

УДК 577.114.7+621.365.5

ВЛИЯНИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА АРАБИНОГАЛАКТАН И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ДИАЦЕТАТОМ БЕТУЛИНА

© Ю.Н. Маляр^{1,2}, М.А. Михайленко³, Н.А. Панкрушина⁴, А.Н. Михеев⁵, С.А. Кузнецова^{1,2}, Т.П. Шахтинейдер^{3,5*}

¹ Институт химии и химической технологии СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Академгородок, 50-24, Красноярск, 660036 (Россия)

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

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

⁴ Новосибирский институт органической химии СО РАН, пр. Акад. Лаврентьева, 9, Новосибирск, 630090 (Россия)

⁵ Новосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090 (Россия), e-mail: shah@solid.nsc.ru

Диацетат бетулина (ДАБ) обладает разнообразной биологической активностью, однако плохая растворимость в воде ограничивает его применение. Использование арабиногалактана (АГ) в качестве комплексообразователя является перспективным для решения проблемы солюбилизации лекарственных веществ. В данной работе исследовано влияние микроволнового (МВ) облучения на свойства АГ и ДАБ и их взаимодействие в водной суспензии с образованием растворимого в воде супрамолекулярного комплекса. Показано, что МВ нагрев АГ в жестких условиях может приводить к деструкции биополимера. Применение МВ нагрева позволило значительно сократить время получения комплекса ДАБ-АГ по сравнению с обычным синтезом на водяной бане. Предварительная механическая обработка смеси компонентов, приводя к образованию механокомпозигов, тормозила протекание реакции между компонентами в водной суспензии при МВ облучении. Методом ИК-спектроскопии показано, что в условиях МВ облучения образуется супрамолекулярный комплекс, подобный тому, который образуется при нагревании традиционным способом. Комплекс ДАБ-АГ был выделен из нагретого с помощью МВ излучения раствора после выпаривания в виде тонкой пленки, которая может быть перспективным материалом для фармакологических применений.

Ключевые слова: арабиногалактан, диацетат бетулина, микроволновая активация, комплексообразование, растворимость.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научного проекта №16-43-242083.

Введение

В последние десятилетия высокоскоростной синтез с помощью микроволновой (МВ) активации привлек значительное внимание исследователей, в частности, в области органического синтеза, создания

Маляр Юрий Николаевич – кандидат химических наук, научный сотрудник, доцент, e-mail: yumalyar@gmail.com

Михайленко Михаил Александрович – кандидат химических наук, научный сотрудник, e-mail: mikhailenko@solid.nsc.ru

Панкрушина Наталья Алексеевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, e-mail: pankrush@nioch.nsc.ru

новых лекарственных средств, супрамолекулярной химии, химии углеводородов [1–4]. В отличие от обычного нагрева МВ облучение производит эффективное внутреннее нагревание с помощью прямого воздействия МВ энергии на молекулы в реакционной смеси, что приводит к уменьшению времени реакции, увеличению выхода продукта, устранению побочных реакций.

Продолжение на с. 64.

* Автор, с которым следует вести переписку.

Ранее [5] мы сообщали о механохимическом получении композитов водорастворимого полисахарида арабиногалактана с диацетатом бетулина. Диацетат бетулина (ДАБ), 3 β ,28-диацетокси-луп-20(29)-ен, (рис. 1), сложный эфир уксусной кислоты и бетулина, обладает разнообразной биологической активностью [6]. Однако плохая растворимость ДАБ в воде снижает его биологическую доступность и, тем самым, ограничивает его применение. Полученные механокомпозиты с арабиногалактаном (АГ) (рис. 2) обладали более высокой растворимостью ДАБ в результате образования комплекса. Комплекс ДАБ-АГ был получен также в виде тонкой пленки, выделенной из водного раствора путем выпаривания. Композитные пленки ДАБ-АГ проявляли противоопухолевую активность против клеток А549 аденокарциномы легких, которая была значительно выше, чем активность как чистого ДАБ, так и его физической или механически обработанной в шаровой мельнице смеси с АГ [7].

Для приготовления комплекса ДАБ-АГ в растворе требовалось несколько часов нагревания на водяной бане [7]. Целью данной работы являлось усовершенствование метода приготовления комплекса ДАБ-АГ с помощью микроволнового облучения.

