

УДК 547.914.4+539.2:54+615.7

Получение нетоксичных композитов бетулина с поливинилпирролидоном и полиэтиленгликолем

Т.П. Шахтшнейдер^а, С.А. Кузнецова^{б,в*},
М.А. Михайленко^а, Ю.Н. Маляр^б, В.В. Болдырев^а

^а Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН,
Россия 630128, Новосибирск, ул. Кутателадзе, 18

^б Институт химии и химической технологии СО РАН,
Россия 660036, Красноярск, Академгородок, 50/24

^в Сибирский федеральный университет,
Россия 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79 ¹

Received 2.03.2012, received in revised form 9.03.2012, accepted 16.03.2012

С помощью механохимических методов получены композиты бетулина с поливинилпирролидоном (ПВП) и полиэтиленгликолем (ПЭГ) и изучены их физико-химические свойства. Композиты характеризуются повышенной концентрацией бетулина при растворении в воде. Показано, что полученные композиты нетоксичны.

Ключевые слова: бетулин, композиты бетулина, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль, механохимическая активация, физико-химические свойства композитов, токсичность.

Одним из основных компонентов бересты березы является бетулин [1-4]. В последние десятилетия возрос интерес к этому пентациклическому тритерпеновому спирту лупанового ряда, поскольку он обладает широким спектром фармакологической активности: гепатопротекторной, противовирусной, капилляроукрепляющей, антиоксидантной, противоопухолевой и др. [5-11].

Реакционноспособными функциональными группами в бетулине являются первичная и вторичная гидроксильные группы и двойная связь в изопропенильной группе у пятичленного кольца. Температура плавления бетулина, приводимая в литературе, колеблется от 251 до 261 °С. Низкая температура плавления (251-252 °С) бетулина, после перекристаллизации из этанола, связывается с образованием сольватов бетулин-этанол [12-14]. Более высокие значения получены после сублимации перекристаллизованного бетулина. Используемый в данной работе очищенный бетулин имеет температуру плавления 245 °С [15].

* Corresponding author E-mail address: ksa@icct.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

Бетулин слабо растворим в большинстве органических растворителей (около 0,5 – 1,0 %) и практически нерастворим в воде. Плохая растворимость бетулина в воде и физиологических водных растворах является одной из причин его пониженной биологической доступности, что ограничивает его использование [16, 17].

Механическая активация (МА) лекарственных субстанций в присутствии вспомогательных веществ служит одним из способов увеличения растворимости лекарственных препаратов для повышения их биодоступности. Механоактивация в смеси с полимерным носителем может приводить к образованию композитов в результате распределения лекарственного вещества в матрице и/или взаимодействия компонентов за счет водородных или иных связей и стабилизации разупорядоченного состояния лекарственного вещества [18].

Целью данной работы стало получение композитов бетулина с водорастворимыми полимерами с помощью механической активации, исследование их физико-химических свойств и токсичности.

Экспериментальная часть

Бетулин выделяли из бересты березы *Betula pendula Roth.*, измельченной до фракции 2-5 мм, по методике [19]. Измельченную бересту обрабатывали смесью вода – спирт – щелочь при использовании ударно-акустического воздействия в течение 5 мин при температуре 70 °С. Реакционную смесь выгружали из реактора, отделяли твердый остаток фильтрованием на воронке Бюхнера, из фильтрата отгоняли спирт и добавляли дистиллированную воду. Выпавший в осадок бетулин отфильтровывали, промывали на фильтре горячей водой до нейтральной реакции и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Бетулин очищали перекристаллизацией из этилового спирта.

Композиты бетулина были получены путем механической активации смесей бетулина с полимерами в планетарно-центробежной мельнице АГО-2 (ИХТТМ СО РАН) с водяным охлаждением барабанов. Объем стальных барабанов 40 мл, диаметр шаров 6 мм, отношение массы навески к массе шаров 1:30. Нагрузка на шар 20 г. Время обработки 15 и 30 мин. Обработку проводили как в сухих условиях, так и при добавлении этанола в количестве 5-10 % к массе обрабатываемой смеси.

