

УДК 541(64+183):539.2

МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СОЛЮБИЛИЗАЦИЮ В МИЦЕЛЛАХ ПОЛИАЛКИЛЕНОКСИДНЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ¹

© 2007 г. В. С. Бугрин, М. Ю. Козлов, И. И. Баскин, Н. С. Мелик-Нубаров

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова.

Химический факультет
119992 Москва, Ленинские горы

Поступила в редакцию 01.08.2006 г.
Принята в печать 09.10.2006 г.

Коэффициенты распределения 39 низкомолекулярных веществ между водой и мицеллами блок-сополимера этиленоксида и пропиленоксида (Pluronic P85) и монолаурилового эфира ПЭО (Brj 35) были измерены методами флуоресцентной спектроскопии, анизотропии флуоресценции и кинетики диализа. Набор исследованных веществ включал ароматические углеводороды, фенолы и нафтолы, ксантеновые красители, антрациклиновые антибиотики и порфирины. Проведен многофакторный анализ полученных коэффициентов распределения, основанный на принципе линейности свободных энергий. Он показал, что протонодонорность веществ способствует их солюбилизации в мицеллах Pluronic и не влияет на солюбилизацию в мицеллах монолаурата ПЭО. Данное различие указывает на то, что при солюбилизации в мицеллах Pluronic вещества попадают в гидрофобное ядро, состоящее из блоков ППО.

ВВЕДЕНИЕ

Практическое использование амфи菲尔ных полимеров в различных областях науки и техники во многом определяется их способностью к образованию мицелл, которые могут солюбилизовать низкомолекулярные соединения [1]. Мицеллы полимерных ПАВ часто используются для экстракции и разделения биологически активных соединений. Их также можно рассматривать как наноконтейнеры для доставки лекарств и пролонгирования их действия [2–4]. Преимущества амфи菲尔ных полимеров по сравнению с низкомолекулярными ПАВ заключаются в их меньшей токсичности и большей стабильности мицелл *in vivo* [5].

Выбор ПАВ для солюбилизации данного соединения представляет собой непростую задачу и требует исследования селективности мицелляр-

ных систем [6]. Чтобы решить эту проблему, необходимо исследовать вклад различных типов межмолекулярных взаимодействий в солюбилизацию соединений в данной мицеллярной системе. Для этого свободную энергию солюбилизации представляют в виде линейной комбинации вкладов различных типов межмолекулярных сил: дисперсионных, водородных и когезионных, причем для каждого из исследуемых соединений рассчитывается параметр, отвечающий данному типу взаимодействий [7, 8]. Такой анализ был проведен ранее для ряда низкомолекулярных ПАВ. Было показано, что природа ПАВ существенно влияет на его способность солюбилизовать соединения определенного типа. Оказалось, что наличие протонодонорных групп в молекуле солюбилизуемого вещества снижает его сродство к мицеллам додецилсульфата натрия [9]. Наоборот, мицеллы цетилпиридиний хлорида имеют явное предпочтение к солюбилизации протонодонорных соединений [10].

Несмотря на большой интерес к мицеллам Pluronic, анализ избирательности их взаимодействия с низкомолекулярными соединениями до сих пор

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 06-03-32403) и гранта “Государственной поддержки ведущих научных школ” (НШ5899.2006.3).

E-mail: melik.nubarov@genebee.msu.ru (Мелик-Нубаров Николай Сергеевич).

Таблица 1. Структурные параметры исследованных ПАВ на основе полиэтиленоксида

ПАВ	M_w	ККМ, %	Радиус ядра мицелл, нм	Эффективный радиус взаимодействия мицелл, нм	Удельный парциальный объем \bar{V}_0 , см ³ /г	Число агрегации мицелл q
Pluronic P85						
<chem>HO(CH2CH2O)26CH(CH2O)40CH3</chem>	4500 [11]	0.003 [12]	3.7 ± 0.3 [13]	7.3 ± 0.3 [13]	0.9054 [15]	75 ± 16 [13]
Brij 35						
<chem>C12H25O-(CH2CH2O)23-H</chem>	1200 [11]	0.001 [16]	1.8 ± 0.1 [17]	3.5 ± 0.1 [17]	0.8986 [16]	54.2 ± 0.6 [16]

не проводился. Такой анализ представляет интерес не только с точки зрения предсказания способности низкомолекулярных лекарств солюбилизоваться в мицеллах Pluronic, но и может дать количественную информацию о способности полиалкиленоксидных ПАВ взаимодействовать с различными соединениями в биологическом окружении.

В настоящей работе мы исследовали солюбилизацию низкомолекулярных веществ в мицеллах двух неионогенных ПАВ на основе алкиленоксидов – блок-сополимера этиленоксида и пропиленоксида (Pluronic P85) и лаурил-ПЭО (Brij 35).

Известно, что оба ПАВ образуют сферические мицеллы, гидрофильная опушка которых состоит из ПЭО, а гидрофобное ядро сформировано ППО-блоками в случае Pluronic P85 и дodeцильными радикалами – в случае Brij 35 [11–17]. При этом граница между гидрофильной опушкой и ядром мицеллы пллюроника в значительной мере размыта ввиду хорошей термодинамической совместимости ППО и ПЭО [14]. Некоторые физические параметры использованных ПАВ приведены в табл. 1.

Чтобы выявить особенности солюбилизующей способности двух ПАВ на основе ПЭО, мы исследовали взаимодействие с этими мицеллами 39 низкомолекулярных соединений различной структуры и попытались определить структур-

ные критерии, существенные для солюбилизации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерческие препараты блок-сополимера этиленоксида и пропиленоксида (Pluronic®P85) и монолаурилового эфира полиэтиленоксида (Brij®35) фирмы "Serva" (Германия). Нафталин, антрацен, бенз[а]антрацен, пирен, перилен, фенол, 1-нафтол, 2-нафтол, 1,3-дигидроксинафталин, 2,3-дигидроксинафталин, 1,5-дигидроксинафталин, 2,7-дигидроксинафталин, 4-хлор-1-нафтол, флуоресцеин, 4',5'-дийодфлуоресцеин, 5(6)-карбоксифлуоресцеин, эозин изотиоцианат, родамин В изотиоцианат, даунорубицин, акридин, L-тирозин, этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина были от "Sigma-Aldrich" (США). 1,4-Нафтохинон приобретен у фирмы "Merck" (Германия), рибофлавин – у фирмы ICN (США), а доксорубицин гидрохлорид – у Института антибиотиков (Россия). Использованные в работе растворители, компоненты буферных растворов и соли были марки ос. ч. Все порфирины, использованные в данной работе, любезно предоставлены А.Б. Соловьевой (Институт химической физики РАН).

