

УДК 547.914.4+539.2:54+615.7

Механохимическое получение композитов эфиров бетулина с арабиногалактаном и изучение их физико-химических свойств

С. А. КУЗНЕЦОВА^{1,2}, Ю. Н. МАЛЯР¹, Т. П. ШАХТШНЕЙДЕР^{3,4}, М. А. МИХАЙЛЕНКО³, В. А. ДРЕБУЩАК^{4,5}, В. В. БОЛДЫРЕВ^{3,4}

¹Институт химии и химической технологии Сибирского отделения РАН, ул. К. Маркса, 42, Красноярск 660049 (Россия)

E-mail: ksa@icct.ru

²Сибирский федеральный университет, проспект Свободный, 79, Красноярск 660041 (Россия)

³Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения РАН, ул. Кутателадзе, 18, Новосибирск 630128 (Россия)

⁴Новосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 2, Новосибирск 630090 (Россия)

⁵Институт геологии и минералогии Сибирского отделения РАН, проспект Академика Коптюга, 3, Новосибирск 630090 (Россия)

Аннотация

Получены механоактивированные композиты диацетата и дипропионата бетулина с водорастворимым природным полисахаридом арабиногалактаном. Установлено, что композиты характеризуются повышенной концентрацией диацилов бетулина при растворении их в воде. Предположено образование молекулярных комплексов диацетата и дипропионата бетулина с арабиногалактаном при механической активации и при растворении исходных и механоактивированных смесей в воде. Комплексы диацилов бетулина с арабиногалактаном получены также в виде тонких пленок, легко растворимых в воде.

Ключевые слова: диацетат бетулина, дипропионат бетулина, арабиногалактан, механохимическая обработка, растворение, гель-проникающая хроматография

ВВЕДЕНИЕ

Из бересты березы получают сложные эфиры бетулина и простейших карбоновых кислот: диацетат бетулина – 3β,28-диацетокси-луп-20(29)-ен (ДАБ) и дипропионат бетулина – 3β,28-дипропиокси-луп-20(29)-ен (ДПБ) (рис. 1).

Установлено, что диацетат бетулина обладает гепатопротекторными, антиоксидантными, противоопухолевыми и другими фармакологическими свойствами. Дипропионат бетулина также может представлять интерес для фармации [1–5]. Один из факторов, сдер-

живающих использование диацилов бетулина, – их плохая растворимость в воде и других растворителях.

Известно, что механическая активация лекарственных субстанций в присутствии вспомогательных веществ способствует увеличению скорости растворения и растворимости лекарственных препаратов, благодаря чему повышается их биодоступность [6, 7]. В ходе механической активации происходит разупорядочение кристаллической структуры лекарственных веществ и их диспергирование в матрице носителя с образованием композиционных материалов. За счет этого повыша-

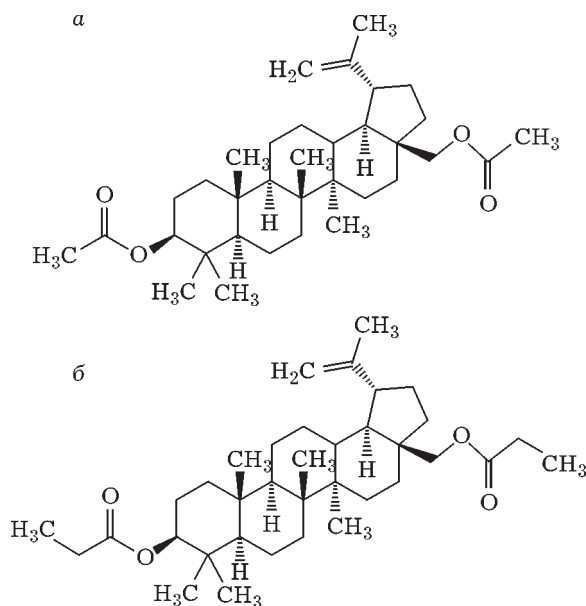


Рис. 1. Структурные формулы диацетата бетулина (а) и дипропионата бетулина (б).

