

**КИНЕТИКА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ БИФУНКЦИОНАЛЬНОГО
ЗОНДА 2,2,5,5-ТЕТРАМЕТИЛ-4-ФЕНИЛ-3-ИМИДАЗОЛИН-1-
ОКСИЛ-3-ОКСИДА ИЗ ПЛЕНОК ПОЛИ-D,L-ЛАКТИДА,
СФОРМИРОВАННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СВЕРХКРИТИЧЕСКОГО ДИОКСИДА УГЛЕРОДА**

Т.А. Иванова — Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия. ORCID 0000-0001-6568-7649. Эл. почта: tatianaivanovamsu@gmail.com (*для переписки*)

Н.А. Чумакова — ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия. ORCID 0000-0002-3058-2254. Эл. почта: harmonic2011@yandex.ru

Е.Н. Голубева, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия. ORCID 0000-0002-2320-0983. Эл. почта: legol@mail.ru

М.Я. Мельников — Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия. ORCID 0000-0002-9712-8929. Эл. почта: melnikov46@mail.ru

©2021 г. Поступила в редакцию 11.11.2020 г. Прошла рецензирование 05.12.2020 г.
Принята к публикации 05.12.2020 г.

Для количественного описания процесса высвобождения нитроксильного зонда из пленок поли-D,L-лактида (PDLLA) в фосфатный буферный раствор впервые совместно использованы методы оптической спектроскопии и спектроскопии ЭПР. Бифункциональный зонд 2,2,5,5-тетраметил-4-фенил-3-имидазолин-1-оксил-3-оксид (IMNO) включает в себя парамагнитный нитроксильный фрагмент и обладает высоким коэффициентом экстинкции в УФ-области спектра. Полимерные пленки были получены из пористых матриц на основе PDLLA, сформированных и допированных IMNO в среде сверхкритического CO₂ (СК-CO₂). Показана перспектива совместного использования указанных методов для получения более подробной информации о процессах высвобождения зондов из пленок PDLLA, длительность которых не превышает 3-х недель.

Ключевые слова: сверхкритический диоксид углерода, спектроскопия электронного парамагнитного резонанса, оптическая спектроскопия, PDLLA, спиновый зонд 2,2,5,5-тетраметил-4-фенил-3-имидазолин-1-оксил-3-оксид.

ВВЕДЕНИЕ

Настоящая работа является продолжением исследований, посвященных диагностике методом ЭПР полимерных систем и материалов, получаемых с использованием сверхкритических флюидных (СКФ) технологий. Спектроскопия ЭПР позволяет наблюдать как за высвобождением инкапсулированных парамагнитных молекул, так и за изменениями, протекающими во внутренней структуре полимера в процессе его набухания и гидролиза [1–4]. В работе [5] были определены оптимальные параметры процесса одновременного вспенивания и импрегнации PDLLA в среде СК-CO₂ для создания перспективных медицинских материалов, допированных биологически активными веществами.

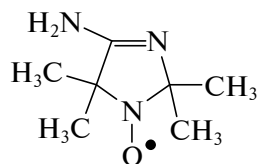


Рис. 1. Строение нитроксильного радикала АТІ

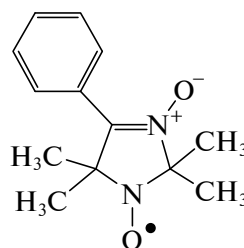


Рис. 2. Строение 2,2,5,5-тетраметил-4-фенил-3-имидазолин-1-оксил-3-оксида (IMNO)

В [6] были получены кинетические кривые высвобождения нитроксильного радикала TEMPONE (2,2,6,6-тетраметил-4-оксо-пиперидин-1-оксил) из вспененного в СК- CO_2 PDLLA. В работах [1, 7] нами была выявлена потеря парамагнетизма в системах «набухший PDLLA — нитроксильный радикал (АТІ/TEMPONE)». Это явление было объяснено уменьшением содержания парамагнитных молекул внутри полимерной матрицы. Строение нитроксильного радикала АТІ приведено на рис. 1.