Алкилпроизводные тиоуредилэозина синтезировали путем модификации изотиоцианата эозина В алифатическими аминами разной длины. Для этого 20 мг эозина В изотиоцианата (28 мкмоль) растворяли в 1 мл безводного ДМФА и добавляли пятикратный мольный избыток про-

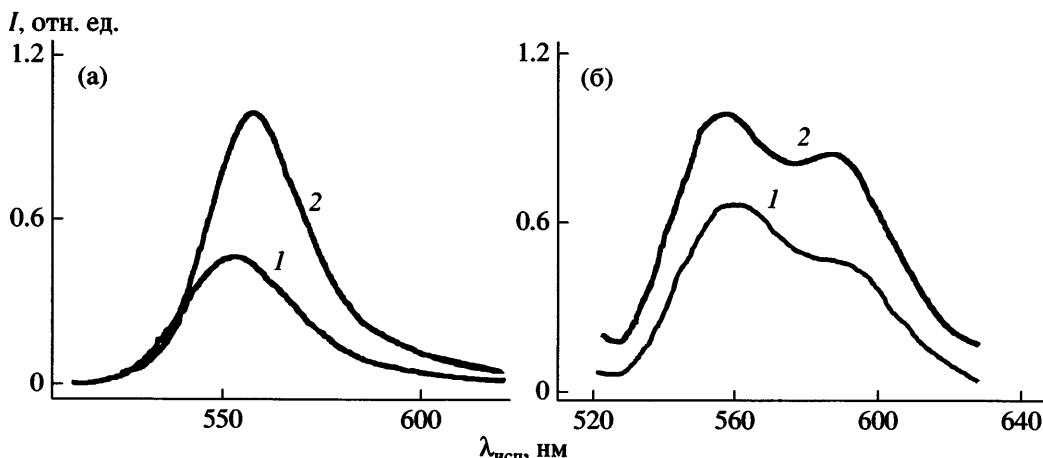


Рис. 1. Спектры флуоресценции N-эозин-N'-пропилтиомочевины (а) и доксорубицина (б) в водном растворе (1) и после солюбилизации в 10% Pluronic P85 (а) и Brij 35 (б) (2). Спектральные характеристики и концентрации флуорофоров указаны в табл. 2.

пиламина, октиламина, дециламина, додециламина или октадециламина. Реакционную смесь инкубировали в течение ночи при комнатной температуре, после чего выделяли полученный продукт с помощью препаративной ТСХ на пластинах силикагеля ("Merck", Германия), используя в качестве элюента смесь этанол : хлороформ (1 : 1). Далее продукт элюировали с пластин с помощью этанола, тщательно фильтровали и высушивали в вакууме.

Мицеллярные растворы ПАВ и солюбилизуемых веществ готовили в водном растворе, содержащем 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM H₃BO₃, 10 mM лимонной кислоты и 50 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.0. Все образцы перед измерением инкубировали при 37°C.

Спектры флуоресценции солюбилизуемых веществ записывали с помощью флуоресцентного спектрофотометра "Hitachi" (модель 650-10S, Япония), терmostатируя кюветное отделение при 37°C. Использованные концентрации солюбилизуемых соединений и длины волн возбуждения и флуоресценции представлены в табл. 2.

Степень солюбилизации низкомолекулярных соединений в мицеллах ПАВ α определяли как

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

где S_m и S_w – концентрация вещества в мицеллярной и водной фазах соответственно. Для ее коли-

чественной оценки были использованы методы, основанные на изучении изменения интенсивности флуоресценции растворенного вещества при его солюбилизации в мицеллах; смещения спектров солюбилизуемого соединения; изменении анизотропии флуоресценции вещества и уменьшении скорости его диффузии через полупроницаемую мембрану.

Флуоресценция большинства исследованных веществ росла по мере увеличения концентрации ПАВ, как это показано на примере N-эозин-N'-пропилтиомочевины на рис. 1а. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации ПАВ имела вид кривой с насыщением, как показано на рис. 2а на примере тетраметилового эфира гематопорфирина IX и 5,10,15,20-тетракис-(4-метоксифенил)порфирина. Полагая, что концентрация соединения, связанного с мицеллами, S_m пропорциональна изменению интенсивности флуоресценции ($I - I_0$), а максимальное изменение флуоресценции от начального значения I_0 до значения, соответствующего плато I_{\max} ($I_0 - I_{\max}$) пропорционально суммарной концентрации солюбилизуемого вещества в растворе ($S_m + S_w$), степень солюбилизации оценивали по формуле

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

Для ряда соединений наблюдали изменение соотношения интенсивностей пиков в спектрах флуоресценции. В качестве характерного приме-

Таблица 2. Концентрации и спектральные характеристики веществ, солюбилиземых в мицеллах ПАВ

