

ДОСЛІДЖЕННЯ АМФІФІЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КОПОЛІЕСТЕРІВ З ХРОМОФОРНИМИ ГРУПАМИ В СИСТЕМІ ВОДА-ОКТАНОЛ

© Ференс М. В., Фігурка Н. В., Василюшин Т. М., Майкович О. В., Варваренко С. М., 2018

Визначено коефіцієнти розподілу макромолекул нових амінофункційних кополієстерів із хромофорними групами від структури їх елементарної ланки в системі н-октанол-вода та експериментальні і розрахункові характеристики їх гідрофільно-ліпофільного балансу. Оцінено їх ліпофільні властивості і встановлено, що макромолекули нових флуоресцеїновмісних кополієстерів можна використати для конструювання полімерних систем доставки ліків.

Ключові слова: коефіцієнт розподілу, гідрофільно-ліпофільний баланс, кополієстери, флуоресцеїн, системи доставки ліків.

M. V. Ferens, N. V. Fihurka, T. M. Vasylyshyn, O. V. Maikovich, S. M. Varvarenko

STUDY OF AMPHIPHILIC PROPERTIES OF COPOLYESTERS WITH CHROMOPHORE GROUPS IN THE WATER-OCTANOL SYSTEM

© Ferens M. V., Fihurka N. V., Vasylyshyn T. M., Maikovich O. V., Varvarenko S. M., 2018

It was determined the effect of elementary chain structure of macromolecules of new aminofunctional copolyesters with chromophore groups on the partition coefficient thereof in water-octanol system and the experimental and calculated characteristics of the hydrophilic-lipophilic balance (HLB) of macromolecules. Evaluation of their lipophilic properties was performed and it was established macromolecules of new fluorescein-containing copolyester can be used for the construction of polymeric delivery systems for drugs.

Key words: partition coefficient, hydrophilic-lipophilic balance, copolyesters, fluorescein, drug delivery systems.

Постановка проблеми. При створенні лікарських препаратів на основі нових класів хімічних сполук одним з основних є питання про механізми проникнення сполук до живих клітин та про взаємодію цих сполук із клітинними мембранами. Ідеальним є збалансоване співвідношення гідрофільних та ліпофільних властивостей препарату або його носія, завдяки чому він однаково добре розчинний і у водному, і в ліпідному середовищах. Оцінювання біорозподілу сполук на модельних системах є важливим етапом створення та оцінювання ефективності засобів доставки ліків, які зможуть досягати місця ураження, проникаючи крізь біологічні бар'єри.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Бурхливий розвиток наук, що мають відношення до фармації, дозволив фармакотехнологам у співпраці з фахівцями інших галузей створювати ліки принципово нового типу, які мають спрямовану лікувальну дію. На відміну від традиційних такі ліки характеризуються: пролонгованою дією, контрольованим вивільненням діючих речовин та їх цільовим транспортуванням до органу-мішені, меншим токсичним впливом. З'явилося нове поняття – фармацевтичне розроблення ліків, яке передбачає обґрунтування оптимального їх складу та вибору технології виробництва, забезпечення якості ліків та зручності їх використання. Значно розширюються біофармацевтичні, клінічні та аналітичні дослідження у фармацевтичній галузі, зростають інвестиції в розроблення нових фармацевтичних препаратів, які створюються з використанням новітніх біоматеріалів та біотехнологій.

Одним із перспективних напрямів розвитку наукових досліджень кінця минулого сторіччя слід вважати вивчення властивостей нанорозмірних об'єктів – як біологічних, так і синтетичних. У медичній практиці можливе їх використання з метою:

- ранньої діагностики захворювань;
- адресної і пролонгованої доставки лікарських препаратів;
- відновлення пошкоджених органів і тканин.

Однак, при створенні лікарських препаратів на основі нових класів хімічних сполук одним з основних є питання про взаємодію цих сполук із клітинними мембранами та механізми проникнення сполук до живих клітин. Відомо, що високу спорідненість із біологічними мембранами проявляють речовини, які мають ліпофільні властивості. Показано, що зростання ліпофільності корелює з підвищенням біологічної активності, прискоренням метаболізму і виведенням, підвищенням швидкості проникнення крізь шкіру, збільшенням ступеня зв'язування з білками плазми. Разом з тим основним середовищем організму є вода, і очевидно, що ефективність дії сполук визначатиметься також їх розчинністю у воді. Тобто найбільш оптимальною буде наявність у молекулі як ліпофільних, так і гідрофільних фрагментів.

