

О. І. Хоменко, О. Г. Будішевська, А. С. Воронов,  
С. М. Варваренко, О. О. Кудіна, І. Т. Тарнавчик, С. А. Воронов

## Амфіфільні дієстери піромелітової кислоти з фрагментами холестеролу для солубілізації ліпофільних речовин

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Ю. Ю. Керчею)

*Послідовною взаємодією піромелітового діангідриду з моноалкіловими етерами поліетиленгліколів з різною довжиною ланцюгів та холестеролу синтезовано нові амфіфільні поверхнево-активні речовини — дієстери піромелітової кислоти (ДЕПК). Молекули ДЕПК містять ліпофільні фрагменти холестеролу і гідрофільні поліоксіетиленові ланцюги різної довжини та утворюють міцели і міцелярні агрегати у водних середовищах. Показано, що міцели і міцелярні агрегати ДЕПК у водних розчинах солубілізують ліпофільні речовини (куркумін) та можуть підвищувати їх розчинність у водних середовищах, що робить їх перспективними для створення нових систем для доставки ліків.*

Актуальною проблемою сьогодення є створення наноносіїв (наноконтейнерів) на основі міцел та міцелярних агрегатів для доставки гідрофобних протипухлинних препаратів та інших терапевтичних засобів у патологічні клітини [1]. Це зумовлює розвиток досліджень нанотерапевтичного транспорту ліків з використанням агрегатів поверхнево-активної речовини (ПАР) — міцел, везикул, ліпосом, які здатні капсулювати гідрофобні протипухлинні препарати (куркумін, паклітаксель тощо), що дає змогу збільшити їх розчинність у воді [2, 3]. Серед них особливо цікавими є ПАР, які містять у структурі молекул ліпофільні фрагменти холестеролу та гідрофільні ланцюги поліетиленгліколю (ПЕГ) різної молекулярної маси. Як відомо, вони здатні капсулювати куркумін, що також дає змогу збільшити його розчинність, біодоступність та цитотоксичність відносно патологічних клітин [4, 5].

Відначимо, що холестерол є важливою складовою клітинних мембран та міститься практично в усіх тканинах організму людини. Основна його кількість утворюється в організмі в результаті біосинтезу. Очевидно, для створення біосумісних нетоксичних ПАР доцільно використовувати холестерол як ліпофільну складову. Такі ПАР є цікавими для доставки лікарських препаратів у клітини. Застосування діангідриду піромелітової кислоти для поєднання в молекулі ПАР ліпофільного фрагмента — холестеролу та гідрофільних ланцюгів ПЕГ у науковій літературі не описано.

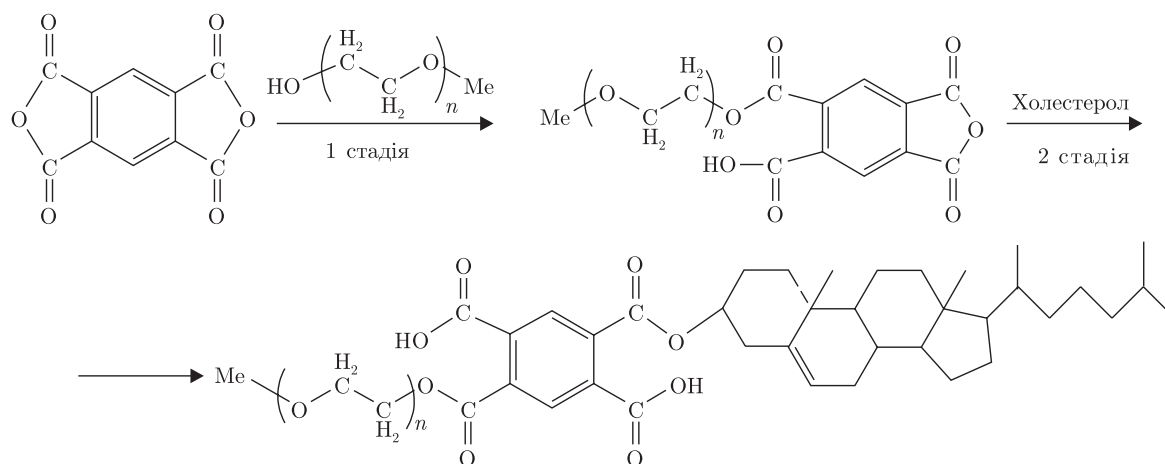
Метою даної роботи був синтез нових олігомерних амфіфільних ПАР: дієстерів піромелітової кислоти (ДЕПК) — холестерил(метилполіоксіетил)піромелітатів, молекули яких містять ліпофільний фрагмент холестеролу і гідрофільний метилполіоксіетильний фрагмент із заданою довжиною ланцюга, а також використання їх міцел і міцелярних агрегатів у водних середовищах для підвищення колоїдної розчинності олеофільних сполук.