В качестве полимеров использовали поливинилпирролидон (ПВП) $M_r = 12\ 600$ (Sigma-Aldrich) и полиэтиленгликоль (ПЭГ) ($M_r = 4\ 000$) (Sigma-Aldrich). Соотношение компонентов бетулин : полимер составляло 1 : 3 и 1 : 9 (по массе). Для сравнения были приготовлены физические смеси бетулина с полимерами простым перемешиванием компонентов в тех же соотношениях.

Электронные микрофотографии получены на растровом электронном микроскопе ТМ-1000 HITACHI (Япония).

Бетулин до и после механической активации определяли методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГЖХ-МС) на приборе Agilent 5080 (Varian), колонка DB-1, температура колонки 280 °С.

Рентгенофазовый анализ проводили на дифрактометре D8 DISCOVER с двухкоординатным детектором GADDS (Bruker), CuK_α -излучение.

Калориметрические измерения (ДСК) выполнены на приборе DSC-204 (Netzch) в стандартных алюминиевых тиглях, закрытых крышками, но не запаянных, в атмосфере чистого

N₂ при скорости потока 100 см³/мин в температурной области 20–270 °С. Скорость нагревания 10 °С/мин.

Инфракрасные спектры нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) в диапазоне частот 4000–600 см⁻¹ снимали на Фурье ИК-спектрометре Digilab Excalibur 3100 (США) с использованием приставки НПВО фирмы Pike с кристаллом ZnSe без прессования образцов.

Растворение композитов бетулина изучали с использованием тестера растворимости 705 DS (Varian). Композиты растворяли в воде в течение 24 ч при температуре 37,5 °С. Раствор центрифугировали, затем проводили экстракцию гексаном, полученные экстракты упаривали и осадки растворяли в спирте. Концентрацию бетулина в спиртовом растворе определяли на жидкостном хроматографе Милихром А-02 (ЭкоНова, Россия). Условия хроматографирования: колонка 2.0 x 75 мм, сорбент ProntoSIL 120-5C18 AQ, размер частиц 5,0 мкм, подвижная фаза Н₂О (А) – CH₃CN (В), градиентный режим 80-100-100 % В. Содержание бетулина рассчитывали по калибровочным кривым на длине волны 200 и 210 нм.

Результаты и обсуждение

Ударно-акустическая активация интенсифицирует гидролиз бересты, ускоряет переход бетулина в раствор и способствует повышению его выхода. Выход бетулина составлял 43 % от веса абсолютно сухой бересты.

Согласно данным ГЖХ-МС перекристаллизованный из этанола образец содержал не менее 95 % бетулина и 5 % лупеола. Перед проведением механохимической активации бетулин подвергали дополнительной очистке путём перекристаллизации из этанола и последующего нагревания полученных кристаллов при температуре 180 °С в течение 30 мин. Это позволило добиться полного разложения сольвата бетулина с этанолом и получить образец бетулина с высокой степенью чистоты и кристалличности [20]. Хроматографическими методами (ВЭЖХ и ГЖХ-МС) показано, что химический состав бетулина после механической обработки не изменялся.

На рис. 1 представлены электронно-сканирующие изображения бетулина, а также его механоактивированных композитов с ПВП и ПЭГ. Кристаллы бетулина имеют игольчатую форму; размеры кристаллов составляют от 10 до 100 мкм (рис. 1 а). В результате механической обработки кристаллы бетулина измельчаются до размеров 5-10 мкм (рис. 1 б). Механическая обработка с полимерами приводит к тому, что бетулин теряет кристаллическую форму; образцы представляют собой агрегаты частиц размером 5-30 мкм (рис. 1 в, г). Можно полагать, что смеси гомогенизируются в результате диспергирования и перемешивания компонентов.

