

# 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](mailto:lipmal@iboch.bas-net.by)

**Введение.** 5-Аминолевулиновая ( $\delta$ -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  $\alpha$ -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  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  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.