---

© О. І. Хоменко, О. Г. Будішевська, А. С. Воронов, С. М. Варваренко, О. О. Кудіна, І. Т. Тарнавчик,  
С. А. Воронов, 2013

Для регулювання гідрофільно-ліпофільних властивостей даного типу ПАР доцільно використовувати ПЕГ різної молекулярної маси. Відомо, що ланцюги ПЕГ, які утворюють гідрофільну оболонку міцелярних структур, забезпечують стеричний і гідродинамічний бар'єр, що запобігає адсорбції протеїнів плазми крові. В результаті цього забезпечується стабільна і пролонгована циркуляція міцелярної структури ПАР у крові. Гідрофобними речовинами слугують фрагменти холестеролу, які забезпечують нетоксичність та біосумісність ПАР й носіїв на їх основі.

Синтез нових олігомерних ПАР: діестерів піромелітової кислоти — холестерил(метилполіоксіетил)піромелітатів здійснювали послідовною взаємодією піромелітового діангідриду з моноалкіловими етерами поліетиленгліколів з різною довжиною ланцюгів та холестеролу за такою реакцією:

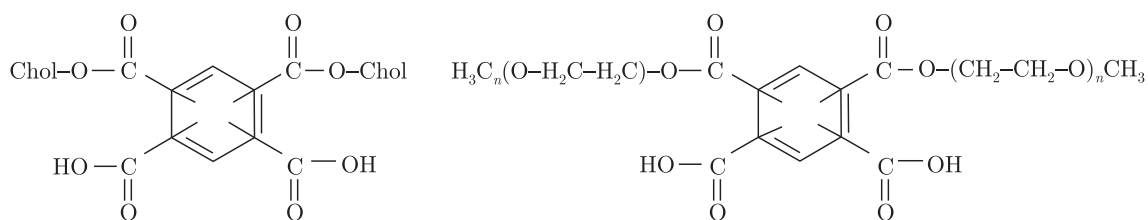


Перевагою запропонованого методу є можливість: 1) регулювання гідрофільно-ліпофільного балансу ПАР і відповідно поверхнево-активних властивостей через контрольоване співвідношення молекулярної маси гідрофільних і ліпофільних фрагментів ПАР; 2) утворення ПАР, які мають біосумісні та деградабельні властивості через наявність фрагментів холестеролу та естерних зв'язків у макромолекулі.

**Експериментальна частина.** *Матеріали.* Піромелітовий діангідрид (ПМДА) (“Aldrich”). Монометилкові етери поліетиленгліколів з ММ 350 (МПЕГ<sub>350</sub>), ММ 550 (МПЕГ<sub>550</sub>), ММ 750 (МПЕГ<sub>750</sub>), вміст основної речовини >98% (“Aldrich”), осушували відгонкою азеотропної суміші води з бензолом при 393 К. Триетиламін (ТЕА) (“Aldrich”) очищали вакуумною перегонкою. Холестерол (Хол) (“Aldrich”) осушували методом азеотропної відгонки води з бензолом. Диметилформамід (ДМФА) (“Aldrich”) очищали висушуванням над КОН впродовж 24 год, потім над СаО 48 год з подальшою вакуумною перегонкою. Куркумін (“Overseal Natural Ingredients Ltd”) використовували без очищення.

*Синтез ДЕПК* — холестерил(метилполіоксіетил)піромелітату (МПЕГ-ПМДА-Хол) здійснювали послідовною взаємодією ПМДА з МПЕГ та Хол у ДМФА в присутності каталізатора ТЕА (0,02 моль/л) при 353 К. На першій стадії проводили взаємодію ПМДА та МПЕГ при концентрації реагентів 2,0 моль/л та їх мольному співвідношенні 1 : 1 до конверсії 80–99%. Потім у реакційну суміш вносили Хол в еквімолярному відношенні до ПМДА та проводили взаємодію до конверсії 97–99%. Конверсію реагентів контролювали за вмістом карбоксильних груп у продукті реакції, який визначали рН-метричним титруванням проб реакційної суміші. Після утворення продуктів реакції з реакційної суміші відганяли розчин-

