

Н. М. Селиванова, Ю. С. Мясникова, Ю. Г. Галяметдинов

ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА α -ТОКОФЕРОЛ АЦЕТАТА В МИЦЕЛЛАХ МОНОДОДЕЦИЛОВОГО ЭФИРА ДЕКАЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ И ТРИБЛОК-СОПОЛИМЕРА PLURONIC P123 В ВОДНЫХ СРЕДАХ

Ключевые слова: мицелла, неионный ПАВ, блок-сополимер, биологически активное вещество, витамин Е.

Исследовано инкапсулирование биоактивной субстанции витамина Е (α -токоферол ацетата) в молекулярно-организованных структурах - мицеллах оксиэтилированных соединений: блок-сополимера Pluronic P123 и монододецилового эфира декаэтиленгликоля $C_{12}EO_{10}$. Проведена оценка изменения агрегационных свойств ПАВ и полимера в присутствии витамина Е. Степень солюбилизации и коэффициенты распределения α -токоферол ацетата между мицеллами и водой были измерены методом флуоресцентной спектроскопии. Найдено, что коэффициент распределения витамина Е в мицеллах $C_{12}EO_{10}$ составляет $359,7 \pm 0,007$, а в мицеллах Pluronic P123 – $182,8 \pm 0,032$, что свидетельствует о лучшем распределении витамина Е в мицеллах неионного ПАВ, обусловленное структурой мицеллярных агрегатов.

Keywords: micelle, nonionic surfactant, block-copolymer, biologically active substance, vitamin E.

Encapsulation of bioactive substance vitamin E (α -tocopherol acetate) in molecular organized structures – micelles of hydroxyethylated compounds: block-copolymer Pluronic P123 and decaethylene glycol monododecyl ether $C_{12}EO_{10}$ have been studied. The aggregation properties of surfactant and polymer in the presence of vitamin E have been investigated. Degree of solubilization and partition coefficient of α -tocopherol acetate between micelles and water have been measured by fluorescence spectroscopy. Partition coefficient of α -tocopherol acetate between micelles of $C_{12}EO_{10}$ and water is $359,7 \pm 0,007$ and in micelles of Pluronic P123 is $182,8 \pm 0,032$. It conforms to intensive partition of vitamin E in surfactant micelles due to the structure of micellar aggregates.

Введение

Одним из актуальных направлений химии и биомедицины является поиск эффективных транспортных систем доставки лекарственных препаратов и биоактивных субстанций. Селективная адресная доставка к конкретному органу или ткани не только улучшает терапевтический эффект, но и позволяет снизить количество лекарственного средства для достижения терапевтического отклика, что приводит к минимизации негативных побочных эффектов [1]. В этом плане привлекательными являются коллоидные системы с размером частиц < 1 мкм. Наиболее простыми самоорганизованными структурами являются мицеллы растворов коллоидных ПАВ. В зависимости от среды и типа формируемых мицелл возможна солюбилизация гидрофобных или гидрофильных субстанций в их ядре. В работе [2] показано, что мицеллярные среды позволяют улучшить растворимость и биодоступность гидрофобных препаратов. Небольшой размер мицелл (10-100 нм) способствует их эффективному накоплению в патологической ткани с повышенной проницаемостью, например, в опухолях. В настоящее время активно используются в качестве фармацевтических наноконтейнеров полимерные мицеллы. Полимерные ПАВ повышают возможность применения лекарственных веществ, имеющих ограниченную растворимость в воде, увеличивая их гидрофильность. Кроме того, использование амфифильных полимеров по сравнению с низкомолекулярными ПАВ имеет ряд преимуществ, таких как меньшая токсичность и пролонгирующий эффект [3,4]. В работе [5] показано, что мицеллы сопряженных

