

УДК 544.77

DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2021.3.17

ДЕГРАДАЦИЯ И НАБУХАНИЕ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ПЕКТИНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

© Р. Р. Вильданова*, С. В. Колесов

Уфимский институт химии УФИЦ РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 69.

Тел.: +7 (347) 235 62 65.

*Email: regina777@list.ru

Получены физически сшитые гидрогели смешением водных солевых растворов хитозана и пектина и высушенные сорбенты на их основе. Гелеобразование протекает за счет формирования полиэлектролитного комплекса с участием водородных связей между макромолекулами хитозана и пектина в течение нескольких минут. Исследованы деградация и набухание полученных образцов в различных условиях (природа среды, температура). Показана биодegradация физически сшитого гидрогеля хитозан-пектин под действием фермента гиалуронидазы (концентрации 64 УЕ/мл). Пленки на основе хитозан-пектинового гидрогеля, содержащие низкомолекулярные соли, характеризуются ограниченным набуханием.

Ключевые слова: хитозан, пектин, гидрогель, сорбент, полиэлектролитный комплекс, набухание, деградация, гиалуронидаза.

Введение

Биополимерные гидрогели являются перспективным материалом для применения в медицине при заживлении ран или доставке лекарственных препаратов, тканевой инженерии, а также для производства сорбентов различного назначения. Современные синтетические полимеры, используемые в производстве гидрогелей, функционируют как пассивная матрица, в то время как биоактивные полисахариды, такие как хитозан (ХТЗ) и пектин (П), способны передать гидрогелям свои свойства: антимикробную активность, мукоадгезию, усиление проницаемости, подавление роста опухолей и т.д. [1–6].

При смешении водных растворов хитозана и пектина образуется полиэлектролитный комплекс (ПЭК) в основном за счет электростатического притяжения между ионизированными сайтами аммонийных групп хитозана и карбоксилатных групп пектина в соответствующих условиях. В работе [2] авторы отмечают, что хитозан может действовать как эффективный сшивающий агент пектина при $pH = 5.6$. При этом поведение гелеобразования зависит от степени этерификации пектина. Birch и др. [3] показали, что гидрогели хитозан-пектин могут быть получены в биологически приемлемых условиях ($pH = 7.4$). Показано, что хитозан-пектиновые губки совместимы со стволовыми клетками костного мозга человека. Ventura и Bianco-Peled исследовали термочувствительные гидрогели на основе пектина и хитозана при их соотношении 3:1 [4]. В работе [5] получали термообратимые хитозан-пектиновые гидрогели при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ в 0.1 М соляной кислоте для доставки ряда лекарственных препаратов. Термочувствительные гидрогели на основе наночастиц хитозан-пектина и золота исследованы в работе [6], которые показали хороший потенциал для ускорения пролиферации и роста костных клеток.

В то же время в перечисленных работах недостаточно внимания уделяется влияющим на транс-

порт лекарственных препаратов свойствам гидрогелей, таким как деградация и набухание. Понимание механизмов процессов набухания и деградации позволит оценить поведение гидрогелей в живом организме под действием солей и ферментов и найти рычаги управления желаемыми характеристиками при заданных условиях. Гиалуронидаза является специфическим ферментом, расщепляющим гиалуроновую кислоту. В то же время в работах [7–10] показано, что этот фермент успешно гидролизует хитозан в кислых растворах, на поверхности пленок, уменьшает размер частиц ПЭК. При этом в ряде работ отмечается ингибирующее действие пектина на гиалуронидазу [11–12]. В связи с этим целью данной работы являлось исследование деградации и набухания физически сшитых гидрогелей на основе хитозана и пектина в присутствии солей и фермента гиалуронидазы.

Экспериментальная часть

В экспериментах использовали гидрохлорид хитозана марки «Биопрогресс» (Россия) с $MM = 30 \times 10^3$, цитрусовый пектин высокометоксилированный марки «Herbstreith&Fox KG» (Германия) с $MM 70 \times 10^3$, физиологический раствор, изотонический фосфатный буферный раствор ($pH = 7.4$). В качестве ферментного препарата использовали гиалуронидазу в виде фармакопейного препарата «Лидаза» производства «НПО Микроген» (Россия).