Результат механохимической обработки – разупорядочение кристаллической структуры бетулина. На рентгеновских дифрактограммах разупорядочение отражается в уширении рефлексов (рис. 2 а, кривая 2), на кривых ДСК при этом появляются экзотермические тепловые эффекты в области 80-130 °С, соответствующие отжигу образовавшихся дефектов. Присутствие полимера делает аморфное состояние бетулина более устойчивым. При отжиге механоактивированной смеси бетулина с ПВП при 130 °С, в отличие от механоактивированного чистого бетулина, не наблюдается кристаллизации бетулина (ср. кривые 4 на рис. 2 б и 3 на рис. 2 а), а на кривых ДСК механоактивированных смесей исчезает пик, соответствующий плавлению

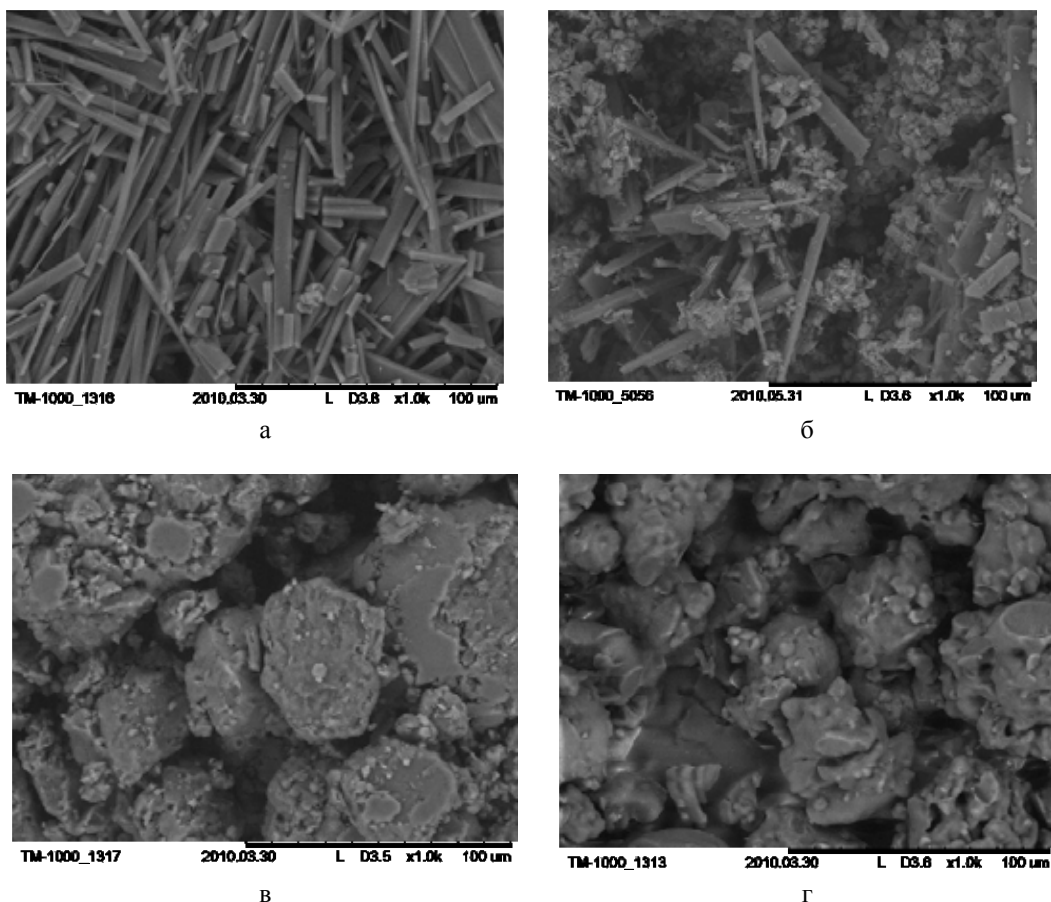


Рис. 1 Электронно-сканирующее изображение: а – бетулина, перекристаллизованного из этанола; б – МА бетулина; в – МА композита бетулин-ПЭГ; г – МА композита бетулин-ПВП

бетулина. Эти данные свидетельствуют об образовании стабильного механокомпозита бетулин – ПВП.

В ИК-спектрах смесей бетулина с ПВП (рис. 3) после проведения механической активации наблюдаются изменения в области валентных колебаний ОН-групп ($3200 - 3500 \text{ см}^{-1}$). Максимум полосы поглощения сдвинут в сторону низких частот примерно на 60 см^{-1} по сравнению со спектром физической смеси компонентов, подвергнутых механической активации по отдельности. Наблюдается перераспределение интенсивности и сдвиг на $5-10 \text{ см}^{-1}$ в область более высоких частот полосы при 1020 см^{-1} , соответствующей $\nu(\text{C-O})$ в молекуле бетулина. Эти изменения свидетельствуют о взаимодействии бетулина с ПВП при механической активации с образованием, по-видимому, водородных связей между ОН-группами бетулина и C=O -группами ПВП. Образование молекулярного комплекса может являться причиной стабилизации аморфного состояния механоактивированного бетулина.