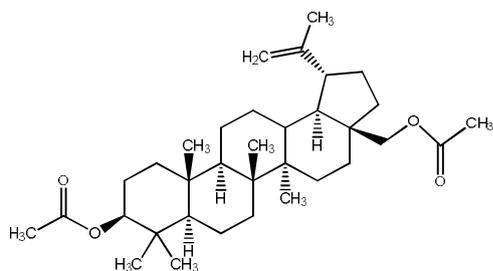


Рис. 1. Молекулярная структура диацетата бетулина

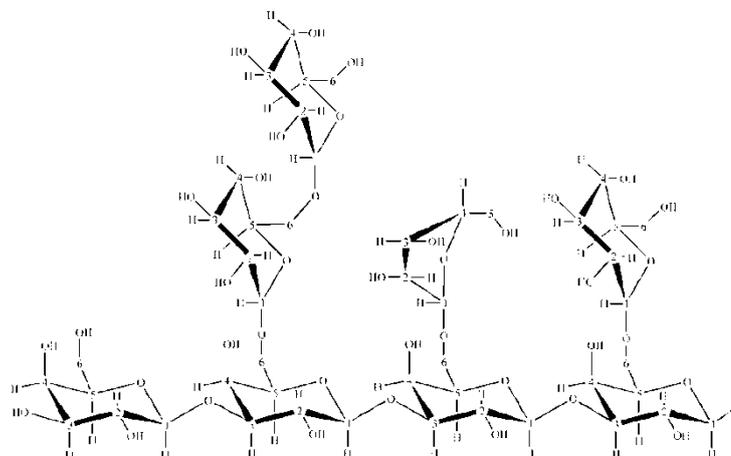


Рис. 2. Молекулярная структура арабиногалактана

Экспериментальная часть

ДАБ получали путем одностадийного синтеза непосредственно из березовой коры без отдельной стадии выделения бетулина [8]. После очистки образцов содержание примесей составило менее 1,4 мас.%. Арабиногалактан ($M_w \sim 16000$) был выделен из древесины лиственницы сибирской (*Larix sibirica*) по разработанному методу [9].

Для приготовления микрокристаллов ДАБ насыщенный раствор ДАБ в этаноле добавляли по каплям в воду и после кристаллизации ДАБ этанол удаляли выпариванием при пониженном давлении и температуре 35 °С. В полученной водной суспензии измеряли распределение частиц ДАБ по размерам с помощью лазерного анализатора Microsizer 201A (ООО «ВА Инсталт», Россия). Микрокристаллы ДАБ отфильтровывали и использовали для микроволнового синтеза, так же как и исходный кристаллический порошок ДАБ.

Эксперименты по микроволновому облучению проводили в микроволновой одномодовой установке (Discover-S-Class, SEM, США) с максимальной контролируемой выходной мощностью СВ воздействия до 300 Вт, позволяющей проводить контролируемую обработку при регистрируемой температуре до 300 °С и давлении до 20 бар. Температура наружной поверхности микроволнового реактора измерялась внешним

Михеев Александр Николаевич – старший научный сотрудник, e-mail: shah@solid.nsc.ru

Кузнецова Светлана Алексеевна – доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник, e-mail: kuznetssvetl@rambler.ru

Шахтинейдер Татьяна Петровна – доктор химических наук, профессор, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией, e-mail: shah@solid.nsc.ru

детектором температуры. Эксперименты проводили в специальных закрытых контейнерах; в качестве растворителя использовали воду. Варьировали следующие параметры СВ нагрева: начальную мощность СВ воздействия, температуру реакции и продолжительность обработки. Каждый эксперимент повторяли трижды.

Для проведения микроволнового эксперимента АГ, ДАБ или их смесь (0,5 г) с соотношением ДАБ : АГ 1 : 9 (масс.) помещали в контейнер и добавляли 4 мл дистиллированной воды. Суспензию предварительно перемешивали в течение 2 мин с помощью магнитной системы перемешивания, затем подвергали МВ облучению. После охлаждения суспензию фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм, чтобы удалить нерастворившийся ДАБ, и фильтраты выпаривали при пониженном давлении и температуре 35–40 °С до получения тонкой гибкой пленки.