Гибель нитроксильных радикалов протекает в результате катализируемого кислотами диспропорционирования олигомеров молочной кислоты, образующихся в порах полимера в результате гидролиза полилактида [8]. Показано, что использование метода спинового зонда не всегда может дать исчерпывающую информацию о кинетических закономерностях высвобождения низкомолекулярных веществ из матриксов на основе алифатических полиэфиров.

В то же время ряд нитроксильных радикалов характеризуется высоким коэффициентом экстинкции в ближней УФ-области спектра [9], поэтому для регистрации кинетики высвобождения подобных веществ из полимерных пленок в буферный раствор можно использовать метод оптической спектроскопии. При этом с помощью спектроскопии ЭПР можно наблюдать за изменениями структуры полимерной матрицы в ходе ее набухания и гидролиза.

В настоящей работе впервые совместно применены методы оптической спектроскопии и спектроскопии ЭПР для количественного описания процесса высвобождения бифункционального зонда из пленок PDLLA, полученных при помощи СКФ-технологий, в фосфатный буферный раствор (PBS). Импрегнация полимеров в среде СК- CO_2 является перспективным способом получения современных материалов медицинского назначения [10–12]. Полимерные пленки удобны для исследования методом ЭПР и могут применяться в качестве раневых покрытий [13]. В качестве бифункционального зонда был выбран радикал IMNO, строение которого приведено на рис. 2. Он имеет полосу поглощения с максимумом при длине волны 290 нм (коэффициент экстинкции в ацетонитриле составляет 11600 л/(моль·см) [9]); при этом полоса поглощения IMNO практически не перекрывается со спектром поглощения раствора PDLLA в ацетонитриле. Параметры проведения процесса высвобождения IMNO из полимерных пленок были аналогичны условиям, подробно описанным и обоснованным в работе [7].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Поли-D,L-лактид (PDLLA) (PURASORB®PDL 04, молекулярная масса 45 кг/моль, температура стеклования 52 °С) компании PuracBiochem был любезно предоставлен П.С. Тимашевым (Институт регенеративной медицины академии им. И.М. Сеченова). Стабильный нитроксильный радикал 2,2,5,5-тетраметил-4-фенил-3-имидазолин-1-оксил-3-оксид (IMNO) (рис. 2) был предоставлен В.Д. Сенем (Институт прикладной химической физики РАН, ИПХФ, г. Черноголовка). Использовали диоксид углерода марки о. с. ч. (99,998 %, NIKM Ltd., Россия). Ацетонитрил марки х. ч. дополнительно очищали дистилляцией. В качестве среды для высвобождения спинового зонда из матрикса применяли фосфатный буферный раствор (PBS) (pH=7,4) («Пушинские лаборатории»).

PDLLA импрегнировали IMNO по методике [6] с использованием СКФ мини-лаборатории, разработанной в ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника» РАН [14]. В качестве растворителя использовали СК-СО₂. Полученные пористые полимерные матриксы, допированные IMNO, измельчали в ножевой мельнице, просеивали через сито с размером ячеек <100 мкм и далее с использованием оборудования Specac Atlas Manual Hydraulic Press (25 т) прессовали при 60 °С под давлением 2 т/см² в течение ~30 с. Частицы имели широкое распределение по размерам, размер преобладающей фракции 40—60 мкм (48 %). Для создания пленки толщиной 200—240 мкм использовали 0,30—0,35 г порошка. Образцы пленки весом 0,05—0,06 г, представляющие собой прямоугольники длиной 5—10 мм и шириной 2—3 мм, выдерживали в 2,0—2,5 г PBS в шейкере-инкубаторе ES-20 (Biosan, Латвия) при 37 °С. Для предотвращения закисления среды продуктами гидролиза PDLLA [8, 15—18] проводили регулярную замену буферного раствора через 1—2 суток. Кинетические закономерности высвобождения радикалов устанавливали, отбирая пробы раствора массой около 2—4 мг и регистрируя их спектры ЭПР. Количество парамагнитного вещества в пробе определяли путем двойного интегрирования спектра, где в качестве стандарта использовали таблетку аланина с известным содержанием парамагнитных центров [19]. Оценку устойчивости нитроксильных радикалов в полимерных пленках, помещенных в PBS, проводили для извлеченных из жидкости и высушенных образцов регистрацией спектров ЭПР и определением содержания радикала в пленке. Затем пленку растворяли в ацетонитриле массой 1,6—1,7 г в кварцевой кювете шириной 1 см и определяли количество IMNO спектрофотометрически [9] по величине оптической плотности при длине волны 290 нм на спектрофотометре Specord M-40.

