

ударної в'язкості та підвищує теплостійкість матеріалу. В композитах на основі полістиролу гідрофобізована крейда демонструє добрі пластифікуючі властивості.

1. Schmid G. *Nanoparticles: from theory to application*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH, 2010. – 522 p. 2. 241L. Domka, A. Wąsicki, M. K. *The microstructure and mechanical properties of new HDPE-chalk composites // Physicochemical Problems of Mineral Processing*. № 37, 2003. p. 141–147. 3. C. Mahesh, B. Kondapanaidu, K. Govindarajulu, V. Balakrishna murthy. “Experimental Investigation of Thermal and Mechanical Properties of Palmyra Fiber Reinforced Polyester Composites With and Without Chemical Treatment and Also Addition of Chalk Powder”. *International Journal of Engineering Trends and Technology (IJETT)*. V5(5):259-271 Nov 2013. 4. Domka L., Wąsicki A., Kozak M. *The microstructure and mechanical properties of new HDPE-chalk composites // Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 37 (2003) p. 141–147.

УДК 678: 541.64

М. В. Ференс, Н. Г. Носова, Н. В. Фігурка, С. М. Варваренко,
В. Ф. Кір'янчук, С. А. Воронов
Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра органічної хімії

ФЛУОРЕСЦЕЇНОВІСНІ КОПОЛІЕСТЕРИ ГЛУТАМІНОВОЇ КИСЛОТИ ТА ПОЛІТЕРДЮЛІВ

© Ференс М. В., Носова Н. Г., Фігурка Н. В., Варваренко С. М., Кір'янчук В. Ф., Воронов С. А., 2015

Створено методики синтезу та синтезовано амфіфільні поліестерні-псевдополі-амінокислоти з флуоресцентними властивостями за рахунок ковалентного приєднання відповідних фрагментів до макромолекул, оптимізовано вміст флуоресцентних фрагментів у макромолекулі. Комплекс властивостей одержаних кополіестерів, таких як здатність понижати поверхневий натяг водних розчинів, утворювати стабільні міцелярні розчини, солюбілізувати водонерозчинні сполуки та здатність до флуоресценції дають змогу використовувати їх як полімерну основу для нових засобів доставки ліків -тераностиків.

Ключові слова: кополіестер, реакція Стегліха, флуоресцеїн.

The synthesis techniques of hybrid macromolecules of amphiphilic polyester materials (pseudo-poly(amino acid)) were developed. Pseudo-poly(amino acid)s with fluorescence properties were obtained via covalent attachment of corresponding fragments in the macromolecule structure. Optimization of fluorescence fragments content in the macromolecules was conducted. A complex of properties of the obtained copolyesters, such as the ability to reduce the surface tension of aqueous solutions, to form stable micellar solutions, to solubilize water-insoluble compounds, and their fluorescent capacity, allows for using them as a polymer base for new drug carriers, namely the theranostics.

Key words: copolyester, Steglich reaction, fluorescein.

Постановка проблеми. Полімерні дисперсні системи, які забезпечують адресне лікування певних захворювань, зокрема раку, а також створюють можливість візуального контролю умов і швидкості вивільнення ліків, стали відомими в останні декілька років за назвою “тераностики”.

Створення тераностиків передбачає синтез макромолекул носіїв, які, будучи наноконтейнерами терапевтичних агентів (ліків), містили би і діагностичні речовини (агенти візуалізації) в одному полімерному матеріалі.

Згідно із сучасними уявленнями сформульовано такі вимоги до полімерної основи тераностика [1]: 1) здатність пролонгованої циркуляції у крові; 2) акумуляція у зоні патологічного процесу; 3) здатність переносити молекули ліків у зони запальних процесів; 4) містити візуалізуючий агент у структурі полімеру, за допомогою якого можна спостерігати за накопиченням ліків у відповідних зонах; 5) не має викликати додаткових подразнень чи алергічних реакцій. При цьому до полімеру-носія висувається цілий ряд специфічних вимог, таких як розчинність у воді, нетоксичність і біосумісність.