ник ДМФА при пониженому тиску і проводили очищення МПЕГ-ПМДА-Хол для видалення побічних продуктів (дихолестерилпіромелітату і ди(метилполіоксіетил)піромелітату):



*Очищення МПЕГ-ПМДА-Хол.* З реакційної суміші відганяли розчинник ДМФА, розчиняли в ацетоні та відфільтровували нерозчинний в ацетоні дихолестерилпіромелітат, після чого двічі переосаджували МПЕГ-ПМДА-Хол з ацетону в гексан для видалення залишків холестеролу. Осад висушували, розчиняли у водному розчині соди з рН 8 і висаджували додаванням 5% розчину НСl і додаванням NaCl у кількості 10–15% загальної маси. Отриманий МПЕГ-ПМДА-Хол висушували при 328 К. Вихід 50–60%.

*Солубілізацію гексану і бензолу* визначали за кількістю колоїдно розчиненого (солубілізованого) вуглеводню з використанням залежності експериментально визначеного показника заломлення від концентрації вуглеводню [6]. Солубілізацію здійснювали у фосфатному буфері (рН 6,58), в якому попередньо розчиняли ДЕПК та вносили чотириразовий (у мольному відношенні до ДЕПК) надлишок вуглеводнів. Суміш перемішували при 293 К впродовж 6 год. Через 2 доби шприцом з голкою обережно відбирали водний шар з солубілізованим вуглеводнем, наносили 1–2 краплі на призму рефрактометра RL3 та вимірювали показник заломлення при 293 К.

*Солубілізацію куркуміну* визначали за залежністю інтенсивності поглинання водних розчинів ПАР МПЕГ-ПМДА-Хол з солубілізованим куркуміном у фосфатному буфері (рН 6,8) при  $\lambda$  470 нм від концентрації ПАР на спектрофотометрі “ЮНИКО 1201”.

ІЧ-спектри з перетворенням Фур’є (далі ІЧ) амфифільних ДЕПК знімали в тонкому шарі, нанесеному з бензольного розчину на таблетку калій броміду за допомогою приладу “Thermo Scientific Nicolet Fourier Transform Infrared Spectrometer” у діапазоні 400–4000 см<sup>-1</sup> з компенсацією атмосферного CO<sub>2</sub> й Н<sub>2</sub>O.

ПМР спектри отримували у дейтерохлороформі на ЯМР спектрометрі “JEOL’s ECA Series Nuclear Magnetic Resonance (NMR)” при частоті 400 МГц при 298 К. ПМР-спектри — з градієнтом по осі Z при 298 К. Розчинник містив внутрішній стандарт. Концентрація ДЕПК — 1,0 %.

Мас-спектри знімали на високороздільному мас-спектрометрі “Bruker Daltonics BioTOF” у режимі реєстрації позитивно заряджених іонів, отриманих методом електроспрей-іонізації в присутності іонів натрію. 5–10 мг зразка естерів розчиняли в 2 мл метанолу та додавали 1–2 краплі 5% розчину трифторацетату натрію в метанолі. Отриманий розчин вводили в камеру для електроспрей-іонізації зі швидкістю 240 мкл/год. Сигнал нагромаджували (5000 сканувань) в діапазоні m/z від 70 до 3000.

ККМ МПЕГ-ПМДА-Хол у водному середовищі визначали за ізотермою поверхневого натягу, отриманою за допомогою тензіометра Дю-Нуї [7].

**Результати та їх обговорення.** Нові амфифільні ПАР: ДЕПК — холестерил(метилполіоксіетил)піромелітати отримували послідовною взаємодією ПМДА з монометилловими естерами поліетиленгліколів і Хол.