ЭПР-спектры образцов регистрировали при помощи радиоспектрометра X-диапазона Bruker EMX 500 Plus при комнатной температуре. Регистрацию спектров проводили при значениях мощности микроволнового излучения, не приводящих к насыщению сигнала. Образцы полимерных пленок и пористых матриксов помещали в кварцевые ампулы с внутренним диаметром 3—4 мм. Высота образцов составляла ~5—10 мм, что соответствует геометрическим параметрам стандарта, используемого для калибровки спектрометра. Перед регистрацией спектров образцы взвешивали на аналитических весах с точностью $\pm 2 \cdot 10^{-4}$ г. Спектры водных растворов радикалов регистрировали в стеклянных капиллярах диаметром 1,0—1,6 мм, высота образцов не превышала 5 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным ЭПР в течение 7 суток наблюдается высвобождение ~7 % IMNO из полимерной пленки в PBS; в дальнейшем радикалы во внешнем растворе не фиксируются. Снижение скорости выхода молекул допанта из матриц на основе PDLLA во внешнюю среду хорошо известно [1, 20–23]. В то же время в течение 90 суток, когда высвобождение парамагнитного вещества из полимерной пленки уже не наблюдается, происходит значительное уменьшение его количества внутри пленки (рис. 3). Через 90 суток радикал IMNO в пленке не фиксируется.

Причиной потери парамагнетизма внутри пленки PDLLA, выдержанной в PBS, по-видимому является диспропорционирование IMNO [8], происходящее в кислой среде, образованной карбоксильными группами гидролизованного полимера. Для проверки гипотезы о гибели парамагнитных соединений в результате закисления внутренних областей полимера была исследована стабильность IMNO в водном растворе соляной кислоты (pH = 1). Было показано, что нитроксильный радикал, действительно, гибнет в кислой среде (рис. 4).

Поскольку парамагнитный нитроксильный фрагмент обладает невысокой устойчивостью в закисленной среде внутри набухшего PDLLA, в работе был использован второй, независимый метод исследования — оптическая спектроскопия. Данные спектрофотометрии свидетельствуют о том, что внутри набухшего полимера происходит уменьшение интенсивности поглощения IMNO в то время, когда его высвобождение во внешний раствор не наблюдается (рис. 5a). Возможно, что причиной наблюдаемого уменьшения поглощения является серия последовательных реакций (диспропорционирование и расщепление цикла с образованием ацетоксида, бензойной кислоты и α -гидроксиламинокетона, протекающих в кислой среде [24]). Для проверки этой гипотезы было проведено определение кинетики изменения оптической плотности раствора IMNO в соляной кислоте с pH = 3 (рис. 5б). Действительно, в этой среде в интервале длин волн 250–350 нм наблюдается снижение общей интенсивности поглощения и изменение формы линий спектра.

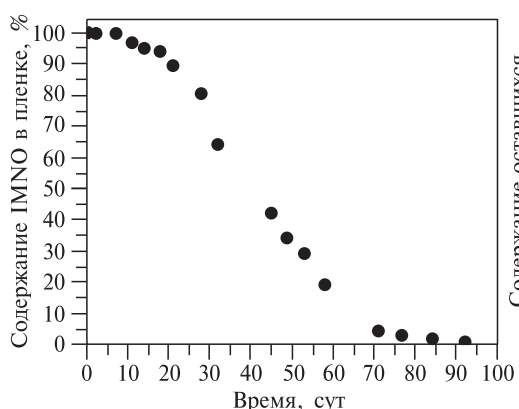


Рис. 3. Кинетическая кривая гибели радикала IMNO в полимерной пленке PDLLA, помещенной в PBS