Электронные спектры поглощения водных растворов соединений снимали в кварцевых кюветках толщиной 1 см на спектрофотометре «Shimadzu UV-3100» (Япония) в области 210–700 нм. Кислотность растворов определяли с помощью pH-метра «Анион 4 100».

Водные растворы гидрохлорида хитозана или пектина концентраций 0.1–8% (10^{-3} – 10^{-1} моль/л) готовили путем растворения соответствующей

навески в дистиллированной воде, физиологическом растворе или фосфатном буфере на магнитной мешалке в течение 5–10 ч. Гелеобразование в системах раствор – хитозан – пектин изучали при разном соотношении хитозана и пектина и их концентраций при температуре 20–40 °С. За точку гелеобразования в системе принимали время, при котором раствор смеси полимеров переставал течь под действием собственной массы при «переворачивании колбы». Для получения пленки гидрогель хитозан – пектин помещали на чашку Петри с последующим выдерживанием при комнатной температуре для испарения растворителя до постоянной массы образца.

Количество образовавшейся гель-фракции G (%) рассчитывали по формуле (1):

$$G = \frac{m}{m_0} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где m – масса гидрогеля, m_0 – масса раствора смеси полимеров.

Изучение деградации гидрогеля проводили путем помещения взвешенного образца в колбу с дисперсионной средой заданного объема в термостате при температурах 20–40 °С. Потерю массы гидрогеля Q (%) рассчитывали по формуле (2):

$$Q = \frac{W_t}{W_0} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где W_0 – масса гидрогеля до начала эксперимента, W_t – масса гидрогеля в момент времени t .

Для определения степени набухания пленок и гидрогелей использовали гравиметрический метод. Степень набухания α рассчитывали по формуле (3):

$$\alpha = \frac{m - m_0}{m_0}, \quad (3)$$

где m_0 – навеска высушенной пленки до набухания, m – навеска пленки или гидрогеля после набухания. По полученным данным строили график зависимости степени набухания от времени $\alpha = f(t)$.

Относительная погрешность экспериментов рассчитывалась на основании данных, в которых каждая точка представляет собой среднее значение из трех параллельных опытов. Погрешность эксперимента не превышала 5–7%.

Анализ (измерения и расчеты) выполнялись на оборудовании ЦКП «Химия» УФИХ УФИЦ РАН.

Результаты и их обсуждение

Ранее были получены гидрогели смешением растворов хитозана и пектина, приготовленных в дистиллированной воде или фосфатном буфере (рН = 7.4) [13–15]. Однако поскольку существуют лекарственные препараты, разведенные в физиологическом растворе (растворе хлорида натрия концентрации 0.9% масс., или 0.15 моль/л), появилась задача исследовать возможность получения физически сшитых гидрогелей на основе хитозана и пектина, приготовленных в данном растворителе, и изучить их свойства. Гидрохлорид хитозана является сильным полиэлектролитом и в нейтральных водных растворах находится в полностью ионизированной форме. При смешении растворов гидро-

хлорида хитозана с полианионами в определенных мольных соотношениях образуется полиэлектролитный комплекс в виде гидрогеля или дисперсии.

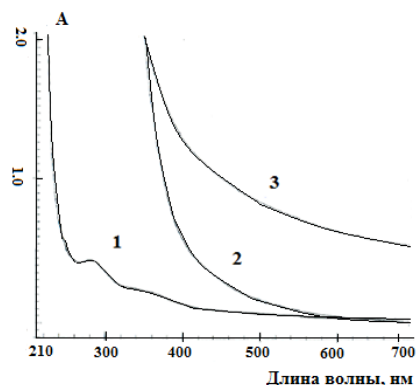


Рис. 1. Электронные спектры поглощения водных солевых растворов пектина $C = 0.03$ моль/л (1), гидрохлорида хитозана $C = 0.13$ моль/л (2), смесь растворов пектина и хитозана П/ХТЗ = 1:1, $C_{\text{NaCl}} = 0.15$ моль/л, $T = 20$ °С.