Содержание ДАБ в пленках определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). ДАБ экстрагировали хлороформом, затем хлороформ испаряли, а твердый остаток растворяли в этиловом спирте. Анализ спиртовых растворов проводили на хроматографе Милихром А-02 (Эконова, Россия) (35 °С, ProntoSIL 120-5-C18 AQ, 2,0 × 75 мм, H₂O (А) – CH₃CN (В), 80–100–100% В, 100 мкл/мин). Содержание ДАБ определяли на длинах волн 200 и 210 нм.

Исследования с помощью гель-проникающей хроматографии (ГПХ) проводили на приборе Agilent 1200 с рефрактометрическим детектором 1260 Infinity (30 °С, PL aquagel-ОН 40, 300 × 7,5 мм, 0,1 М LiNO₃, 1 мл/мин). Колонки калибровали с помощью стандартных образцов декстранов (Sigma-Aldrich) с молекулярными массами 10600, 20000, 41272, 70000. Хроматограммы нормировали на максимум поглощения рефрактометрического детектора.

Механическую обработку смесей АГ с ДАБ (1 : 9, масс.) осуществляли в вибрационной мельнице Spx 8000 (CertiPrep Inc., США) в стальных барабанах объемом 40 мл. Режим обработки: мелющие тела – стальные шары диаметром 6 мм, загрузка – 30 г, ускорение мелющих тел – 8–10 g, масса обрабатываемой смеси – 1 г, время обработки – 15 мин.

ИК-спектры регистрировали на ИК Фурье спектрометре Tensor 27 (Bruker) в таблетках с KBr в области 4000–400 см⁻¹.

Результаты и обсуждение

Исследование влияния МВ облучения на АГ с помощью ГПХ анализа показало, что в отличие от механических воздействий, в результате которых связи в макромолекулах АГ разрывались, и молекулярная масса уменьшалась почти вдвое [10], под действием МВ облучения при 70 °С (образец АГ1), молекулы АГ практически не разрушаются, и молекулярные массы, M_w и M_n , а также полидисперсность, остаются примерно равными исходным (рис. 3, табл. 1). Это согласуется с общепринятой точкой зрения, что МВ облучение не должно приводить к разрыву химических связей [1].

Тем не менее было обнаружено, что МВ-воздействие в жестких условиях (температура 100 °С, продолжительность МВ-воздействия 20 мин, энергия МВ-воздействия – выше 7 кДж) (образец АГ2) приводит к небольшому сдвигу на ГПХ-хроматограмме пика, соответствующего времени удерживания 9 мин ($M \sim 16000$), и появлению плеча при времени удерживания 9,5 мин, соответствующего пику с более низкой молекулярной массой ($M \sim 8000$). Появление молекул с вдвое меньшей, по сравнению с исходным АГ, молекулярной массой, наблюдавшееся ранее при его механической активации [10], может быть связано с особенностями строения макромолекул и механизмом их разрушения [11]. Следует отметить, что при нагревании АГ до 100 °С на масляной бане молекулярная масса полимера не изменялась. Можно предположить, что эффект деструкции полимера связан со «специфическим» действием МВ излучения на вещество.

Исследование влияния МВ-воздействия на ДАБ с помощью ВЭЖХ не выявили каких-либо изменений в структуре ДАБ после микроволнового нагрева.

Содержание ДАБ в композитных пленках ДАБ-АГ, полученных из подвергнутых МВ-воздействию суспензий, приведено в таблице 2.

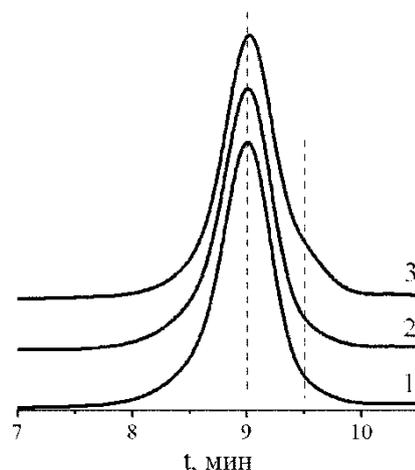


Рис. 3. Гель-проникающие хроматограммы АГ исходного (1) и после микроволнового облучения: АГ1 (2) и АГ2 (3)