полиэтиленгликолей демонстрируют низкую токсичность и высокую стабильность. Обладая малым значением ККМ (порядка 10^{-5} моль/л) мицеллы сохраняют целостность структуры даже при разведении в бассейне крови во время предполагаемого терапевтического применения. В этом плане интерес представляют оксиэтилированные ПАВ и блок-сополимеры окиси пропилена и окиси этилена, обладающие высокими поверхностно-активными свойствами и низким значением ККМ. Ранее нами исследовались поверхностно-активные свойства растворов неионных ПАВ в присутствии добавок ионов лантаноидов и длинноцепочного спирта [6-8]. Были установлены закономерности формирования мицеллярных и везикулярных структур. В работе [9] исследованы поверхностно-активные свойства амфифильного блок сополимера Pluronic P123 в водных средах. Показано, что поверхностная активность блок-сополимера близка к неионным ПАВ. Найдено, что с уменьшением концентрации полимера наблюдается тенденция к образованию более плотных агрегатов. Данная работа является продолжением этих исследований, целью которых являлось исследование солюбилизирующей способности мицелл неионного ПАВ - монододецилового эфира декаэтиленгликоля и триблок-сополимера Pluronic P123 в отношении жирорастворимого витамина Е. Витамин Е является биологически активным соединением, участвует в регуляции окислительных процессов, влияет на клеточное дыхание, предотвращает коагуляцию крови в сосудах. В этой связи актуальным является выяснение закономерностей инкапсулирования гидрофобной биоактивной субстанции в мицеллах

различного типа для разработки эффективных транспортных систем.

Экспериментальная часть

В работе использовались коммерческие вещества блок-сополимер Pluronic P123, состоящий из оксиэтиленовых и оксипропиленовых звеньев $(\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_{70}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}\text{H})$ и монододециловый эфир декаэтиленгликоля $\text{C}_{12}\text{EO}_{10}$ (где $\text{EO}_{10} = (-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_n$) фирмы Aldrich без дополнительной обработки. Витамин Е (α -токоферол ацетат) представлял собой 30% масляный раствор производства ОАО «Марбиофарм».

Приготовление растворов

Растворы $\text{C}_{12}\text{EO}_{10}$ готовились путем последовательного разбавления в диапазоне концентраций $2,456 \cdot 10^{-3} - 1,021 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Растворы Pluronic P123 были приготовлены путем взвешивания и последующего растворения каждого образца. Концентрационный диапазон для Pluronic P123 составлял: 0,8 – 7% масс. Расчетные навески блок-сополимера P123 и ПАВ растворяли в бидистиллированной воде при перемешивании при температуре 25 °С. Для установления фазового равновесия растворы стояли в течение суток. Концентрация витамина Е в исследуемых растворах составляла $6,1 \cdot 10^{-6}$ моль/л

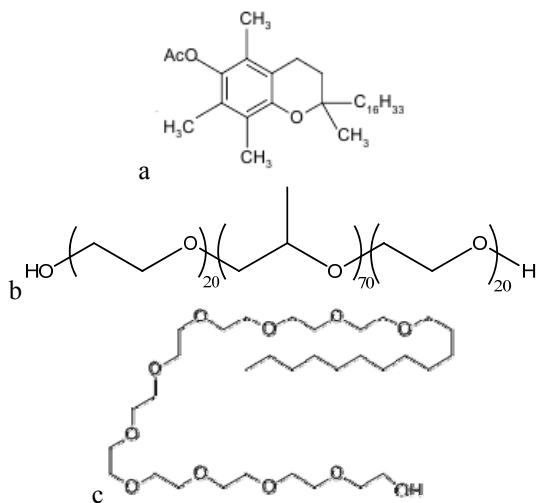


Рис. 1 – Структурные формулы α -токоферол ацетата (а), триблок-сополимера Pluronic P123 (б), монододецилового эфира декаэтиленгликоля (с)

Для измерения размеров мицеллярных агрегатов использовался метод динамического рассеяния света (ДРС) на приборе Malvern Zetasizer Nano компании Malvern Instruments. Перед измерениями растворы для удаления пыли фильтровали через гидрофильный фильтр Millipore фирмы Millex HV Filter Unit 0,45 мкм. Угол рассеяния света составлял $\theta=173^\circ$.