В первую очередь изучено взаимодействие разбавленных растворов гидрохлорида хитозана и пектина при эквимольном соотношении полимеров (рис. 1). При сливании растворов отмечается резкое увеличение вязкости системы, которое сопровождается ростом электронной плотности в УФ-спектре в области 400–700 нм, однако формирования гидрогеля не наблюдается. Увеличение концентрации полимеров в смеси приводит к формированию полиэлектролитного комплекса в виде гидрогеля, что обнаруживается по потере текучести системы. При этом при перемещении гидрогеля из колбы часть жидкости выделяется. Анализ дисперсионной среды, не вошедшей в гидрогель, показал, что она содержит смесь полимеров (рис. 2). Поскольку максимумы электронных полос гидрохлорида хитозана и пектина находятся в непосредственной близости, при 290 и 282 нм соответственно, разделить их не представилось возможным.

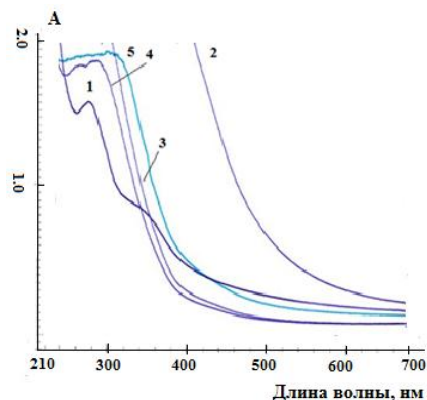


Рис. 2. Электронные спектры поглощения водных солевых растворов пектина $C = 0.11$ моль/л (1), гидрохлорида хитозана при концентрациях C : 0.49 моль/л (2), 0.049 моль/л (3), 0.032 моль/л (4), дисперсионной среды, не вошедшей в гидрогель (5), $C_{\text{NaCl}} = 0.15$ моль/л, $T = 20$ °С.

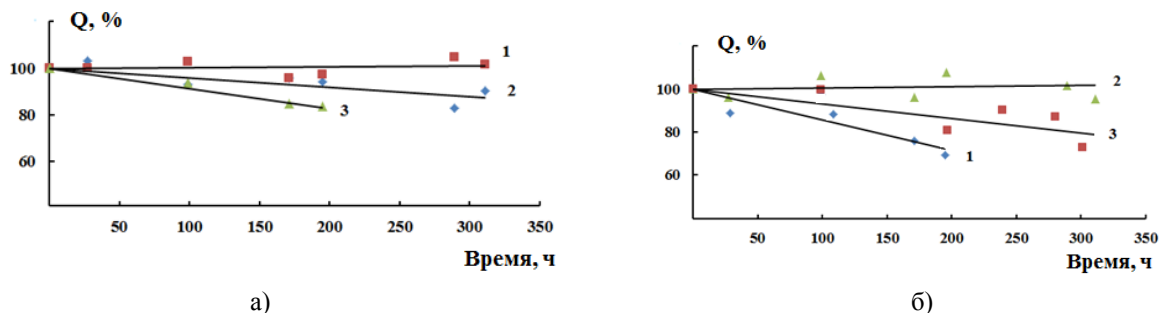


Рис. 3. Изменение массы гидрогеля состава П/ХТЗ = 1:1, приготовленного в растворе хлорида натрия (а) или фосфатном буфере (б), помещенного в раствор хлорида натрия (1), дистиллированную воду (2), фосфатный буферный раствор (3), $C_{\text{NaCl}} = 0.15$ моль/л, $T = 20$ °С.

При выдерживании гидрогеля в физиологическом растворе во времени в раствор с небольшой скоростью выделяется смесь полимеров. Дegrаdация гидрогеля сопровождается переходом наименее закрепленных водородными связями волокон с поверхности полимерной матрицы в дисперсионную среду с последующим их набуханием и растворением.