В ИК-спектрах механоактивированных смесей бетулина с ПЭГ не было изменений, что свидетельствует об отсутствии образования водородных связей между компонентами при механической обработке. На рентгенограммах смесей бетулина с ПЭГ после механической акти-

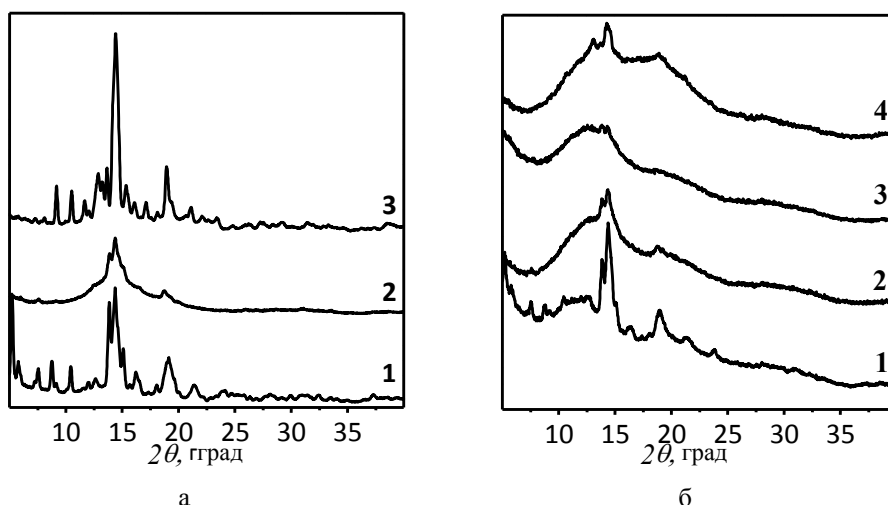


Рис. 2. Рентгеновские дифрактограммы образцов: а – исходного бетулина (1), бетулина после 30 мин МА (2), механоактивированного бетулина после нагревания при 130 °С 30 мин (3); б – смесей бетулин – ПВП 1:3 (по массе): физической смеси исходных компонентов (1), физической смеси механоактивированных компонентов (2), смеси после 30 мин МА (3), механоактивированной смеси после нагревания при 130 °С 30 мин (4)

Таблица 1. Концентрация бетулина при растворении механически активированных (МА) композитов с полимерами (37,5±0,5) °С), мг/мл ($\beta=0,95$, $n=3$)

Образец	С, мг/мл
МА композит бетулин : ПЭГ 4000 1 : 9	$(12,1 \pm 0,9) \cdot 10^{-3}$
МА композит бетулин : ПЭГ 4000 1 : 9 (10 % этанола)	$(14,8 \pm 0,9) \cdot 10^{-3}$
МА композит бетулин : ПЭГ 4000 1 : 9 (5 % этанола)	$(17,1 \pm 1,9) \cdot 10^{-3}$
МА композит бетулин : ПВП 12600 1 : 9	$(29,1 \pm 0,8) \cdot 10^{-3}$
МА композит бетулин : ПВП 12600 1 : 9 (5 % этанола)	$(52,4 \pm 2,0) \cdot 10^{-3}$

Примечание: концентрация бетулина в воде при растворении исходного бетулина (37,5±0,5) °С – $(1,90 \pm 0,55) \cdot 10^{-3}$ мг/мл; при растворении МА бетулина – $(2,80 \pm 0,32) \cdot 10^{-3}$ мг/мл.

вации наблюдается уширение рефлексов и уменьшение их интенсивности, что свидетельствует о частичной аморфизации бетулина.

При растворении механоактивированных композитов бетулина с полимерами в воде содержание бетулина в растворе значительно увеличилось (табл. 1) по сравнению с растворением исходного и механоактивированного бетулина, а также физических смесей бетулина с ПВП и ПЭГ. Образцы с большим содержанием полимера (соотношение компонентов бетулин – полимер 1 : 9) проявили повышенную растворимость бетулина по сравнению с образцами бетулин – полимер 1 : 3.

