

*С.М. Варваренко, Н.В. Фігурка, В.Я. Самарик, А.С. Воронов, І.А. Дронь, І.Т. Тарнавчик,
Н.Г. Носова, В.Б. Вострес, С.А. Воронов*

ВПЛИВ СТРУКТУРИ МАКРОМОЛЕКУЛ ПСЕВДОПОЛІАМІНОКИСЛОТ НА ЇХ КОЕФІЦІЄНТ РОЗПОДІЛУ В СИСТЕМІ ВОДА–ОКТАНОЛ

**Національний університет „Львівська політехніка”
North Dakota State University**

Визначені коефіцієнти розподілу макромолекул нових амінофункційних поліестерів псевдополіамінокіслот від структури їх елементарної ланки в системі н-октанол–вода та експериментальні і розрахункові характеристики їх гідрофільно-ліпофільного балансу. Здійснене оцінювання їх ліпофільних властивостей і встановлено, що макромолекули нових псевдополіамінокіслот можуть бути використані для конструювання полімерних систем доставки ліків.

Вступ

Полімерні системи доставки ліків на основі амфіфільних полімерів викликають зростаючий інтерес у фармакології та медицині, для транспортування терапевтичних засобів у клітини. Мірою рівня взаємодії, яка забезпечує доставку ліків у клітину, прийнято вважати ліпофільність полімерного носія. Вона визначає можливість молекул взаємодіяти з ліпідними шарами клітинних мембран і, як наслідок, їх здатність проникати у клітину [1].

Дослідження ліпофільних властивостей є необхідним етапом при визначенні здатності полімерних сполук до використання в якості основи систем транспорту ліків. Величина відносної ліпідної розчинності полімерного носія може бути визначена через вимірювання коефіцієнту розподілу макромолекул носія між двома не змішуваними фазами – органічною (октанол) та водною. Коефіцієнт розподілу це відношення розчинності макромолекул носія у ліпідах та воді, який визначає здатність макромолекул носія переходити з водного середовища через ліпідну мембрану у клітину. Саме цей фактор часто використовують для конструювання систем доставки ліків. Такі дослідження є особливо актуальними для нових амфіфільних полімерів, які здатні виконувати роль полімерної основи систем доставки. В останні роки синтезовано новий клас полімерів – псевдополіамінокіслоти поліестерного типу, які містять у структурі макромолекул залишки природних амінокіслот. Псевдополіамінокіслоти мають унікальні властивості – біосумісність та здатність до біодеградації з утворенням нетоксичних продуктів. Розробка нами нового методу

синтезу поліестерів через реакцію Стегліха на основі N-похідних глутамінової кислоти та поліестерів діолів різної молекулярної маси дозволила отримати гомологічний ряд амфіфільних полімерів – нових псевдополіамінокіслот [2] (рис. 1).

Метою даної роботи є дослідження залежності коефіцієнта розподілу ряду нових псевдополіамінокіслот від структури їх елементарної ланки в системі н-октанол–вода та отримання експериментальних та розрахункових характеристик гідрофільно-ліпофільного балансу (ГЛБ) їх макромолекул.

Експериментальна частина

Реагенти та розчинники. Поліетиленгліколи (PEG-300, PEG-400, PEG-600, PEG-1000 та PEG-2000), дипропіленгліколь (DPG) виробництва фірми Aldrich. Для очистки від домішок води до відповідного гліколю додавали п'ятикратний надлишок бензолу та відганяли азеотропну суміш бензол–вода ($T_k=69^{\circ}\text{C}$). Залишки бензолу видаляли вакуумуванням. N-стеарилглутамінову кислоту (GluSt), N,N'-дициклогексилкарбодіїмід (ДЦК) виробництва фірми Aldrich використовували без додаткового очищення. Розчинники: бензол, метиленхлорид, октанол-1 очищали за методиками [3,4]. У дослідах використовували н-октанол, насичений до рівноваги водою, та, відповідно, воду – н-октанолом.