Кількісною характеристикою ліпофільності є коефіцієнт, який характеризує спорідненість молекули до ліпідної фази порівняно з водною і має назву парціального коефіцієнта (Р). Після виявлення кореляції між біологічною активністю речовини і коефіцієнтом розподілу її в системі н-октанол-вода ($P_{o/w}$) значення $\log P_{o/w}$ стали використовувати як параметр ліпофільності. Вибір н-октанолу як фази порівняння пояснюється тим, що баланс його полярних і неполярних фрагментів добре моделює властивості ліпідів і протеїнів у мембранах клітин і живих тканинах. Бінарна система н-октанол-вода є адекватною моделлю для оцінювання ліпофільності і застосовується для попередніх досліджень властивостей перспективних продуктів [1].

Мета роботи – дослідження ліпофільності кополієстерів, синтезованих на основі N-заміщеної глутамінової кислоти і полієтердіолів, у макроланцюг яких введено як хромофорні групи фрагменти флуоресцеїну, які є перспективними для створення засобів доставки ліків та діагностики через експериментальне визначення їх розподілу у бінарній системі н-октанол-вода.

Експериментальна частина

Методика одержання кополієстерів флуоресцеїну за реакцією Стегліха

У двогорлий реактор об'ємом 50 мл, оснащений мішалкою та зворотним холодильником з хлоркальцієвою трубкою, завантажували N-заміщену глутамінову кислоту, комомери з ряду PEG (PEG-300, PEG-400, PEG-600, PEG-1000 та PEG-1500), DPG, а також флуоресцеїн і розчинник. Після цього реакційну масу охолоджували до 280 К і при перемішуванні послідовно вводили попередньо приготовлені розчини 4-диметиламінопіридину (DMAP) та дициклогексилкарбодііміду (DCC) у відповідному розчиннику. Температуру реакційної суміші піднімали до 288 К і витримували протягом 3-х годин, а потім витримували ще 3 години при 308 К. Після закінчення відділяли з реакційної суміші утворений осад дициклогексилсечовини (DCU). Фільтрат упарювали у вакуумі водоструминного насоса. Потім очищували полімер від непрореагованих мономерів, активатора та каталізатора. Отриманий продукт сушили у вакуумі до сталої маси.

Методи досліджень

Визначення вмісту флуоресцеїну

Вміст флуоресцеїну в полімерах визначали спектрофотометрично після їх гідролізу за дії гідроксиду калію у метанолі при довжині хвилі $\lambda=480$ нм з використанням кварцових кювет завтовшки 5,0 мм (спектрофотометр “ЮНИКО 1201”). Для аналізу готували розчин полімеру в метанолі з концентрацією 0,07–0,08 %, додавали 10 % розчин КОН і поміщали на 1 год у “водяну баню” при $T=333$ К. Концентрацію флуоресцеїну в отриманому розчині розраховували за рівнянням залежності оптичної густини від концентрації флуоресцеїну (калібрувальної прямої).

Коефіцієнт розподілу флуоресцеїнвмісного кополієстеру визначається відношенням концентрацій флуоресцеїну в октанолі і у воді:

$$P = C_o/C_w, \quad (1)$$

де C_o , % – концентрація флуоресцеїну в октанолі; C_w , % – концентрація флуоресцеїну у воді.

Визначення коефіцієнта розподілу. Наважку флуоресцеїнвмісного кополієстеру диспергували у воді, створюючи концентрації 0,3÷0,5 %. До (1.00±0,10) г отриманої дисперсії додавали 1.00±0,10 г н-октанолу і перемішували протягом 24 год. Утворену емульсію центрифугували при 10000 с⁻¹ для розділення фаз протягом 10 хв. З кожної фази відбирали пробу і визначали вміст флуоресцеїну.

Визначення гідрофільно-ліпофільного балансу (GLB) кополієстерів

Експериментальне значення GLB розраховували за співвідношеннями концентрацій флуоресцеїну в різних фазах після перерозподілу в системі вода-октанол за формулою Девіса [2]:

$$GLB = 7 + 0.36 \cdot \ln(C_w/C_o), \quad (2)$$

де C_w , C_o – концентрації кополієстеру у водній та вуглеводневій фазах відповідно.

