

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ РАСТВОРОВ ЭФИРОВ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ВОДЕ И ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДЕ

Михальчук А.Л., Курман П.В., Шабуня П.С., Фатыхова С.А., Рудак Е.В., Кисель М.А.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси
ул. Купревича, 5/2, Минск, 220141, Беларусь
E-mail: lipmal@iboch.bas-net.by

Введение. 5-Аминолевулиновая (δ -амино-4-оксопентановая) кислота (5-АЛК) — биогенная аминокислота, являющаяся биосинтетическим предшественником хлорофилла у растений и гема у животных [1]. Сфера применения 5-АЛК простирается от медицины до сельского хозяйства [2]. В медицине 5-АЛК применяется, главным образом, в онкологии, в флуоресцентной диагностике (ФД) для визуализации опухолевых тканей при оперативных вмешательствах и в фотодинамической терапии (ФДТ) в качестве биосинтетического предшественника фотосенсибилизирующего агента протопорфирина IX. 5-АЛК не проявляет флуоресцентных и фотосенсибилизирующих свойств, однако являясь биосинтетическим предшественником протопорфирина IX, опосредованно выступает в качестве фотоактивного биофора в живых организмах. Всё более широкие перспективы открываются в применении 5-АЛК в дерматологии и косметологии [3]. В растениеводстве 5-АЛК в силу ограниченной доступности и относительно высокой стоимости пока ещё имеет ограниченное применение. Однако количество научных, научно-популярных и научно-технических публикаций, включая патентную информацию, посвящённых использованию 5-АЛК как росторегулятора и адаптогена, множится лавинообразно, что предполагает всё более глубокое проникновение 5-АЛК в сферу агропромышленного производства.

Отличительной структурной особенностью 5-АЛК является присутствие в её структуре наряду с амино- и карбоксильной группами карбонильной группы, формирующей высокореакционноспособную α -аминокарбонильную группировку, предопределяющую физико-химические свойства и биохимические функции 5-АЛК. В силу указанных свойств в свободном состоянии 5-АЛК крайне лабильна и в растворах весьма быстро превращается в 3,6-дигидропиразин-2,5-дипропионовую кислоту, и далее в порфобиллиноген и псевдопорфобиллиноген вследствие раскрытия цикла димерного кетимина [4]. 3,6-дигидропиразин-2,5-дипропионовая кислота может также окисляться с образованием пиразин-2,5-дипропионовой кислоты. Для предотвращения димеризации 5-АЛК получают и используют в виде солей с минеральными кислотами, преимущественно в виде гидрохлорида.

Другим «неблагоприятным» качеством 5-АЛК является ее гидрофильность, препятствующая проникновению через липидные мембраны в клетки и клеточные органеллы. Преодоление этого ограничения в применении 5-АЛК достигается получением эфиров или амидов, проявляющих повышенную липофильность и, как следствие, более высокую биодоступность. Согласно литературным данным эфиры 5-АЛК представляют значительный практический интерес как более эффективные агенты для ФД и ФДТ, а также в качестве альтернативного генным технологиям метода повышения и стабилизации сельскохозяйственного производства продуктов земледелия. Исследования на клетках человека и животных подтверждают эффективность применения 5-АЛК в виде эфиров со спиртами [5,6].

Постановка задачи. Практическое применение 5-АЛК в медицине и сельском хозяйстве не представляет каких-либо проблем, так как кислота хорошо растворима и достаточно устойчива в виде солей в воде — самом распространенном и самом приемлемом для биологических объектов растворителе. В то же время информация о свойствах эфиров 5-АЛК (растворимость, стабильность растворов и др.) ограничена, что препятствует разработке лекарственных и препаративных форм для применения в медицине и сельском хозяйстве. В этой связи представлялось актуальным изучить растворимость и стабильность растворов

эфиров 5-АЛК гидрохлоридов в наиболее приемлемых для биологических объектов растворителях.

Методы исследования. Синтез эфиров осуществляли по реакции конденсации гидрохлорида 5-АЛК с соответствующим спиртом в присутствии кислоты при постоянном отделении выделяющейся воды. Выход эфиров 5-АЛК гидрохлоридов составил 80-90%. Чистоту эфиров определяли с помощью ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии и хромато-масс-спектрометрии. Качественный и количественный контроль растворимости и стабильности растворов гексилового эфира 5-АЛК гидрохлорида в воде и диметилсульфоксиде (ДМСО) проводили с использованием метода ВЭЖХ-МС. Был использован хроматограф Agilent 1200 с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6410 Triple Quad и диодно-матричным детектором Agilent G1315C. Условия хроматографии: колонка Zorbax Eclipse XDB-C18; подвижная фаза — 0,05% водный раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде и ацетонитрил в режиме градиентного элюирования при скорости потока 0,5 мл/мин; температура колонки 35 °С; объем инъекции 2 мкл. Параметры работы масс-спектрометра: интерфейс ионизации электроспрей в режиме сканирования положительных ионов, фрагментор – 135 В, поток осушающего газа 10 л/мин, температура в ионном источнике 350 °С, давление на распылителе 30 psi, напряжение на капилляре 4000В, диапазон масс от 100 до 300 а.е.м. В качестве стандартов использовали растворы эфира и 5-АЛК, которые хранили при -20°С.

Критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ) определяли по интенсивности флуоресценции 1,6-дифенилгексатриена в водных растворах эфиров 5-АЛК в интервале концентраций $5 \times 10^{-2} - 10^{-5}$ М по методике, описанной в работе [7].

Результаты. Исследование растворимости эфиров 5-АЛК гидрохлоридов показало, что эфиры с низшими ($\text{C}_1 - \text{C}_4$) и средними ($\text{C}_6 - \text{C}_{12}$) спиртами растворимы в полярных апротонных растворителях (ДМСО, ДМФА, ацетонитриле), хлоруглеводородах (хлороформ, дихлорэтан) и нерастворимы в простых и сложных эфирах, ацетоне, углеводородах. Эфиры с высшими спиртами ($\text{C}_{16} - \text{C}_{18}$) плохо растворимы во всех изученных растворителях. Эфиры с низшими спиртами хорошо растворимы в воде, а эфиры со средними и высшими спиртами образуют мицеллярные растворы с ККМ 0,01; 0,0075; 0,005; 0,00045; 0,0003М для гексилового, октилового, децилового, додецилового и гексадецилового эфиров 5-АЛК гидрохлоридов соответственно. При этом мицеллы из последнего эфира при концентрации более 0,002М не образуются, при его диспергировании ультразвуком формируются крупные надмолекулярные структуры, которые быстро осаждаются. Установлено, что 3%-ные растворы гексилового эфира 5-АЛК гидрохлорида в воде и ДМСО при хранении в нормальных условиях на протяжении 6 месяцев подвергаются медленному гидролизу с накоплением свободной 5-АЛК гидрохлорида. Никаких других продуктов превращения в исследуемых растворах не обнаружено. Гидролиз эфира в растворе ДМСО обусловлен высокой гигроскопичностью растворителя и поглощением влаги из атмосферного воздуха. В отсутствие контакта раствора в ДМСО с воздухом гидролиз эфира может быть исключён.

Исследование стабильности кристаллических образцов эфиров 5-АЛК гидрохлоридов ($\text{C}_1, \text{C}_4, \text{C}_6, \text{C}_8, \text{C}_{10}, \text{C}_{12}, \text{C}_{16}$) не показало какого-либо заметного разложения препарата в течение 12 месяцев.

Заключение. Полученные результаты позволяют констатировать, что наиболее приемлемой формой для фармсубстанций и препаративных форм эфиров 5-АЛК гидрохлоридов являются кристаллические или лиофилизированные порошки и растворы в ДМСО. При условии ограниченных сроков хранения в качестве готовых лекарственных и препаративных форм могут рассматриваться растворы препарата в воде.

Литература

1. O'Neill G.P., Söll D. Transfer RNA and the formation of the heme and chlorophyll precursor, 5-aminolevulinic acid. *Biofactors*. 1990, Vol 2, N4, P. 227-235.

2. Armoškaitė V., Ramanauskienė K., Briedis V. Selection of the optimal Pharmaceutical form of 5-Aminolevulinic acid and its application in the treatment of oncologic diseases. *Medicina (Kaunas)*. 2011, Vol. 47, Suppl. 2, P. 49-55.
3. Nishikawa S., Murooka Y. 5-Aminolevulinic acid: production by fermentation, and agricultural and biomedical applications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2001, Vol. 18, P. 149-170.
4. Donnelly R.F., McCarron P.A. Woolfson A.D. Derivatives of 5-Aminolevulinic Acid for Photodynamic Therapy. *Perspectives in Medicinal Chemistry* 2007, Vol. 1, P. 49–63.
5. Lange N., Jichlinski P., Zellweger M., et al. Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolaevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX: a pilot study. *British Journal of Cancer*. 1999, Vol. 80, N1-2, P. 185-193.
6. Endlicher E., Rümmele P., Hausmann F., et al. Protoporphyrin IX distribution following local application of 5-aminolevulinic acid and its esterified derivatives in the tissue layers of the normal rat colon. *British Journal of Cancer*. 2001, Vol. 85, N10, P. 1572–1576.
7. Chattopadhyay A., London E. Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Analytical Biochemistry*. 1984, Vol. 139, N2, P. 408-412.

THE STUDY OF 5-AMINOLEVULINIC ACID ESTERS STABILITY IN WATER AND DIMETHYLSULFOXIDE SOLUTIONS

Mikhal'chuk A.L., Kurman P.V., Fatykhava S.A., Shabunya P.S., Rudak E.V., Kisel M.A.

Institute of Bioorganic Chemistry of Belarus National Academy of Sciences
Kuprevich str., 5/2, Minsk, 220141, Belarus

The properties of 5-aminolevulinic acid esters hydrochlorides in water and DMSO solutions are studied. It is shown that the most reasonable formulation of hexyl ester of 5-ALA hydrochloride is crystalline and lyophilized powders as well as the solution in DMSO. On condition the limited working life (up to 6 months at + 5 °C) the solution of the drug in water is allowed to consider as a formulation.

Изучены свойства порошков и растворов гексилового эфира 5-АЛК гидрохлорида в воде и ДМСО. Показано, что наиболее приемлемыми лекарственными формами гексилового эфира 5-АЛК гидрохлорида являются кристаллические и лиофилизированные порошки, а также раствор в ДМСО. При условии ограниченных сроков хранения (до 6 мес. при +5°C) в качестве готовых лекарственных форм могут рассматриваться растворы препарата в воде.