Исследован выход гидрогеля на основе растворов хитозана и пектина концентраций 8% масс. (0.49 моль/л) и 2% масс. (0.11 моль/л) соответственно, который оказался порядка $50 \pm 5\%$ при смешении эквимольных количеств полимеров и выдерживании гидрогеля в течение 1–10 суток. При этом гидрогель содержит водную фазу, в 15–20 раз превышающую массу полимеров в матрице. При изменении мольного соотношения полимеров выход гидрогеля уменьшался. Изучено влияние природы растворителя полимеров, использованных для приготовления гидрогеля, т.е. дисперсионной среды гидрогеля, на его деградацию в водной среде (рис. 3). В слабощелочной среде ($\text{pH} = 7.4$) отмечается уменьшение массы гидрогеля как на основе раствора хлорида натрия, так и на основе фосфатного буфера. В физиологическом растворе ($\text{pH} = 7$) масса гидрогеля на основе фосфатного буфера ($\text{pH} = 7.4$) уменьшается на 35% за 8 дней, в то время как масса геля на основе физиологического раствора практически не меняется в течение 2 недель.

Введение фермента «Лиаза» (гиалуронидазы) в концентрации 64 УЕ/мл в физиологический раствор внешней среды приводит к постепенному уменьшению массы гидрогеля (рис. 4) в тем большей степени, чем больше температура системы.

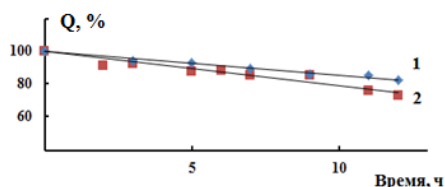


Рис. 4. Изменение массы гидрогеля состава П/ХТЗ = 1:1 под действием гиалуронидазы концентрации 64 УЕ/мл, помещенного в раствор хлорида натрия при $T = 20$ (1) или 40 °С, $C_{\text{NaCl}} = 0.15$ моль/л.

Часть полученных гидрогелей была переведена в сорбенты в виде пленок на основе физически сшитых хитозана и пектина. На рис. 5 видно, что кинетика набухания гидрогелевых пленок в течение 1–2 ч выходит на плато. Поведение гидрогелевых пленок на основе физиологического раствора или фосфатного буфера практически не различается, в то время как образец на основе дистиллированной воды набухает в 3 раза больше, достигая своего равновесного гидрогелевого состояния, и постепенно фрагментируется уже через 3 ч после погружения в воду. Добавление низкомолекулярных солей в состав полимерной матрицы приводит к уменьшению набухания и предотвращает ее деградацию в течение, по крайней мере, 4 суток.

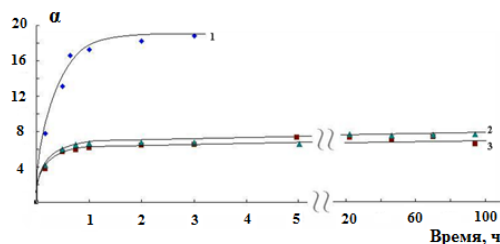


Рис. 5. Кинетические кривые сорбции дистиллированной воды пленками на основе гидрогеля состава П/ХТЗ = 1:1, дисперсионная среда: дистиллированная вода (1); фосфатный буфер (2); раствор хлорида натрия (3), $C_{\text{NaCl}} = 0.15$ моль/л, $T = 20$ °С.

Выводы

1. Формирование гидрогеля на основе хитозана и пектина возможно в водном растворе в отсутствие или присутствии низкомолекулярных солей, однако характер деградации полимерной матрицы будет отличаться в зависимости от природы внешней среды.

2. Физически сшитый гидрогель на основе хитозана и пектина подвергается ферментативной деструкции под действием гиалуронидазы в концентрации 64 УЕ/мл.

3. Пленки на основе хитозана и пектина, содержащие низкомолекулярные соли, характеризуются ограниченным набуханием.

Работа выполнена в рамках программы ФНИ государственных академий. Гос. задание №АААА-А20-120012090024-5.