Тому є важливим завдання розроблення нових полімерних носіїв, що відповідають сучасним вимогам.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. У попередніх роботах [2, 3] було описано ряд амфіфільних кополієстерів на основі двоосновних природних амінокислот та поліетиленгліколів, які у водних розчинах мають поверхнево-активні властивості і утворюють при цьому різноманітні міцелярні асоціати. При цьому вони здатні транспортувати ліпофільні молекули, а також є біодеградабельними, нетоксичними і повністю відповідають сучасним вимогам до полімеру носія. Проте їх виявлення в зоні патологічної тканини вимагає складного препарування та коштовних аналізів. Одним з варіантів вирішення цієї проблеми є введення хромофорних фрагментів (маркерів) у макромолекулярний ланцюг [4]. Серед маркерних сполук відомий барвник – флуоресцеїн, який часто застосовують у медичній діагностиці. Він біологічно нейтральний, тому його вводять в організм (в кров або в певні органи) і, спостерігаючи флуоресценцію тканин, з'ясовують проникність судин, кровопостачання різних ділянок шкіри тощо [5]. За умови ковалентного приєднання маркера до макромолекули носія інтерпретація результатів вважається найбільш надійною [6]. Аналіз літератури показує, що створення полімерних молекул носія з ковалентно приєднаними маркерами, які містять хромофорні групи, дає змогу візуалізувати місцезнаходження макромолекул тераностика в певних органах та тканинах організму і є актуальною задачею полімерної хімії.

Мета роботи. Синтез нових амінофункційних кополієстерів – псевдополіамінокислот, здатних до флуоресценції, як полімерної основи для створення тераностичних засобів доставки ліків.

Експериментальна частина. *Реагенти та розчинники.* Поліетиленгліколі (ПЕГ-400÷1200) (PEG), діпропіленгліколь (DPG) (Aldrich) сушили від слідів води методом азеотропної відгонки бензолу. N-стеароїлглутамінову кислоту (GluSt), N, N'-дициклогексилкарбодіїмід (ДЦК), N, N'-диметиламінопіридин (ДМАП), флуоресцеїн (Fl) (Aldrich) використовували без додаткового очищення. Розчинники бензол, метиленхлорид використовували марок "ХЧ", очищені за методиками [7].

Синтез кополієстерів проводили через взаємодію діолів, N-захищеної глютамінової кислоти (при співвідношеннях реагентів) та флуоресцеїну у розчині безводного бензолу за методикою [3]. Вихід полімеру становив 92–99 %. Отримані полімери є твердими, легко топкими аморфними речовинами, безбарвними або солом'яного кольору.

Методи досліджень. ІН ЯМР спектри зразків мономерних фрагментів та кополієстерів отримували у дейтерохлороформі при частоті 400 МГц в автоматичному режимі сканування. Аналізували ПМР-спектри за таблицями характерних хімічних зсувів, наведених у [8], а також програмою Снем Bio Draw Ultra 11.0.1. ІЧ спектри зразків кополієстерів отримано на приладі Thermo Scientific Nicolet 8700. Аналіз ІЧ-спектрів проводили за таблицями характерних частот поглинання [9,10]. Молекулярну масу визначали гель-проникною хроматографією з використанням

хроматографа Waters Corporation. Спектральні характеристики полімеру визначали у воді, етанолі, октанолі та конденсованій фазі за допомогою спектрофлуориметра CM 2203 CM 2203.

Результати та обговорення. Синтез флуоресцеїновмісних похідних амфіфільних амінофункційних кополієстерів із включенням фрагментів флуоресцеїну в основний ланцюг макромолекули здійснювали через кополіконденсацію реагентів в бензолі за реакцією Стегліха за такою схемою.