Таблица 1. Молекулярная масса АГ до и после микроволнового (МВ) нагрева

Образец	Среднечисловая молекулярная масса, M_n	Средневесовая молекулярная масса, M_w	M_w/M_n	Условия МВ нагрева				
				$T_{исх.}, ^\circ C$	$T_{max}, ^\circ C$	Начальная мощность, Вт	Продолжительность, с	Энергия МВ-воздействия, Дж
АГ	13397	16006	1,19					
АГ1	13311	15883	1,19	70	89	200	600	3610
АГ2	12189	14528	1,19	100	102	200	1200	7881

Таблица 2. Содержание ДАБ в пленках, приготовленных из суспензий ДАБ с АГ (1 : 9, масс.), подвергнутых микроволновому нагреванию, в зависимости от условий процесса

№ образца	Мощность МВ-воздействия, Вт	Температура реакции, $^\circ C$	Продолжительность облучения, мин	Содержание ДАБ, %
1	70	70	10	$1,9 \pm 0,1$
2	70	70	30	$2,1 \pm 0,1$
3	200	70	10	$2,6 \pm 0,1$
4	200	70	20	$2,2 \pm 0,1$
5	200	100	20	$1,9 \pm 0,1$
6	200	70	10	$2,2 \pm 0,1$
7	200	70	10	$1,6 \pm 0,2$

Из таблицы следует, что в то время как увеличение продолжительности МВ облучения не приводит к изменению содержания ДАБ в продукте (образцы 1 и 2, 3 и 4), с увеличением мощности МВ-воздействия от 70 (образец 1) до 200 Вт (образец 3) при неизменном времени процесса содержание ДАБ в пленке повышается. Тем не менее четких корреляционных зависимостей между параметрами МВ нагрева (начальная мощность и продолжительность МВ-воздействия) и содержанием ДАБ не прослеживается. Исходный ди-ацетат бетулина плохо смачивается водой и практически в ней не растворяется, поэтому воспроизводимое получение однородной суспензии является затруднительным. Это, в свою очередь, приводит к значительной неоднородности диэлектрических свойств суспензии ДАБ и возникновению точек локального перегрева. По-видимому, локальные перегревы и неоднородность их распределения и приводят к отсутствию четких корреляционных зависимостей между параметрами МВ нагрева и содержанием ДАБ.

Кривые температуры и мощности для образцов 1 и 3 представлены на рисунке 4. Видно, что под действием МВ-поля в течение 20–35 секунд наблюдается быстрый подъем температуры до заданной величины. Заданная температура МВ синтеза поддерживается достаточно точно и для 70, и для 200 Вт микроволновой мощности. Синтез комплекса ДАБ-АГ, по-видимому, происходит за относительно короткие времена МВ воздействия (от 5 до 10 мин), а последующий нагрев может приводить к частичной деструкции, особенно при жестких условиях проведения процесса (образец 5).

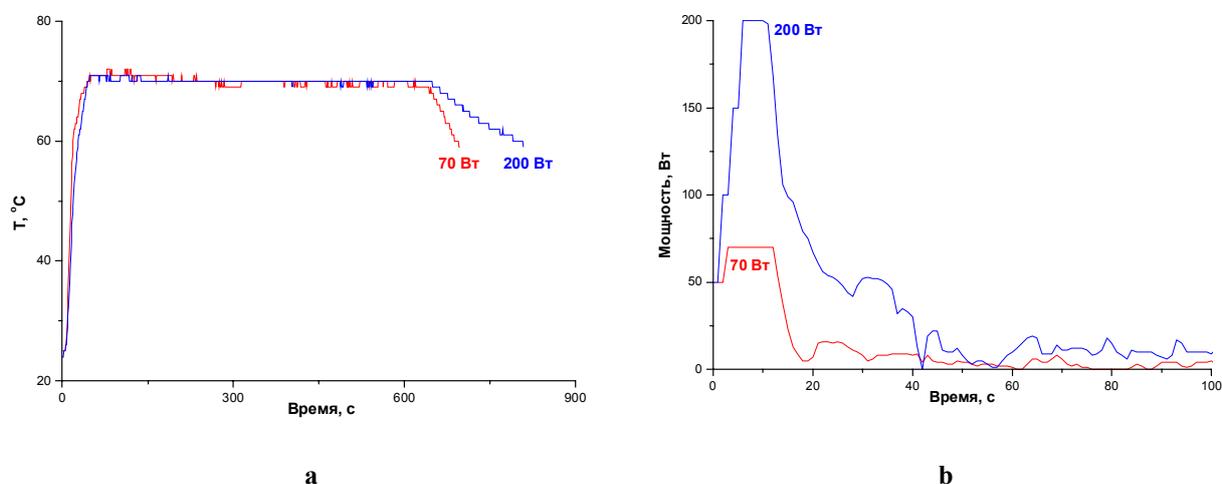


Рис. 4. Кривые температуры (а) и мощности (б) при микроволновом синтезе комплекса ДАБ-АГ (образцы 1 и 3)