Увеличение концентрации бетулина в растворе может быть связано с образованием растворимого молекулярного комплекса бетулина с ПВП. Влияние ПЭГ, не образующего водородные

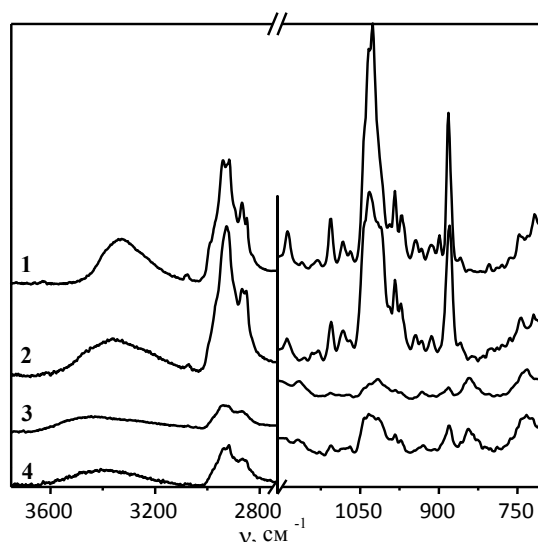


Рис. 3. ИК-спектры исходного бетулина (1), после 30 мин МА (2), смесей бетулин – ПВП 1:3 (по массе): физической смеси механоактивированных компонентов (3), смеси после 30 мин МА (4)

связи с бетулином, можно объяснить образованием композита в результате распределения лекарственного вещества в полимере и взаимодействия компонентов за счет сил Ван-дер-Ваальса [18]. С увеличением количества полимера процесс образования композитов происходит, по-видимому, более полно.

Еще больший эффект был получен в случае механической обработки с добавлением небольших количеств этанола к обрабатываемым смесям. Влияние добавок «каталитических» количеств жидкостей при механической обработке смесей молекулярных кристаллов на ускорение процессов синтеза хорошо известно. В данном случае добавка растворителя в гораздо меньших объемах, чем в [21], приводит к положительному влиянию на растворимость лекарственного вещества. Следует отметить, что при добавлении 5 % этанола эффект больше, чем при добавлении 10 %. Действие этанола может быть связано с пластифицирующим влиянием на полимер, что будет оказывать положительное влияние на процесс формирования композитов с бетулином благодаря смещению точки стеклования полимера и увеличению подвижности его молекул.

Для токсикологического исследования были отобраны композиты бетулина с ПВП 12600 и ПЭГ 4000, полученные совместной механической активацией в присутствии 5 % этанола. Проведенное токсикологическое исследование на базе аккредитованного испытательного центра г. Красноярск показало, что композиты бетулина с ПЭГ и с ПВП, так же как и бетулин, в дозе 2000 мг/кг не являются ядовитыми и, согласно международной токсикологической классификации, их можно отнести к 4-му классу малотоксичных веществ.

Выводы

Одновременное проведение ударно-акустической активации бересты, ее щелочного гидролиза и экстракции позволило уменьшить продолжительность извлечения бетулина из бе-

ресты и увеличить его выход. С помощью механохимической активации получены композиты бетулина с водорастворимыми полимерами – ПВП и ПЭГ. Изучены их физико-химические характеристики. Показано образование водородных связей между бетулином и ПВП. Механоактивированные композиты при их растворении характеризуются повышенной концентрацией бетулина в воде по сравнению с исходным и механоактивированным бетулином, а также с исходными смесями бетулина с ПВП и ПЭГ.

Установлено, что механоактивированные композиты бетулина с ПВП и ПЭГ не являются ядовитыми и, согласно международной токсикологической классификации, их можно отнести к 4-му классу малотоксичных веществ.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (11-03-12114-офи-м), Совета по грантам при Президенте РФ по поддержке ведущих научных школ (НШ-212.2012.3) и программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