Образец №	Соединение	Концентрация $c \times 10^8$, моль/л	λ , нм	
			возбуждение	испускание
Ароматические углеводороды и их производные				
1	1,6-Дифенилгексатриен-1,3,5	100	366	433
2	Нафталин	2000	280	330/340*
3	Антрацен	800	355	410
4	Бенз[а]антрацен	200	290	430
5	Пирен	30	333	374
6	Перилен	100	350	443
Фенолы и нафтоловы				
7	Фенол			
8	1,4-Гидрохинон	1000	280	335
9	1,4-Нафтохинон	1000	354	408
10	1-Нафтол	400	325	380
11	2-Нафтол	400	325	380
12	1,3-Дигидроксинафталин	200	325	380
13	2,3-Дигидроксинафталин	200	325	380
14	1,5-Дигидроксинафталин	200	325	380
15	2,7-Дигидроксинафталин	200	325	380
16	4-Хлор-1-нафтол	1000	310	360
Ксантеновые красители и их производные				
17	Флуоресцеин	10	495	520
18	4',5'-Дийодфлуоресцеин	60	505	555
19	5(6)-Карбоксифлуоресцеин	6	495	515
20	Эозин карbamотиоевая О-кислота	100	520	545
21	N-Эозин-N'-пропилтиомочевина	100	500	560
22	N-Эозин-N'-октилтиомочевина	100	495	555
23	N-Эозин-N'-декилтиомочевина	100	495	555
24	N-Эозин-N'-додецилтиомочевина	100	495	555
25	N-Эозин-N'-октадецилтиомочевина	100	495	555
26	Родамин В карbamотиоевая О-кислота	100	520	575
Антрациклические антибиотики				
27	Доксорубицин	100	475	560/585*
28	Даунорубицин	100	470	560/585*
Порфирины				
29	Мезо-тетрафенилпорфирина	10	420	655
30	5,10,15,20-Тетракис-(4-аминофенил)порфирина	20	418	670
31	5,10,15,20-Тетракис-(3-сульфо-4-метоксифенил)порфирина	1	515	620
32	5,10,15,20-Тетракис-(4-метоксифенил)порфирина	2	425	660
33	5,10,15,20-Тетракис-(4-нитрофенил)порфирина	10	425	655
34	Гематопорфирина IX, тетраметиловый эфир	10	403	625
35	Протопорфирина IX, диэтиловый эфир	70	407	638
36	Копропорфирина III, тетраметиловый эфир	100	400	628
Соединения, не вошедшие ни в одну из групп				
37	Акридин	1000	358	435
38	N-Ацетил-L-тироzin, этиловый эфир	2000	270	330
39	Рибофлавин	100	445	525

* Измерения проводили на двух значениях длины волн, соответствующих максимумам спектра испускания.

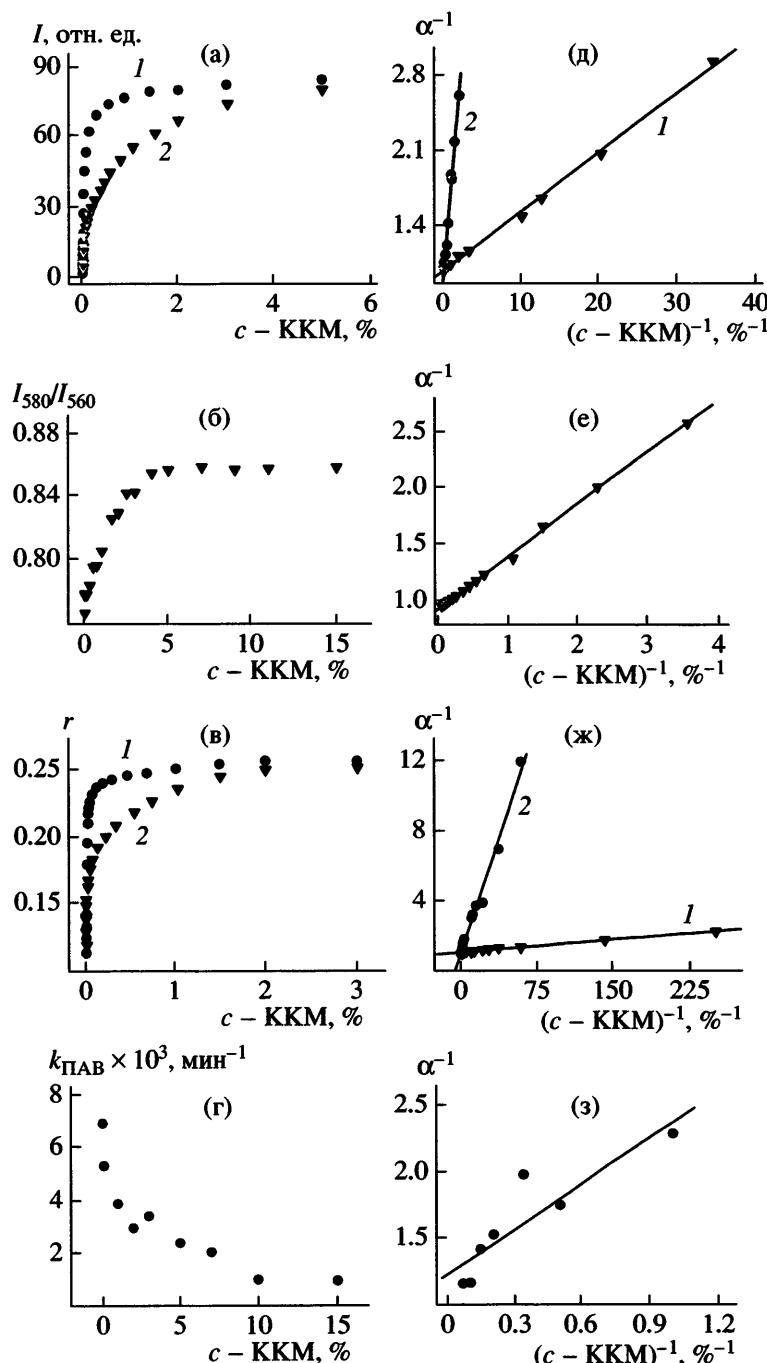


Рис. 2. Типичные зависимости интенсивности флуоресценции (а), соотношения пиков флуоресценции (б), анизотропии флуоресценции (в) и наблюдаемой константы скорости диализа (г) некоторых соединений от концентрации ПАВ. а, б, д, е – солюбилизация соединений в мицеллах Brij 35; в, г, ж, з – в мицеллах Pluronic P85, д–з – линеаризация этих зависимостей в двойных обратных координатах, соответствующих уравнению (8). а и д – тетраметиловый эфир гематопорфирина IX (1) и 5,10,15,20-тетракис-(4-метоксифенил)порфирин (2); б и е – доксорубицин; в и ж – N-эозин-N'-октадецилтиомочевина (1) и Родамин В карбамотиоевая О-кислота (2); г и з – фенол.