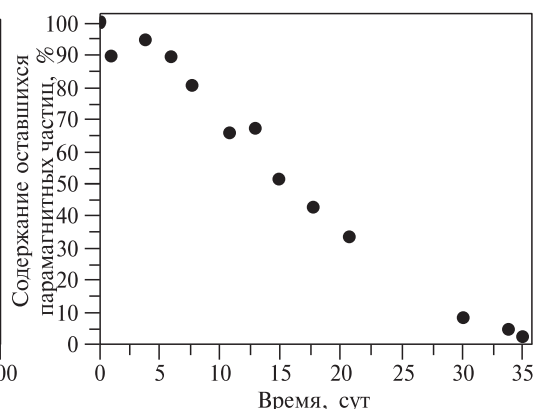


Рис. 4. Кинетика гибели радикала IMNO в водном растворе соляной кислоты (pH = 1)

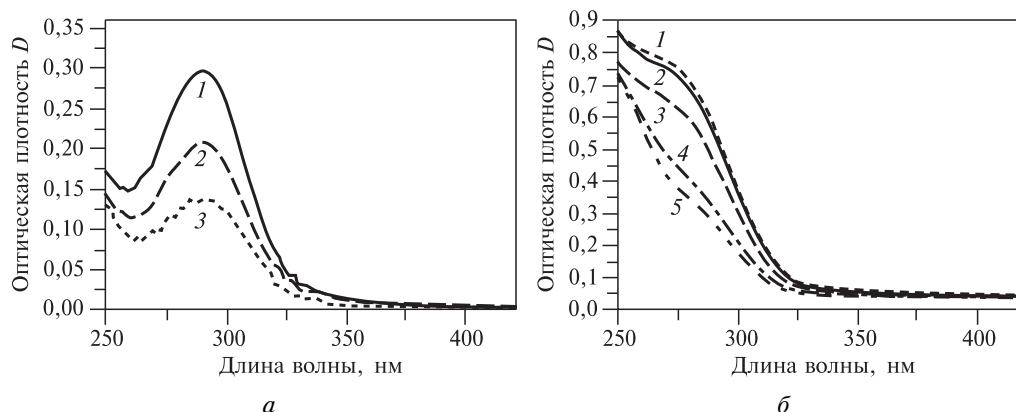


Рис. 5. Кинетика изменения оптических спектров растворов IMNO в разных образцах при различном времени выдерживания полимерной пленки в PBS, сут:

а — растворение набухших пленок из PDLLA, допированных IMNO, в ацетонитриле: 1 — 0; 2 — 28; 3 — 45; б — растворение IMNO в солянокислом растворе (pH=3): 1 — 1; 2 — 5; 3 — 10; 4 — 23; 5 — 29

Временная зависимость количества IMNO в набухших пленках из PDLLA, зарегистрированная методами ЭПР и оптической спектроскопии, представлена на рис. 6. Видно, что устойчивость фрагмента, отвечающего за оптический переход, в кислой среде значительно выше, чем устойчивость нитроксильного фрагмента. Так, в течение 20 суток интенсивность оптического перехода уменьшается на ~10 %, при этом парамагнитный фрагмент гибнет на ~40 %. Далее заметной разницы в скорости гибели парамагнитного фрагмента и фрагмента, отвечающего за оптический переход, не наблюдается. Таким образом, зонд IMNO может быть введен в полимерную матрицу с помощью СК-СО₂ и использован в дальнейшем для спектрофотометрической регистрации кинетики высвобождения допанта из матрицы PDLLA в экспериментах, длительность которых не превышает 3-х недель.