ется скорость растворения и растворимости субстанций. Ранее мы показали [8], что механическая активация бетулина в смесях с водорастворимыми полимерами поливинилпирролидоном (ПВП) и полиэтиленгликолем (ПЭГ) приводит к образованию композитов, для которых характерно разупорядочение структуры бетулина и взаимодействие его с носителями. При растворении механокомпозитов в воде концентрация бетулина в растворе оказалась выше, чем при растворении исходного бетулина. Однако механическая обработка ДАБ с ПВП и ПЭГ не привела к повышению его растворимости. Возможно, это связано с тем, что при механической обработке с полимерами ДАБ не переходит в разупорядоченное состояние и не образует молекулярных комплексов с ПВП и ПЭГ [8, 9].

Арабиногалактан (АГ) – водорастворимый природный полисахарид, который выделяется из древесины лиственницы и используется в качестве стабилизатора, наполнителя, носителя для лекарственных субстанций. При этом большое влияние на качество и свойства этого полимера оказывает его молекулярная масса. Получение межмолекулярных комплексов АГ с некоторыми малорастворимыми лекарственными веществами позволило улучшить их фармакологические характеристики [10–13]. В связи с этим представ-

ляло интерес использовать АГ для получения механоактивированных композитов с диацилами бетулина.

Цель данной работы – получение композитов диацетата и дипропионата бетулина с АГ и изучение их физико-химических свойств.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали ДАБ, ДПБ и АГ, полученные по разработанным оригинальным методикам [14–16].

Механохимическую обработку проводили с использованием мельницы SPEX 8000 (CertiPrep Corp., США) в стальных барабанах вместимостью 40 мл. Режим обработки: мелющие тела – стальные шары диаметром 6 мм, масса шаров 30 г, ускорение мелющих тел 8–10g, масса обрабатываемой смеси 1 г, максимальное время обработки 30 мин. Соотношение ДАБ (ДПБ)/АГ составляло 1 : 9 (по массе).

Рентгенофазовый анализ проводили с использованием дифрактометра D8 DISCOVER с двухкоординатным детектором (Bruker), CuK_α -излучение, $2\theta = 5\text{--}40^\circ$. ИК-спектры снимали методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) в диапазоне частот $4000\text{--}500\text{ см}^{-1}$ на Фурье-ИК-спектрометре Digilab Excalibur 3100 (Varian) без прессования образцов. Электронные микрофотографии получены на растровом электронном микроскопе TM-1000 Hitachi (Япония). Для термоаналитических измерений использовали калориметр DSC-204 (Netzsch). Стандартные алюминиевые тигли не запаивали, но закрывали крышками. Скорость нагревания составляла 6 К/мин, скорость продувки аргоном – 20 мл/мин, навеска образца – 5.0 мг.

Молекулярно-массовое распределение образцов исследовали методом геле-проникающей хроматографии на хроматографе Agilent 1200 с рефрактометрическим детектором 1260 Infinity (30 °С, PL aquagel-ОН 40 300×7.5 мм, 0.1 M LiNO₃, 1 мл/мин). Калибровка колонки осуществлялась с помощью стандартных образцов декстранов (Sigma-Aldrich) с молекулярными массами 10 600, 20 000, 41 272, 70 000. Хроматограммы нормированы на максимум поглощения рефрактометрического детектора.

Исследование растворимости композитов в воде проводили в тестере растворимости Varian 705 DS. В сосуд с водой помещали навеску композита ДАБ–АГ либо ДПБ–АГ массой 200 мг и выдерживали при постоянном перемешивании при 37 °С в течение 2 сут. Затем раствор отфильтровывали с помощью фильтров с диаметром пор 0.2 мкм. Фильтраты выпаривали при пониженном давлении и температуре 35–40 °С (ротационный испаритель ИР-1М, Россия). Сухой остаток (9–10 мг) подвергали трехкратной экстракции хлороформом. Хлороформные экстракты объединяли и выпаривали, твердый остаток после выпаривания растворяли в 1 мл этанола. Содержание ДАБ и ДПБ в этанольных растворах определяли хроматографически с помощью хроматографа Милихром А-02 (ЗАО “ЭкоНова”, Россия) (условия хроматографирования: 35 °С, колонка 2.0×75 мм, ProntoSIL 120-5C18 AQ, размер частиц 5.0 мкм, подвижная фаза H₂O (А) –