Спектры флуоресценции исследуемых систем регистрировали на сканирующем

спектрофлуориметре Cary Eclipse фирмы Varian. Параметры щели возбуждения и эмиссии 5 и 10 нм. Витамин Е вводился в растворы в виде аликвоты объемом 3 мкл. Измерения проводили после отстаивания растворов в течение 20 мин. Длина волны возбуждения витамина Е $\lambda = 227$ нм, эмиссии – $\lambda = 330$ нм.

Результаты и обсуждения.

Агрегационные свойства $\text{C}_{12}\text{EO}_{10}$ и Pluronic P123 в присутствии витамина Е

Анализ агрегационных свойств водных систем P123/VE и $\text{C}_{12}\text{EO}_{10}/\text{VE}$ проводился в концентрационных пределах выше значения ККМ исследуемых поверхностно-активных веществ. На рисунке 3 приведены кривые распределения числа частиц по размеру.

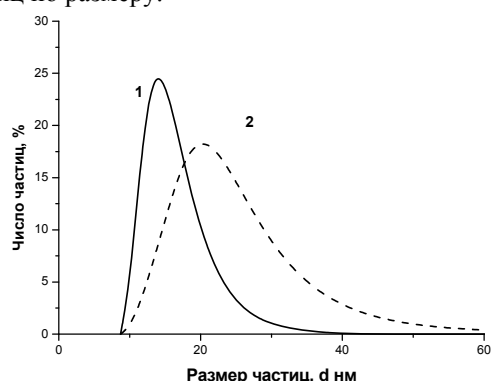


Рис. 2 – Распределение числа частиц по размеру для систем (1) Pluronic P123/VE C=1% масс. (2) и $\text{C}_{12}\text{EO}_{10}/\text{VE}$ C=1% масс. в водной среде

Анализ кривых показал, что в растворах наблюдается мономодальное распределение частиц по размеру с максимумами (d_h) 14 и 22 нм для полимера и ПАВ соответственно. Индекс полидисперсности для систем P123/VE и $\text{C}_{12}\text{EO}_{10}/\text{VE}$ равен 0,171 и 0,297 соответственно, что характеризует системы как монодисперсные. Согласно [10] в индивидуальной системе $\text{C}_{12}\text{EO}_{10}/\text{H}_2\text{O}$ размер мицелл составляет порядка 6-8 нм, в случае P123/ H_2O формируются агрегаты диаметром 14 нм [9]. Добавление витамина Е приводит к существенному увеличению размеров мицелл неионного ПАВ, что свидетельствует о встраивании гидрофобной субстанции в ядро мицеллы. В случае полимерной системы, размеры мицелл увеличиваются, но в меньшей степени.

Солюбилизирующая способность мицелл $\text{C}_{12}\text{EO}_{10}$ и Pluronic P123 по данным флуоресцентного анализа

Поскольку витамин Е обладает собственной флуоресценцией, для контроля его биораспределения использовался спектральный метод. В спектрах возбуждения (рис. 3а) наблюдаются максимумы при 227 нм и 282 нм. Спектры флуоресценции при $\lambda_{\text{ex}}=227$ нм представлены на рисунке 3б. Отчетливо видно, что

интенсивность флуоресценция витамина Е увеличивается при солюбилизации в мицеллярных средах. Причем интенсивность эмиссии возрастает при переходе от мицелл коллоидного ПАВ к мицеллам блок-сополимера.

Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации ПАВ и блок-сополимера имела вид кривой с насыщением.

Степень солюбилизации витамина Е в мицеллах ПАВ и блок-сополимера определяли согласно [11]:

$$\alpha \equiv \frac{S_m}{S_m + S_w}, \quad (1)$$

где S_m и S_w – концентрация вещества в мицеллярной и водной фазах соответственно. Для ее количественной оценки был использован метод, основанный на изменении интенсивности флуоресценции растворенного вещества при его солюбилизации в мицеллах.

