

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

УДК 577.16 + 543.544.5.068.7

КІНЕТИЧНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ ВИВІЛЬНЕННЯ ФОЛІЄВОЇ КИСЛОТИ З ПОЛІУРЕТАНОВИХ НОСІЇВ РІЗНОЇ СТРУКТУРИ

М. В. ГРИГОР'ЄВА

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: mayagrigorieva@gmail.com

Розроблення нових біологічно активних полімерних матеріалів є надзвичайно актуальним. Мета представленої роботи – оцінити динаміку вивільнення фолієвої кислоти (ФК) з поліуретанових носіїв різної структури *in vitro* за допомогою оптимізованого методу обернено-фазової ВЕРХ. Досліджували два типи полімерних зразків як носіїв ФК: лінійної структури (ковалентний зв'язок ФК з носієм; 13% мас. і 26% мас. ФК – зразки 1 і 2) та зшитої структури (водневий зв'язок ФК з носієм; 1% мас. ФК і 6% мас. ФК – зразки 3 і 4). Показано, що швидкість і характер вивільнення ФК залежить від способу іммобілізації на полімерному носії та структури полімеру. У зразків лінійної структури (1 і 2) сумарна кількість ФК, вивільненої в модельне середовище на 28-му добу, становить відповідно 1,20 мг/мл і 2,17 мг/мл. У зразків зі зшитою структурою (3 і 4) сумарна кількість ФК, вивільнена на 28-му добу, становить відповідно 0,16 і 0,38 мг/мл.

Ключові слова: фолієва кислота, поліуретановий носій, ВЕРХ, вивільнення, іммобілізація.

Сьогодні неможливо собі уявити відсутність полімерних матеріалів у таких сферах як медицина, фармацевтика, біотехнологія тощо. Іммобілізація лікарських речовин, біологічно активних сполук (БАС) на полімерних носіях різного складу й структури дозволяє створювати нові матеріали та пристрої, що з успіхом застосовуються у медицині. Призначені для інтерактивної взаємодії з організмом на субклітинному рівні з високим ступенем специфічності, ці полімерні матеріали забезпечують зниження побічних ефектів іммобілізованих сполук, підвищують їхню біодоступність і пролонгують їх дію [1–3].

Серед різних полімерів, що використовують для медичних цілей, одними з найпопулярніших є поліуретани. Хімічні, механічні та біологічні властивості цих сполук роблять їх придатними для застосування в імплантатах різного роду, а також полімерних носіях і покриттях для БАС. У роботі поліуретани застосовано як полімерні носії для фолієвої кислоти (ФК), яка є крово-

творним вітаміном, присутнім у печінці, нирках, грибах, шпинаті, дріжджах тощо.

Розроблення нових полімерних депо-форм з іммобілізованими біологічно активними сполуками потребує специфічних екстракційних процедур, точних кількісних методів оцінки. За даними літератури, серед методів визначення фолатів та їхніх метаболітів можна відмітити спектрофотометрію з попередньою дериватизацією [4] або без неї [5], хроматомас-спектрометрію [6], мікробіологічні методи [7], а також методи високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), за допомогою яких визначають рівень ФК у біологічних зразках, вивчають вплив ФК на метаболічні процеси в організмі людини за різних захворювань та патологічних станів [8, 9], вимірюють рівень ФК у фармацевтичних препаратах [10, 11], їжі та напоях [12, 13].

Мета представленої роботи – оцінити вивільнення фолієвої кислоти (ФК) з полімерних носіїв різної структури *in vitro* за допомогою оптимізованого методу обернено-фазової ВЕРХ.

Матеріали і методи

У роботі використовували реактиви: метанол і фолієву кислоту (Sigma-Aldrich, Німеччина), солі фосфорної кислоти $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ і $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, гідроксид амонію (Хімлаборреактив, Україна), дистильовану воду (ГОСТ 6709), ацетонітрил (Merck, Німеччина), ортофосфорну кислоту (Fluka, Німеччина).