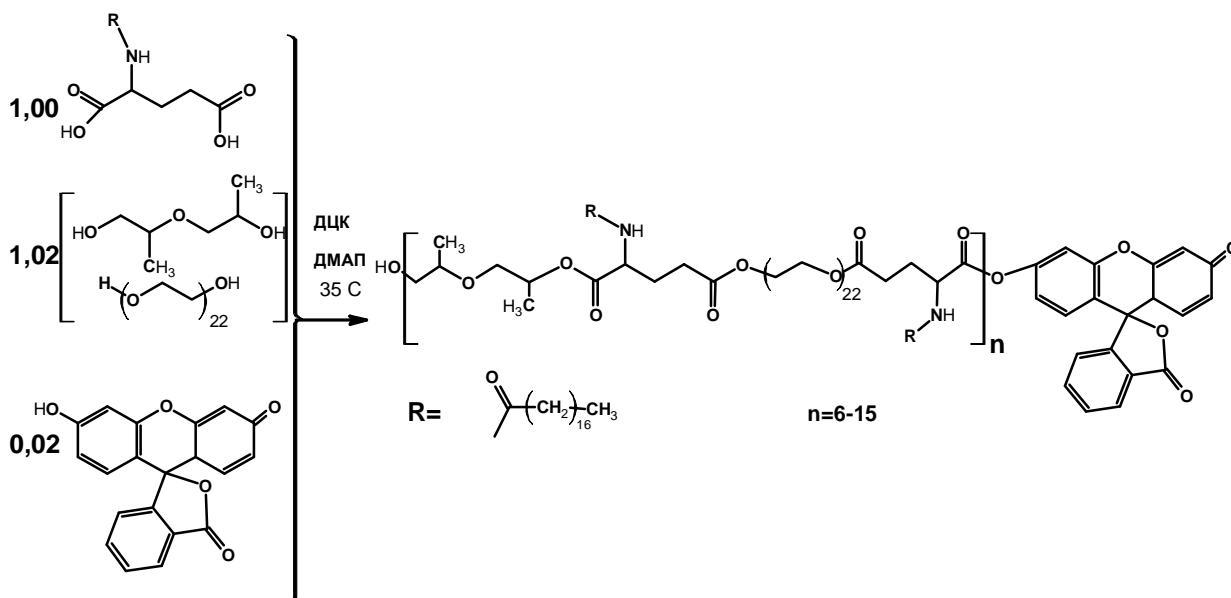


Рис. 1. Схема синтезу флуоресцеїновмісних макромолекул тераностиків (co-GluSt-co-PEG-co-DPG-Fl) через взаємодії *N*-стеаройлглутамінової кислоти та поліетерів діолів у присутності флуоресцеїну за реакцією Стегліха

Реакція Стегліха використовується для синтезу низькомолекулярних естерів і є особливо зручною при роботі з малостійкими субстратами. Нами було показано в попередніх роботах, що при співвідношенні двоосновної кислоти та діолів у реакційній суміші, близькому до еквімолярного, перебіг цієї реакції приводить до одержання кополієстерів [11]. Проведені нами дослідження показали, що заміна частини гідроксилвмісного мономеру (в розрахунку на мольну частку реакційноздатних гідроксильних груп) на флуоресцеїн приводить до утворення флуоресцеїновмісного кополієстеру згідно із наведеною схемою (рис. 1). Встановлено, що із збільшенням частки флуоресцеїну понад 5 % мольних від загальної кількості гідроксилвмісних мономерів відбувається закономірне зменшення молекулярної маси отриманих кополієстерів і при перевищенні цього значення утворюються тільки низькомолекулярні продукти.

Можливість використання флуоресцеїну у цій системі ґрунтується на тому, що у неводних середовищах (бензол) флуоресцеїн може існувати у декількох таутомерних формах, які відрізняються кількістю реакційно здатних груп. Вважається, що в цих умовах найімовірнішою є структура, яка передбачає наявність одного фенольного гідроксилу та карбоксильної групи, яка утворила лактон (рис. 1) [12, 13]. Відомо також, що в умовах реакції Стегліха гідроксильна група фенольного типу здатна вступати в реакцію естерифікації з утворенням естерів [14]. Нами встановлено, що при синтезі кополієстерів на основі *N*-стеаройлглутамінової кислоти та поліетердіолів за реакцією Стегліха молекули флуоресцеїну як монофункційний агент обривають матеріальні ланцюги кополієстерів з утворенням відповідних кінцевих фрагментів макромолекул.

Результати тонкошарової хроматографії вказують на відсутність у складі реакційної суміші не прищепленого флуоресцеїну. За даними гель-проникної хроматографії молекулярна маса отриманих кополієстерів становила 6000–9000, що приблизно на 20–30 % менше, аніж молекулярна

маса кополієстерів, які отримували при кополіконденсації в порівняльних умовах, проте без використання флуоресцеїну. Цей факт свідчить про те, що флуоресцеїн є агентом обриву матеріального ланцюга в цій системі і опосередковано підтверджує припущення про його молекулярну формулу в умовах цієї реакції.