Розрахункові значення гідрофільно-ліпофільного балансу (GLB) отримували, визначаючи LogP всіх мономерів за допомогою програмного забезпечення ACDLabs і за формулою (2), але з врахуванням частки кожного фрагмента у складі кополієстеру (за даними ¹H ЯМР спектроскопії) [3].

¹H ЯМР спектри зразків мономерних фрагментів та кополієстерів флуоресцеїну отримували у дейтерохлороформі на приладі Bruker Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometer при частоті 400 МГц в автоматичному режимі сканування. Аналізували ПМР-спектри за таблицями характерних хімічних зсувів, наведених у [4], а також за допомогою програмного забезпечення ACDLabs.

Середню молекулярну масу, молекулярно-масовий розподіл та коефіцієнт полідисперсності кополімерів отримували з використанням хроматографа Waters Corporation з рефрактометричним детектором Waters 2998, насосом Waters 1515 Isocratic HPLC Pump. Як елюент використовували тетрагідрофуран з витратою 0,1 мл/хв. Для калібрування використали стандарти (полістирол) з вузьким молекулярно-масовим розподілом.

Результати та обговорення. Полімерні матеріали завдяки структурній різноманітності та можливості функціоналізації щораз частіше використовують як основу для конструювання складних наносистем транспорту ліків.

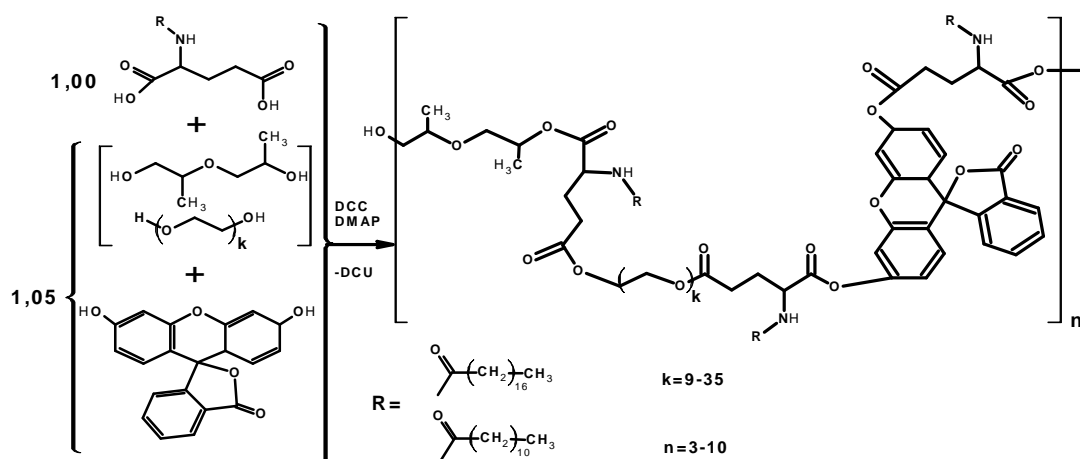


Рис. 1. Схема отримання флуоресцеїнвмісного кополієстеру при кополіконденсації його з N-заміщеною глутаміною кислотою і політерфдіолами за реакцією Стегліха

Значну перспективу для такого застосування мають амфіфільні кополієстери (які відомі також за назвою “псевдополіамінокислоти”), що поєднують властивості гідрофільних поліетиленгліколів

та гідрофобномодифікованих природних двоосновних амінокислот. Їх біодеградабельність, нетоксичність продуктів деградації та утворення у водних розчинах стійких дисперсій з частинками 50–200 нм робить їх цікавими об'єктами з погляду використання як мікро- та нанорозмірних полімерних носіїв для іммобілізації біологічно активних речовин.

Спостерігається тенденція до надання носіям додаткових функцій введенням відповідних структурних елементів, які забезпечують високий ступінь “адресності” носія та/або полегшують його виявлення в організмі доступними методами. Одним з найбільш зручних та поширених методів виявлення є флуоресцентна спектроскопія. Тому актуальним завданням було ввести фрагмент – мітку, здатну до флуоресценції, в макромолекули кополієстерів, яка б давала можливість виявляти їх макромолекули в тканинах організму, візуалізувати наноносії і так встановлювати їх ефективність. З огляду літератури можна зробити висновок, що як у традиційних, так і в нових областях хімії, біохімії та медицини поширено використання таких барвників ксантенового ряду, як родамін, флуоресцеїн та їхні похідні.