ЛИТЕРАТУРА

1. Martău G. A., Mihai M., Vodnar D. C. The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector—Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability // *Polymers*. 2019. Vol. 11. No 1837. Pp. 1–28.
2. Marudova M., MacDougall A. J., Ring S. G. Pectin–chitosan interactions and gel formation // *Carbohydrate Research*. 2004. Vol. 339. No 11. Pp. 1933–1939.
3. Birch N. P., Barney L. E., Pandres E., Peyton S. R., Schiffman J. D. Thermal-Responsive Behavior of a Cell Compatible Chitosan/Pectin Hydrogel // *Biomacromolecules*. 2015. Vol. 16. No 6. Pp. 1837–1843.
4. Ventura H., Bianco-Peled H. Small-angle X-ray scattering study on pectin–chitosan mixed solutions and thermoreversible gels // *Carbohydrate Polymers*. 2015. Vol. 123. Pp. 122–129.
5. Neufeld L., Bianco-Peled H. Pectin–chitosan physical hydrogels as potential drug delivery vehicles // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017. Vol. 101. Pp. 852–861.
6. Tentor F. R., de Oliveira J. H., Scariot D. B., Lazarin-Bidóia D., Bonafé E. G., Nakamura C. V., Venter S. A. S., Monteiro J. P., Muniz E. C., Martins A. F. Scaffolds based on chitosan/pectin thermosensitive hydrogels containing gold nanoparticles // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017. Vol. 102. Pp. 1186–1194.
7. Кулиш Е. И., Туктарова И. Ф., Чернова В. В., Захаров В. П., Колесов С. В. Кинетические особенности процесса ферментативного гидролиза пленок хитозана // *Химическая физика*. 2015. Т. 34. №4. С. 35–39.
8. Туктарова И. Ф., Чернова В. В., Лаздин Р. Ю., Кулиш Е. И. Ферментативная устойчивость лекарственных пленочных покрытий на основе хитозана // *Физикохимия поверхности и защита материалов*. 2016. Т. 52. №2. С. 203–208.
9. Чернова В. В., Туктарова И. Ф., Кулиш Е. И. О возможности регулирования скорости реакции ферментативной деградации хитозана в растворе уксусной кислоты // *Химическая физика*. 2017. Т. 36. №4. С. 75–80.
10. Колесов С. В., Бадыкова Л. А., Мударисова Р. Х. Ферментативная устойчивость наночастиц интерполиэлектролитных комплексов хитозана // *Химическая физика*. 2020. Т. 39. №11. С. 73–79.
11. Maeda Y., Yamamoto M., Masui T., Sugiyama K., Yokota M., Okada N., Sugiyama K., Katayama H., Nakagomi K. Hyaluronidase Inhibitor in the Fruit of Citrus reticulata Blanco // *J-STAGE home. Eiseikagaku*. 1991. Vol. 37. No 3. Pp. 205–210.
12. Sawabe Y., Nakagomi K., Iwagami S., Suzuki S., Nakazawa H. Inhibitory effects of pectic substances on activated hyaluronidase and histamine release from mast cells // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1992. Vol. 1137. №3. Pp. 274–278.
13. Вильданова Р. Р., Сигаева Н. Н., Фаянова Е. А., Куковинцев О. С., Власова Н. М., Колесов С. В. Интерполиэлектролитные гидрогели на основе хитозана и пектина // *Вестник Башкирского университета*. 2017. Т. 22. №1. С. 72–76.
14. Вильданова Р. Р., Фарец А. Н. В., Иванов С. П., Султанбаев А. В., Сигаева Н. Н. Получение и реологические свойства гидрогелей на основе хитозана и пектина // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2020. №1. С. 61–66.
15. Сигаева Н. Н., Вильданова Р. Р., Султанбаев А. В., Иванов С. П. Получение и свойства гидрогелей на основе хитозана и пектина // *Коллоидный журнал*. 2020. Т. 82. №3. С. 1–14.

Поступила в редакцию 14.05.2021 г.

DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2021.3.17

DEGRADATION AND SWELLING OF HYDROGELS BASED ON CHITOSAN AND PECTIN IN AQUEOUS SOLUTIONS

© R. R. Vildanova*, S. V. Kolesov

Ufa Institute of Chemistry, Ufa Federal Research Center of RAS
69 Oktyabrya Avenue, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

Phone: +7 (347) 235 62 65.