CH₃CN (В), градиентный режим 80–100–100 % В, скорость подачи подвижной фазы 100 мкл/мин) на длинах волн 200 и 210 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После механической активации смесей диацилов бетулина с АГ в течение 5 мин на рентгеновских дифрактограммах еще заметны рефлексы, присущие исходным ДАБ и ДПБ. Однако после активации в течение 15 мин их интенсивность сильно снижается, и после 30 мин механической обработки рефлексы практически исчезают (рис. 2). Исчезновение рефлексов диацилов бетулина может свидетельствовать о распределении ДАБ и ДПБ в матрице АГ с образованием рентгеноаморфных композитов.

Об этом же свидетельствуют данные дифференциальной сканирующей калориметрии. На кривой ДСК механоактивированной смеси ДПБ с АГ (рис. 3) видны лишь “следы” пика плавления ДПБ. Большой эндотермический пик, который начинается практически при комнатной температуре и заканчивается при ~150 °С, соответствует удалению воды из АГ. Слабый пик плавления ДПБ с максимумом около 160 °С показан на рис. 3 в увеличенном масштабе. Наличие этого пика говорит о том, что, возможно, не все вещество перешло в аморфное состояние, либо часть вещества закристаллизовалась при нагревании. Тем не менее, отсутствие на кривой ДСК истинного пика плавления ДПБ свидетельствует об образовании при механической обработке довольно прочного композита ДПБ–АГ. Это

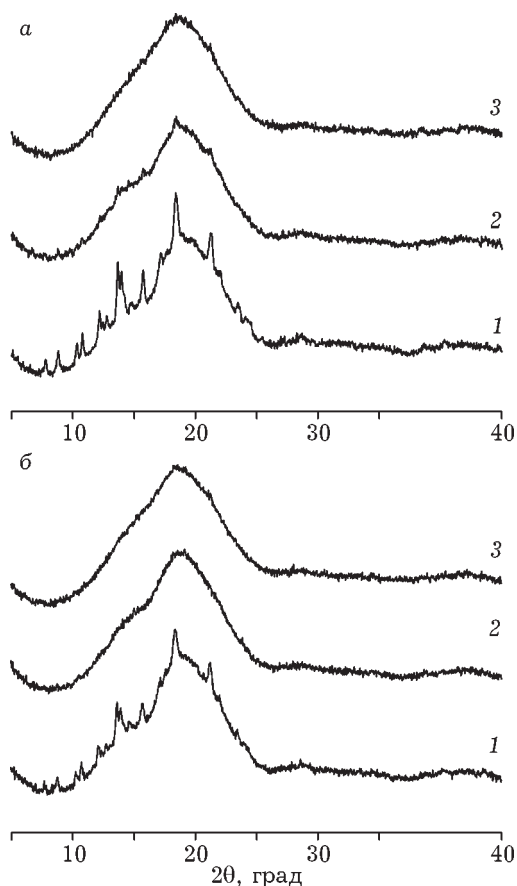


Рис. 2. Рентгеновские дифрактограммы смесей ДАБ с АГ (а) и ДПБ с АГ (б) после механической активации. Продолжительность активации, мин: 5 (1), 15 (2), 30 (3).

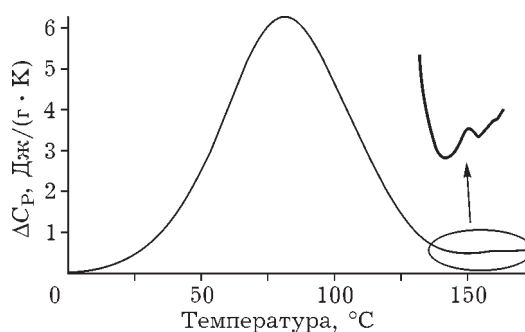


Рис. 3. Тепловые эффекты в механоактивированной смеси ДПБ с АГ. Пик плавления ДПБ показан в увеличенном масштабе.

