

УДК 544.353.3:544.353.21:536.44:539.2:615.273

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕЙ,
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОСТРАНСТВЕННО-ЗАТРУДНЕННЫМИ ФЕНОЛАМИ**© 2011 Л.А. Добрун^{1*}, Е.Л. Кузякина¹, О.В. Ракитина², О.Ю. Сергеева², М.Е. Михайлова¹,
Н.С. Домнина², А.В. Лезов¹¹Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет²Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет

Статья поступила 17 мая 2011 г.

Химической модификацией полиэтиленгликолей антиоксидантами из класса пространственно-затрудненных фенолов получены водорастворимые конъюгаты, отличающиеся по структуре присоединенного антиоксиданта и по молекулярной массе. Включение гидрофобных концевых групп в состав молекул полиэтиленгликоля приводит к понижению нижней критической температуры смешения раствора по сравнению с исходным полимером. Методами вискозиметрии и рассеяния света в разбавленных растворах определены молекулярно-массовые характеристики полимеров и гидродинамические радиусы единичных молекул конъюгатов. В водных растворах конъюгатов массовая доля единичных молекул превышает 95 %. Агрегаты представляют собой частицы мицеллярного типа, ядро которых образовано гидрофобными фрагментами пространственно-затрудненных фенолов. Показано, что антирадикальная активность антиоксидантов 3-(3-*трет*-бутил-4-гидрокси-5-метилфенил)-пропионовой кислоты и 3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)-пропионовой кислоты, использованных для модификации, различается незначительно, тогда как активность конъюгатов на их основе существенно возрастает.

Ключевые слова: конъюгат, антиоксидант, динамическое рассеяние света, вискозиметрия, агрегирование, антирадикальная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из активно развивающихся в настоящее время подходов к дизайну новых лекарственных средств является создание "гибридных" препаратов, в которых сочетаются химические фрагменты, обеспечивающие разную специфическую активность. Преимуществами гибридных структур или конъюгатов могут быть повышение эффективности биологически активного соединения, возможность его адресной доставки в защищаемой биосистеме, корректировка растворимости и снижение уровня токсичности [1, 2].

Примером реализации такого подхода является создание нового класса гибридных макромолекулярных антиоксидантов (ГМАО), представляющих собой продукты модификации гидрофильных полимеров различными антиоксидантами [3]. К настоящему времени получены и подробно исследованы молекулярные и антиоксидантные характеристики ГМАО на основе декстрана и поливинилового спирта с использованием производных пространственно-затрудненных фенолов (ПЗФ). Обнаружено, что антирадикальная активность ПЗФ резко возрастает при присоединении их к основной цепи полимера [3—6]. В этой связи поиск полимеров, которые могли бы служить основой ГМАО, представляет значительный интерес.

* E-mail: fleur-de-lyse@mail.ru

Круг полимеров, которые могли бы служить основой новых ГМАО, ограничен жестким требованием к их растворимости в воде. Особое место в ряду таких полимеров занимают полиэтиленгликоли (ПЭГ), обладающие высокой биосовместимостью, отсутствием токсичности и иммуногенности, что способствует их широкому применению в качестве основы плазмозаместителей, ингредиентов мазей и таблеток.

В настоящей работе методами рассеяния света и вискозиметрии изучено поведение водных растворов конъюгатов, полученных модификацией полиэтиленгликолей отличающимися по химической структуре и антиоксидантной активности ПЗФ. Установлено влияние молекулярной массы ПЭГ и химической структуры *орто*-заместителей в молекулах ПЗФ на размеры и конформацию молекул конъюгатов. Определена массовая доля агрегатов в растворах, измерена антирадикальная активность конъюгатов и их низкомолекулярных аналогов в водно-органической среде.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Водорастворимые конъюгаты получены химической модификацией ПЭГ антиоксидантами из класса ПЗФ по методу, описанному в работе [7]. Для модификации использованы: 3-(3-*трет*-бутил-4-гидрокси-5-метилфенил)-пропионовая кислота (ПЗФ1) и 3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)-пропионовая кислота (ПЗФ2), синтезированные в Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН.

