

МОДИФИКАЦИЯ УКОРОЧЕННЫХ ОДНОСТЕННЫХ (ОДНОСЛОЙНЫХ) НАНОТРУБОК С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО ВОДОРАСТВОРИМОГО НОСИТЕЛЯ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ

В. Н. Алдобаев¹, М. А. Презент², А. В. Любешкин², Т. Б. Егорова³

¹Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России

²Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Поступила в редакцию 10.04.2017 г.

Аннотация. Был проведён синтез потенциального носителя для фармакологических субстанций, представляющего собой водорастворимые модифицированные укороченные одностенные углеродные нанотрубки (УОУНТ). Синтез осуществлялся путём ковалентного присоединения к графеновой поверхности УОУНТ водорастворимого линкера, обеспечивающего стабильность водных суспензий синтезированной субстанции.

Ключевые слова: одностенные (однослойные) углеродные нанотрубки (ОУНТ), носитель, линкер, графеновая поверхность, ЯМР-¹H, ПЭМ.

Abstract. It was realized the synthesis of drug delivery system (DDS), represented hydrophilic grafted shorted SWCNT. The synthesis constituted of covalent addition hydrophilic linker to graphene surface SWCNT, resulted in stabilization of synthesized substance water suspension.

Keywords: single walled carbon nanotubes (SWCNT), drug delivery system, linker, graphene surface, NMR ¹H, TEM.

За последние два десятилетия большое количество наночастиц различной химической природы было разработано и в той или иной степени опробовано в качестве потенциальных лекарственных носителей (DDS – drug delivery system) при раковой терапии и иных заболеваниях [1,2].

Применение одностенных (однослойных) углеродных нанотрубок (ОУНТ) для создания наноструктурированных лекарственных форм остаётся одним из перспективных направлений научных разработок фармацевтической индустрии [3].

В данной работе предпринята попытка синтеза субстанции носителя на основе укороченных одностенных углеродных нанотрубок (УОУНТ) путём модификации графеновой поверхности. При этом основными критериями при выборе стратегии модификации посредством ковалентного присоединения линкера, обеспечивающего водорастворимость, служили: увеличение выхода носителя, упрощение схемы синтеза и удешевление процесса синтеза, главным образом с учётом стоимости реагентов.

Выбранный нами способ модификации графеновой поверхности заключался в ее окислении с образованием свободных карбоксильных групп

© Алдобаев В. Н., Презент М. А., Любешкин А. В., Егорова Т. Б., 2017

[4]. Далее, под действием тионилхлорида в среде диметилфорида образовывался хлорангидрид УОУНТ, который затем вступал в реакцию с 1-N-Вос-1,8-диаминопропиленгликолем, давая соответствующий амид. Обработка разбавленной соляной кислотой приводила к удалению защитной группы и образованию целевого продукта в виде гидрохлорида [5].

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Одностенные (однослойные) углеродные нанотрубки для получения субстанции водорастворимых модифицированных УОУНТ на коммерческой основе были приобретены у Cheap Tubes Inc., США. Основные характеристики УОУНТ по паспорту: внешний диаметр (OD) – 1-2 нм; внутренний диаметр (ID) – 0.8-1.6 нм; длина (length) – 0.5-2.0 мкм; зольность (ash) < 1.5 %; показатель удельной поверхности (SSA) - 407 м²/г; насыпная плотность (BD) - 0.14 г/см³; истинная плотность (TD) - 2.1 г/см³; остаточное содержание аморфного углерода < 3.0 %; остаточное содержание MWCT (многостенных углеродных нанотрубок) < 5.0 %; способ получения – CVD.

Для проведения реакций модификации графеновой поверхности при синтезе вариантов носителя использовали следующие реактивы и растворители: хлористый тионил (thionyl chloride), CAS 7719-09-7, 99.6 %, Sciencelab.com. Inc®; 1-N-Вос-1,8-диаминопропиленгликоль (N-Вос-2,2'-(ethylenedioxy)diethylamine), CAS 153086-78-3, 98 %, AKSci®.

При проведении реакций с УОУНТ суспензии обрабатывали в УЗ ванне VBS-4D при мощности ультразвукового излучателя 180 Вт.

При проведении реакций с УОУНТ суспензии отделяли на центрифуге ОПН-16 с ротором 6 x 50 мл, Labtex®.

Значения pH растворов контролировали pH-метром ЭКОТЕСТ-120, ТУ 4215-004-41541647-98.