Известно, что размер и морфология частиц играют важную роль в твердофазном синтезе [12], в том числе с участием жидкой фазы. Для сравнения были проведены микроволновые эксперименты с использованием микрочастиц ДАБ, полученных путем осаждения из спиртового раствора в воду. Размеры частиц в водной суспензии варьировали от 3 до 20 мкм (рис. 5). Однако в данном случае (образец 6) содержание ДАБ в пленке, полученной после МВ нагревания, не увеличилось, что говорит о том, что, возможно, достигнута максимальная концентрация продукта.

Можно было ожидать, что механическая активация приведет к увеличению реакционной способности смеси в микроволновом синтезе. Для того чтобы сравнить с реакцией между исходными реагентами, механически активированную смесь ДАБ с АГ (1 : 9, масс.) подвергали воздействию МВ облучения (образец 7). Однако предварительная механическая активация смеси ДАБ с АГ привела к уменьшению выхода продукта. Вполне вероятно, что при механической обработке ДАБ распределился по поверхности частиц АГ, экранируя их и препятствуя их последующему растворению. Наличие АГ в осадке после фильтрования подвергнутой МВ облучению суспензии подтверждает эту гипотезу.

На рисунке 6 приведены ИК-спектры пленок, полученных при испарении фильтратов, подвергнутых МВ нагреванию (кривая 3), в сравнении со спектрами АГ (кривая 1) и комплекса ДАБ-АГ, полученного в виде пленки в результате традиционного нагревания (кривая 2). На кривых 2 и 3, по сравнению с кривой 1, наблюдаются слабые пики в области $1760\text{--}1720\text{ см}^{-1}$, соответствующие валентным колебаниям $\text{C}=\text{O}$ групп; изменяются контуры полос поглощения при $1150\text{--}1000\text{ см}^{-1}$, соответствующих валентным колебаниям $\text{C}-\text{O}$, а также полос в области $3500\text{--}3100\text{ см}^{-1}$, соответствующих валентным колебаниям $-\text{OH}$ -групп. Совокупность изменений в ИК-спектрах образцов после традиционного и МВ-нагрева может свидетельствовать об образовании комплекса ДАБ-АГ посредством образования связей между карбонильными группами диацетата бетулина и гидроксильными группами арабиногалактана. Это позволяет предположить, что в условиях МВ облучения образуется супрамолекулярный комплекс, подобный тому, что образуется в результате нагревания традиционным способом.

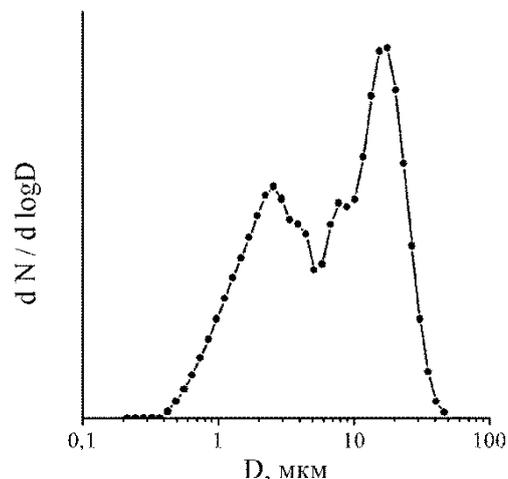


Рис. 5. Распределение частиц ДАБ по размерам в водной суспензии, полученной при осаждении частиц ДАБ из спиртового раствора