За методикою, описаною в експериментальній частині, синтезовано за реакцією Стегліха ряд амфіфільних кополієстерів на основі N-похідних глутамінової кислоти та поліетиленгліколів, до яких у заданих кількостях як структурна одиниця макромолекули входить флуоресцеїн (рис. 1). Структуру полімерів, отриманих за реакцією поліконденсації N-захищеної глутамінової кислоти з поліетердіолами, було підтверджено ¹H ЯМР-спектроскопією та гель-проникною хроматографією. Вміст флуоресцеїну в кополієстерах визначали також спектрофотометрично.

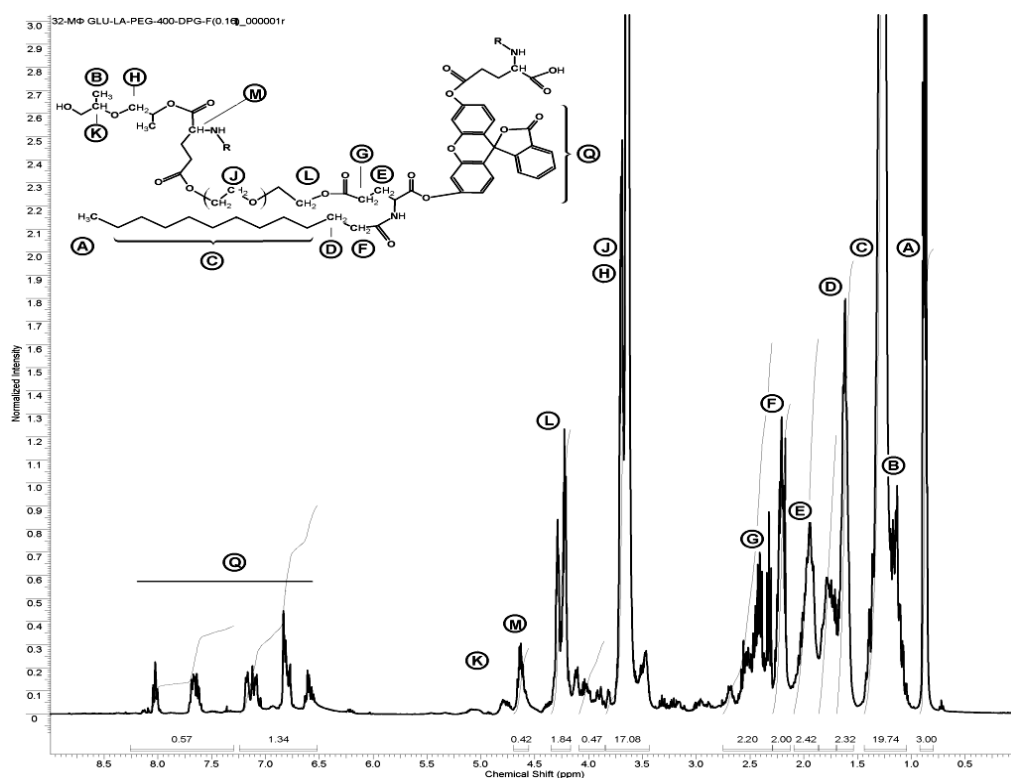


Рис. 2. ПМР-спектр кополієстеру флуоресцеїну з 2-додеканамінопентадіоною та поліетиленгліколю 400 і дипропіленгліколю 32-МФ

¹H ЯМР спектроскопічні дослідження отриманих кополієстерів дали можливість зробити віднесення сигналів протонів і за їхньою інтенсивністю розрахувати вміст ланок кожного мономеру у макромолекулі [5].

Отже, за реакцією активованої кополіконденсації за Стегліхом отримано та охарактеризовано ряд кополієстерів N-похідних глутамінової кислоти, дипропіленгліколю та різної молекулярної маси поліоксиетилендіолів, які характеризувалися заданим вмістом фрагментів флуоресцеїну.

Амфифільний характер отриманих полімерів, який забезпечувався використанням для синтезу мономерів різної природи: ліпофільних N– похідних глутамінової кислоти (GluL, GluSt) та гідрофільних поліетердіолів – передбачає їх поверхневу активність та перспективу їх використання для створення систем доставки, а флуоресцентний фрагмент надає їм також і функцію діагностики.