Синтез поліестерів. Синтез поліестерів проводили при взаємодії діолу (або суміші діолів) і N-захищеної глутамінової кислоти в розчині безводного метилену хлористого. Розчин охолоджували до 7°C і при перемішуванні добавляли відповідну кількість каталізатора – 4-диметиламінопіридину (ДМАП) та ДЦК у вигляді розчинів в

цьому ж розчиннику. Після додавання розчину ДЦК, температуру піднімали до 15°C і витримували протягом 3-х год, після чого прогрівали ще 3 год при 35°C. Далі дициклогексилсечовину відділяли фільтруванням, а розчин полімеру упарювали. Для очищення поліестерів від залишків ДМАП та ДЦК готували їх розчини у бензолі, тричі промивали їх 15%-ним розчином NaCl у 0,1N HCl, потім 15%-ним розчином NaCl у воді до нейтрального рН, сушили над сульфатом магнію, фільтрували і упарювали. Вихід полімеру складав 92–99%. Полімери ожержані на основі різних N-захисених похідних глутамінової кислоти та ряду діолів (DPG, PEG-300, PEG-600, PEG-1000 та PEG-2000), є твердими аморфними речовинами, безбарвними або солом'яного кольору.

Методи досліджень

Визначення коефіцієнта розподілу. В макромолекулах псевдополіамінокислот (ППАК) визначали вміст азоту за мікрометодом Кельдаля [5]. Формували водну дисперсію ППАК (концентрація полімеру близько 1%) та додавали рівну за масою до водної фази кількість n-октанолу. Дисперсію перемішували протягом 12 год для встановлення рівноваги. Утворену гетерогенну систему центрифугували при 10000 с⁻¹ протягом 15 хв для досягнення повного розподілу фаз. З кожної фази відбирали пробу, визначали вміст азоту і розраховували концентрацію полімеру в кожній з фаз.

Поверхневий натяг вимірювали методом Дю-Нуї [6], розміри частинок визначали методом динамічного світлорозсіювання (DLS) на приладі Zeta Sizer Nano-ZS90 (Malvern).

Результати та обговорення

Відомо, що колоїдно-хімічні властивості поверхнево-активних речовин (ПАР) і, насамперед, їх поверхнева активність визначаються особливостями їх будови. Молекули ПАР, зазвичай, є дифільними, тобто складаються з гідрофільної та ліпофільної частини. Саме співвідношення (баланс) між розмірами гідрофільної та ліпофільної частин молекули визначають її розчинність у водній (C_w) та в олео (C_o) фазах, а також коефіцієнт розподілу (K) між фазами K=C_o/C_w. Таким чином, величина коефіцієнта розподілу дає можливість передбачити тенденції до зміни роз-

чинності ПАР у воді та у вуглеводні (октанолі) при зміні молекулярної будови ПАР. Для молекул полімерних ПАР, таких як ППАК, оцінювання K та гідрофільно-ліпофільного балансу можна здійснити через аналіз хімічної будови елементарної ланки поліестеру ППАК за Гріффіном та Девісом [7,8].

Для досліджень було синтезовано дві групи полімерів (I та II таблиці), які мають однакову загальну формулу, але відрізняються розташуванням гідрофільних і ліпофільних фрагментів у структурі макромолекулярного ланцюга (рис 2,а, 2,б) [9,10]. Полімери першої групи (рис. 2,а) мають регулярне чергування гідрофільних та ліпофільних фрагментів у макромолекулі GluSt-DPG-GluSt-PEG. Формування такої структури зумовлено взаємодією двоосновного карбоксилвмісного фрагменту, на основі стеарилглутамінової кислоти і дипропіленгліколю та ряду поліетиленгліколів (рис. 2,а).

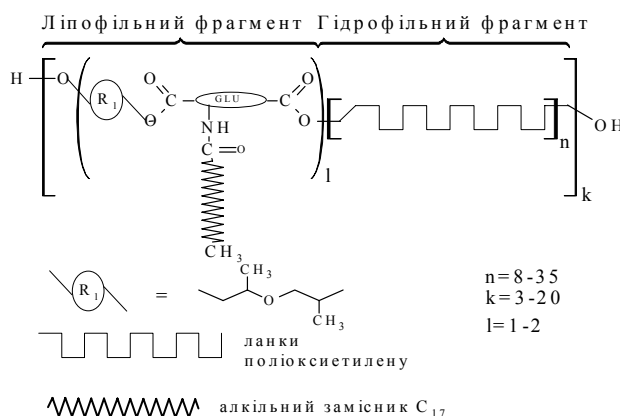


Рис. 1. Загальна структура псевдополіамінокислот

Кополіестери групи II (рис. 2,б) отримані при кополіконденсації стеарилглутамінової кислоти та суміші дипропіленгліколю та поліетиленгліколю. За таким методом синтезу одержані поліестери статистичної структури, тобто вміст ліпофільних фрагментів GluSt-DPG вздовж макромолекулярного ланцюга має статистичний нерегулярний характер.