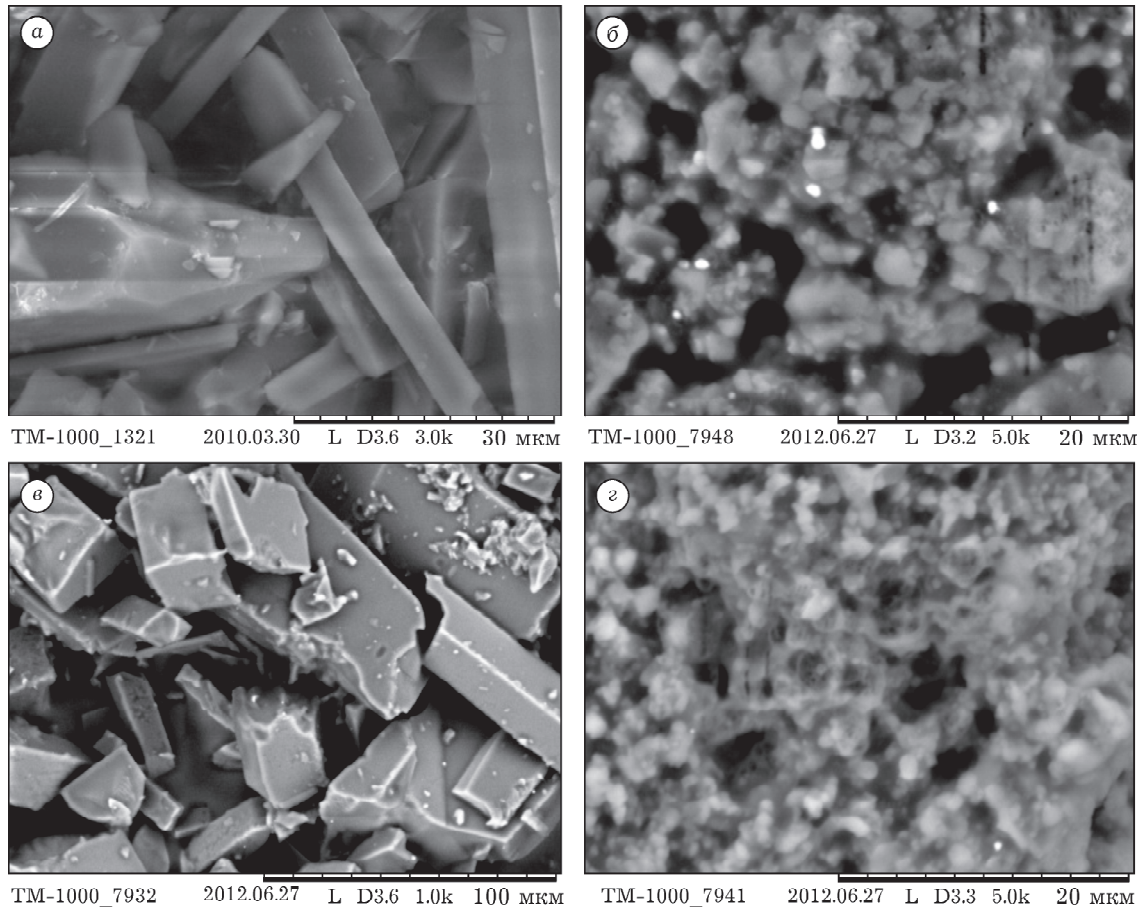


Рис. 4. Электронно-микроскопические изображения: а – ДАБ; б – механоактивированного композита ДАБ–АГ; в – ДПБ; г – механоактивированного композита ДПБ–АГ.

может быть распределение молекул (или ансамблей молекул) диацилов бетулина в полимере, как это предполагалось для некоторых других низкомолекулярных лекарственных субстанций в работах [11, 12], или диспергирование ДАБ и ДПБ до наноразмерного состояния с образованием однородной механической смеси с АГ. Стабильность такого композита при нагревании, возможно, обусловлена взаимодействием компонентов при механической активации.