Таблиця 1

Умови синтезу та характеристики кополієстерів на основі N-заміщених похідних глутамінової кислоти, поліетердіолів і флуоресцеїну

Шифр кополієстеру	Узагальнена структурна формула	Склад мономерної суміші мольн. частки				Отримано в кополієстері мольн. частки				Вміст Ф у полімері, %	Середня ММ кополієстеру
		К-та	ПЕГ	ДПГ	Флуоресцеїн	К-та	ПЕГ	ДПГ	Флуоресцеїн		
32-МФ	GluLa-PEG400-DPG-F	0,5	0,307	0,137	0,0815	0,5	0,257	0,041	0,203	9,64	2950
28-МФ	GluLa-PEG600-DPG-F	0,5	0,274	0,137	0,116	0,5	0,262	0,049	0,189	13,07	3920
30-МФ	GluSt-PEG600-DPG-F	0,5	0,274	0,138	0,113	0,5	0,280	0,072	0,149	9,69	2540
36-МФ	GluLa-PEG1000-DPG-F	0,5	0,358	0,143	0,0265	0,5	0,31	0,095	0,095	1,87	5460
33-МФ	GluLa-PEG1000-DPG-F	0,5	0,337	0,134	0,052	0,5	0,301	0,043	0,156	3,75	3515
34-МФ	GluLa-PEG1000-DPG-F	0,5	0,307	0,13	0,083	0,5	0,261	0,062	0,177	5,56	4930

Здатність речовини проникати крізь мембрану клітин, яка є вирішальним фактором при виборі ефективних лікарських сполук та їх лікарських форм, визначається їх ліпофільністю. Зручним методом, який дає змогу чисельно охарактеризувати ступінь ліпофільності сполук, є вивчення розподілу речовини між 1-октанолом (модель фосфоліпідної мембрани) і водою (міжклітинна рідина). У випадку ковалентного зв'язування барвника в структурі макромолекул концентрація кополієстеру після перерозподілу однозначно корелює із вмістом флуоресцеїну в кожній з фаз.

Варто зауважити, що інкорпорація флуоресцеїну в структуру макромолекул синтезованих амфифільних кополієстерів дає змогу отримувати колоїдні розчини у воді з більш ніж на порядок вищою концентрацією, аніж власна розчинність флуоресцеїну. Це дало можливість розробити методику аналізу з використанням відносно простого спектрофотометричного обладнання.

В отриманих кополієстерах співвідношення молекулярної маси гідрофільних та ліпофільних фрагментів визначає їх GLB та інші колоїдно-хімічні властивості. Як відомо, число GLB дає змогу передбачати використання поверхнево-активних речовин: емульгатори зворотних емульсій 3–6, прямих емульсій 10–13, солюбілізатори 15–18 тощо [6]. Експериментально отримані значення коефіцієнта розподілу ($P_{o/w}$) синтезованих кополієстерів (рис. 1), а також їх $GLB_{експ}$, які розраховані за формулою (2), наведено в табл. 2. У цій самій таблиці наведено також $GLB_{розр}$, отримані з використанням даних про склад кополієстерів, отриманих методом ¹H ЯМР спектроскопії (табл.1). Видно, що в більшості випадків вони задовільно корелюють між собою. Найістотніші відхилення спостерігаються для зразків кополієстерів № 2,12,13 (табл. 2), які проявили здатність до утворення стійкої емульсії вода-октанол, яка не руйнувалась при центрифугуванні.

Причиною деякого незбігу може бути також і те, що при розрахунку за адитивною схемою для елементарної ланки полімеру не враховують такі важливі фактори, як структура макроланцюга, його сегментальна рухливість, функціональна та структурна неоднорідність статистичного кополієстеру та природа кінцевих груп. Тим не менше оцінка GLB через розрахунок є адекватним

відображенням властивостей кополієстеру і необхідна для вибору стратегії синтезу полімерів із прогнозованими властивостями.