Колоїдно-хімічні характеристики синтезованих ППАК

Структура елементарної ланки полімеру	Вміст N, %	K _{o/w}	ККМ ₂ , %	ГЛБ _D	ГЛБ _{D1}	
I	[(GluSt-DPG-GluSt)-PEG-300]	2,30	24,800	0,0096	5,8	2,0
	[(GluSt-DPG-GluSt)-PEG-400]	2,14	1,600	0,0210	6,6	2,7
	[(GluSt-DPG-GluSt)-PEG-1000]	1,48	0,600	0,0786	7,2	4,45
II	[GluSt-DPG-GluSt-PEG-600]	2,50	3,046	0,022	6,2	4,5
	[GluSt-DPG-GluSt-PEG-1000]	1,48	0,064	0,0628	7,1	7,6
	[GluSt-DPG-GluSt-PEG-2000]	1,14	0,165	0,1000	7,1	15,3

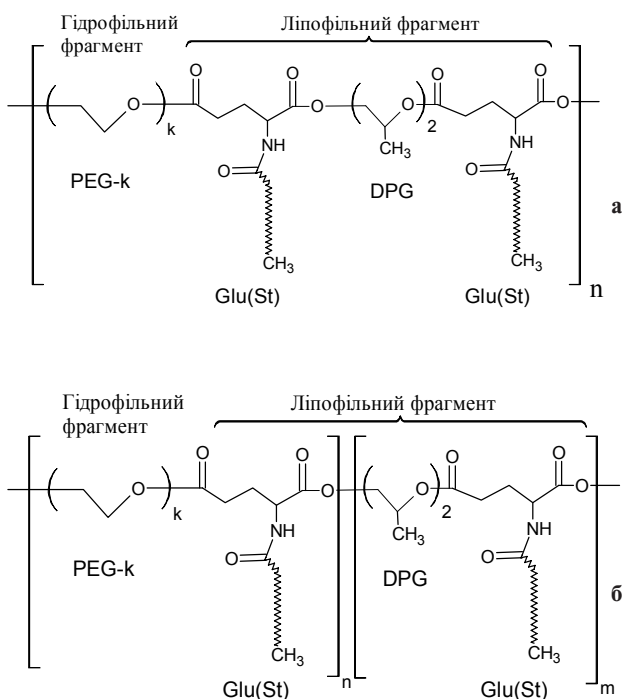


Рис. 2. Схема ППАК альтернатної будови (а), схема ППАК статистичної будови (б)

Полімери, як альтернатної, так і статистичної будови, вмають поверхнево-активними властивості – понижують поверхневий натяг (σ) і формують міцели у розчинах.

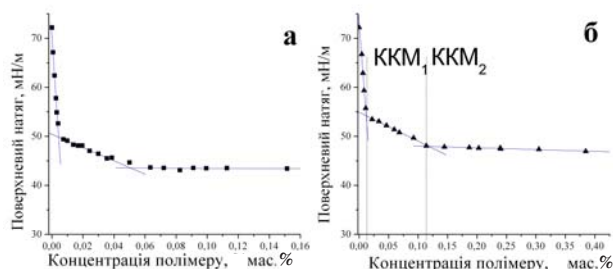


Рис. 3. Ізотерми поверхневого натягу псевдополіамінокислот а – альтернатної будови, б – статистичної будови

Видно, що ППАК альтернатної будови в порівняльних умовах понижують поверхневий натяг водних розчинів на 28–30 мН/м, а ППАК статистичної будови на 22–25 мН/м. Деякі колоїдно-хімічні характеристики синтезованих ППАК наведені в таблиці.

У полімерах загальної формули (рис. 1) залишки N-похідних глутамінової кислоти (Glu-St) відіграють роль ліпофільних фрагментів, а поліетерів діолів (ПЕГ) – гідрофільних фрагментів. Співвідношення цих фрагментів в молекулі ППАК визначає їх поверхнево-активні властивості. Числовим виразом для цього співвідношення є гідрофільно-ліпофільний баланс (ГЛБ). Відомо, що за

ГЛБ класифікуються всі поверхнево-активні речовини – емульгатори зворотних емульсій 3–6, прямих емульсій 10–13, солюбілізатори 15–18, тощо [11]. При конструюванні макромолекул полімерних ППАК (рис. 1) для оцінки впливу структури на ГЛБ нами було використано відому формулу Девіса [8]. Вона дозволяє розрахувати ГЛБ за хімічною будовою речовини при використанні групових вкладів структурних одиниць визначених Гріффіном [7].

$$GLB = 7 + \sum(H_i) - \sum(L_i), \quad (1)$$

де H_i – числове значення інкременту групового вкладу гідрофільного фрагменту; L_i – числове значення інкременту групового вкладу ліпофільного фрагменту.