ра на рис. 1б показаны спектры флуоресценции доксорубицина в отсутствие ПАВ и в присутствии 10% Brij 35. В этом случае для определения степени солюбилизации рассчитывали соотношение

интенсивности двух пиков флуоресценции (I_1/I_2), которое плавно изменялось с ростом концентрации ПАВ и в области высоких концентраций выходило на плато, как показано на рис. 2б. Пола-

гая, что величина $(I_1/I_2)_{\max}$ соответствует солюбилизации всего содержащегося в растворе флуорофора в мицеллах, степень солюбилизации определяли как

$$\alpha = \frac{(I_1/I_2) - (I_1/I_2)_0}{(I_1/I_2)_{\max} - (I_1/I_2)_0}, \quad (3)$$

где $(I_1/I_2)_0$ – соотношение интенсивностей в отсутствие ПАВ.

Анизотропию флуоресценции солюбилизованного вещества r , показывающую степень его вращательной и поступательной подвижности, рассчитывали следующим образом:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (4)$$

Здесь I_{\parallel} и I_{\perp} – интенсивность поляризованной флуоресценции, измеренной при параллельных и скрещенных поляризаторах. Как и в двух предыдущих случаях, анизотропия флуоресценции плавно увеличивалась при повышении концентрации ПАВ и выходила на плато, соответствующее полной солюбилизации флуорофора в мицеллах (рис. 2в). В этом случае величину α находили так:

$$\alpha = \frac{r - r_0}{r_{\max} - r_0}, \quad (5)$$

где r_0 – анизотропия флуоресценции в отсутствие ПАВ, а r_{\max} – анизотропия флуоресценции низкомолекулярного соединения, полностью солюбилизованного в мицеллах.

Ранее было показано [18], что солюбилизация вещества в мицеллах приводит к уменьшению скорости его диффузии через полупроницаемую мембрану (например, рис. 2г для фенола). Соотношение наблюдаемой константы скорости диффузии вещества в отсутствие ПАВ k_0 к константе скорости диффузии в присутствии ПАВ $k_{\text{ПАВ}}$ позволяет вычислить степень солюбилизации, согласно уравнению

$$\alpha = 1 - \frac{k_0}{k_{\text{ПАВ}}} \quad (6)$$

Константы скорости диффузии вещества через диализную мембрану мы оценивали, согласно ранее описанной методике [18], используя термо-

стацируемую диализную ячейку, оснащенную проточным УФ-детектором (BioRad).

Степень солюбилизации вещества в мицеллах зависит от концентрации ПАВ и поэтому не является термодинамической характеристикой взаимодействия вещества с мицеллами. Для оценки сродства веществ к мицеллам ПАВ использовали коэффициент распределения P , который определяется как соотношение локальных концентраций вещества в мицеллярной и водной фазах:

$$P = \frac{S_m V_w}{S_w V_m}, \quad (7)$$

где S_m и S_w – концентрация растворенного вещества в мицеллярной и водной фазах, V_w и V_m – объем соответствующих фаз. Согласно работе [18], коэффициент распределения может быть определен из зависимости степени солюбилизации α от концентрации мицелл по уравнению

$$\frac{1}{\alpha} = \frac{100}{\bar{V}_0 P} \frac{1}{(c - \text{KKM})} + 1 - \frac{1}{P} \quad (8)$$

Здесь c – концентрация ПАВ (в мас. %), \bar{V}_0 – парциальный мольный объем ПАВ (в г/см³), а коэффициент 100 переводит процентную концентрацию ПАВ в г/см³. Коэффициент распределения мы определяли из наклона прямой в координатах зависимости α^{-1} от $(c - \text{KKM})^{-1}$ см³/г (рис. 2д–2з) как $P = 100 / (\bar{V}_0 \times \text{наклон})$. Коэффициенты линейных зависимостей, а также погрешность отклонения от экспериментальных значений рассчитывали по методу наименьших квадратов при помощи программы Origin 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Коэффициенты распределения 39 соединений между водным раствором и мицеллами Pluronic P85 и Brj 35 представлены в табл. 3. Исследованные соединения относятся к различным структурным классам: ароматическим углеводородам, фенолам и нафтолам, ксантеновым красителям, антрациклическим антибиотикам и порфирина. Такой набор соединений позволяет получить полную информацию о вкладах разных типов межмолекулярных взаимодействий в солюбилизацию.

Таблица 3. Коэффициенты распределения и молекулярные дескрипторы исследованных соединений