Спектры ЯМР-¹H регистрировали на приборе Bruker AM300 SF, Bruker®, при рабочей частоте 300 МГц. Спектры ЯМР-¹H субстанций модифицированных укороченных ОУНТ с Вос-защищёнными амино группами линкера снимали в CDCl₃. Спектры ЯМР-¹H субстанций модифицированных укороченных ОУНТ со снятой Вос-защитой снимали в D₂O.

Для оценки массовой доли присоединённого линкера в субстанции носителя использовали метод добавки внутреннего стандарта в ЯМР-¹H

анализе. В качестве внутреннего стандарта выступал трет-бутиловый спирт (t-BuOH). Для этой цели приготовили раствор t-BuOH в CDCl₃ с концентрацией 10 мг/мл. Добавку осуществляли автоматической пипеткой переменного объёма в виде аликвоты раствора в кювету для ЯМР, содержащую образец.

Расчёты проводили по формуле:

$$\omega_{\text{Link}} = I_{\text{обр}} / I_{\text{ст}} * (m_{\text{ст}} * n_{\text{ст}} * M_{\text{зам}}) / (n_{\text{зам}} * M_{\text{ст}} * m_{\text{обр}}), \text{ где } \text{е} \quad (1)$$

где $m_{\text{обр}}$ - масса навески исследуемого образца (субстанции модифицированных УОУНТ); $I_{\text{обр}} / I_{\text{ст}}$ - соотношение интегральных интенсивностей сигналов ЯМР-¹H исследуемого образца/внутреннего стандарта; $n_{\text{зам}}$ - количество протонов в Вос-заместителе (9 протонов); $M_{\text{зам}}$ - Мол. вес заместителя (1-N-Вос-1,8-диаминопропиленгликолевый линкер с учётом групп атомов, между амино группой и графеновой поверхностью); $m_{\text{ст}}$ - масса навески стандарта (t-BuOH); $n_{\text{ст}}$ - количество протонов в молекуле стандарта (9 протонов); $M_{\text{ст}}$ - Мол. вес стандарта.

Качество носителя контролировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) JEM-2100 (Jeol, Япония), снабженного электронной пушкой с полевой эмиссией, корректором сферических aberrаций Cs (CEOS GmbH, Германия) и энергетическим фильтром электронов GIF (Gatan, США). Ускоряющее напряжение составляло 200 кВ, разрешение по точкам – 0.1 нм, по линиям – 0.08 нм. Размеры зонда в сканирующем режиме варьировали от 0.2 до 1.5 нм в зависимости от исследуемого материала, при нанодифракции – в диапазоне 0.5-1.5 нм. В качестве аналитических приставок использовали энергодисперсионный рентгеновский микроанализатор с азотным охлаждением и спектрометр характеристических потерь энергии электронов с разрешением 0.5 эВ.

Распределение частиц носителя по размерам в водных суспензиях контролировали с помощью анализатора размера частиц ZetaSizer Nano ZS методом динамического светорассеяния. Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Malvern instruments, позволявшего получать значения ζ-потенциала, индекса полидисперсности (PDI), распределения частиц по интенсивности, объёму и числу.

Схема синтеза (рисунок 1) состояла из 4-х основных стадий (А – окисление; В - получение хлорангидрида-производного УОУНТ; С - модификация УОУНТ линкером (N-Вос-2,2'-(ethylenedioxy)

diethylamine); D – снятие Boc-защиты и получение варианта носителя) [5].

Стадия А. В круглодонной стеклянной колбе объемом 250 мл смешивали 93.5 мл концентрированной серной и 31.5 мл концентрированной азотной кислоты. Охлаждали полученную смесь до 40 °С и прибавляли к смеси 100 мг УОУНТ, затем помещали колбу в ультразвуковую ванну и проводили ультразвуковую обработку суспензии в течение 1 ч при температуре ванны 40 °С. К суспензии прибавляли 375 мл дистиллированной воды, перемешивали и распределяли полученную смесь по пластиковым центрифужным пробиркам с уравниванием. Центрифугировали при ускорении 12000 g в течение 1 ч. Надосадочную жидкость отбрасывали, осадок суспендировали в 10-20 мл дистиллированной воды, переносили в одну центрифужную пробирку, доводили объем суспензии дистиллированной водой до 40 мл и

центрифугировали при тех же условиях с пробиркой-противовесом. Операции отбрасывания надосадочной жидкости, ресуспендирования осадка и центрифугирования проводили еще 2 раза (до установления нейтрального значения рН надосадочной жидкости).