Зразки. Полімерні зразки було синтезовано у відділі полімерів медичного призначення ІХВС НАН України. Досліджували лінійні полімери (у вигляді плівок), синтезовані на основі макродіізоціанату, який було одержано з поліоксипропіленгліколю (Мм 1002) та толуїлендіізоціанату (ТДІ 80/20) і модифіковано ФК (13% і 26% мас. – зразки 1 і 2 відповідно), яка була іммобілізована на полімерній матриці за рахунок утворення ковалентних зв'язків із полімером, а також зшиті полімери (у вигляді губок) на основі Лапролу 2012 (Мм 2012) та ТДІ (80/20), наповнені ФК у концентрації 1,0 і 6,0% мас. відносно маси поліуретану (зразки 3 і 4 відповідно).

Процедура екстракції. Зі зразків 1–4 готували по три наважки (0,1 г), які поміщали в бюкси з 0,9%-им розчином NaCl (3,0 мл). Оскільки ФК – фоточутлива сполука, експозицію зразків проводили в темряві в термостаті при 37 °С із заміною модельного розчину на свіжий після кожного вимірювання. Фолієву кислоту, що вивільнилась із полімерних зразків в індукований розчин, вимірювали методом обернено-фазової ВЕРХ через певні проміжки часу (спочатку в інтервалі від 30 хв до 5 год, а потім від 1 доби до 28 діб).

ВЕРХ-метод. Хроматографічний аналіз проводили на високоефективному рідинному хроматографі (ЛКВ, Швеція) з УФ-детектором. Колонка Supelcosil–LC-8, розмір частинок 5 мкм, I.D.150 × 4,6 мм (Supelco, Німеччина).

Для кількісного визначення ФК, що вивільнялася з полімеру в модельний розчин, було оптимізовано метод обернено-фазової ВЕРХ [14]. Вимірювання проводили при кімнатній температурі, довжина хвилі дорівнювала 254 нм, швидкість потоку – 1,0 мл/хв, об'єм проби – 20 мкл. Мобільна фаза: метанол/0,01 М натрій фосфатний буфер, рН 4,5 у співвідношенні 40 : 60 (v/v). Фосфатний буфер (0,01 М, рН 4,5) приготовлено за стандартним методом; рН до необхідного значення доводили 1%-им розчином ортофосфорної кислоти. Час утримання ФК – 9 хв. Кількість вимірювань – три на

Регресійна статистика калібрувальної кривої ФК $Y=a+bC$

Діапазон концентрацій, мг/мл	0,005–2,0
Регресійний коефіцієнт, a	0,83
Регресійний коефіцієнт, b	0,69
Коефіцієнт кореляції, r	0,997
Стандартне відхилення, SD	0,05
Межа детектування (LOD), мг/мл	0,005
Найменший рівень вимірювання (LOQ), мг/мл	0,006

кожний зразок. Концентрацію ФК визначали за калібрувальним графіком, побудованим відповідно до результатів вимірювання стандартних розчинів, які готували точним розведенням основного розчину (1 мг/мл) сумішшю метанол/0,01 М натрій фосфатний буфер із додаванням водного розчину гідроксиду амонію (розбавлений в ~50 разів концентрований розчин) для покращення розчинності ФК (40 : 58 : 2, v/v/v). Середньоквадратичне відхилення параметрів утримання та висота піків коливались у межах 7–10%. Регресійна статистика калібрувальної кривої представлена в таблиці.

Досліди повторювали тричі із трьома паралельними пробами для кожного полімерного зразка. Одержані дані представлено у вигляді $M \pm SD$ ($n = 3$). Стандартне відхилення (SD), регресійні параметри (a , b) та коефіцієнт кореляції (r), LOD, LOQ розраховували згідно з [15] у програмі MS Excel, графіки побудовано також у цій програмі.

Результати та обговорення

Відомо, що біологічно активні полімерні комплекси характеризуються оптимальним балансом між біостабільністю та біодеградацією. Важливим також є співвідношення між їхньою гідрофобністю та гідрофільністю. Поряд з цим, швидкість деградації полімеру, яка залежить, насамперед, від його структури, має бути такою, щоб забезпечувати тривале вивільнення БАС.