№ Образец	Соединение	$\lg P \pm \Delta \lg P$ (метод)		A	B	$S_{\text{гфб}}$
		Pluronic–вода	Brij–вода			
Ароматические углеводороды и их производные						
1	1,6-Дифенилгексатриен-1,3,5	—	3.45 ± 0.17 (а)	0.03	0.37	5.07
2	Нафталин	2.51 ± 0.22 (а)	3.06 ± 0.26 (б)	0	0.19	2.99
3	Антрацен	2.46 ± 0.28 (а)	—	0	0.24	3.65
4	Бенз[а]антрацен	3.43 ± 0.31 (а)	—	0	0.30	4.10
5	Пирен	3.40 ± 0.24 (д)	—	0	0.28	3.61
6	Периллен	3.31 ± 0.29 (а)	—	0	0.34	4.21
		3.58 ± 0.24 (г)	—	—	—	—
Фенолы и нафтолы						
7	Фенол	1.97 ± 0.17 (г)	—	0.60	0.26	2.32
8	1,4-Гидрохинон	1.64 ± 0.18 (а)	—	1.01	0.45	2.26
9	1,4-Нафтохинон	1.43 ± 0.11 (а)	—	0	0.76	3.03
10	1-Нафтол	3.24 ± 0.28 (а)	3.05 ± 0.26 (а)	0.60	0.37	2.96
11	2-Нафтол	3.24 ± 0.26 (а)	—	0.61	0.40	2.95
12	1,3-Дигидроксинафталин	2.19 ± 0.23 (а)	—	1.13	0.58	2.96
13	2,3-Дигидроксинафталин	0.50 ± 0.05 (а)	—	1.00	0.51	2.96
14	1,5-Дигидроксинафталин	2.34 ± 0.25 (а)	2.78 ± 0.22 (а)	0.93	0.58	2.99
15	2,7-Дигидроксинафталин	2.34 ± 0.22 (а)	2.64 ± 0.18 (а)	1.00	0.51	2.96
16	4-Хлор-1-нафтол	3.39 ± 0.22 (а)	—	0.61	0.29	3.09
Ксантеновые красители и их производные						
17	Флуоресцеин	1.68 ± 0.14 (а)	2.15 ± 0.22 (а)	0.81	1.24	4.47
18	4',5'-Дийодфлуоресцеин	2.23 ± 0.23 (а)	2.71 ± 0.21 (а)	0.63	1.45	4.90
19	5(6)-Карбоксифлуоресцеин	—	2.47 ± 0.17 (в)	—	—	—
20	Эозин карbamотиоевая О-кислота	3.55 ± 0.24 (в)	3.34 ± 0.30 (а)	1.15	1.50	4.17
		—	3.74 ± 0.26 (в)	1.26	2.24	6.33
21	N-Эозин-N'-пропилтиомочевина	4.31 ± 0.35 (в)	4.29 ± 0.34 (в)	1.12	2.29	7.64
22	N-Эозин-N'-октилтиомочевина	4.39 ± 0.46 (в)	4.34 ± 0.45 (в)	1.11	2.31	9.18
23	N-Эозин-N'-декилтиомочевина	4.61 ± 0.39 (в)	4.87 ± 0.43 (в)	1.10	2.32	9.76
24	N-Эозин-N'-додецилтиомочевина	4.70 ± 0.31 (в)	4.60 ± 0.40 (в)	1.09	2.33	10.37
25	N-Эозин-N'-октадецилтиомочевина	4.37 ± 0.36 (в)	4.87 ± 0.33 (в)	1.08	2.35	12.22
26	Родамин В карbamотиоевая О-кислота	2.80 ± 0.22 (в)	3.69 ± 0.34 (а)	0.81	2.49	6.95
Антраклиновые антибиотики						
27	Доксорубицин	1.49 ± 0.13 (б)	2.33 ± 0.16 (б)	1.23	3.74	6.74
		1.62 ± 0.16 (в)	2.29 ± 0.13 (в)	—	—	—
28	Даунорубицин	1.17 ± 0.12 (г)	—	—	—	—
		2.10 ± 0.12 (б)	—	1.21	3.48	6.74
Порфирины						
29	Мезо-тетрафенилпорфири	5.78 ± 0.57 (а)	4.21 ± 0.43 (а)	0	1.41	8.21
30	5,10,15,20-Тетракис-(4-аминофенил)порфири	4.05 ± 0.41 (а)	4.71 ± 0.41 (а)	0.83	2.50	8.21
31	5,10,15,20-Тетракис-(3-сульфо-4-метоксифе-нил) порфири	2.07 ± 0.21 (а)	2.96 ± 0.24 (а)	1.34	4.65	8.35
32	5,10,15,20-Тетракис-(4-метоксифенил)порфири	2.20 ± 0.13 (а)	2.16 ± 0.12 (а)	0	2.04	8.83
33	5,10,15,20-Тетракис-(4-нитрофенил)порфири	1.78 ± 0.17 (а)	1.97 ± 0.19 (а)	0	1.73	8.21
		1.76 ± 0.26 (в)	—	—	—	—
34	Гематопорфири IX, тетраметиловый эфир	5.74 ± 0.56 (в)	3.36 ± 0.30 (а)	0	2.19	8.61
35	Протопорфири IX, диэтиловый эфир	2.65 ± 0.20 (а)	2.50 ± 0.17 (а)	0	1.78	8.99
36	Копропорфири III, тетраметиловый эфир	2.42 ± 0.16 (а)	2.22 ± 0.23 (а)	0	2.42	10.21
Соединения, не вошедшие ни в одну из групп						
37	Акридин	1.70 ± 0.16 (а)	3.09 ± 0.26 (а)	0	0.55	3.52
38	N-Ацетил-L-тирозин, этиловый эфир	1.79 ± 0.17 (а)	—	0.83	1.33	4.60
39	Рибофлавин	1.69 ± 0.15 (а)	3.07 ± 0.26 (в)	1.54	3.51	5.40

Примечание. В скобках указан метод измерения коэффициента распределения: а – по интенсивности флуоресценции, б – по отношению пиков, в – по анизотропии флуоресценции, г – по кинетике диализа [15].

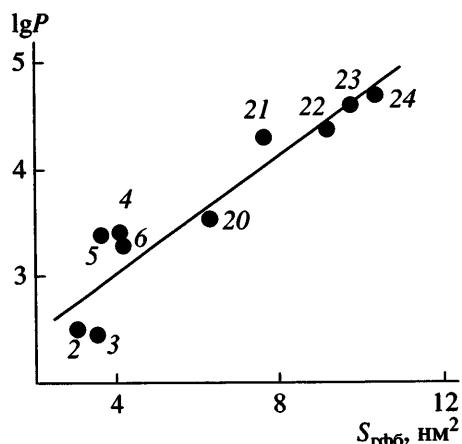


Рис. 3. Коэффициенты распределения ароматических углеводородов и алкилтиоуреидильных производных эозина между водой и мицеллами Pluronic P85 в зависимости от их гидрофобности, определяемой как площадь гидрофобной поверхности молекулы. Номера точек на рисунке соответствуют номерам образцов в табл. 3.

Коэффициенты распределения многих соединений были определены несколькими различными методами, которые давали близкие значения. Так, например, логарифм коэффициента распределения доксорубицина между водой и мицеллами Pluronic P85, найденный по соотношению пиков в спектре флуоресценции, равен 1.49 ± 0.22 , определенный с помощью измерения анизотропии флуоресценции — 1.62 ± 0.24 , а по кинетике диализа — 1.17 ± 0.18 . Совпадающие в пределах экспериментальной погрешности результаты были также получены при измерении различными методами коэффициентов распределения перилена, тетраметилового эфира гематопорфирина IX, 5,10,15,20-тетракис-(4-нитрофенил)порфирина, 4',5'-дийодфлуоресцина и эозина карбамотиоевой О-кислоты (табл. 3). Это указывает на корректность использованных методов, в основном базирующихся на чувствительности флуоресцентных характеристик солюбилизуемых соединений к свойствам их микроокружения.