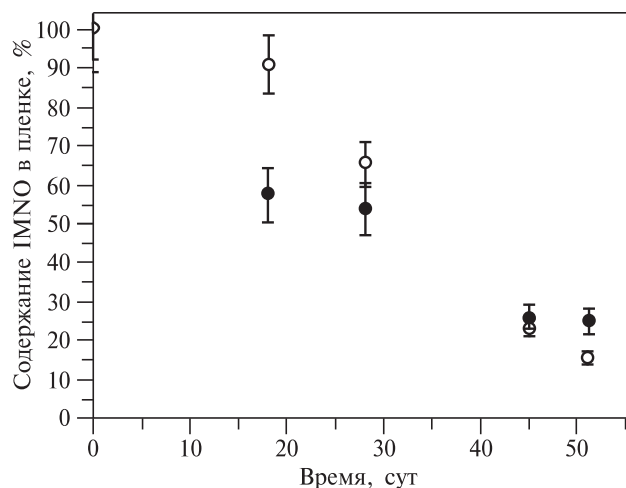


Рис. 6. Кинетика гибели радикала IMNO в набухших пленках PDLLA по данным методов ЭПР (●) и оптической спектроскопии (○)

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета. Авторы благодарят РФФИ (грант № 18-29-06059) за финансовую поддержку. Выражаем благодарность В.Д. Сеню за плодотворное обсуждение результатов работы и С.Н. Чурбанову за изготовление полимерных пленок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Golubeva E.N., Chumakova N.A., Kuzin S.V., Grigoriev I.A., Kalai T., Korotkevich A.A., Bogorodsky S.E., Krotova L.I., Popov V.K., Lunin V.V. // J. Supercrit. Fluids. 2020. Vol. 158. P. 104748.
2. Mader K. // Biomaterials. 1996. Vol. 17. No 4. P. 457.
3. Mader K., Bittner B., Li Y., Wohlauf W., Kissel T. // Pharmaceutical Research. 1998. Vol. 15. No 5. P. 787.
4. Голубева Е.Н., Чумакова Н.А. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2018. № 3. С. 33.
5. Чумакова Н.А., Голубева Е.Н., Иванова Т.А., Воробьева Н.Н., Тимашев П.С., Баграташвили В.Н. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2018. № 1. С. 86.
6. Иванова Т.А., Чумакова Н.А., Голубева Е.Н., Лунин В.В. Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2019. № 1. С. 67.
7. Chumakova N.A., Golubeva E.N., Kuzin S.V., Ivanova T.A., Grigoriev I.A., Kostjuk S.V., Melnikov M.Ya. // Polymers. 2020. Vol. 12. No 12. P. 1.
8. Плисс Е.М., Сень В.Д., Тихонов И.В. Нитроксильные радикалы в химических и биохимических процессах. Saarbrücken : LAMBERT Academic Publishing, 2013. 96 с.
9. Sen V.D., Golubev V.A., Rosantsev V.G. // Russ Chem Bull. 1975. Vol. 23. No 12. P. 2676.
10. Abate M.T., Ferri A., Guan J., Chen G., Nierstrasz V. Impregnation of Materials in Supercritical CO₂ to Impart Various Functionalities, in Advanced Supercritical Fluids Technologies / Ed. Igor Piore. L.: IntechOpen Limited, 2020.
11. Champeau M., Thomassin J.-M., Tassaing T., Jérôme C. // J. Control. Release. 2015. Vol. 209. P. 248.
12. García-Casas I., Montes A., Valor D., Pereyra C., Martinez E.J. // Polymers. 2019. Vol. 11. No 9. P. 1390.
13. Yasuda K., Ogushi M., Nakashima A., Nakano Y., Suzuki K. // In vivo. 2018. Vol. 32. No 4. P. 799.
14. Patent USA No 147199. 2014.
15. Cabezas L.I., Gracia I., Garcia M.T., De Lucas A., Rodriguez J.F. // J. of Supercritical Fluids. 2013. Vol. 80. P. 1.
16. Gleadall A., Pan J., Kruff M.A., Kellomäki M. // Acta Biomater. 2014. Vol. 10. № 5. P. 2223.
17. Zweers M.L.T., Engbers G.H.M., Grijpma D.W., Feijen J. // J. Control. Release. 2004. Vol. 100. № 3. P. 347.
18. Codari F., Lazzari S., Soos M., Storti G., Morbidelli M., Moscatelli D. // Polym. Degrad. Stab. 2012. Vol. 97. № 11. P. 2460.
19. Eaton G.R., Eaton S.S., Barr D.P., Weber R.T. Quantitative EPR. Wien: Springer-Verlag, 2010. 185 p.
20. Tarvainen T., Karjalainen T., Malin M., Pohjolainen S., Tuominen J., Seppälä J., Järvinen K. // J. Control. Release. 2002. Vol. 81. № 3. P. 251.
21. Tarvainen T., Malin M., Barragan I., Tuominen J., Seppälä J., Järvinen K. // Int. J. Pharm. 2006. Vol. 310. № 1–2. P. 162.
22. Santo V.E., Duarte A.R.C., Popa E.G., Gomes M.E., Mano J.F., Reis R.L. // J. Control. Release. 2012. Vol. 162. № 1. P. 19.
23. Yao H., Cao Z., Peng L., Liu J., Zhang X., Deng Z. // Drug Delivery and Translational Research. 2020. Vol. 10. № 1. P. 13.
24. Tikhonov I.V., Sen' V.D., Borodin L.I., Pliss E.M., Golubev V.A., Rusakov A.I. // J. Phys. Org. Chem. 2014. Vol. 27. № 2. P. 114.