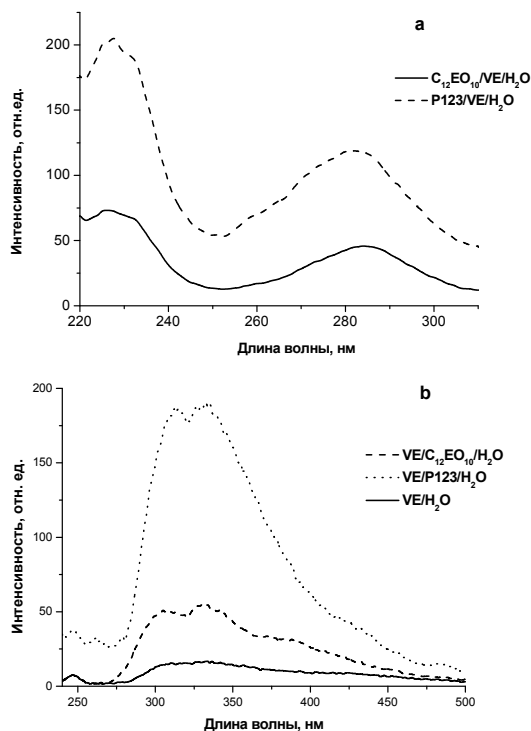


Рис. 3 – Спектры возбуждения (а) и флуоресценции (б) α -токоферол ацетата, солюбилизированного в мицеллярных средах

Степень солюбилизации рассчитывали согласно уравнению:

$$\alpha = \frac{I - I_0}{I_{\max} - I_0}, \quad (2)$$

где $I - I_0$ соответствует концентрации вещества в мицеллярной фазе, а $I_{\max} - I_0$ пропорционально суммарной концентрации вещества в мицеллярной и водной фазах.

На рисунке 4 представлены зависимости степени солюбилизации витамина Е от концентрации поверхностно-активных веществ. Анализ кривых показал, что степень солюбилизации

увеличивалась по мере увеличения концентрации полимера и ПАВ.

Для оценки сродства веществ к мицеллам использовали коэффициент распределения P , который определяется как соотношение локальных концентраций веществ в мицеллярной и водной фазах [11]:

$$P = \frac{S_m V_w}{S_w V_m}, \quad (3)$$

где S_m и S_w – концентрация растворенного вещества в мицеллярной и водной фазах, V_w и V_m – объем соответствующих фаз. Коэффициент распределения согласно [12] может быть определен по уравнению:

$$\frac{1}{\alpha} = \frac{100}{\bar{V}_0 P (C - \text{ККМ})} + 1 - \frac{1}{P}, \quad (4)$$

где C – концентрация ПАВ (в % масс.), $\bar{V}_0$ – парциальный мольный объем ПАВ (в $\text{см}^3/\text{г}$), коэффициент 100 переводит процентную концентрацию ПАВ в $\text{г}/\text{см}^3$.

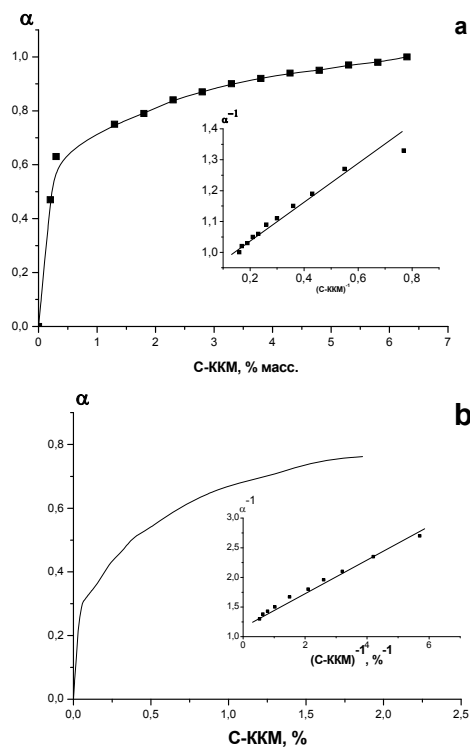


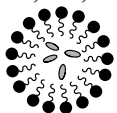
Рис. 4 – Зависимость степени солюбилизации витамина Е от концентрации P123 (а) и $C_{12}EO_{10}$ (б) в водной среде. В виде вкладки представлены линейные зависимости интенсивности флуоресценции витамина Е от концентрации $C_{12}EO_{10}$ и P123 в двойных обратных координатах, соответствующих уравнению (4)

Коэффициенты линейных зависимостей, а также погрешность отклонения от экспериментальных значений рассчитывали по методу наименьших квадратов при в программном пакете Origin 8.0.