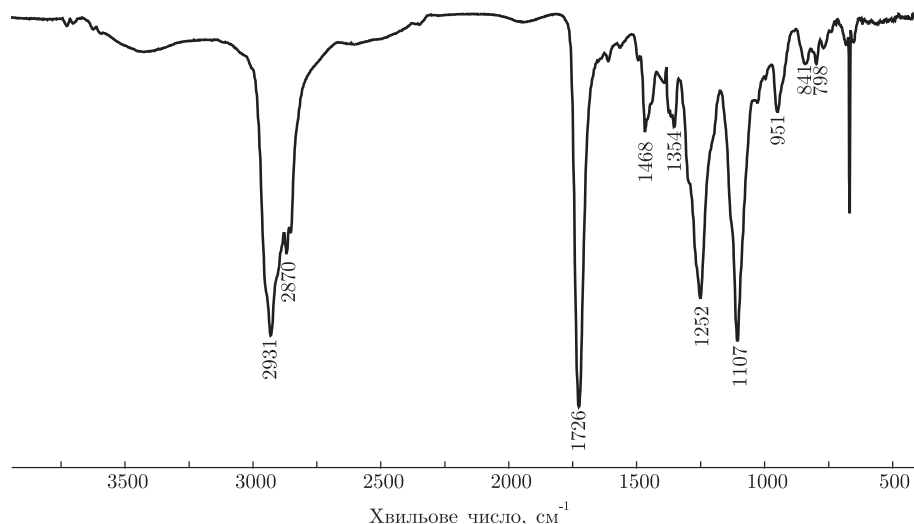


Рис. 1. ІЧ-спектр ДЕПК МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол

Будову МПЕГ-ПМДА-Хол підтверджували методами ІЧ й ПМР спектроскопії та мас-спектрометрії. На рис. 1 наведено типовий ІЧ-спектр ДЕПК, що синтезовано з використанням МПЕГ<sub>550</sub>.

На ІЧ-спектрі зразка МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол (див. рис. 1) спостерігаються смуги поглинання при  $1726\text{ см}^{-1}$ , які відповідають валентним коливанням  $\text{C}=\text{O}$  в естері, а також інтенсивна смуга при  $1252\text{ см}^{-1}$ , що відповідає валентним коливанням  $\text{OSO}-\text{C}$  зв'язків, підтверджує присутність естерних груп у МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол. Поглинання при  $2931\text{--}2870\text{ см}^{-1}$ , що характерні для валентних коливань  $\text{CH}_3$ , свідчать про присутність у молекулах ДЕПК замісника холестерилу. Наявність широкої смуги поглинання при  $3300\text{--}3500\text{ см}^{-1}$  вказує на присутність карбоксильних груп біля ароматичного циклу в усіх зразках дієстерів. Присутність ланцюгів поліоксіетилену підтверджується наявністю інтенсивної смуги при  $1107\text{ см}^{-1}$ , яка характерна для етерних груп ( $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ) [8]. Смуги при  $1468\text{ см}^{-1}$  (валентні площинні  $\text{C}=\text{C}$  коливання) та при  $841\text{ см}^{-1}$  (позаплощинна  $\text{C}-\text{H}$ , яка характерна для 2,4,5,6-заміщених ароматичних ядер) свідчать про присутність ароматичних циклів. Слабоінтенсивна смуга при  $1354\text{ см}^{-1}$  може бути віднесена до деформаційного коливання  $\text{CH}_2$  і вказує на присутність холестерилу.

Будову і склад МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол підтверджує й ПМР спектроскопія.

У ПМР-спектрі МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол (рис. 2) спостерігаються сигнали протонів метильних груп алкільного замісника холестерилу в ДЕПК (протони К, L, M) зі зміщенням  $0,85\text{--}1,0$  м. ч. та протонів метиленових груп цього самого замісника та у циклічних фрагментах холестерилу (N, Y, J) із зміщенням у діапазоні від  $1,0$  до  $2,0$  м. ч., а також сигнали протонів С й В із зміщенням  $4,86$  і  $5,4$  м. ч. відповідно. Група сигналів із зміщенням від  $3,5$  до  $4,5$  м. ч. відповідає сигналам протонів метильної та метиленових груп у ланцюгу МПЕГ (протони G, F, E й F). Сигнали із зсувом  $8$  м. ч. відповідають протонам ароматичного фрагмента залишку піромелітової кислоти. Відношення суми інтегралів сигналів протонів у поліоксіетиленовому заміснику ( $I_{\text{HMPЕГ}}$ ) до сигналів протонів у заміснику холестерилі ( $I_{\text{HХол}}$ ) дорівнює:  $(I_{\text{HMPЕГ}} : 47)/(I_{\text{HХол}} : 43) \approx (51 : 47)/(51,3 : 43) \approx 0,91$ , де  $47$  — кількість протонів у метиленових групах замісника МПЕГ<sub>550</sub>, а  $43$  — у холестерилі. Структура МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол схарактеризована також і мас-спектрами (рис. 3).