У таблиці наведено числові значення розрахованого гідрофільно-ліпофільного балансу ГЛБ_{D1} для елементарної ланки псевдополіамінокислот (рис. 1). Разом з тим слід відмітити, що розрахунок за адитивною схемою для елементарної ланки полімеру не може коректно визначати ГЛБ макромолекули. У цьому випадку важливе значення мають також структура макроланцюгу, його сегментальна рухливість та природа кінцевих груп. Тим не менше проведення оцінки ГЛБ для елементарної ланки необхідно для вибору стратегії синтезу полімерів з прогнозованими властивостями. Розрахунок за формулою 1 показує (таблиця ГЛБ_{D1}), що через вибір вихідних речовин та методу синтезу можна передбачати ГЛБ елементарної ланки ППАК у діапазоні від 2 до 15.

Існує також формула Девіса, яка пов'язує ГЛБ з експериментально визначеною величиною коефіцієнта розподілу ПАР між вуглеводневою та водною фазами [8].

$$GLB = 7 + 0,36 \cdot \ln(C_w/C_o), \quad (2)$$

де C_w , C_o – в нашому випадку, це концентрації ППАК у водній та вуглеводневій фазах відповід-

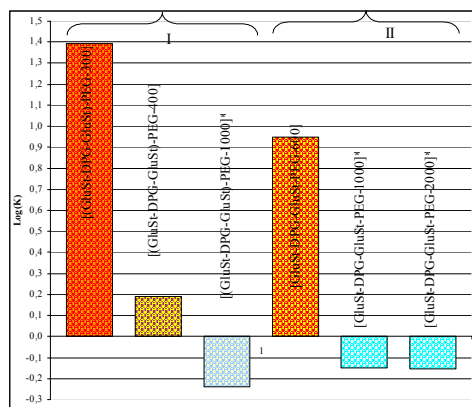


Рис. 4. Залежність критерія ліпофільності $\lg(K_{o/w})$ від структури ППАК

но.

У цьому випадку можна одержувати значення ГЛБ які більш коректно відповідають поверхнево-активним властивостям ППАК. У таблиці наведені експериментальні значення ГЛБ_D синтезованих ППАК, які розраховані за формулою (2), а також розрахункові ГЛБ_{D1} за формулою (1). Видно, що вони задовільно корелюють між собою. Крім того видно, що вони мало відрізняються в залежності від кількості оксиетиленових ланок у їх складі. Можна зробити висновок, що існує лише незначна залежність ГЛБ від молекулярної маси гідрофільного фрагменту.

Взаємозв'язок будови ППАК з їх здатністю до проникнення через мембрани у клітини є основним питанням їх придатності для застосування як основи систем доставки терапевтичних засобів. Параметр ліпофільності, який був запропонований в [12], визначається, як логарифм коефіцієнта розподілу, і є доволі точною мірою участі речовини в ліпофільних чи гідрофільних взаємодіях:

$$\text{Lg}(K) = \text{Lg}\left(\frac{C_o}{C_w}\right), \quad (3)$$

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

Відомо, що значення $K < 1$ означає, що сполука має більш високу спорідненість до водної фази (більш гідрофільна); коли $K = 1$, сполука однаково розподілена між ліпідною й водною фазами; значення $K > 1$ означає більш високу концентрацію сполуки в ліпідній фазі (більш ліпофільна). Відповідно параметр ліпофільності для ліпофільних речовин додатний, а для гідрофільних – від'ємний.

На рис. 4 наведено залежність значень критерія ліпофільності $\text{lg}(K_{o/w})$ від структури ППАК. Видно, що параметр ліпофільності для ППАК [(GluSt-DPG-GluSt)-PEG-300] складає 1,4, тоді як для [GluSt-DPG-GluSt-PEG-600] – 0,95. Це вказує на можливість найбільшої взаємодії таких макромолекул з ліпідними шарами клітинних мембран. Разом з тим полімери [(GluSt-DPG-GluSt)-PEG-400], [(GluSt-DPG-GluSt)-PEG-1000], [GluSt-DPG-GluSt-PEG-1000], [GluSt-DPG-GluSt-PEG-2000] мають параметри ліпофільності близькі до нуля. Таким чином, вони мають однакову спорідненість як до вуглеводневого, так і до водного середовища.