На рис. 4 представлены электронные микрорентгенограммы образцов исходных диацилов бетулина и механоактивированных (МА) композитов ДАБ–АГ и ДПБ–АГ. Исходные кристаллы диацилов бетулина имеют игольчатую форму с размерами от 10 до 100 мкм. Механически обработанная смесь диацилов бетулина с АГ однородная и состоит из агрегатов частиц размером 5–30 мкм.

В ИК-спектрах смесей ДАБ и ДПБ с АГ в результате механической активации (рис. 5) наблюдается уширение и снижение интенсивности полос в области валентных колебаний $\nu(\text{O-H})$ ($3200\text{--}3500\text{ см}^{-1}$), $\nu(\text{C=O})$ (1720 см^{-1}), $\nu(\text{C-O})$ (1150 см^{-1}), что может быть вызвано аморфизацией диацилов бетулина. О сдвиге полос диацилов и АГ судить сложно, поэто-

ТАБЛИЦА 1

Концентрация ДПБ в воде при растворении исходной и механоактивированной смесей ДПБ с АГ

Смеси	Время растворения, ч	Концентрация, мкг/мл
Исходная	24	2.8
Механоактивированная	1	2.9
	2	3.8
	3	4.4
	21	5.3
	24	10.8

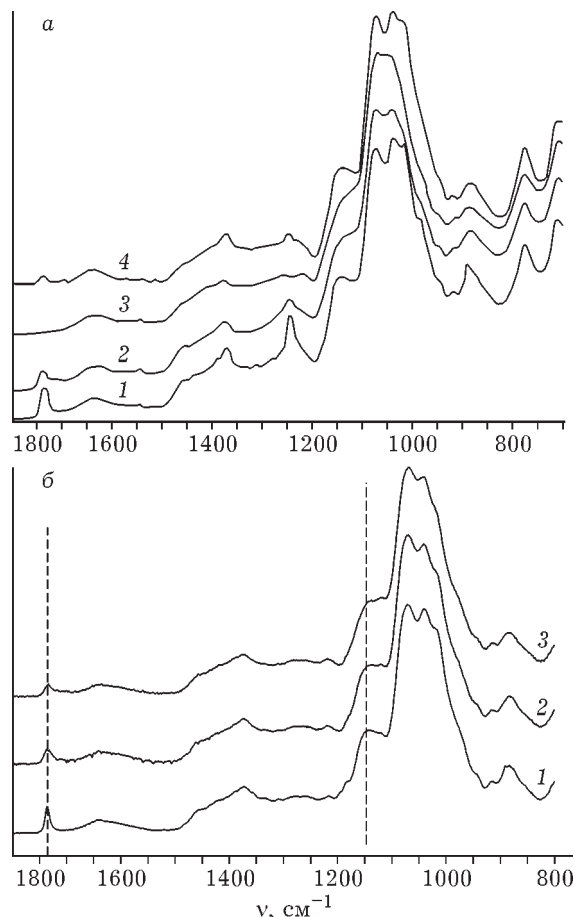


Рис. 5. ИК-спектры: *a* – исходной смеси ДАБ с АГ (1) и после механоактивации в течение 15 мин (2), механоактивированного АГ (3), пленки, полученной выпариванием раствора смеси ДАБ с АГ (4); *б* – смеси ДПБ с АГ после механоактивации в течение 5 (1), 15 (2) и 30 мин (3).

му выявить наличие водородных связей между компонентами не представляется возможным. Можно предположить, что связи между диацилами бетулина и АГ в механоактивированных смесях осуществляются за счет Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий.

Как упоминалось ранее, исходные ДАБ и ДПБ практически нерастворимы в воде. В табл. 1 представлены данные по содержанию ДПБ в воде при растворении исходных и механоактивированных в течение 15 мин смесей с АГ. Видно, что после механической активации ДПБ с АГ содержание ДПБ в водном растворе возрастает почти в 4 раза по сравнению с физической смесью и составляет 10,8 мкг/мл. Увеличение продолжительности механической активации до 30 мин не способствовало повышению растворимости композита. Данные по растворению механокомпозита ДАБ–АГ также свидетельствуют об увеличении содержания ДАБ в растворе до 9,4 мкг/мл.