Главной движущей силой солюбилизации соединений в мицеллах принято считать гидрофобные силы. Согласно классическим представлениям, развитым в работах Nemethy и Scheraga [19, 20], эти взаимодействия определяются структурированием воды на поверхности неполярных фрагментов растворенных молекул. Поэтому наиболее адекватный способ оценки гидрофобности соединения состоит в расчете площади гидрофоб-

ной поверхности молекулы $S_{\text{гфб}}$. В настоящей работе ее расчет для исследованных соединений проводился для оптимальной конформации молекулы, определяемой путем минимизации энергии методами молекулярной механики с помощью программного пакета Hyperchem 6.01 и содержащегося в нем модуля “QSAR properties” (“Hypercube Inc.”, США). Результаты этого расчета представлены в табл. 3.

Оказалось, что закономерное увеличение коэффициентов распределения мицеллы–вода с ростом $S_{\text{гфб}}$ солюбилизуемого соединения наблюдалось только в рядах структурно сходных соединений, например ароматических углеводородов и алкильных производных эозина (рис. 3). В то же время ряды нафтолов и фенолов, ксантеновых красителей и порфиринов этой закономерности не подчиняются.

Так, коэффициенты распределения 1- и 2-нафтола в системе мицеллы Pluronic P85–вода в 5 раз выше коэффициента распределения нафталина, хотя указанные соединения имеют довольно близкие значения параметра $S_{\text{гфб}}$. 4-Хлор-1-нафтоль солюбилизуется в мицеллах гораздо эффективнее акридина, хотя у него меньшая площадь гидрофобной поверхности ($S_{\text{гфб}} = 3.09$ и 3.52 нм^2 соответственно). Эозин карбамотиоевая О-кислота характеризуется в 5 раз более высоким коэффициентом распределения, чем родамин В карбамотиоевая О-кислота, хотя площади гидрофобной поверхности данных соединений близки (6.33 и 6.95 нм^2). 1,3-, 1,5- и 2,7-Дигидроксианфалины солюбилизуются в мицеллах почти в 4 раза лучше, чем флуоресцин, хотя площадь гидрофобной поверхности у них в ~1.5 раза меньше.

Интересно, что аналогичные закономерности для солюбилизации в мицеллах Brj 35 не наблюдались: пары нафталин и 2-нафтоль, родамин В и эозин карбамотиоевые О-кислоты имели одинаковые коэффициенты распределения, а разница между коэффициентами распределения дигидроксианфалинов и флуоресцина была значительно меньше, чем в случае солюбилизации в мицеллах Pluronic (табл. 3).

Таким образом, гидрофобность соединения, учитываемая площадью его гидрофобной поверхности, не является единственным фактором, обуславливающим солюбилизацию в мицеллах Pluronic. Можно предположить, что существен-

ный вклад в солюбилизацию вносит образование водородных связей между солюбилизуемым соединением и ПАВ. Для учета данного фактора мы использовали параметры, характеризующие Н-кислотность и Н-основность исследованных веществ, которые определяются из констант равновесия образования водородных связей. Указанные константы ранее измерил M. Abraham с соавторами для различных доноров и акцепторов протонов [21, 22]. Из своих данных авторы рассчитали не зависящую от природы партнера способность данной функциональной группы к образованию водородной связи. Эти параметры в литературе принято обозначать *A* (Н-кислотность) и *B* (Н-основность).

Чтобы найти Н-кислотность и Н-основность исследованных соединений мы воспользовались демонстрационной версией программы ADME BOXES 2.0, любезно предоставленной нам фирмой "Sirius Analytical" (Англия), алгоритм которой основан на суммировании экспериментально определенных инкрементов отдельных функциональных групп. Результаты этого расчета представлены в табл. 3.

Для определения вклада гидрофобности и способности к образованию водородных связей в солюбилизацию низкомолекулярных соединений в мицеллах полиалкиленоксидов мы применили многофакторный анализ, основанный на принципе линейности свободных энергий [7, 8], согласно которому свободная энергия сложного процесса (например, солюбилизации в мицеллах) может быть представлена как линейная комбинация вкладов элементарных взаимодействий

$$\Delta G_S = \sum_i \Delta G_i = \sum_i z_i Z_i, \quad (9)$$

где Z_i – способность соединения участвовать в i -м типе взаимодействий, а z_i характеризует относительную (по сравнению с водой) способность мицеллы принимать участие в этом виде взаимодействий. Параметры соединений Z_i определяются или рассчитываются независимо, а параметры среды z_i выступают в качестве коэффициентов многопараметрической регрессии. Такой подход позволяет выявить вклад различных типов взаимодействий в сложный процесс. В данной работе мы рассмотрели корреляцию между $\lg P$ и линей-

ной комбинацией трех параметров, отвечающих гидрофобности исследуемых соединений, их протоноакцепторным и протонодонорным свойствам. Тогда уравнение (9) принимает следующий вид:

$$\lg P_{\text{мицеллы-вода}} = c_0 + sS_{\text{гфб}} + aA + bB, \quad (10)$$

где c_0 – свободный член, параметр s показывает изменение свободной энергии системы за счет дегидратации гидрофобных фрагментов солюбилизируемой молекулы при ее переносе из воды в мицеллу, а параметры *a* и *b* показывают, насколько среда мицеллы является более сильным Н-основанием и Н-кислотой, чем вода.

Как правило, корреляция считается надежной, если количество соединений более чем в 5 раз превышает количество дескрипторов. В настоящей работе для построения трехпараметрических корреляций мы использовали коэффициенты распределения более 30 соединений, т.е. статистический критерий достоверности корреляции выполнялся.