Під час визначення характеру вивільнення ФК із полімерних зразків досліджували плівки, одержані з лінійного полімеру (зразок 1, 13% ФК; зразок 2, 26% ФК), та пористі губки, одержані на основі зшитого полімеру (зразок 3, 1% ФК; зразок 4, 6% ФК). У зразках 1 і 2 ФК ковалентно зв'язана з полімером [16],

а у зразках 3 і 4 її додавали до полімеру як наповнювач, тобто між полімерним носієм і ФК утворювалися водневі зв'язки [17].

На рис. 1 представлено вивільнення ФК із поліуретанових носіїв при 37 °С залежно від часу експозиції зразків у модельному середовищі. Видно, що на першій стадії, в інтервалі від 30 хв до 5 год, характер вивільнення ФК є схожим у всіх зразках, незважаючи на відмінності структури полімерних носіїв і способу іммобілізації ФК. Так, на початку процесу (30 хв) спостерігається максимальне вивільнення ФК з усіх чотирьох зразків із подальшим поступовим його зниженням (1, 3, 5 год). Непропорційність вивільнення ФК її вмісту в зразках 1 і 4 була неочікуваною.

На рис. 2 показано сумарне вивільнення ФК із досліджуваних зразків на другій стадії, в інтервалі від 1-ї до 28-ї доби. Видно, що характер вивільнення ФК схожий між парами зразків: лінійні (1 і 2) і зшиті (3 і 4). У зразків 1 і 2, де ФК має хімічний зв'язок із полімерним носієм лінійної структури, її кумулятивна кількість у модельному середовищі з часом інтенсивно зростає з 7- до 28-ї доби і становить на 28-му добу відповідно 1,20 і 2,17 мг/мл ФК. Зі зразка 1 ФК вивільнюється зі швидкістю приблизно 0,02 мг/мл на добу в інтервалі від 7- до 21-ї доби, а потім – з 21- до 28-ї – зростає до 0,07 мг/мл на добу. Що стосується зразка 2,

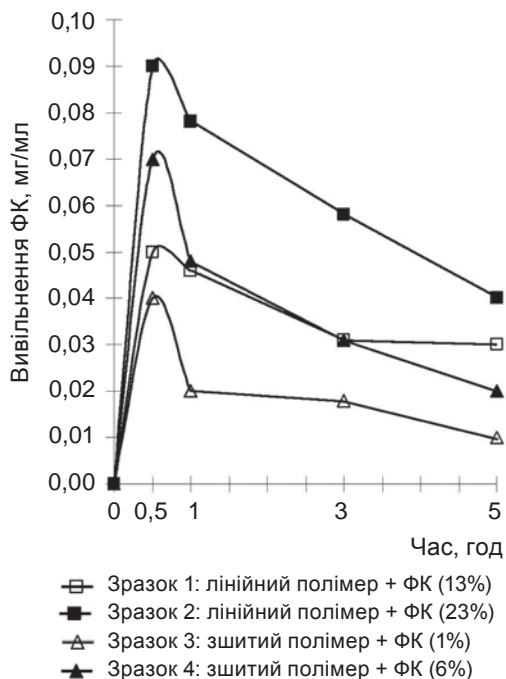


Рис. 1. Вивільнення фолієвої кислоти (ФК) з лінійних і зшитих полімерних носіїв у модельному середовищі при 37 °С