KINETICS OF RELEASE OF THE BIFUNCTIONAL PROBE 2,2,5,5-TETRAMETHYL-4-PHENYL-3-IMIDAZOLINE-1-OXYL-3-OXIDE FROM POLY-D,L-LACTIDE FILMS FORMED WITH THE USE OF SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE

Ivanova T.A. — M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, Russia. ORCID 0000-0001-6568-7649. E-mail: tatianaivanovamsu@gmail.com (for correspondence)

Chumakova N.A. — Federal Research Center of Chemical Physics N.N. Semenov RAS, Moscow, Russia 0000-0002-3058-2254.

Golubeva E.N. — M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, Russia. ORCID 0000-0002-2320-0983.

Mel'nikov M.Ya. — M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, Russia. ORCID 0000-0002-9712-8929.

The optical spectroscopy and EPR spectroscopy methods were used together for the first time to quantitatively describe the release of a nitroxyl probe from poly-D,L-lactide (PDLLA) films into a phosphate buffer solution. The bifunctional probe 2,2,5,5-tetramethyl-4-phenyl-3-imidazoline-1-oxyl-3-oxide (IMNO) contains a paramagnetic nitroxyl fragment and has a high extinction coefficient in the UV spectrum. Polymer films were obtained from porous matrices based on PDLLA, formed and doped with IMNO in a supercritical CO₂ environment. It has been established that the combined use of spectrophotometry and EPR spectroscopy is promising for obtaining more detailed information on the processes of the release of probes from PDLLA films, the duration of which does not exceed three weeks.

Key words: supercritical carbon dioxide, electron paramagnetic resonance spectroscopy, optical spectroscopy, PDLLA, spin probe 2,2,5,5-tetramethyl-4-phenyl-3-imidazoline-1-oxyl-3-oxide.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was carried out using equipment purchased at the expense of the Moscow University Development Program. The authors are grateful to the Russian Foundation for Basic Research (Grant No. 18-29-06059) for financial support. We express our gratitude to V.D. Sen' for the fruitful discussion of the results of this work and S.N. Churbanov for the production of polymer films.

REFERENCES

1. Golubeva E.N., Chumakova N.A., Kuzin S.V., Grigoriev I.A., Kalai T., Korotkevich A.A., Bogorodsky S.E., Krotova L.I., Popov V.K., Lunin V.V. // *J. Supercrit. Fluids*. 2020. Vol. 158. P. 104748.
2. Mader K. // *Biomaterials*. 1996. Vol. 17. No 4. P. 457.
3. Mader K., Bittner B., Li Y., Wohlauf W., Kissel T. // *Pharmaceutical Research*. 1998. Vol. 15. No 5. P. 787.
4. Golubeva E.N., Chumakova N.A. // *Russ. J. Phys. Chem. B*. 2019. Vol. 13. P. 1088.
5. Chumakova N.A., Golubeva E.N., Ivanova T.A., Vorobieva N.N., Timashev P.S., Bagratashvili V.N. // *Russ. J. Phys. Chem. B*. 2018. V. 12. P. 1255.
6. Ivanova T.A., Chumakova N.A., Golubeva E.N., Lunin V.V. // *Russ. J. Phys. Chem. B*. 2019. V. 13. P. 1211.