Корреляции между значениями $\lg P_{\text{P85-вода}}$ и $\lg P_{\text{Brj 35-вода}}$ и линейной комбинацией трех параметров $S_{\text{гфб}}$, *A* и *B* описывается уравнениями

$$\begin{aligned} \lg P_{\text{P85-вода}} &= (0.15 \pm 0.05) + (0.38 \pm 0.11)A - \\ &- (1.24 \pm 0.19)B + (0.82 \pm 0.08)S_{\text{гфб}} \quad (11) \end{aligned}$$

$(N = 32, R = 0.903, F = 39)$

$$\begin{aligned} \lg P_{\text{Brj 35-вода}} &= (0.43 \pm 0.15) - (0.0061 \pm 0.3)A - \\ &- (0.27 \pm 0.2)B + (0.48 \pm 0.07)S_{\text{гфб}} \quad (12) \end{aligned}$$

$(N = 45, R = 0.896, F = 55)$

Зависимость экспериментальных значений $\lg P_{\text{мицеллы-вода}}$ от соответствующих значений, рассчитываемых по уравнениям (11) и (12) для Pluronnic P85 и Brj 35 соответственно, представлена на рис. 4. Видно, что из этой зависимости сильно выпадают точки, соответствующие некоторым порфиринам (5,10,15,20-тетракис-(4-метоксифенил)порфирины, 5,10,15,20-тетракис-(4-нитрофенил)порфирины, диэтиловый эфир протопорфирина IX и тетраметиловый эфир копропорфирина III), а также N-эозин-N'-октадецилтиомочевина (образцы 32, 33, 35, 36 и

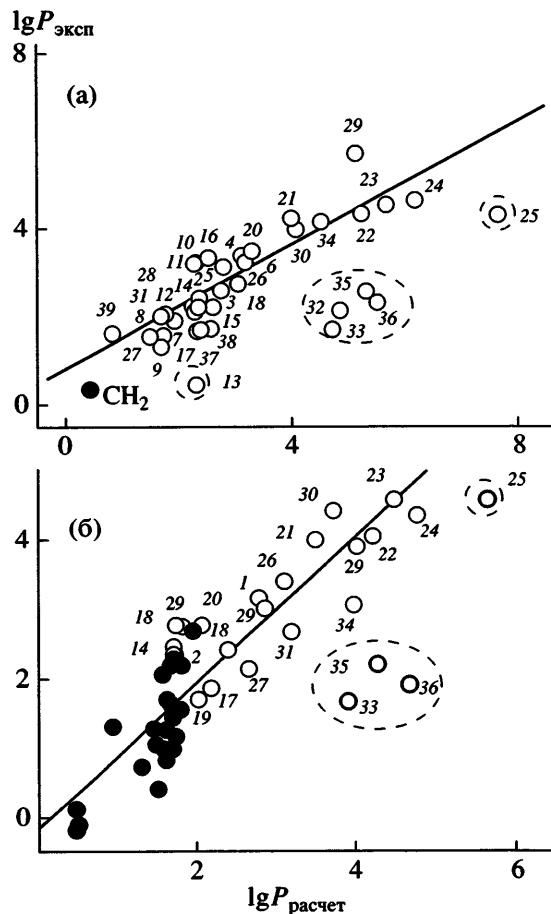


Рис. 4. Корреляция между экспериментально определенными коэффициентами распределения соединений в мицеллы Pluronic P85 (а) и Brij 35 (б) и величинами, рассчитанными по выражениям (11) и (12). Номера точек соответствуют номерам образцов в табл. 3.

25 соответственно). По всей видимости, такие отклонения вызваны способностью указанных соединений к агрегации в водных растворах [23, 24]. Отклонение точки, соответствующей 2,3-дигидроксинафталину (образец 13), вероятно, вызвано тем, что в молекуле этого соединения возможно образование внутримолекулярной водородной связи между вицинальными гидроксильными группами. В данном случае расчет параметров A и B недостоверен, что и приводит к отклонению коэффициента распределения, рассчитанного по уравнению (11), от экспериментального значения.

Интересно, что корреляционные уравнения (11) и (12) описывают не только соединения, представленные в нашей работе, но и ранее исследованные соединения. Так, коэффициент рас-

пределения метиленовой группы, приведенный в работе [15], удовлетворительно предсказывается уравнением (11) (рис. 4а). Темные точки на рис. 4б соответствуют соединениям, исследованным ранее в работе Quina с соавторами [25]. В эту группу входят 14 производных бензола, несколько низших жирных кислот, а также кислород, аргон, метан, четыреххлористый углерод и низшие алканы. Несмотря на то, что указанные соединения имеют гораздо более простую структуру, чем вещества, исследованные в настоящей работе, их коэффициенты распределения вполне удовлетворительно предсказываются общим уравнением (12).

Анализ выражений (11) и (12) показывает, что наибольший вклад в солюбилизацию в мицеллах обоих полиалкиленоксидов вносят гидрофобные взаимодействия, определяемые дескриптором $S_{\text{гф}}$. При этом наличие протоноакцепторных полярных групп препятствует солюбилизации в мицеллах обоих ПАВ, поскольку Н-кислотные свойства мицелл полиалкиленоксидов меньше Н-кислотности воды.

Существенный вклад в солюбилизацию в мицеллах Pluronic P85 вносят протонодонорные свойства (Н-кислотность) солюбилизуемого соединения. Иными словами, мицеллы Pluronic проявляют Н-основные свойства. При этом Н-кислотность солюбилизуемого соединения не влияет на солюбилизацию в мицеллах Brij: коэффициент a в регрессионном уравнении (12) близок к нулю, т.е. Brij 35 практически не способен образовывать водородные связи с солюбилизуемыми соединениями. Вероятно, это объясняется тем, что гидрофобное ядро таких мицелл не содержит Н-основных групп, а их гидрофильная опушка сильно гидратирована [17, 26].

Таким образом, сопоставление уравнений (11) и (12) для Pluronic P85 и Brij 35 указывает на то, что солюбилизации в мицеллах Pluronic способствует образование водородных связей солюбилизуемого соединения с блоком ППО, составляющим ядро мицеллы Pluronic. Можно предполагать, что пониженная по сравнению с ПЭО гидратация блока ППО, составляющего ядро мицеллы Pluronic, а также более низкая по сравнению с водой диэлектрическая проницаемость способствуют образованию водородных связей с солюбилизуемыми в мицеллах соединениями.

Роль водородных связей для структурообразования в системах, содержащих полиалкиленоксиды, отмечалась ранее. Так, в работах [27, 28] было обнаружено, что ПЭО могут взаимодействовать с поликислотами за счет образования водородных связей с протонированными карбоксильными группами. Аналогичную природу имеют комплексы, формируемые ПЭО с гидроксипропилметилцеллюлозой [29]. Водородные связи полиалкиленоксидов с водой регистрируются с помощью ИК-спектроскопии [30], и их существенная роль выявляется при квантово-механическом моделировании взаимодействий ПЭО с водой [31].