Для синтеза использовали ПЭГ фирмы "Fluka" со средневязкостной молекулярной массой $M_{\eta} = 3400$ (ПЭГ1); 3900 (ПЭГ2); 6800 (ПЭГ3) и 21600 Да (ПЭГ4) (табл. 1).

Количество введенных в полимерную цепь ПЗФ определяли по данным УФ спектров с использованием удельных коэффициентов экстинкции соответствующих модельных соединений [8]. Для всех исследованных конъюгатов полученные значения согласуются с вычисленными по M_{η} с учетом замещения двух концевых групп полимера (рис. 1, табл. 2).

Растворы ПЭГ и конъюгатов готовили при комнатной температуре в воде. Вязкость растворов полимеров η измеряли в вискозиметре Уббелоде с диаметром капилляра 0,8 мм при 25 °С.

Для определения гидродинамического радиуса R_h молекул ПЭГ и конъюгатов применяли метод динамического рассеяния света [9]. Измерения проводили при температурах от 15 до 40 °С в диапазоне углов рассеяния θ от 25 до 130° на установке "PhotoCor Complex" (Россия), снабженной коррелятором реального времени "PhotoCor-FC" и одноименным гелий-неоновым

Т а б л и ц а 1

Гидродинамические и молекулярно-массовые характеристики ПЭГ и конъюгатов в воде

Образец	$[\eta]$, дл/г	$M_{\eta} \times 10^{-3}$	$D_{01} \times 10^7$, см ² /с	$D_{02} \times 10^7$, см ² /с	n	R_{h1} , нм	R_{h2} , нм	X_2 , %
ПЭГ1	0,09	3,4	14,0	—	77	1,8	—	—
ПЭГ1—ПЗФ2*	—	—	—	3,30	—	—	5,8	—
ПЭГ2	0,10	3,9	—	—	88	—	—	—
ПЭГ2—ПЗФ2	0,04	—	12,4	4,58	—	2,0	5,3	1
ПЭГ3	0,15	6,8	10,0	—	154	2,3	—	—
ПЭГ3—ПЗФ1	0,15	—	11,5	2,90	—	2,1	8,4	2
ПЭГ3—ПЗФ2	0,12	—	10,4	3,20	—	2,3	7,6	2
ПЭГ4	0,35	21,6	4,9	—	491	5,0	—	—
ПЭГ4—ПЗФ1	0,46	—	5,1	1,38	—	4,8	18,0	5
ПЭГ4—ПЗФ2	0,30	—	4,9	0,84	—	5,0	30,0	1

* Измерения проведены при 15 °С.

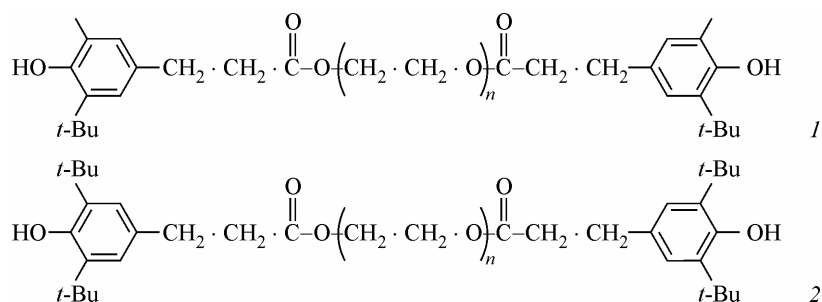


Рис. 1. Структурные формулы конъюгатов, содержащих концевые группы ПЗФ1 (1) и ПЗФ2 (2)

лазером с длиной волны $\lambda_0 = 632,8$ нм. Функции распределения $\Psi(\tau)$ по временам релаксации $\tau = 1/Dq^2$ получали с помощью программы DynaLS из автокорреляционных функций интенсивности рассеянного света. Зависимости обратного времени релаксации $1/\tau$ от квадрата вектора рассеяния $q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \sin(\theta/2)$ для ПЭГ и конъюгатов аппроксимировали прямыми, проходящими через начало координат, что свидетельствует о диффузионном характере наблюдаемых процессов. Коэффициент поступательной диффузии D находили из наклона этих зависимостей. Поправки на температурные зависимости показателя преломления n_0 и вязкости η_0 воды учитывали, используя данные, приведенные в [10].