Отделенный осадок добавляли к смеси 100 мл концентрированной серной кислоты и 25 мл 30 % перекиси водорода в круглодонной стеклянной колбе объемом 250 мл. Колбу помещали в ультразвуковую ванну и проводили ультразвуковую обработку суспензии в течение 30 мин при температуре ванны 40 °С. Центрифугирование суспензии проводили по схеме, указанной выше. Надосадочную жидкость отбрасывали, осадок суспендировали в 10-20 мл абсолютизированного этанола, переносили в одну центрифужную пробирку, доводили объем суспензии абсолютизированным этанолом до 40 мл и центрифугировали с

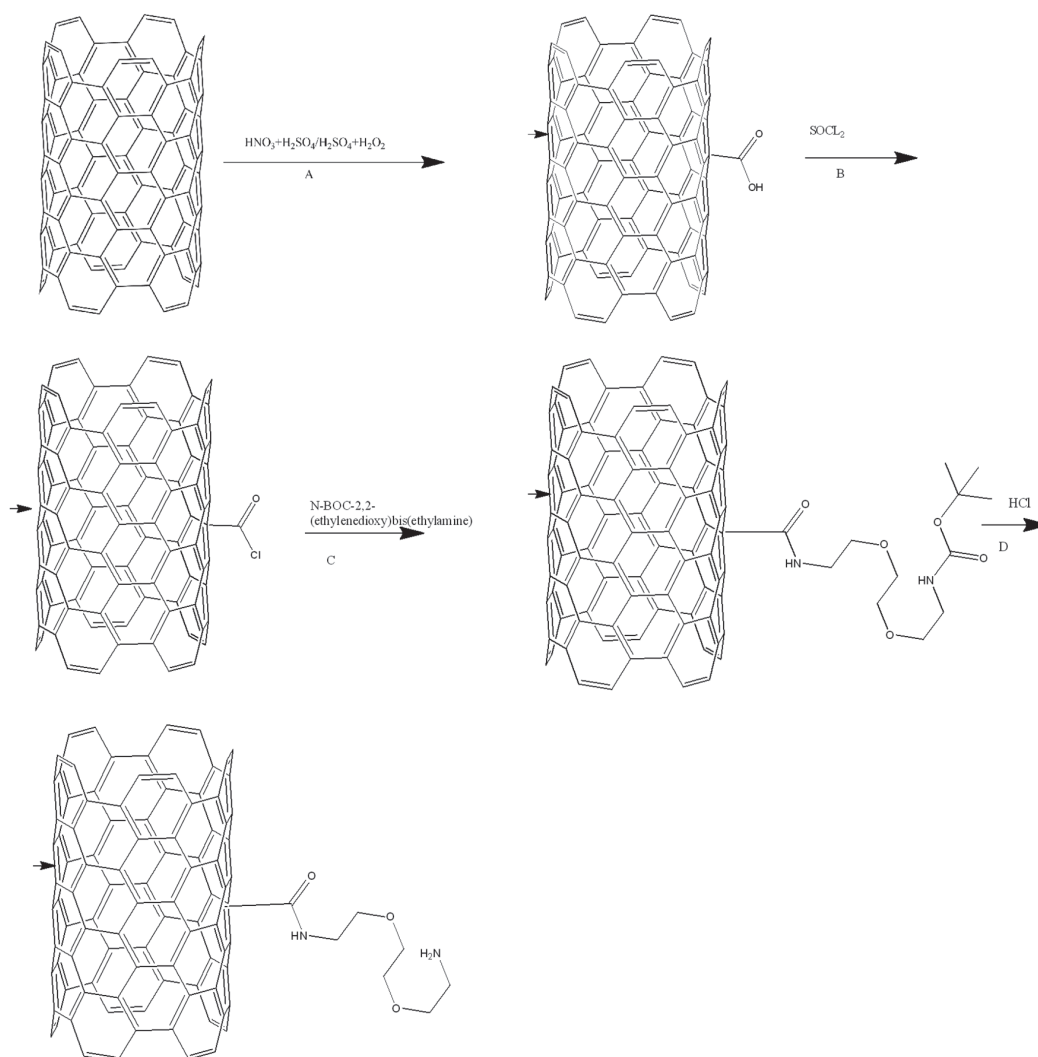


Рис. 1. Схема модификации графеновой поверхности УОУНТ 1-N-Boc-1,8-диаминопропангликолем через промежуточные стадии окисления и получение ацил хлорид-производного УОУНТ

пробиркой-противовесом при ускорении 12000 g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость отбрасывали, осадок суспендировали в 40 мл абсолютизированного этанола и повторяли центрифугирование еще раз. После этого осадок отделяли как описано выше и переносили в минимальном количестве абсолютизированного этанола в грушевидную колбу объемом 50 мл, далее растворитель удаляли на роторном испарителе при остаточном давлении 15 torr и температуре бани 50 °С в течение 2 ч. Получали на этой стадии 92 мг продукта.