Структуру отриманих кополієстерів підтверджено ІЧ- та ЯМР-спектроскопією.

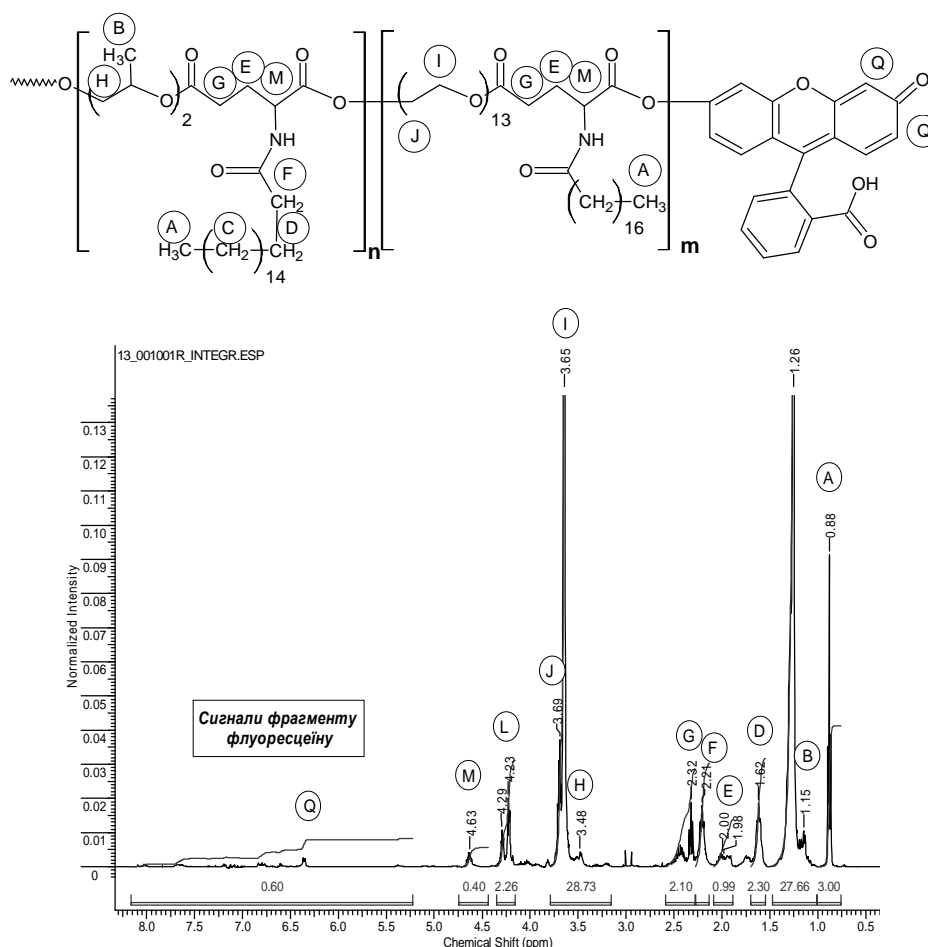


Рис. 2. ¹H ЯМР спектр кополієстеру co-GluSt-co-PEG-400-co-DPG-Fl (розчинник хлороформ, 300 МГц)

Розрахунок за наведеним ¹H ЯМР спектром співвідношень інтегралів протонів ароматичних фрагментів хромофорної групи і протонів α-СН груп N-стеароїлглутамінової кислоти у кополієстері вказує на входження одного фрагмента молекули флуоресцеїну на 8–10 ланок N-стеароїлглутамінової кислоти (таблиця). Таке співвідношення при молекулярній масі кополієстеру 9000 забезпечує входження фрагмента флуоресцеїну в кожен другу макромолекулу, наприклад, для кополієстеру co-GluSt-co-PEG-400-co-DPG-Fl.

Здатність до люмінесценції псевдополіамінокислот полієстерного типу з флуоресцентними фрагментами досліджували при довжині хвилі опромінення λ=450 нм. Дослідження проводили у водно-етанольному розчині та в середовищі октанолу, що моделює природні ліофільні середовища (мембрани клітин). Характерні спектри люмінесценції в цих середовищах наведено на рис. 3, а, б відповідно для полімеру будови co-GluSt-co-PEG-400-co-DPG-Fl. Як у водному, так і октанольному середовищах спектр має характерний для флуоресцеїну вигляд з максимумом при 515 нм та 519 нм в октанолі (рис. 3, а, б). Ковалентне приєднання фрагмента флуоресцеїну до макромолекули приводить до батохромного ефекту у спектрі випромінювання кополієстеру в обох середовищах (максимум випромінювання флуоресцеїну 513 нм).