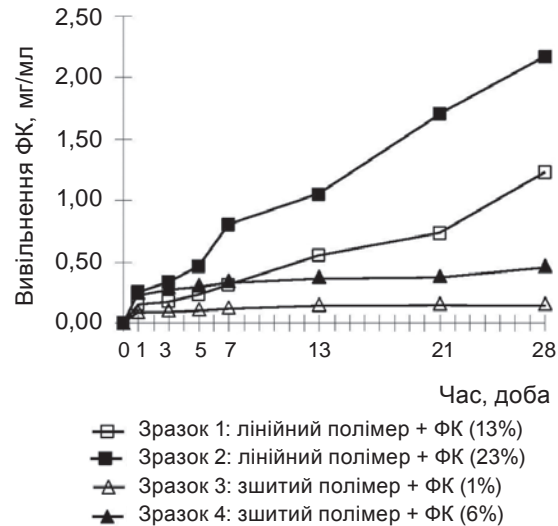


Рис. 2. Сумарне вивільнення фолієвої кислоти (ФК) із лінійних і зшитих полімерних носіїв у модельному середовищі при 37 °С

то вивільнення ФК прискорюється в період із 13- до 28-ї доби: 0,02 мг/мл на добу від 7- до 13-ї доби, а далі – 0,06 мг/мл на добу. Можна припустити, що у зразках 1 і 2 відбувається вимивання частини ФК із полімеру за рахунок утворення порожнин в його структурі під впливом модельного середовища. При цьому, очевидно, вміст ФК у полімері впливає на кількість адсорбованої води на його поверхні, що в свою чергу покращує вивільнення ФК. Крім того, ймовірно, присутність гідрофільних поліетиленгліколей у складі полімеру також може сприяти його повільній частковій деградації в модельному середовищі [18].

У той же час зі зразків зі зшитою структурою (3 і 4), в яких ФК містилась як наповнювач, протягом усього дослідження вивільнення мало майже постійну швидкість – відповідно 0,003 і 0,017 мг/мл на добу. Отже, сумарна кількість ФК, вивільнена на 28-му добу дослідження, відповідно була 0,16 і 0,38 мг/мл. Раніше було показано [17], що зі збільшенням кількості наповнювача в складі полімерної композиції зростає ступінь поперечного зшивання полімеру і, як результат, у полімері уповільнюється орієнтація ланцюгів, зменшується ефективність міжмолекулярної взаємодії, знижуються механічні показники. На цій підставі можна було б припустити, що зі зшитого полімерного зразка 4 (6% наповнювача) мало б вивільнитися значно більше ФК, ніж зі зразка 3 (1% наповнювача). Утім, кількість ФК, що вивільнилася зі зразка 4 була більшою приблизно вдвічі. Крім того, відсутність кореляції між вмістом і кількістю

вивільненої ФК у зразках 1 і 4 на початку процесу (рис. 1) на другій стадії дослідження нівелюється (рис. 2).

Таким чином, за допомогою оптимізованого методу обернено-фазової ВЕРХ досліджено вивільнення ФК із поліуретанових носіїв у модельне середовище впродовж 28 діб. Одержані дані свідчать про те, що спосіб іммобілізації ФК на полімерному носії, а також структура полімеру впливають на швидкість і характер її вивільнення.

КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ПОЛИУРЕТАНОВЫХ НОСИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

М. В. Григорьева

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: mayagrigorieva@gmail.com

Разработка новых биологически активных полимерных материалов является чрезвычайно актуальной. Цель представленной работы – оценить высвобождение фолиевой кислоты (ФК) из полиуретановых носителей различной структуры *in vitro* с помощью оптимизированного метода обращенно-фазовой ВЭЖХ. Исследовали два типа полимерных образцов в качестве носителей ФК: линейной структуры (ковалентная связь ФК с носителем; 13% масс. и 26% масс. ФК – образцы 1 и 2) и сшитой (водородная связь ФК с носителем; 1% масс. ФК и 6% масс. ФК – образцы 3 и 4). Показано, что скорость и характер высвобождения ФК зависит от способа иммобилизации на полимерном носителе и структуры полимера. У образцов линейной структуры (1 и 2) суммарное количество ФК, высвобожденной в модельную среду на 28-е сутки, составляет соответственно 1,20 и 2,17 мг/мл. У образцов с сшитой структурой (3 и 4) кумулятивное количество ФК, высвобожденной на 28-е сутки, составляет соответственно 0,16 и 0,38 мг/мл.