Стадия В. В двугорлой круглодонной колбе объемом 100 мл, снабжённой термометром и обратным холодильником, составляли смесь из 40 мл свежеперегнанного хлористого тионила и 2 мл абсолютизированного диметилформамида, добавляли к этой смеси весь продукт, полученный на стадии А, и перемешивали содержимое колбы на магнитной мешалке с подогревом в течение 24 ч при ~70 °С. После этого реакцию смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали с пробиркой-противовесом при ускорении 12000 g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость отбрасывали, осадок ресуспендировали в 45 мл абсолютизированного тетрагидрофурана и проводили центрифугирование при вышеуказанных условиях. Промывку осадка тетрагидрофураном и центрифугирование повторяли еще раз, после чего осадок отделяли как описано выше и переносили в минимальном количестве абсолютизированного тетрагидрофурана в грушевидную колбу объемом 50 мл, далее растворитель удаляли на роторном испарителе при остаточном давлении 15 torr и температуре бани 40 °С в течение 2 ч. Получали на этой стадии 135 мг продукта.

Стадия С. К 100 мг модифицированных УОУНТ, полученных на стадии В, помещённых в грушевидную колбу объемом 10 мл добавляли 2 мл 1-N-Вос-1,8-диаминопропиленгликоля и перемешивали на магнитной мешалке с подогревом при ~70 °С в течение 4 суток. Затем смесь переносили в центрифужную пробирку, разбавляли 40 мл абсолютизированного этанола и центрифугировали с пробиркой-противовесом при ускорении 12000 g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость переносили в грушевидную колбу на 100 мл, осадок ресуспендировали в 40 мл абсолютизированного этанола и проводили центрифугирование при вышеуказанных условиях. Надосадочную жидкость снова переносили в грушевидную колбу на 100 мл, объединяя фракции этанола. Затем растворитель отгоняли на роторном испарителе

при остаточном давлении 15 torr и температуре бани 40 °С в течение 2 ч. К сухому остатку добавляли 50 мл 10 %-го водного раствора щавелевой кислоты, переносили в делительную воронку и трижды экстрагировали 50 мл хлороформа. Экстракты объединяли и промывали 20 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия, переносили в круглодонную колбу объемом 250 мл и сушили над предварительно прокалённым сульфатом магния в течение 2 часов. Далее экстракт переносили в грушевидную колбу объемом 250 мл и отгоняли растворитель на роторном испарителе при остаточном давлении 15 torr и температуре бани 40 °С в течение 2 ч. Получали 130 мг продукта, по консистенции напоминающего темное масло, структура которого по данным ЯМР-¹H спектроскопии (рисунок 2) соответствует амиду линкера 1-N-Вос-1,8-диаминопропиленгликоля.

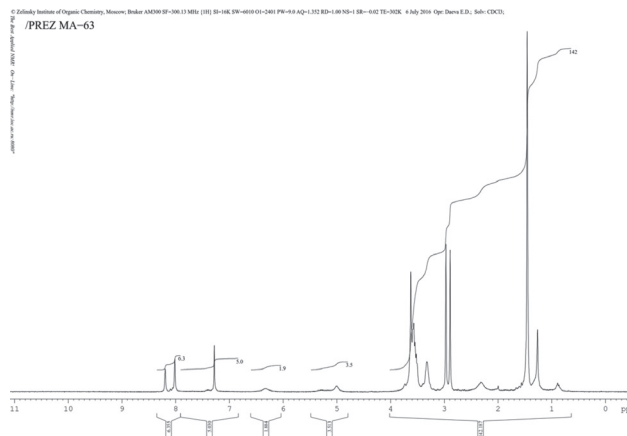


Рис. 2. ЯМР-¹H спектр образца модифицированных УОУНТ с Вос-защищённым линкером, полученных на стадии С