Таблиця 2

Колоїдно-хімічні характеристики кополієстерів на основі N-заміщених похідних глутамінової кислоти, поліетердіолів і флуоресцеїну

№ з/п	Узагальнена структурна формула	Концентрація Φ у полімері, %	$P_{o/w}$	Log P	GLB _{кспер}	GLB _{розрах}
1	31– МФ GluLa-PEG400-DPG-F	5,53	2,03	0,31	6,75	6,15
2	39– МФ GluSt-PEG400-DPG-F	4,67	2,83	0,45	6,63*	4,84
3	27– МФ GluLa-PEG600-DPG-F	5,20	2,85	0,45	6,63	6,58
4	29-МФ GluSt-PEG600-DPG-F	4,03	2,86	0,46	6,72	5,38
4a	GluSt-PEG600-DPG	0	3,05	0,48	6,2	5,7
5	28-МФ GluLa-PEG600-DPG-F	13,07	1,90	0,28	6,77	6,30
6	30-МФ GluSt-PEG600-DPG-F	9,69	1,52	0,181	6,85	5,21
7	33-МФ GluLa-PEG1000-DPG-F	3,75	1,45	0,16	6,87	7,39
7a	GluSt-PEG1000-DPG	0	0,06	-1,19	7,9	6,37
8	38-МФ GluSt-PEG1000-DPG-F	2,87	2,36	0,37	6,74	6,31
9	37-МФ GluSt-PEG1000-DPG-F	5,87	0,68	-0,17	7,14	5,93
10	34-МФ GluLa-PEG1000-DPG-F	5,56	1,45	0,16	6,86	7,045
11	44-МФ GluLa-PEG1000-DEG-F	6,82	0,31	-0,58	7,48	7,62
12	43-МФ GluLa-PEG1000-F	5,32	1,76	0,245	6,80*	7,41
13	46-МФ GluLa-PEG1500-DPG-F	3,182	6,05	0,78	6,35*	8,63

* утворення стійкої емульсії.

У результаті проведених досліджень можна стверджувати, що більшість отриманих кополієстерів проявляють слабо виражені ліпофільні властивості, про що свідчать невеликі, але додатні значення LogP (табл. 2). Загалом для кополієстерів, синтезованих із використанням поліоксистердіолів з молекулярними масами 600–1500, значення Log P коливається в межах $\pm 0,5$, що свідчить про доволі добру їх спорідненість як до водної фази, так і до фази н-октанолу.

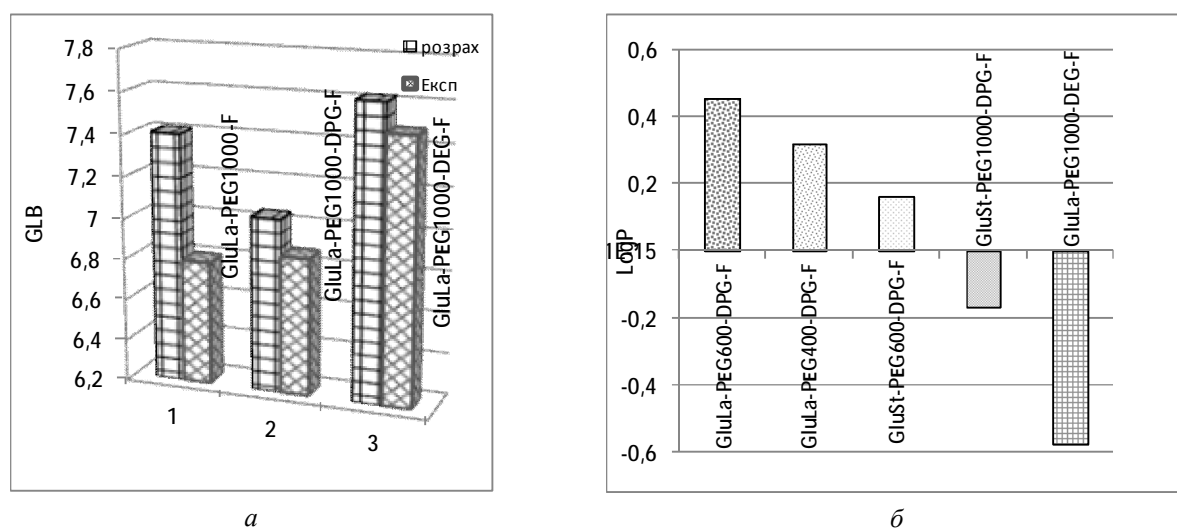


Рис. 3. Залежність коефіцієнта розподілу ($\log(P)$) від структури кополієстерів:
а – порівняння кополієстерів, синтезованих без низькомолекулярного комономеру (1) та з дипропіленгліколем (2) або диетиленгліколем (3); б – порівняння коефіцієнта розподілу ($\log P$) для кополієстерів різного складу (зразки 3,1,6,9,11, табл. 2)