**Кинетика высвобождения бифункционального зонда IMNO
из пленок PDLLA, сформированных с использованием сверхкритического диоксида углерода**

7. Chumakova N.A., Golubeva E.N., Kuzin S.V., Ivanova T.A., Grigoriev I.A., Kostjuk S.V., Melnikov M.Ya. // *Polymers*. 2020. Vol. 12. No 12. P. 1.
 8. Pliss E.M., Sen V.D., Tikhonov I.V. Nitroxyl radicals in chemical and biochemical processes. Saarbrücken: LAMBERT Academic Publishing, 2013. 96 p.
 9. Sen' V.D., Golubev V.A., Rosantsev V.G. // *Russ Chem Bull*. 1975. Vol. 23. No 12. P. 2676.
 10. Abate M.T., Ferri A., Guan J., Chen G., Nierstrasz V. Impregnation of Materials in Supercritical CO₂ to Impart Various Functionalities. In *Advanced Supercritical Fluids Technologies* / Eed. Igor Piore. London: IntechOpen Limited, 2020.
 11. Champeau M., Thomassin J.-M., Tassaing T., Jerome C. // *J. Control. Release*. 2015. Vol. 209. P. 248.
 12. Garcia-Casas I., Montes A., Valor D., Pereyra C., Martinez E.J. // *Polymers*. 2019. Vol. 11. No 9. P. 1390.
 13. Yasuda K., Ogushi M., Nakashima A., Nakano Y., Suzuki K. // *In vivo*. 2018. Vol. 32. No 4. P. 799.
 14. Patent USA No 147199. 2014.
 15. Cabezas L.I., Gracia I., Garcia M.T., De Lucas A., Rodriguez J.F. // *J. of Supercritical Fluids*. 2013. Vol. 80. P. 1.
 16. Gleadall A., Pan J., Krufft M.A., Kellomaki M. // *Acta Biomater*. 2014. Vol. 10. No 5. P. 2223.
 17. Zweers M.L.T., Engbers G.H.M., Grijpma D.W., Feijen J. // *J. Control. Release*. 2004. Vol. 100. No 3. P. 347.
 18. Codari F., Lazzari S., Soos M., Storti G., Morbidelli M., Moscatelli D. // *Polym. Degrad. Stab*. 2012. Vol. 97. No 11. P. 2460.
 19. Eaton G.R., Eaton S.S., Barr D.P., Weber R.T. *Quantitative EPR*. Wien : Springer-Verlag, 2010. 185 p.
 20. Tarvainen T., Karjalainen T., Malin M., Pohjolainen S., Tuominen J., Seppala J., Jarvinen K. // *J. Control. Release*. 2002. Vol. 81. No 3. P. 251.
 21. Tarvainen T., Malin M., Barragan I., Tuominen J., Seppala J., Jarvinen K. // *Int. J. Pharm*. 2006. Vol. 310. No 1—2. P. 162.
 22. Santo V.E., Duarte A.R.C., Popa E.G., Gomes M.E., Mano J.F., Reis R.L. // *J. Control. Release*. 2012. Vol. 162. No 1. P. 19.
 23. Yao H., Cao Z., Peng L., Liu J., Zhang X., Deng Z. // *Drug Delivery and Translational Research*. 2020. Vol. 10. No 1. P. 13.
 24. Tikhonov I.V., Sen' V.D., Borodin L.I., Pliss E.M., Golubev V.A., Rusakov A.I. // *J. Phys. Org. Chem*. 2014. Vol. 27. No 2. P. 114.
-
-