Стадия D. К продукту, полученному на стадии С, добавляли 20 мл 15 % соляной кислоты и перемешивали на магнитной мешалке в течение 4 ч при комнатной температуре. Раствор соляной кислоты отгоняли на роторном испарителе при температуре бани 40 °С в течение 2 ч и в результате получали 110 мг чёрного порошкообразного продукта, структура которого по данным ЯМР-¹H спектроскопии (рисунок 3) соответствует гидрохлориду моноацилированного 1,8-диаминопропиленгликоля.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исходя из массы добавки и образца, интегральных интенсивностей сигналов протонов t-ВсОН и Вос-заместителя по формуле (1) была определена массовая доля линкера в образце, которая составила 0.43. На рисунке 4 представлен ЯМР-¹H образца с добавкой, на котором отмече-

ны интегральные интенсивности аналитических сигналов (108,4 -1,5 ppm и 86,6 - 1,2 ppm, Вос-заместителя и t-BuOH соответственно).

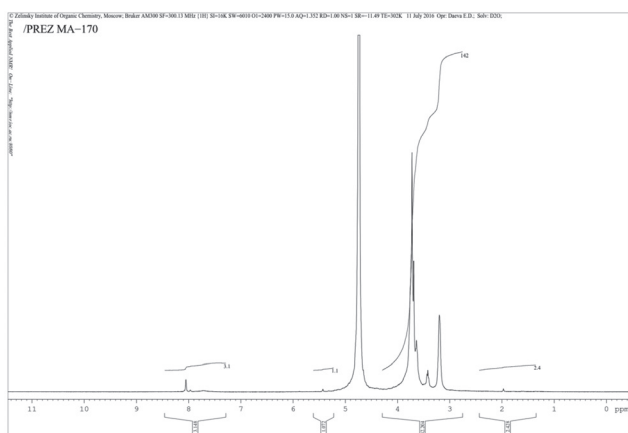


Рис. 3. ЯМР-¹H спектр образца модифицированных УОУНТ со снятой Вос-защитой, полученных на стадии D

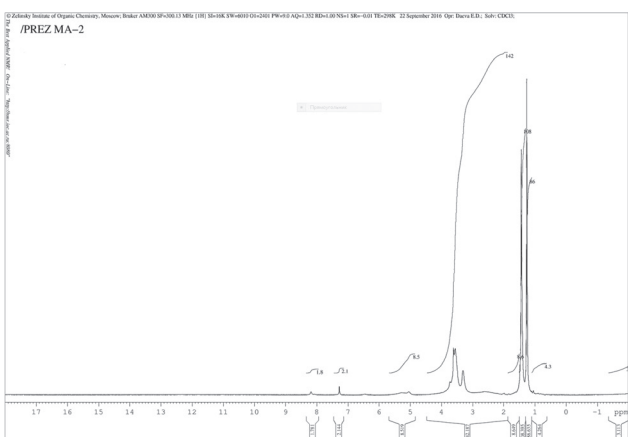


Рис. 4. ЯМР-¹H спектр образца модифицированных УОУНТ с Вос-защищённым линкером, полученных на стадии C, с добавкой t-BuOH

Растворимость в воде субстанции носителя составила 22-25 мг/мл. При такой концентрации образовывалась тонкодисперсная непрозрачная суспензия без тенденции к частичной седиментации. При измерении на анализаторе ZetaSizer Nano ZS распределения частиц по размерам в водной суспензии было установлено, что средний диаметр частиц превышал 2500 нм и находился выше верхнего предела измерения прибора. Значение ζ-потенциала составляло 29 ± 28 мВ (± ст. отклонение), данная величина находится на условной границе устойчивости для коллоидных систем. Полученная оценка величины среднего диаметра частиц в суспензии согласуется с линейными размерами ОУНТ в выбранном для проведения синтеза исходном наноматериале.

На рисунке 5 представлены электронные фотографии образцов носителя, выполненные с различным разрешением.