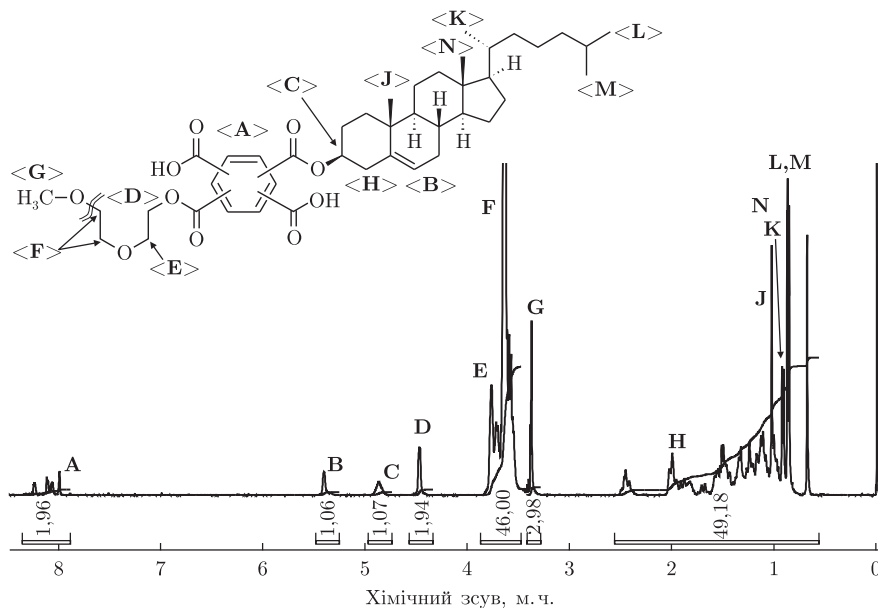


Рис. 2. ПМР спектр зразка МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол

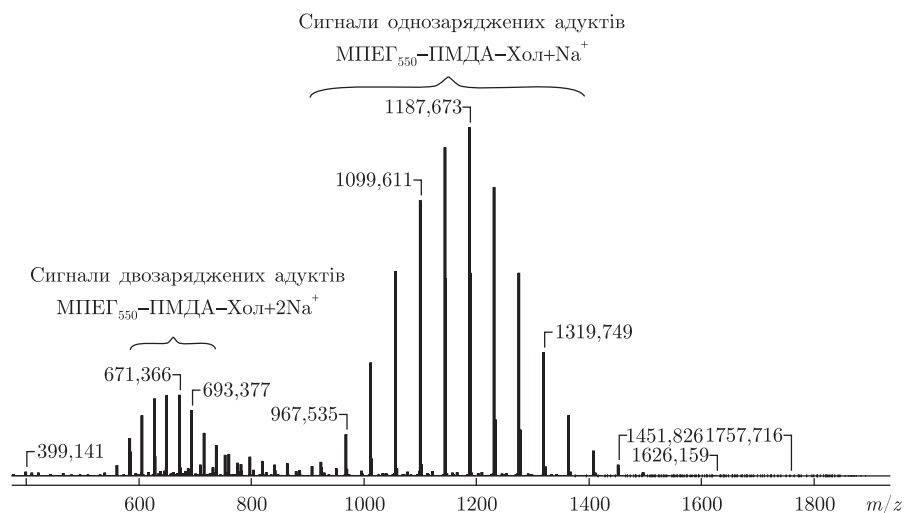


Рис. 3. Мас-спектр МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол, отриманий в режимі визначення позитивно заряджених іонів у присутності трифторацетату натрію

У мас-спектрі зразка присутні сигнали, які відповідають одно- й двозарядженим адуктам цільового продукту з катіоном (катіонами) натрію і, в сукупності з ІЧ й ПМР спектроскопією, підтверджують структуру отриманого продукту.

Синтезовані олігомери МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол є амфифільними речовинами і розчиняються як у полярних розчинниках (водному середовищі), так і в малополярних органічних розчинниках — бензолі, діоксані, тетрагідрофурані, хлороформі, тетрахлорометані. Така амфифільність зумовлена наявністю в структурі ліпофільного фрагмента холестерилу і ланцюгів гідрофільних залишків МПЕГ та їх сольватацією відповідними спорідненими за природою розчинниками.