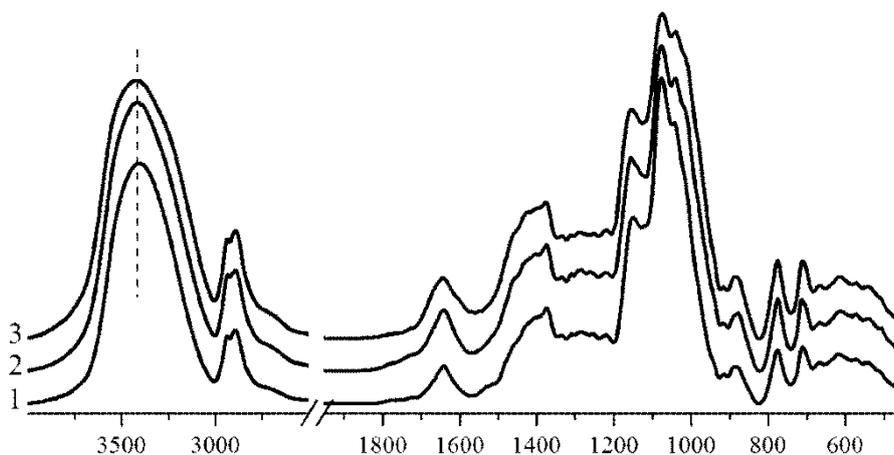


Рис. 6. ИК-спектры исходного АГ (1) и комплекса ДАБ-АГ, полученного в виде пленки в результате традиционного (2) и микроволнового (3) нагревания

Заключение

Полученные результаты показывают, что МВ нагрев является эффективным методом для осуществления высокоскоростного синтеза супрамолекулярного комплекса ДАБ-АГ. Увеличение температуры и продолжительности МВ-воздействия не приводят к повышению содержания продукта, но могут вызвать деструкцию АГ. Предварительная механическая обработка смеси компонентов, приводя к образованию механокомпозигов, тормозит протекание реакции между компонентами в водной суспензии при МВ облучении. Образующийся при МВ-воздействии супрамолекулярный комплекс подобен тому, который образуется в результате нагревания традиционным способом, и может быть перспективным материалом для фармакологических применений.

Авторы благодарят В.Р. Хуснутдинова за измерение размеров частиц и Е.В. Карпову за регистрацию ИК-спектров.

Список литературы

1. Kappe C.O. Controlled microwave heating in modern organic synthesis // *Angewandte Chemie International Edition*. 2004. Vol. 43. N46. Pp. 6250–6284.
2. Alexandre F.-R., Doman L., Frère S., Testard A., Thiéry V., Besson T. Microwaves in drug discovery and multi-step synthesis // *Molecular Diversity*. 2003. Vol. 7. N2. Pp. 273–280.
3. Doehler D., Peterlik H., Binder W.H. A dual crosslinked self-healing system: Supramolecular and covalent network formation of four-arm star polymers // *Polymer*. 2015. Vol. 69. Pp. 264–273.
4. De la Hoz A., Loupy A. *Microwaves in Organic Synthesis: Third Edition*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. Vol. 2. 1251 p.
5. Shakhtshneider T.P., Kuznetsova S.A., Mikhailenko M.A., Zamai A.S., Malyar Yu.N., Zamai T.N., Boldyrev V.V. Effect of mechanochemical treatment on physicochemical and antitumor properties of betulin diacetate mixtures with arabinogalactan // *Chemistry of Natural Compounds*. 2013. Vol. 49. Pp. 470–474.
6. Patent 2013117137 (WO). Preparation of lupane triterpenoid derivatives and pharmaceutical use thereof / F. Lu / 15.08.2013.
7. Shakhtshneider T.P., Mikhailenko M.A., Kuznetsova S.A., Malyar Yu.N., Zamai A.S. Boldyrev V.V. New derivatives of betulin esters with arabinogalactan as highly potent anticancer agents // *Natural Product Research*. 2016. Vol. 30. N12. Pp. 1382–1387.
8. Патент № 2324700 (РФ). Способ получения диацетата бетулинола / С.А. Кузнецова, Б.Н. Кузнецов, Е.С. Редькина, В.А. Соколенко, Г.П. Скворцова / 20.05.2008.
9. Патент № 2273646 (РФ). Способ получения арабиногалактана / С.А. Кузнецова, Б.Н. Кузнецов, А.Г. Михайлов, Г.П. Скворцова / 10.04.2006.
10. Dushkin A.V., Meteleva E.S., Tolstikova T.G., Tolstikov G.A., Polyakov N.E., Neverova N.A., Medvedeva E.N., Babkin V.A. Mechanochemical preparation and pharmacological activities of water-soluble intermolecular complexes of arabinogalactan with medicinal agents // *Russian Chemical Bulletin*. 2008. Vol. 57. N6. Pp. 1299–1307.
11. Grassie N., Scott G. *Polymer Degradation and Stabilisation*. Cambridge University Press, 1985. 222 p.
12. Butyagin P. Mechanochemical synthesis: Mechanical and chemical factors // *Journal of Materials Synthesis and Processing*. 2000. Vol. 8. N3. Pp. 205–211.