Гидродинамический радиус частиц R_h рассчитывали по формуле Эйнштейна—Стокса [11]

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta_0 D}. \quad (1)$$

Функции распределения $\Psi(\tau)$ являются взвешенными по интенсивности рассеянного света, поэтому в полидисперсной системе вес каждого пика ω_i зависит не только от концентрации частиц в растворе, но и от их гидродинамического радиуса R_{hi} . Чтобы оценить массовую долю частиц каждого размера в растворе использовали формулу [7]

$$X_i = (\omega_i / R_{hi}^3) / \left(\sum_i (\omega_i / R_{hi}^3) \right). \quad (2)$$

Антирадикальную активность конъюгатов определяли путем расчета константы скорости их взаимодействия K со свободным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ) в смеси вода—этанол (1:1 об.).

Т а б л и ц а 2

Константы скорости реакции антиоксидантов с ДФПГ в смеси вода—этанол

Образец	Содержание ПЗФ в конъюгате, мас. %		K , л/моль·с
	по УФ спектрам	теоретически по M_n	
ПЗФ1	—	—	4,8±0,1
ПЗФ2	—	—	3,4±0,1
ПЭГ1—ПЗФ1	11,7	11,4	84,2±0,9
ПЭГ1—ПЗФ2	13,5	13,3	15,7±0,8
ПЭГ2—ПЗФ1	9,7	10,1	76,1±1,9
ПЭГ2—ПЗФ2	11,0	11,8	—
ПЭГ3—ПЗФ1	5,7	6,1	79,4±1,7
ПЭГ3—ПЗФ2	7,1	7,1	11,5±0,7
ПЭГ4—ПЗФ1	2,1	2,0	83,7±0,9
ПЭГ4—ПЗФ2	2,7	2,5	11,4±0,7
Декстран—ПЗФ2	9,0	—	12,5±0,8

Кинетику взаимодействия антиоксидантов с ДФПГ исследовали на спектрофотометре СФ-56 (Россия) по изменению во времени оптической плотности раствора при 520 нм. Реакцию проводили до степени конверсии свободного радикала не более 20 % [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работах [12, 13] было установлено, что растворимость ПЭГ в воде ухудшается при повышении температуры раствора, т.е. полимер имеет нижнюю критическую температуру смешения (НКТС). Для ПЭГ с молекулярной массой $M = 5 \cdot 10^3$ Да НКТС оказывается выше 100 °С, при увеличении M полимера до $5 \cdot 10^6$ Да НКТС понижается до 20 °С [12]. Термодинамическое поведение ПЭГ может оказывать существенное влияние на возможность его практического использования для создания ГМАО. Поэтому были проведены измерения зависимостей интенсивности рассеянного света и гидродинамического радиуса R_h частиц конъюгатов в водных растворах при разных температурах.

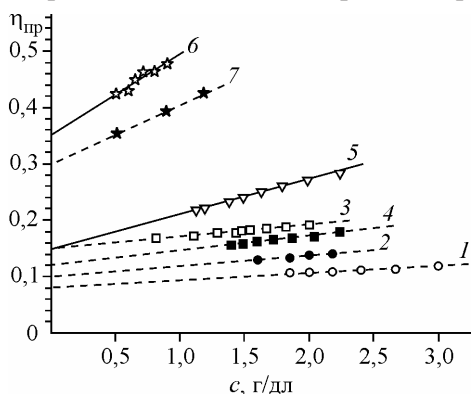
При нагревании растворов конъюгатов ПЭГ1—ПЗФ2 и ПЭГ2—ПЗФ2 с концентрацией $c = 3,5$ г/дл до температур 22 и 37 °С соответственно наблюдали постепенное увеличение интенсивности рассеянного света и гидродинамического радиуса рассеивающих частиц. При достижении этих температур происходило помутнение растворов, сопровождавшееся дальнейшим ростом интенсивности рассеянного света и размеров частиц. Через некоторое время в растворах конъюгатов ПЭГ1—ПЗФ2 и ПЭГ2—ПЗФ2 наблюдали выпадение осадка. Интенсивность рассеянного света и гидродинамический радиус исходных полимеров ПЭГ1 и ПЭГ2 не менялись в интервале температур от 15 до 40 °С. Такое поведение системы полимер—растворитель указывает на то, что конъюгаты в воде имеют НКТС, которая существенно ниже, чем у ПЭГ с близкой молекулярной массой.