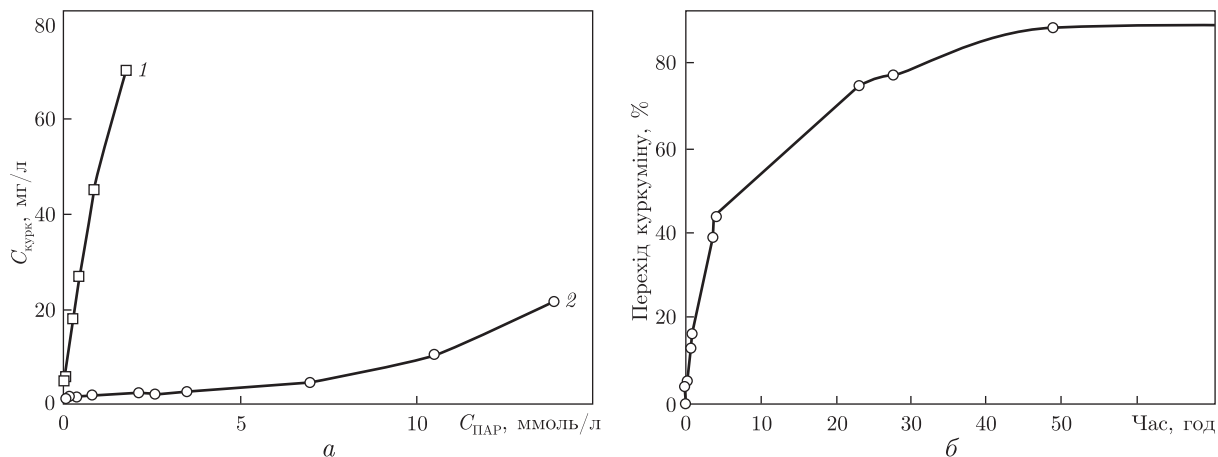


Рис. 4. Солюбілізація і вивільнення куркуміну: *a* — залежність солюбілізації куркуміну від концентрації ПАР у водному розчині (рН 6,5): МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол (1); ДДС (2); *б* — кінетика переходу куркуміну з водного колоїдного розчину МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол в олеофазу 1-октанолу

У водних розчинах ДЕПК — МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол знижують поверхневий натяг на 20 мН/м. ККМ МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол при рН 6,5 визначено за ізотермою поверхневого натягу і становить 1,7 ммоль/л.

Присутність двох карбоксильних груп у фрагменті — залишку піромелітової кислоти дає змогу регулювати поверхневу активність ДЕПК величиною рН водного середовища.

Здатність амфифільних ДЕПК — МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол утворювати міцели дозволяє солюбілізувати ліпофільні водонерозчинні речовини у водних середовищах. Солюбілізаційна здатність розчинів МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол при рН 6,5 і концентраціях, більших за ККМ у розрахунку моль солюбілізату/моль ПАР зростає до певної межі, у випадку бензолу 8,15, а гексану 7,11 моль/моль. Це може свідчити про імобілізацію солюбілізату в ліпофільних “ядрах” міцел, які утворюються фрагментами холестеролу.

Особливо важливою є здатність міцел МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол солюбілізувати у водних розчинах протираковий препарат куркумін. Вміст куркуміну, солюбілізованого у розчинах МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол, зростає симбатно концентрації амфифільного ПАР (рис. 4, *a*). Видно, що солюбілізація куркуміну в розчині ДЕПК істотно більша (див. *a* на рис. 4, крива 1), ніж у розчині додецилсульфату натрію (ДДС) (крива 2).

Актуальним було вивчення переходу солюбілізованого у міцелах МПЕГ<sub>550</sub>-ПМДА-Хол куркуміну з водного розчину з фізіологічним рН 6,5 в олеофазу нашарованого 1-октанолу. Відомо, що ліпідну розчинність найчастіше визначають у 1-октанолі, який добре імітує шар фосфоліпідів, що складають клітинну стінку. Перехід куркуміну з водної фази в 1-октанол, в якому він добре розчинний, визначали колориметрично за калібрувальною кривою (див. *б* на рис. 4). Видно, що практично 90% куркуміну поступово переходить в олеофазу 1-октанолу з водного міцелярного розчину ПАР впродовж 48 год.