Поступило в редакцию 6 марта 2017 г.

После переработки 30 мая 2017 г.

Malyar Yu.N.^{1,2}, Mikhailenko M.A.³, Pankrushina N.A.⁴, Mikheev A.N.⁵, Kuznetsova S.A.^{1,2}, Shakhtshneider T.P.^{3,5*}
EFFECT OF MICROWAVE IRRADIATION ON ARABINOGALACTAN AND ITS INTERACTION WITH BETULIN DIACETATE

¹Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS, FRC KSC SB RAS, Akademgorodok, 50-24, Krasnoyarsk, 660036 (Russia)

²Siberian Federal University, pr. Svobodny, 79, Krasnoyarsk, 660041 (Russia)

³Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS, ul. Kutateladze, 18, Novosibirsk, 630128 (Russia)

⁴N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, pr. Lavrentieva, 9, Novosibirsk, 630090 (Russia)

⁵Novosibirsk State University, ul. Pirogova, 2, Novosibirsk, 630090 (Russia), e-mail: shah@solid.nsc.ru

Betulin diacetate (BDA) has a variety of biological activities, but poor solubility in water limits its application. The use of arabinogalactan (AG) as a complexing agent is a promising method for solving the problem of solubilization of drugs. In this work, influence of microwave (MW) irradiation on the properties of AG and BDA and their interaction in the aqueous suspension with formation of a water-soluble supramolecular complex was studied. It is shown that the MW heating of AG under hard conditions can lead to degradation of the biopolymer. The use of MW heating allowed significantly reducing the complex preparation time compared to the conventional synthesis in a water bath. The preliminary mechanical treatment of the mixture of components, leading to the formation of mechanocomposites, inhibited the reaction between the components in the aqueous suspension under MW irradiation. The IR spectroscopy method has shown that a supramolecular complex formed under MW irradiation similar to that formed by conventional heating. BDA-AG complex was isolated from a MW heated solution as a thin film, which may be a promising material for pharmaceutical applications.

Keywords: arabinogalactan, betulin diacetate, microwave irradiation, complexation, solubility.

References

1. Kappe C.O. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, vol. 43, no. 46, pp. 6250–6284.
2. Alexandre F.-R., Domon L., Frère S., Testard A., Thiéry V., Besson T. *Molecular Diversity*, 2003, vol. 7, no. 2, pp. 273–280.
3. Doehler D., Peterlik H., Binder W.H. *Polymer*, 2015, vol. 69, pp. 264–273.
4. De la Hoz A., Loupy A. *Microwaves in Organic Synthesis: Third Edition*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013, vol. 2, 1251 p.
5. Shakhtshneider T.P., Kuznetsova S.A., Mikhailenko M.A., Zamai A.S., Malyar Yu.N., Zamai T.N., Boldyrev V.V. *Chemistry of Natural Compounds*, 2013, vol. 49, pp. 470–474.
6. Patent 2013117137 (WO). 15.08.2013.
7. Shakhtshneider T.P., Mikhailenko M.A., Kuznetsova S.A., Malyar Yu.N., Zamai A.S. Boldyrev V.V. *Natural Product Research*, 2016, vol. 30, no. 12, pp. 1382–1387.
8. Patent 2324700 (RU). 20.05.2008 (in Russ.).
9. Patent 2273646 (RU). 10.04.2006 (in Russ.).
10. Dushkin A.V., Meteleva E.S., Tolstikova T.G., Tolstikov G.A., Polyakov N.E., Neverova N.A., Medvedeva E.N., Babkin V.A. *Russian Chemical Bulletin*, 2008, vol. 57, no. 6, pp. 1299–1307.
11. Grassie N., Scott G. *Polymer Degradation and Stabilisation*. Cambridge University Press, 1985, 222 p.
12. Butyagin P. *Journal of Materials Synthesis and Processing*, 2000, vol. 8, no. 3, pp. 205–211.

Received March 6, 2017

Revised May 30, 2017

* Corresponding author.