В настоящей работе была впервые продемонстрирована роль водородных связей во взаимодействии мицелл Pluronic с низкомолекулярными соединениями в водной среде. Полагаем, что образование водородных связей между Pluronic и протонодонорными группами может быть существенно для взаимодействия Pluronic с низкомолекулярными соединениями, мембранными, полисахаридами и белками в биологическом окружении.

Авторы выражают свою благодарность А.Б. Соловьевой за образцы порфиринов, доктору G. Cimpan (Syrius Analytical, Cambridge, UK) за представление демонстрационной версии программного пакета ADME Boxes, версия 2.0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Myers D. Surfactants Science and Technology. New Jersey: Wiley, 2006.
2. Rangel-Yagui C.O., Pessoa A., jr., Tavares L.C. // J. Pharm. Pharm. Sci. 2005. V. 8. № 2. P. 147.
3. Adams M.L., Lavasanifar A., Kwon G.S. // J. Pharm. Sci. 2003. V. 92. № 7. P. 1343.
4. Torchilin V.P., Lukyanov A.N., Gao Z., Papahadjopoulos-Sternberg B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 10. P. 6039.
5. Torchilin V.P. // J. Controlled Release. 2001. V. 73. № 2–3. P. 137.
6. Yang S., Khaledi M.G. // Anal. Chem. 1995. V. 67. № 3. P. 499.
7. Politzer P., Murray J.S. // Quantitative Treatments of Solute/Solvent Interactions. Amsterdam: Elsevier, 1994.
8. Abraham M.H. // Pure Appl. Chem. 1993. V. 65. № 12. P. 2503.
9. Abraham M.H., Chadha H.S., Dixon J.P., Rafols C., Treiner C. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. II. 1995. № 5. P. 887.
10. Abraham M.H., Chadha H.S., Dixon J.P., Rafols C., Treiner C. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. II. 1997. № 1. P. 19.
11. Ash M., Ash I. The Condensed Encyclopedia of Surfactants. New York: Chemical, 1989.
12. Batrakova E.V., Han H.Y., Miller D.W., Kabanov A.V. // Pharm. Res. 1998. V. 15. № 10. P. 1525.
13. Goldmints I., von Gottberg F.K., Smith K.A., Hatton T.A. // Langmuir. 1997. V. 13. № 14. P. 3659.
14. Hurter P.N., Scheutjens J.M.H.M., Hatton T.A. // Macromolecules. 1993. V. 26. № 19. P. 5592.
15. Kozlov M.Yu., Melik-Nubarov N.S., Batrakova E.V., Kabanov A.V. // Macromolecules. 2000. V. 33. № 9. P. 3305.
16. Glenn K., van Bommel A., Bhattacharya S.C., Palepu R.M. // Colloid Polym. Sci. 2005. V. 283. № 8. P. 845.
17. Borbely S. // Langmuir. 2000. V. 16. № 13. P. 5540.
18. Melik-Nubarov N.S., Kozlov M.Yu. // Colloid Polym. Sci. 1998. V. 276. № 3. P. 381.
19. Nemethy G., Scheraga H.A. // J. Chem. Phys. 1962. V. 36. № 12. P. 3382.
20. Ooi T., Oobatake M., Nemethy G., Scheraga H.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 10. P. 3086.
21. Abraham M.H. // Chem. Soc. Rev. 1993. V. 22. № 2. P. 73.
22. Abraham M.H., Ibrahim A., Zissimos A.M., Zhao Y.H., Comer J., Reynolds D.P. // Drug Discovery Today. 2002. V. 7. № 20. P. 1056.
23. Scheer H. // The Porphyrins / Ed. by Dolphin D. New York: Academic, 1978.
24. Соловьева А.Б., Мелик-Нубаров Н.С., Аксенова Н.А., Глаголев Н.Н., Встовский Г.В., Бугрин В.С., Лузгина В.Н., Ольшевская В.А., Белкова Г.В. // Журн. физ. химии. 2006. Т. 80. № 1. С. 124.
25. Quina F.H., Alonso E.O., Farah J.P.S. // J. Phys. Chem. 1995. V. 99. № 30. P. 11708.
26. Tomšić M., Bešter-Rogač M., Jamnik A., Kunz W., Touroud D., Bergmann A., Glatter O. // J. Phys. Chem. B. 2004. V. 108. № 22. P. 7021.
27. Антипина А.Д., Барановский В.Ю., Паписов И.М., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1972. Т. 14. № 4. С. 941.

28. Baranovsky V.Yu., Litmanovich A.A., Papisov I.M., Kabanov V.A. // Eur. Polym. J. 1981. V. 17. № 9. P. 969.
29. Fullera C.S., MacRaeb R.J., Waltherb M., Cameron R.E. // Polymer. 2001. V. 42. № 23. P. 9583.
30. Su Y.-L., Wang J., Liu H.-Z. // J. Colloid Interface Sci. 2002. V. 251. № 2. P. 417.
31. Aray Y., Marquez M., Rodriguez J., Vega D., Manso Y.S., Coll S., Gonzalez C., Weitz D.A. // J. Phys. Chem. B. 2004. V. 108. № 7. P. 2418.

Intermolecular Interactions Governing Solubilization in Micelles of Poly(alkylene oxide) Surfactants

V. S. Bugrin, M. Yu. Kozlov, I. I. Baskin, and N. S. Melik-Nubarov

*Faculty of Chemistry, Moscow State University,
Leninskie gory, Moscow, 119992 Russia
e-mail: melik.nubarov@genebee.msu.ru*

Abstract—Partition coefficients of 39 low-molecular-mass compounds between water and micelles of an ethylene oxide–propylene oxide block copolymer (Pluronic P85) and monolauryl ether of poly(ethylene oxide) (Brij 35) have been measured by the methods of fluorescence spectroscopy, fluorescence anisotropy, and dialysis kinetics. The tested compounds include aromatic hydrocarbons, phenols, naphthols, xanthene dyes, anthracycline antibiotics, and porphyrins. The multifactor analysis of the partition coefficients in terms of the linear free-energy relationships has been performed. It has been shown that the H-donating ability of compounds facilitates their solubilization in Pluronic micelles and has no effect on solubilization in micelles of monolauryl ether of poly(ethylene oxide). This difference indicates that, when solubilization occurs in Pluronic micelles, the compounds under study appear in a hydrophobic core composed of poly(propylene oxide) blocks.