Таким чином, вперше було синтезовано амфифільні ПАР: ДЕПК — МПЕГ-ПМДА-Хол, які містять в своїй структурі ліпофільний фрагмент — залишок холестеролу та гідрофільний фрагмент — залишок метилполіоксіетиленгліколю. Підтверджено структуру синтезованих ДЕПК з допомогою мас-спектрометрії, ЯМР й ІЧ спектроскопії. Показано, що у воді макромолекули МПЕГ-ПМДА-Хол утворюють прямі міцели. Визначено

критичну концентрацію міцелоутворення у водному середовищі при рН 6,5. Міцелярні структури ДЕПК можуть слугувати наноконтейнерами ліпофільних речовин у водних середовищах, що робить їх перспективними для створення нових систем транспорту ліків. Показано можливість вивільнення куркуміну з водного колоїдного розчину МПЕГ-ПМДА-Хол у шар олеофази 1-октанолу, що імітує шар фосфоліпідів клітинної стінки.

1. *Sinha R., Kim G. J., Nie S., Shin D. M.* Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery // *Mol. Cancer Ther.* – 2006. – 5, Iss. 8. – P. 1909–1917.
2. *Sou K., Oyajobi B. O., Goins B. et al.* Characterization and cytotoxicity of self-organized assemblies of curcumin and amphiphatic poly(ethylene glycol) // *J. Biomedical Nanotechnology.* – 2009. – 5, Iss. 2. – P. 202–209.
3. *Sahu A., Bora U., Kasoju N. et al.* Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells // *Acta Biomater.* – 2008. – 4, Iss. 6. – P. 1752–1761.
4. *Leung M. H. M., Colangelo H. et al.* Encapsulation of curcumin in cationic micelles suppresses alkaline hydrolysis // *Langmuir.* – 2008. – No 24. – P. 5672–5675.
5. *Bisht S., Feldmann G., Sheeta Soni et al.* Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (“nanocurcumin”): a novel strategy for human cancer therapy // *J. Nanobiotechnology.* – 2007. – 5: 3. – <http://www.jnanobiotechnology.com/content/5/1/3>.
6. *Нейман Р. Э., Вережников В. Н., Курдеева А. П. и др.* Практикум по коллоидной химии латексов и поверхностно-активных веществ. – Москва: Высш. шк., 1972. – 176 с.
7. *Баранова В. И., Бибик Е. Е., Кожеевникова Н. М. и др.* Практикум по коллоидной химии. – Москва: Высш. шк., 1983. – 215 с.
8. *Беллами Л.* Инфракрасные спектры сложных молекул. – Москва: Изд-во иностр. лит., 1963. – 590 с.

Національний університет “Львівська політехніка”

Надійшло до редакції 08.11.2012

**Е. И. Хоменко, О. Г. Будишевская, А. С. Воронов, С. М. Варваренко,  
Е. А. Кудина, И. Т. Тарнавчик, С. А. Воронов**

### **Амфифильные диэфиры пиромеллитовой кислоты с фрагментами холестерина для солюбилизации липофильных соединений**

*Последовательным взаимодействием пиромеллитового диангирида с моноалкиловыми эфирами полиэтиленгликолей с заданными разной длины цепями и холестерином было синтезировано новые амфифильные ПАВ — диэфиры пиромеллитовой кислоты (ДЭПК). Молекулы ДЭПК содержат липофильные фрагменты холестерина и гидрофильные полиоксипропиленовые цепи разной длины и образуют мицеллы в водных средах. Показано, что мицеллы ДЭПК в водных растворах солюбилизируют липофильные соединения (куркумин) и могут повышать их растворимость в водных средах, что делает их перспективными при создании новых систем для доставки лекарств.*

O. I. Khomenko, O. G. Budishevskaya, A. S. Voronov, S. M. Varvarenko,  
O. O. Kudina, I. T. Tarnavchyk, S. A. Voronov

### **Amphiphilic diesters of pyromellitic acid with cholesterol fragments for solubilization of lipophilic substances**

*By consistent interactions between pyromellitic dianhydride (PMDA) and polyethylene glycol mono-alkyl ethers with different chain lengths and cholesterol, new amphiphilic surfactants — diesters of pyromellitic acid (DEPA) — are synthesized. DEPA molecules contain lipophilic cholesterol fragments and hydrophilic polyoxyethylene chains with different lengths and form micelles and micellar aggregates in aqueous environments. It is shown that the DEPA micelles and micellar aggregates in aqueous solutions solubilize lipophilic substances (curcumin) and are able to increase the solubility of lipophilic substances in aqueous environments, making them promising for the creation of new systems for drug delivery.*