of an interpolyelectrolyte complex. The HPLC method was used to study the diffusion of a cytostatic gel – cisplatin, a drug used in oncology. Its prolonged release from the developed polymer matrix to physiological saline and distilled water is shown. This makes it possible to increase the maximum permissible dose of cytostatic and the successful use of hydrogels based on chitosan and pectin as a dosage form for the mild and effective action of a therapeutic agent.

Key words: chitosan, cisplatin, biopolymers, hydrogel, pectin, rheology.