Методом динамічного світлорозсіювання (DLS) (рис. 5) показано, що макромолекули ППАК в водних розчинах утворюють колоїдні системи з міцелярними частинками розмірами 50–650 нм при концентраціях, близьких до ККМ₂.

Одержані результати вказують на те, що нові амінофункційні поліестери – псевдополіамінокислоти Методом динамічного світлорозсіювання

(DLS) (рис. 5) показано, що макромолекули ППАК в водних розчинах утворюють колоїдні системи з міцелярними частинками розмірами 50–650 нм при концентраціях, близьких до ККМ₂.

Одержані результати вказують на те, що нові амінофункційні поліестери – псевдополіамінокислоти – можуть бути використані для конструювання полімерних систем доставки ліків у клітини.

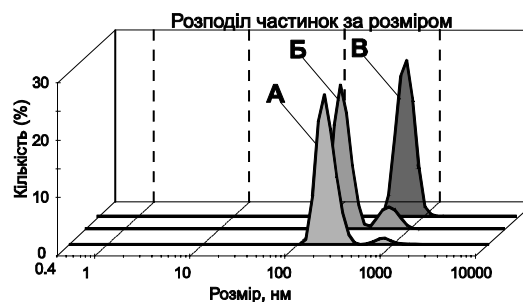


Рис. 5. Гістограми розподілу частинок дисперсної фази поліестеру [GluSt-DPG-GluSt-PEG-1000] за розміром при різній концентрації полімеру (А – 0,02% , Б – 0,05%, В – 0,1%)

Висновки

Структура макромолекулярного ланцюга амінофункційних поліестерів псевдополіамінокислот впливає на величину їх коефіцієнта розподілу в системі вода – н-октанол. Розраховані та визначені експериментальні величини гідрофільно-ліпофільного балансу макромолекул псевдополіамінокислот альтернантної та статистичної будови, які задовільно корелюють між собою. Значення коефіцієнтів розподілу і відповідно ліпофільності макромолекул визначаються структурою елементарної ланки макроланцюга. Ліпофільність макромолекул альтернантної будови вища ліпофільності макромолекул статистичної будови. При концентраціях близьких до ККМ макромолекули псевдополіамінокислот утворюють міцелярні структури певної ліпофільності. Такі міцелярні структури можуть бути використані для конструювання полімерних систем доставки ліків.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Plisca Ed.V., Testa B., Waterbeemd H. Lipophilicity in Drug Action and Toxicologi. – VCH: Weinheim, 1996. – 438 p.
2. Синтез псевдополіамінокислот на основі двохосновних α-амінокислот / Варваренко С.М., Пузько Н.В., Самарик В.Я. и др. // Вісник НУ "Львівська політехніка", Сер. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2011. – № 700. – С.391-395.
3. Вайсберг А., Проскауэр Э., Риддис Д. Органические растворители. – М.: Иностранная литература. – 1976. – 541 с.

4. Гордон А., Форд Э. Спутник химика. – М.: Мир. – 1976. – 541 с.
5. Климова В.А. Основные микрометоды анализа органических соединений. – М.: Химия. – 1967. – 208 с.
6. Торопцева А.М., Белгородская К.В., Бондаренко В.М. Лабораторный практикум по химии и технологии высокомолекулярных соединений. – Л.: Химия. – 1976. – 415 с.
7. Бабак В.Г. Высококонцентрированные эмульсии. Физико-химические принципы получения и устойчивость // Успехи химии. – № 77(8). – 2008. – С.729-756.
8. 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.
9. Псевдо-полі(амінокислоти) – перспективні поверхнево-активні полімери для створення лікарських форм / Варваренко С.М., Пузько Н.В., Носова Н.Г. и др. // Вісник НУ „Львівська політехніка”. Сер. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2012. – № 726. – С.394-399.
10. Синтез псевдо-полі(амінокислот) складної архітектури для одержання дисперсних систем доставки ліків / Пузько Н.В., Варваренко С.М., Самарик В.Я. и др. // Вісник НУ „Львівська політехніка”. Сер. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2012. – № 726. – С.400-405.
11. Адамсон А. Физическая химия поверхностей. – М.: Мир. – 1979. – 568 с.
12. Hanch C., Leo A. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. – New York: Wiley&Sons. – 1979. – 339 p.

Надійшла до редакції 1.04.2013