Для анализа влияния молекулярной массы и размеров молекул ПЭГ на свойства конъюгатов были выполнены измерения вязкости и динамического рассеяния света их водных растворов.

На рис. 2 представлены зависимости приведенной вязкости $\eta_{пр} = (\eta - \eta_0)/\eta_0 c$ от концентрации раствора c для ПЭГ и конъюгатов. Все зависимости аппроксимировали прямыми линиями, из экстраполяции которых к бесконечному разбавлению определяли характеристическую вязкость $[\eta]$ полимеров, а из наклона — постоянную Хаггинса k' . Постоянная Хаггинса конъюгатов оказалась выше, чем k' для ПЭГ. Это показывает, что термодинамическое качество воды как растворителя для конъюгатов хуже, чем для ПЭГ.

Молекулярную массу ПЭГ M_n рассчитывали по уравнению Марка—Куна—Хаувинка $[\eta] = 2,4 \times 10^{-4} M_n^{0,73}$ [14]. Полученные значения $[\eta]$, M_n и степени полимеризации ПЭГ $n = M_n/M_0$, где $M_0 = 44$ — молекулярная масса повторяющегося звена ПЭГ, приведены в табл. 1.

Характеристическая вязкость $[\eta]$ конъюгатов, содержащих ПЗФ2, меньше, чем у соответствующих ПЭГ (см. табл. 1). Принимая во внимание, что $[\eta]$ определяется отношением куба размеров макромолекул к молекулярной массе полимера, ее изменение может быть вызвано как возрастанием M , так и вариацией размеров макромолекул за счет присоединения ПЗФ [11].



Кроме того, на величину характеристической вязкости может оказывать влияние и присутствие агрегатов в растворах. Необходимо отметить, что замена ПЗФ2 на ПЗФ1 в полимере вызывает повышение $[\eta]$ (см. табл. 1).

Гидродинамический радиус R_h молекул ПЭГ и конъюгатов определяли по данным динамического рассеяния света. Функции распределения $\Psi(\tau)$ для всех исследован-

Рис. 2. Зависимость приведенной вязкости $\eta_{пр}$ от концентрации c для ПЭГ1 (1), ПЭГ2 (2), ПЭГ3 (3), ПЭГ3—ПЗФ2 (4), ПЭГ3—ПЗФ1 (5), ПЭГ4 (6) и ПЭГ4—ПЗФ2 (7) в воде

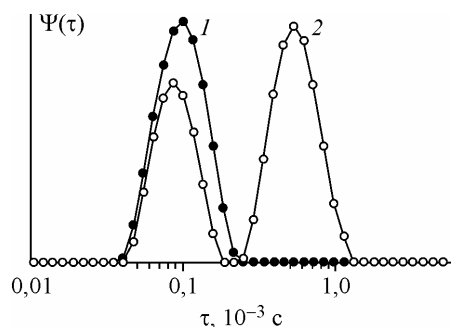


Рис. 3. Функции распределения по времени релаксации τ для ПЭГ4 при $c = 1,9$ г/дл, $\theta = 60^\circ$ (1) и ПЭГ4—ПЗФ2 при $c = 2,0$ г/дл, $\theta = 60^\circ$ (2)

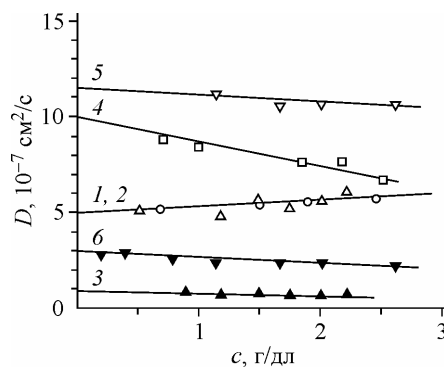


Рис. 4. Зависимость коэффициентов диффузии D_1 для ПЭГ4 (1), ПЭГ4—ПЗФ2 (2), ПЭГ3 (4) и ПЭГ3—ПЗФ1 (5) и D_2 для ПЭГ4—ПЗФ2 (3) и ПЭГ3—ПЗФ1 (6) от концентрации c в воде