Исследовано изменение молекулярно-массового распределения АГ при механической обработке. Установлено, что в результате механической активации молекулярная масса (M) для части молекул АГ уменьшается примерно в два раза: с $\sim 16\,000$ до ~ 8000 , как это наблюдалось в [13] при механической обработке в других мелющих аппаратах. Действительно, гель-хроматограмма АГ (рис. 6, *a*, кривая 1) имеет основной максимум с

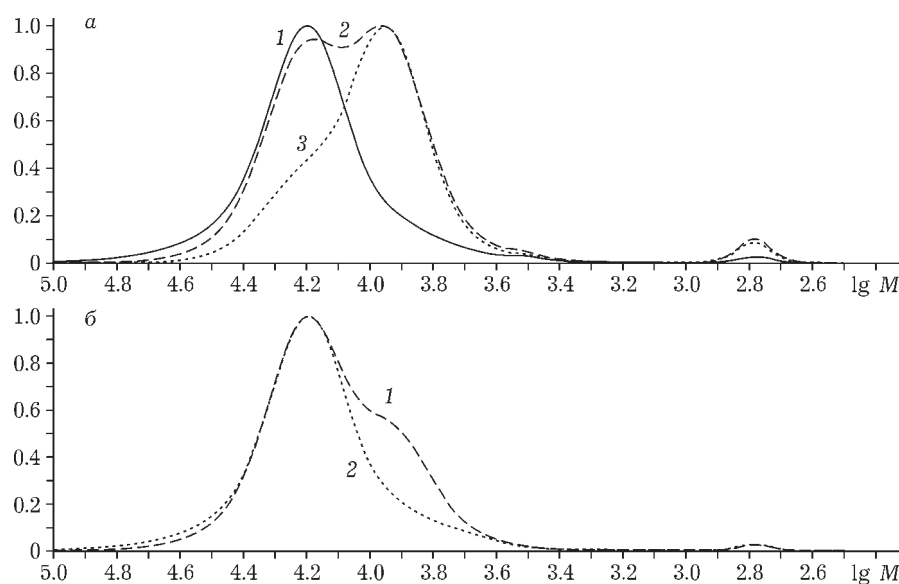


Рис. 6. Гель-хроматограммы АГ и его смесей с ДАБ: *a* – исходный АГ (1), после МА в течение 10 (2) и 30 мин (3); *б* – АГ (1) и смесь ДАБ с АГ (2) после МА в течение 10 мин, растворения в воде и последующего испарения растворителя.

$\lg M = 4.2$. Механическая активация в течение 10 мин приводит к его расщеплению вследствие появления нового максимума с $\lg M = 3.9$, а после 30 мин активации происходит полный сдвиг максимума с $\lg M = 4.2$ до $\lg M = 3.9$ (см. рис. 6, а, кривая 3). Соотношение площадей пиков $\lg M = 3.9/\lg M = 4.2$ (в координатах “интенсивность – время выхода”) после 10 и 30 мин механической активации составляет 1.2 и 6.3, что соответствует “степени превращения” АГ в низкомолекулярное состояние ~55 и 87 % соответственно.

Растворение механоактивированных образцов АГ в воде и последующее испарение растворителя приводит к частичному “восстановлению” молекулярной массы (см. рис. 6, б, кривая 1). В случае смесей АГ с ДАБ хроматограммы механоактивированных образцов (см. рис. 6, б, кривая 2) после растворения их в воде и выпаривания растворителя идентичны хроматограммам исходного АГ. Причиной этого может быть комплексообразование ДАБ с несколькими макромолекулами АГ в растворе. Действительно, обнаружено, что ДАБ не извлекается из водного раствора смеси ДАБ с АГ при экстракции гексаном. Это говорит о том, что в водном растворе, по видимому, образуется прочный межмолекулярный комплекс ДАБ с АГ.