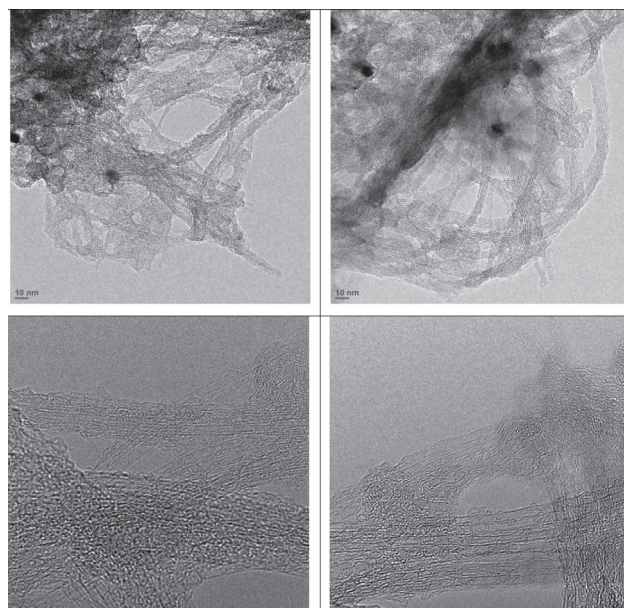


Рис. 5. Электронные фотографии образцов носителя, выполненные методом ПЭМ, с низким и высоким разрешением в верхнем и нижнем ряду соответственно. Масштаб указан в левом нижнем углу каждого снимка

На качественном уровне методом ПЭМ подтверждено наличие ОУНТ в целевом продукте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В лабораторных условиях был реализован синтез потенциального носителя для фармакологических субстанций, представляющего собой водорастворимые модифицированные укороченные одностенные углеродные нанотрубки (УОУНТ).

Целевой продукт был количественно охарактеризован по показателю массовой доли линкера в своём составе методом ЯМР-¹H, величиной ζ-потенциала частиц в водных суспензиях методом динамического светорассеяния и качественно снимками ПЭМ.

По данным сравнительного анализа описанных в литературе методик синтеза вариантов носителя на основе ОУНТ путём модификации посредством ковалентного присоединения линкера, обеспечивающего необходимую водорастворимость, представленный вариант выгодно отличается по показателям стадийности, трудоёмкости, выхода конечного продукта и в первую очередь по стоимости необходимого оборудования и реактивов.

Алдобаев В. Н., Презент М. А., Любешкин А. В., Егорова Т. Б.

Результаты были получены в рамках выполнения работ по Государственному заданию № 26.001.16.800 ФМБА России. Авторы благодарят Отдел структурных исследований ИОХ РАН за исследование образцов методом электронной микроскопии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Farokhzad O.C. Impact of nanotechnology on drug delivery / O.C. Farokhzad, R. Langer // ACS Nano. — 2009. — № 3. — P.16-20.

2. Pridgen E.M. Biodegradable, polymeric nanoparticle delivery systems for cancer ther-

apy / E.M. Pridgen, R. Langer, O.C. Farokhzad // Nanomed. — 2007. — № 2. — P. 669-680.

3. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon / S. Iijima // Nature. — 1991. — № 354. — P.56-58.

4. Purification of CVD synthesized single-wall carbon nanotubes by different acid oxidation treatments / Y. Li [et al.] // Nanotechnology. — 2004. — Vol. 15, № 11. — P. 1645-1649.

5. Banerjee S. Covalent surface chemistry of single-walled carbon nanotubes / S. Banerjee, T. Hemraj-Benny, S. S. Wong // Adv. Mater. — 2005. — Vol. 17, №1. — P. 17-29.

Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии»

Алдобаев В. Н., кандидат биологических наук, начальник отдела аналитической химии и радиобиологии

Тел.: +7 915 217-72-19

E-mail: vladimir@aldobaev.ru

Research center for toxicology and hygienic regulation of biopreparations – branch of National Research Center National Research Center Institute of Immunology

Aldobaev V. N., Ph.D. (biol.), Head of division for analytical chemistry and radiobiology

Ph.: +7 915 217-72-19

E-mail: vladimir@aldobaev.ru

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского

Презент М. А., кандидат химических наук, научный сотрудник

Тел.: +7 903 793-89-62

E-mail: pre1962@mail.ru

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry

Present M. A., Ph.D. (chem.), researcher,

Ph.: +7 903 793-89-62

E-mail: pre1962@mail.ru

Любешкин А. В., кандидат химических наук, научный сотрудник

Тел.: +7 916 136-3156

E-mail: cito2006@rambler.ru

Lyubeshkin A. V., Ph.D. (chem.), researcher.

Ph.: +7 916 136-3156

E-mail: cito2006@rambler.ru

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Егорова Т. Б., инженер кафедры физической химии

Тел.: (926)398-54-90

E-mail: tolganay@mail.ru

M. V. Lomonosov Moscow State University
Egorova T. B., engineer of Physical chemistry chair

Ph.: (926)398-54-90

E-mail: tolganay@mail.ru