**Фрагменти макромолекули, відповідні їм зсуви протонів та їхні інтеграли
у кополієстері co-GluSt-co-PEG-400-co-DPG-Fl. Віднесення сигналів протонів полімерів
на основі N-стеаройл-глутамінової кислоти, діпропіленгліколю, ПЕГ та флуоресцеїну**

Позн.	Зсув	Тип	Віднесення	Фрагмент	Кількість протонів	Інтеграл
A	0,88	т	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	Stearoyl	3	3
B	1,15 (α 1)	д	$\begin{array}{c} -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{O}-\text{C}- \\ \quad \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$	DPG	3,15	27,66
	1,22	д	$\begin{array}{c} -\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}- \\ \quad \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$			
C	1,26	д	$\text{H}_3\text{C}-\left(\text{CH}_2\right)_{14}-\text{CH}_2-$	Stearoyl	28	
D	1,62	м	$-\left(\text{CH}_2\right)_{14}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{NH}-$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{O}$	Stearoyl	2	2,3
E	1,9-2,0	шм	$\begin{array}{c} -\text{O}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}-\text{O}- \\ \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{NH} \quad \text{O} \end{array}$	Glu	2	0,99
F	2,21	м	$-\left(\text{CH}_2\right)_{14}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{NH}-$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{O}$	Stearoyl	2	2,20
G	2,32	м	$\begin{array}{c} -\text{O}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}-\text{O}- \\ \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{NH} \quad \text{O} \end{array}$	Glu	2	2,10
H	3,2	м	$\begin{array}{c} -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{O}-\text{C}- \\ \quad \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$	DPG	2,1	28,73
	3,5	м	$\begin{array}{c} -\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}- \\ \quad \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$			
I	3,63	с	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}- \\ \diagup \quad \quad \quad \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \\ \diagdown \quad \quad \quad \text{O}-\text{CH}_2- \\ \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$	PEG	24,7	
J	3,67	м	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{O}$	PEG	2,1	
L	4,23-4,29	шм	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{O}$	PEG	2,1	2,26
M	4,63	с	$\begin{array}{c} -\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}-\text{O}- \\ \quad \quad \\ \text{NH} \quad \text{O} \end{array}$	Glu	1	0,4
Q	6.7	шм		F	2	0.03

Важливою для цих речовин є здатність формувати флуоресцентний “відгук” як у водному, так і в ліофільному середовищах, що є важливою умовою для використання цього класу псевдополіамінокислот полієстерного типу з флуоресцентними фрагментами як основи тераностичної системи. Треба зауважити, що флуоресцеїн практично нерозчинний у октанолі, тому отримати його спектр в цьому середовищі було неможливо. Разом з тим завдяки приєднанню до макромолекули кополієстеру флуоресцеїнового фрагменту він здатний переходити у розчин в октанолі, про що свідчить отриманий спектр (рис. 3, б). Зміщення максимуму випромінювання в цьому випадку до 519 нм спричиняє сольватохромний ефект внаслідок зміни полярності середовища.