Аналогично ДАБ, ДПБ также не извлекается из растворов его смесей с АГ при экстракции гексаном. При выпаривании водных растворов механически активированных смесей ДАБ и ДПБ с АГ комплексы получены в виде прозрачных, гибких пленок желтоватой окраски, полностью растворимых в воде. ИК-спектры пленок повторяют полосы физических смесей диацилов бетулина с АГ (см. рис. 5, а), следовательно, в полученных пленках связи между диацилами и АГ осуществляются преимущественно за счет сил Ван-дер-Ваальса. Учитывая тот факт, что пленки растворяются в гораздо меньших объемах воды, нежели было затрачено для их получения, исследование фармакологической активности таких материалов может представлять интерес для дальнейшего использования их в медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что в результате механической активации смесей АГ с ДАБ и ДПБ по-

следние распределяются в матрице носителя с образованием аморфных композитов. Предположено, что при этом происходит компоненты взаимодействуют с образованием межмолекулярных комплексов. Обнаружено, что при растворении в воде механокомпозитов повышается концентрация ДАБ и ДПБ в растворе по сравнению с исходными веществами.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине”.

Авторы благодарят А. В. Душкина и Л. И. Демковку за получение гель-хроматограмм, Г. П. Скворцову за синтез диацилов бетулина, Центр коллективного пользования Красноярского научного центра за съемку электронных микрофотографий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Кузнецова С. А., Васильева Н. Ю., Калачева Г. С., Титова Н. М., Редькина Е. С., Скворцова Г. П. // Журн. Сиб. фед. ун-та. Химия. 2008. № 2. С. 151–165.
- 2 Кузнецова С. А., Скворцова Г. П., Маляр Ю. Н., Соколенко В. А., Кузнецов Б. Н. // Химия раст. сырья. 2011. № 4. С. 77–82.
- 3 Кузнецова С. А., Кузнецов Б. Н., Скворцова Г. П., Васильева Н. Ю., Скурыдина Е. С., Калачева Г. С. // Химия уст. разв. 2010. Т. 18. С. 313–320.
- 4 Сьмон А. В., Веселова Н. Н., Каплун А. П., Власенкова Н. К., Федорова Г. А., Лютик А. И., Герасимова Г. К., Швец В. И. // Биоорган. химия. 2005. Т. 31, № 3. С. 320–325.
- 5 Pat. No. 20090318719 US, 2009.
- 6 Shakhhtshneider T. P., Boldyrev V. V. Mechanochemical Synthesis and Mechanical Activation of Drugs. “Reactivity of Molecular Solids” / Ed. E. Boldyreva, V. Boldyrev. England: John Wiley & Sons Ltd., 1999. P. 271–312.
- 7 Colombo I., Grassi G., Grassi M. // J. Pharm. Sci. 1998. Vol. 98, No. 5. P. 3961–3986.
- 8 Михайленко М. А., Шахтшнейдер Т. П., Дребущак В. А., Кузнецова С. А., Скворцова Г. П., Болдырев В. В. // Химия природ. соед. 2011. № 2. С. 211–214.
- 9 Шахтшнейдер Т. П., Кузнецова С. А., Михайленко М. А., Маляр Ю. Н., Скворцова Г. П., Болдырев В. В. // Журн. Сиб. фед. ун-та. Химия. 2012. Т. 5, № 1. С. 52–60.
- 10 Медведева Е. Н., Бабкин В. А., Остроухова Л. А. // Химия раст. сырья. 2003. № 1. С. 27–37.
- 11 Метелева Е. С., Душкин А. В., Толстикова Т. Г., Толстиков Г. А., Поляков Н. Э., Медведева Е. Н., Неверова Н. А., Бабкин В. А. // Изв. РАН. Сер. хим. 2008. № 6. С. 1274–1282.
- 12 Пат. 2337710 РФ, 2008.
- 13 Медведева Е. Н., Неверова Н. А., Федорова Т. Е., Бабкин В. А., Метелева Е. С., Душкин А. В., Толстикова Т. Г., Хвостов М. В., Долгих М. П. // Химия раст. сырья. 2009. № 3. С. 49–56.
- 14 Пат. 2324700 РФ, 2008.
- 15 Пат. 2469043 РФ, 2012.
- 16 Пат. 2273646 РФ, 2006.