ных ПЭГ имели один пик, что указывает на присутствие в растворе частиц одного размера. В отличие от исходных ПЭГ, функции $\Psi(\tau)$ конъюгатов имели два пика, которые соответствовали частицам разного размера (рис. 3). Значения D_{01} и D_{02} для ПЭГ и конъюгатов получали экстраполяцией концентрационных зависимостей коэффициентов поступательной диффузии к бесконечному разбавлению (рис. 4). Полученные значения D_{01} и D_{02} , а также гидродинамические радиусы частиц R_{h1} и R_{h2} , рассчитанные по уравнению (1) при значении $\eta_0 = 0,894$ сП при 25°C и $1,14$ сП при 15°C [10], приведены в табл. 1.

Степень полимеризации n исследованных ПЭГ достаточно велика (см. табл. 1). Это позволяет считать, что макромолекулы ПЭГ находятся в конформации статистического клубка, гидродинамический радиус R_{hT} которого в Θ -условиях можно рассчитать по формуле $R_{hT} = 0,271\sqrt{nA\lambda}$ [7]. При вычислении R_{hT} были использованы значения длины сегмента Куна A и проекции повторяющегося звена на направление цепи λ , взятые из работ [7, 11]. Рассчитанные значения $R_{hT} = 2,0, 2,5$ и $5,3$ нм для ПЭГ1, ПЭГ3 и ПЭГ4 в пределах погрешности эксперимента совпадают с измеренными (см. табл. 1).

Гидродинамический радиус конъюгатов R_{h1} , содержащих ПЗФ1 и ПЗФ2, в пределах погрешности опыта совпадает с R_{h1} молекул соответствующего ПЭГ, а их массовая доля в растворе превышает 95%. Частицы конъюгатов с радиусом R_{h2} отсутствуют в растворах исходных ПЭГ (см. табл. 1). Можно предположить, что они являются агрегатами единичных молекул конъюгатов, формирование которых вызвано притяжением между гидрофобными концевыми группами ПЗФ. Агрегаты стабилизируются в растворе гидрофильными участками ПЭГ [7]. Массовая доля X_2 агрегатов в растворе варьируется от 1 до 5% в зависимости от химического строения ПЗФ (см. табл. 1).

Полученные молекулярные характеристики конъюгатов можно сопоставить с результатами исследований водных растворов конъюгатов декстран—ПЗФ2 и поливинилового спирт—ПЗФ2 [4, 7]. В растворах этих соединений также были зафиксированы единичные молекулы и агрегаты, доля которых не превышала 1%. В отличие от конъюгатов ПЭГ—ПЗФ2 размеры единичных молекул декстран—ПЗФ2 и поливинилового спирт—ПЗФ2 зависели от доли гидрофобных антиоксидантных групп в полимерной цепи.

Переходя к обсуждению влияния химического строения ПЗФ в конъюгатах на их антирадикальную активность, следует остановиться на механизме участия ПЗФ в радикальных реакциях. Начальный акт такой реакции связан с отрывом атома водорода от гидроксильной группы фенола с образованием феноксильного радикала. Стабильность образующихся феноксильных радикалов зависит от величины пространственного экранирования реакционного центра и степени делокализации неспаренного электрона по сопряженной системе связей радикала. Наличие в молекулах ПЗФ2 в *орто*-положениях объемных *трет*-бутильных групп приводит не только к эффективному экранированию радикального центра, но и к уменьшению сопряжения

и дестабилизации образующегося феноксильного радикала. Замена *трет*-бутильной группы на метильную заметно не сказывается на экранировании, но при этом слабее влияет на сопряжение [15]. Именно это и является причиной того, что ПЗФ1, имеющий в *орто*-положениях метильную и *трет*-бутильную группы, обладает несколько большей антирадикальной активностью, о чем свидетельствует сопоставление значений констант скорости реакции ДФПГ с ПЗФ1 и ПЗФ2 в смеси вода—этанол (см. табл. 2).