Найденные коэффициенты распределения витамина Е между водным раствором и мицеллами Pluronic P123 и $C_{12}EO_{10}$ представлены в таблице 1.

Полученные данные показывают, что наиболее эффективная солюбилизация биоактивной субстанции наблюдается в мицеллах неионного ПАВ. Коэффициент распределения α -токоферол ацетата в $C_{12}EO_{10}$ выше в 2 раза по сравнению в мицеллами блок-сополимера. Вероятно, это может быть обусловлено различной структурой агрегатов. В случае блок-сополимера углеводородное ядро мицеллы формируется оксипропиленовыми звеньями и имеет менее гидрофобную природу по сравнению с коллоидным ПАВ. Поэтому жирорастворимая биоактивная субстанция более эффективно инкорпорируется в гидрофобном ядре классических мицелл.

Таблица 1 – Коэффициенты распределения α -токоферол ацетата в структурах мицелл коллоидного ПАВ и блок-сополимера

$P \pm \Delta P$	
Pluronic P123 – вода	$C_{12}EO_{10}$ – вода
182,8 $\pm$ 0,032	359,7 $\pm$ 0,007
	

Заключение

В данной работе проведены исследования солюбилизирующих способностей амфифильного триблок-сополимера Pluronic P123 и монододецилового эфира декаэтиленгликоля $C_{12}EO_{10}$. По данными ДРС показано инкапсулирование витамина Е в мицеллах Pluronic P123 и $C_{12}EO_{10}$ в водных средах с образованием агрегатов, размеры которых составляют (d_h) 14 и 22 нм соответственно. По данным флуоресцентной спектроскопии определены степени солюбилизации

и коэффициенты распределения α -токоферол ацетата между водной средой и мицеллами исследованных веществ. Установлено, что солюбилизация витамина Е в мицеллах $C_{12}EO_{10}$ происходит интенсивнее в два раза, по сравнению с блок-сополимером, что обусловлено различной структурой гидрофобного ядра мицелл.

Литература

1. Basak R., Bandyopadhyay R., Langmuir, 29, 4350–4356 (2013);
2. Shirin A., Cosgrove T., Castle Th.C., Grillo I., Prescott S.W., J. Phys. Chem. B, 116, 11545–11551 (2012);
3. Yuk S.H., Oh K.S., Cho S.H., Kim S.Y., Oh S., Lee J.H., Kim K., Kwon I.C., Mol. Pharmaceutics, 9, 230–236 (2012);
4. Chen Y.Yu., Wu H.C., Sun J.-S., Dong G.-C., Wang T.-W., Langmuir, 29, 3721–3729 (2013);
5. Torchilin, V.P., Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 235–252 (2002);
6. Selivanova, N.M., Galeeva A.I., Gubaydullin A.T., Lobkov V.S., Galyametdinov Y.G., Journal of Physical Chemistry B, 116, 735–742 (2012);
7. Selivanova N.M., Galeeva A.I., Sukhanov A.A., Gnezdilov O.I., Chachkov D.V., Galyametdinov Y.G., Journal of Physical Chemistry B, 117(17), 5355–5364 (2013);
8. Селиванова Н.М., Кузовкова М.А., Галяметдинов Ю.Г., Вестник Казанского технологического университета, № 16 (4), С. 85–88 (2013);
9. Селиванова Н.М., Мясникова Ю.С., Галяметдинов Ю.Г., Вестник Казанского технологического университета, № 18, С. 129–133 (2013);
10. Селиванова Н.М., Макарова Д.В., Галяметдинов Ю.Г., Известия ВУЗов. Химия и химическая технология, Т. 56, №. 10 С. 70–74 (2013);
11. Бугрин В. С., Козлов М. Ю., Баскин И. И., Мелик-Нубаров Н.С., Высокомолекулярные соединения, Серия А, 49, № 4, С. 701–712 (2007);
12. Melik-Nubarov N.S., Kozlov M.Yu., Colloid. Polym. Sci. 276, 381–387 (1998).