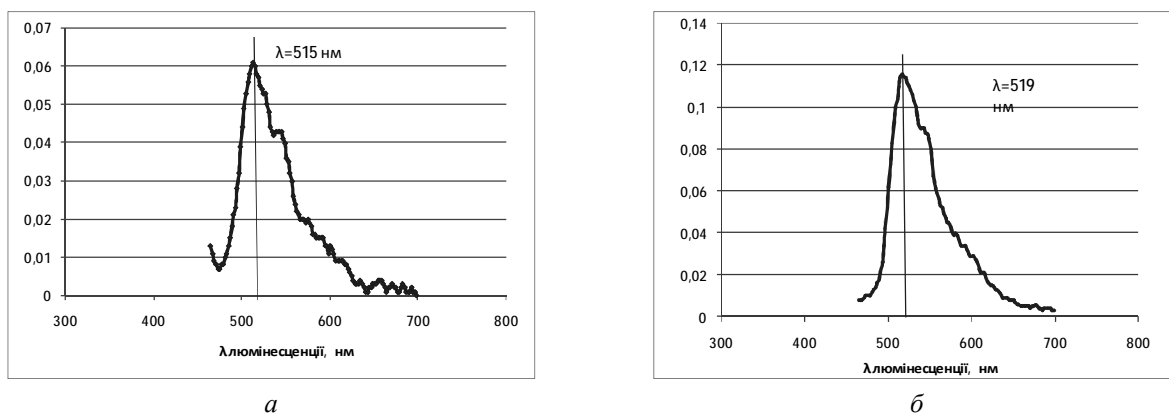


Рис. 3. Спектри люмінесценції **а**-водно-спиртового розчину та **б**-октанольного розчину кополіестеру з флуоресцентними фрагментами *co-Glu(St)-co-PEG400-co-DPG-Fl*.

Висновки. Розроблено умови синтезу за реакцією Стегліха та синтезовані кополіестери, здатні до флуоресценції через введення хромофорного фрагмента в макромолекулу.

Ці характеристики дають змогу використовувати синтезовані кополіестери як полімерну основу для створення нового покоління систем доставки ліків – тераностиків.

1. Torchilin. V. P. Multifunctional nanocarriers // *Adv. Drug. Ddiv. Rev.* 2006. 59. (14). 1532-1555.
2. Варваренко С. М., Фігурка Н. В., Самарик В. Я., Воронов А. С., Тарнавчик І. Т., Дронь І. А., Носова Н. Г., Воронов С. А. Нові амфідільні поліестери псевдополіамінокислоти на основі природних двоосновних амінокислот та діолів, одержані через реакцію естерифікації Стегліха // *Полімерний журнал.* – 2013. – Т. 35, № 3. – С. 282–290.
3. Варваренко С. М., Носова Н. Г., Дронь І. А., Воронов А. С., Фігурка Н. В., Тарнавчик І. Т., Тарас Р. С., Вострес В. Б., Самарик В. Я., Воронов С. А. Нові амфідільні амінофункційні поліестери та дисперсні системи на їх основі // *Вопросы химии и химической технологии.* – Дніпропетровськ, ДХТІ, 2013. – № 5. – С 58–65.
4. Тёрнер Э., Карубе И., Уилсон Д. Биосенсоры: основы и приложения. – М.: Мир, 1992. – 616 с.
5. Барский И. Я., Поляков Н. И., Якубскас В. А. Контактная микроскопия. – М.: Медицина, 1976. – 159 с.
6. Фрайштат Д. М. Реактивы и препараты для микроскопии. – М.: Химия, 1980. – 480 с.
7. Вайсберг А., Проскауэр Э., Риддис Д. и др. Органические растворители. – М.: Иностранная литература, 1976. – 541 с.
8. Казичина Л. А. Применение УФ-, ИК-, ЯМР- спектроскопии в органической химии / Л. А. Казичина, Н. Б. Куплетская. – М.: Высшая школа, 1971. – 264 с.
9. Белами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул / Белами Л. [пер. с англ. Акимова В. М., Пентина Ю. А., Тетерина Ю. Г. под ред. Пентина Ю. А.]. – М.: Издательство иностранной литературы, 1963 – 590 с.
10. Workman J. Handbook of Organic Compounds. Ni, Ir, Raman, and Uv-Vis Spectra Featuring Polymers and Surfactants // J. Workman. – San Diego: Buckram Publisher. AcademicPress, 2001 – 428 p.
11. Sergiy Varvarenko, Ihor Tarnavchyk, Andriy Voronov, Nataliia Fihurka, Iryna Dron, Nataliia Nosova, Roman Taras, Volodymyr Samaryk, Stanislav Voronov. Synthesis and colloidal properties of polyesters based on glutamic acids and glycols of different nature // *Chemistry and Chemical Technology.* – 2013. – Vol.7, № 2. – P.164–168.
12. Jang Y. H., Hwang S., Chung D. S. *Chem. Lett.* 2001. – P.1316–1317.
13. Richard P., Haugland R. P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. Eighth Edition, Molecular Probes, Inc., 1998. – 580 p.
14. Richard P., Haugland R. P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. Eighth Edition, Molecular Probes, Inc., 1998. – 580 p.