*Email: regina777@list.ru

Physically cross-linked hydrogels and sorbents on the base of aqueous salt solutions of hydrochloride chitosan and citrus pectin were obtained and studied at 20–40 °C. Gelation occurs due to the formation of polyelectrolyte complex with the participation of hydrogen bonds between the macromolecules of chitosan and pectin for several minutes. The mixing of chitosan and pectin solutions with concentrations of 8 wt% (0.49 mol/L) and 2 wt% (0.11 mol/L) respectively, leads to the formation of hydrogel with yield of $50 \pm 5\%$ when mixing equimolar amounts of polymers and keeping the hydrogel for 1–10 days. In this case, the hydrogel contains an aqueous phase 15–20 times greater than the weight of the polymers in the matrix. With a change in the molar ratio of polymers, the yield of the hydrogel decreased. The biodegradation of the physically cross-linked chitosan – pectin hydrogel under the action of the enzyme hyaluronidase (concentration 64 U/ml) was shown. The weight loss of the hydrogel is about 20% when immersed in enzyme solution for 12 hours. Films based on chitosan-pectin hydrogel containing inorganic salts are characterized by limited swelling. The swelling kinetics of hydrogel films reaches a plateau within 1–2 hours. The behavior of hydrogel films based on saline or phosphate buffer is practically the same, while a sample based without salts swelled 3 times more, reaching its equilibrium hydrogel state, and gradually fragmented within 3 hours after immersion in water.

Keywords: chitosan, pectin, hydrogel, sorbent, polyelectrolyte complex, swelling, degradation, hyaluronidase.

Published in Russian. Do not hesitate to contact us at bulletin_bsu@mail.ru if you need translation of the article.

REFERENCES

1. Martău G. A., Mihai M., Vodnar D. C. *Polymers*. 2019. Vol. 11. No 1837. Pp. 1–28.
2. Marudova M., MacDougall A. J., Ring S. G. *Carbohydrate Research*. 2004. Vol. 339. No 11. Pp. 1933–1939.
3. Birch N. P., Barney L. E., Pandres E., Peyton S. R., Schifman J. D. *Biomacromolecules*. 2015. Vol. 16. No 6. Pp. 1837–1843.
4. Ventura H., Bianco-Peled H. *Carbohydrate Polymers*. 2015. Vol. 123. Pp. 122–129.
5. Neufeld L., Bianco-Peled H. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017. Vol. 101. Pp. 852–861.
6. Tentor F. R., de Oliveira J. H., Scariot D. B. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017. Vol. 102. Pp. 1186–1194.
7. Kulish E. I., Tuktarova I. F., Chernova V. V., Zakharov V. P., Kolesov S. V. *Khimicheskaya fizika*. 2015. Vol. 34. No. 4. Pp. 35–39.
8. Tuktarova I. F., Chernova V. V., Lazdin R. Yu., Kulish E. I. *Fizikokhimiya poverkhnosti i zashchita materialov*. 2016. Vol. 52. No. 2. Pp. 203–208.
9. Chernova V. V., Tuktarova I. F., Kulish E. I. *Khimicheskaya fizika*. 2017. Vol. 36. No. 4. Pp. 75–80.
10. Kolesov S. V., Badykova L. A., Mudarisova R. Kh. *Khimicheskaya fizika*. 2020. Vol. 39. No. 11. Pp. 73–79.
11. Maeda Y., Yamamoto M., Masui T., Sugiyama K., Yokota M., Okada N., Sugiyama K., Katayama H., Nakagomi K. *J-STAGE home. Eiseikagaku*. 1991. Vol. 37. No 3. Pp. 205–210.
12. Sawabe Y., Nakagomi K., Iwagami S., Suzuki S., Nakaza-wa H. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1992. Vol. 1137. No. 3. Pp. 274–278.
13. Vil'danova R. R., Sigaeva N. N., Fayanova E. A., Kukovinets O. S., Vlasova N. M., Kolesov S. V. *Vestnik Bashkirskogo universiteta*. 2017. Vol. 22. No. 1. Pp. 72–76.
14. Vil'danova R. R., Farets A. N. V., Ivanov S. P., Sultanbaev A. V., Sigaeva N. N. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN*. 2020. No. 1. Pp. 61–66.
15. Sigaeva N. N., Vil'danova R. R., Sultanbaev A. V., Ivanov S. P. *Kolloidnyi zhurnal*. 2020. Vol. 82. No. 3. Pp. 1–14.

Received 14.05.2021.