З отриманих даних не можна однозначно зробити висновок про суттєвий вплив величини N-замісника у глутаміновій кислоті на GLB кополієстеру. Як для кополієстерів GluLa, так і для GluSt GLB, отримане з експериментальних даних, за розподілом відрізняється в межах похибки експерименту, хоча GLB, розраховане за частками фрагментів у макромолекулі, має закономірні відмінності: продукти, отримані з використанням GluSt, мають менші значення GLB. Введення флуоресцеїну до складу кополієстерів, зважаючи на його власну ліпофільність ($\text{LogP}=3,2$), дещо знижує GLB, якщо порівнювати із зразками, синтезованими без флуоресцеїну (Зразки 4, а і 4). Проте збільшення вмісту ланок флуоресцеїну в кополієстерах уже значного впливу не має (Зразки 4 і 6, табл. 2).

Аналіз отриманих даних дає змогу стверджувати, що за інших однакових умов на коефіцієнт розподілу і GLB кополієстерів впливає використання при кополієстерифікації низькомолекулярного комономеру (табл. 2). Як видно з рис. 3, а, наявність у структурі фрагмента дипропіленгліколю чи його відсутність не приводять до значних змін GLB кополієстеру, і він проявляє незначні ліпофільні властивості (бари 1 і 2), однак при введенні у структуру кополієстеру більш гідрофільного диетилєнєліколю спостерігається зменшення значень LogP , і GLB макромолекули зростає (бар 3). Загальна тенденція до зменшення LogP із збільшенням молекулярної маси поліоксєтиєнового фрагмента в складі кополієстеру свідчить про те, що отримані полімери можуть за певного складу одночасно проявляти як гідрофобні, так і гідрофільні властивості (рис. 3, б).

Отже, вибір відповідних компонентів та їх співвідношення у реакційній суміші при кополієстерифікації за реакцією Стеєліха дає змогу отримувати кополієстери з визначеними колоїдно-хімічними властивостями, макромолекули яких містять хромофорні фрагменти флуоресцеїну.

Висновки. Наявність ліпофільних властивостей кополієстеру є оптимальною для наповнення його наночастинок лікарськими препаратами та забезпечує взаємодію з клітинними мембранами, водночас його гідрофільні властивості сприяють стабілізації дисперсій у водному середовищі і доставку лікарського препарату в наночастинках з потоком крові і міжклітинної рідини до органів-мішеней. Порівняння характеристик кополієстерів, отриманих з експериментального перерозподілу та розрахованих за адитивною схемою через склад елементарної ланки дає можливість стверджувати, що загалом ці значення задовільно корелюють. Це дає змогу попередньо оцінити ліпофільність макромолекул за даними про їх склад отриманими ^1H ЯМР-спектроскопією та прогнозувати їх властивості залежно від вибору компонентів реакційної суміші на стадії синтезу. Слід зазначити, що більшість досліджуваних кополієстерів мають невеликі значення логарифма коефіцієнта розподілу (від -0,5 до 0,5), а отже, можуть рівною мірою розподілятися між водною і ліпідною фазами, що є одним з визначальних факторів при створенні систем доставки ліків.

1. Hansch C., Fujita T. ρ - σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. // J. Am. Chem. Soc. 1963. Vol. 86. P. 1616–1626. 2. Davies J. T. A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface // Proceedings of the International Congress of Surface Activity. – 1957. p. 426–438. 3. ACD/LogP DB. www.acdlabs.com/logp/ Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada. – 15 January, 2007. 4. Казицина Л. А. Применение УФ-, ИК-, ЯМР- спектроскопии в органической химии / Л. А. Казицина, Н. Б. Куплетская. – М.: Высшая школа, 1971. – 264 с. 5. Варваренко С. М., Самарик В. Я., Влізло В. В., Остапів Д. Д., Носова Н. Г., Тарнавчик І. Т., Фігурка Н. В., Ференс М. В., Нагорняк М. І., Тарас Р. С., Яремчук І. М., Воронов А. С., Воронов С. А. Флуоресцеїновмісні тераностики на основі псевдополіамінокислот для моніторингу доставки та вивільнення лікарських засобів // Полімерний журнал. – 2015. – Т. 37, № 2. – Р. 193–199. 6. Адамсон А. Физическая химия поверхностей. – М.: Мир, 1979. – 568 с.