Ключевые слова: фолиевая кислота, полиуретановый носитель, ВЭЖХ, высвобождение, иммобилизация.

KINETIC PATTERN OF FOLIC ACID RELEASE FROM POLYURETHANE MATRICES OF VARIED STRUCTURES

M. V. Grigorieva

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: mayagrigorieva@gmail.com

The development of new bioactive polymeric materials is very topical. The goal of the present work was to use an optimized reversed-phase HPLC method to determine the release of folic acid (FA) from polyurethane carriers of different structures *in vitro*. Two types of polymeric samples were studied as FA carriers: linear (covalent bonds between FA and the carrier; 13 mass % and 26 mass % FA – samples 1 and 2) and cross-linked (hydrogen bonds between FA and the carrier; 1 mass % FA and 6 mass % FA – samples 3 and 4). The rate and pattern of the FA release was shown to depend on the way of FA immobilization on the polymeric carrier and the polymer structure. The cumulative amount of FA released from the linear samples (1 and 2) into model medium on the 28th day was 1.20 mg/ml and 2.17 mg/ml, respectively. The cumulative amount of FA released from the cross-linked samples (3 and 4) on the 28th day was 0.16 mg/ml and 0.38 mg/ml, respectively.

Key words: folic acid, polyurethane carrier, HPLC, release, immobilization.

1. Jeong B., Bae Y. H., Lee D. S., Kim S. W. // Nature. – 1997. – **388**, N 6645. – P. 860–862.
2. Pinchuk L., Wilson G. J., Barry R. T. et al. // Biomaterials. – 2008. – **29**, N 4. – P. 448–460.
3. Григорьева М. В. // Биотехнология. – 2011. – **4**, № 2. – С. 9–23.
4. Enyedy E. A., Farkas E., Dömötör O., Santos A. M. // J. Inorgan. Biochem. – 2011. – **105**, N 3. – P. 444–453.
5. Shishehbore M. R., Sheibani A., Haghdoost A. // Spectrochimica Acta Part A: Molecul. Biomol. Spectr. – 2011. – **81**, N 1. – P. 304–307.
6. Nelson C. B., Sharpless E. K., Sander C. L. // J. Chromat. A. – 2006. – **1135**, N 2. – P. 203–211.
7. Kall M. A. // Food Chem. – 2003. – **82**. – P. 315–319.

8. *Leung J., Dwyer J., Hibberd P. et al.* // *J. Renal Nutrition.* – 2011. – **21**, N 3. – P. 246–256.
9. *Koufopantelis P., Georgakakou S., Kazanis M. et al.* // *J. Chromat. B.* – 2009. – **877**, N 30. – P. 3850–3856.
10. *Deconinck E., Crevits S., Baten P. et al.* // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2011. – **54**, N 5. – P. 995–1000.
11. *Jin P., Xia L., Li Z. et al.* // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2012. – **70**, N 4. – P. 151–157.
12. *Rivas A., Rodrigo D., Company B. et al.* // *Food Chemistry.* – 2012. – **104**, N 4. – P. 1550–1559.
13. *Breithaupt D. E.* // *Food Chemistry.* – 2001. – **74**, N 4. – P. 521–525.
14. *Akhtar M. J., Khan M. A., Ahmad I.* // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1997. – **16**, N 1. – P. 95–99.
15. *Епштейн Н. А.* // *Хім.-фарм. журн.* – 2004. – **38**, № 4. – С. 40–56.
16. *Андрюшина О. С., Закашун Т. Є., Демченко І. Б., Рожнова Р. А.* // *Доповіді НАНУ.* – 2011. – № 8. – С. 113–116.
17. *Григор'єва М. В., Мазур Л. М., Галатенко Н. А. и др.* // *Полімерний журн.* – 2004. – **26**, № 4. – С. 254–259.
18. *Westedt U., Wittmar M., Hellwing M. et al.* // *J. Control. Release.* – 2006. – **111**, N 1. – P. 235–246.

Отримано 03.06.2013