Присоединение ПЗФ к концевым группам ПЭГ приводит к резкому увеличению константы скорости их реакции с ДФПГ по сравнению с соответствующими индивидуальными ПЗФ (см. табл. 2). Следует отметить, что различие в значениях констант скорости реакции K для ПЗФ1 и ПЗФ2 становится существенно больше после их присоединения к ПЭГ. Причина большей эффективности конъюгатов связана с наличием гидратной оболочки вокруг гидрофильной цепи полимера, в которой происходит эта реакция [16]. Гидратная оболочка любого гидрофильного полимера, в том числе и ПЭГ, обладает повышенной по сравнению с объемной водой ионизирующей способностью, что и определяет высокую скорость радикальной реакции в растворах обоих конъюгатов.

Данные по антирадикальной активности ПЭГ—ПЗФ можно сравнить с результатами изучения конъюгатов на основе декстрана, который характеризуется большей по сравнению с ПЭГ гидрофильностью [3, 17]. В работе [3] было обнаружено, что константа скорости реакции ДФПГ с конъюгатами декстрана, молекулы которого содержат около 9 моль% ПЗФ2, резко возрастает при увеличении молекулярной массы полимера и достигает максимального значения при $M = 40 \cdot 10^3$ Да, которая близка к K для конъюгатов ПЭГ—ПЗФ2 независимо от их молекулярной массы (см. табл. 2).

Таким образом, исследования влияния молекулярных характеристик ПЭГ на антиоксидантные характеристики ГМАО показали, что константа скорости реакции K в пределах погрешности опыта не зависит от молекулярной массы ПЭГ и определяется химической структурой присоединенных ПЗФ (см. табл. 2). Наличие у ПЭГ1—ПЗФ2 и ПЭГ2—ПЗФ2 НКТС может ограничивать возможность использования ПЭГ1 и ПЭГ2 для создания ГМАО.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. Биологическая кинетика* / Под ред. Е.Б. Бурлакова. Том 2. – М.: Химия, 2005.
2. *Кориак В.В., Штильман М.И.* Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. – М.: Наука, 1984.
3. *Арефьев Д.В., Белостоцкая И.С., Вольева В.Б. и др.* // Изв. АН. Сер. хим. – 2007. – № 4. – С. 751.
4. *Филиппов С.К., Комолов А.С., Сергеева О.Ю. и др.* // Высокомолекуляр. соединения. А. – 2009. – 51, № 2. – С. 209.
5. *Filippov S., Lezov A., Sergeeva O. et al.* // Eur. Polym. J. – 2008. – 44, N 10. – P. 3361.
6. *Domnina N.S., Arefiev D.V., Komarova E.A., Bilibin A.Yu.* // Macromol. Symp. – 1999. – 144, N 1. – P. 339.
7. *Домнина Н.С., Сергеева О.Ю., Вильбицкая А.Н. и др.* // Высокомолекуляр. соединения. А. – 2010. – 52, № 9. – P. 1570.
8. *Арефьев Д.В., Домнина Н.С., Комарова Е.А. и др.* // Журн. прикл. химии. – 1999. – 72, № 4. – С. 670.
9. *Камминс Г., Пайкс Э.* Спектроскопия оптического смешения. – М.: Мир, 1978.
10. *Рабинович В.А., Хавин З.Я.* Краткий химический справочник. – Л.: Химия, 1978.
11. *Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я.* Структура макромолекул в растворах. – М.: Наука, 1964.
12. *Тагер А.А., Вишников С.А., Андреева В.М., Секачева Т.В.* // Высокомолекуляр. соединения. А. – 1974. – 16, № 1. – С. 9.
13. *Malkolm G.N., Rowlinson J.S.* // Trans. Faraday Soc. – 1957. – 53. – P. 921.
14. *Благодатских И.В., Васильева О.В., Быков С.В. и др.* // Высокомолекуляр. соединения. А. – 2003. – 45, № 10. – С. 1749.
15. *Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А.* Пространственно-затрудненные фенолы. – М.: Химия, 1972.
16. *Arefiev D.V., Domnina N.S., Komarova E.A., Bilibin A.Yu.* // Eur. Polym. J. – 2000. – 36. – P. 857.
17. *Yasushi Maeda, Noriaki Tsukida, Hiromi Kitano et al.* // J. Phys. Chem. – 1993. – 97. – P. 13903.