Список литературы

1. Jääskeläinen P. Betulinol and its utilization //Paperi ja Puu. 1981. V. 63. P. 599–603.
2. Eckerman Ch., Ekman R. Comparison of solvents for extraction and crystallisation of betulinol from birch bark waste //Paperi ja Puu-Pap. Och Trü. 1985. №3. P. 100–106.
3. Похилло Н.Д., Уварова Н.И. Изопреноиды различных видов рода *Betula* //Химия природных соединений. 1988. №3. С. 325–341.
4. Hyek E.W.H., Jordis U., Moche W., Sauter F. A Bicentennial of Betulin //Phytochemistry. 1989. V.28. P. 2229-2242.
5. Lugemwa F.N., Huang F-Y., Bentley M.D., Mendel M.J., Alfofd A.R. A Heliothis zea antifeedant from the abundant birchbark triterpene betulin //Journal of Agriculture and Food Chemistry. 1990. V.38. №2. P. 493-496.
6. Кислицын А.Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение //Химия древесины. 1994. №3. С. 3-28.
7. Толстиков Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность //Химия в интересах устойчивого развития. 2005. Т. 13. С. 1-30.
8. Krasutsky P.A. Birch bark research and development // Natural Products Reports. 2006. V. 23. P. 919-942.
9. Толстиков Т.Г., Сорокина И.В., Толстиков Г.А. Терпеноиды ряда Лупана – биологическая активность и фармакологические перспективы //Биоорганическая химия. 2006. Т. 32. С. 42-55.
10. Alakurtti S., Mäkelä T., Koskimies S., Ylikauhaluoma J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin// European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2006. V.29. P. 1-13.
11. Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Веселова О.Ф. Изучение состава гексанового экстракта бересты и его токсико-фармакологических свойств// Химия растительного сырья. 2008. №1. С. 45-49.
12. Жученко А.Г., Черкасова А.И. Химический состав бересты берез// Сб. Тр. СвердловНИИП древесины М., 1969. Вып. 4. С. 6–9.

13. Абышев А.З., Агаев Э.М., Гусейнов А.Б. Методы стандартизации качества субстанций бетулинола и его лекарственных форм //Химико-фармацевтический журнал. 2007. Т. 41. С. 22–26.
14. Дребущак Т.Н., Михайленко М.А., Брезгунова М.Е., Шахтшнейдер Т.П., Кузнецова С.А. Кристаллическая структура сольвата бетулина с этанолом //Журнал структурной химии. 2010. Т.51. С. 823-827.
15. Drebushchak V.A., Mikhailenko M.A., Shakhtshneider T.P., Kuznetsova S.A. Melting of orthorhombic betulin// J. Therm. Anal. Calorim. DOI 10.1007/s10973-012-2235-4.
16. Sugimoto M., Okagaki T., Narisawa S., Koida Y., Nakajima K. Improvement of dissolution characteristics and bioavailability of poorly water-soluble drugs by novel cogrinding method using water-soluble polymer //Int. J. Pharm. 1998. V.160. P. 11-19.
17. Liu R. (ed.) Water-Insoluble Drug Formulation //CRS Press. 2008. 669 P.
18. Shakhtshneider T.P., Boldyrev V.V. Mechanochemical synthesis and mechanical activation of drugs. "Reactivity of Molecular Solids". Ed. E. Boldyreva, V. Boldyrev. John Wiley & Sons LTD. England. 1999. P. 271-312.
19. Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Михайлов А.Г., Левданский В.А. Способ получения бетулина. Патент РФ №2264411, 2005.
20. Михайленко М.А., Шахтшнейдер Т.П., Брезгунова М.Е., Дребущак В.А., Кузнецова С.А., Болдырев В.В. Получение и исследование физико-химических свойств сольватов бетулина// Химия растительного сырья. 2010. № 2. С. 63-70.
21. Sugimoto M., Okagaki T., Narisawa S., Koida Y., Nakajima K. Improvement of dissolution characteristics and bioavailability of poorly watersoluble drugs by novel cogrinding method using water-soluble polymer // Int. J. Pharm. 1998. V.160. P. 11-19.

Obtaining of Nontoxic Betulin Composites with Polyvinylpyrrolidone and Polyethylene Glycol

**Tatyana P. Shakhtshneider^a, Svetlana A. Kuznetsova^{6,8},
Mikhail A. Mikhailenko^a, Yuriy N. Malyar⁶,
Galina P. Skvortsova⁶ and Vladimir V. Boldyrev^a**

*^a Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS
18 Kutateladze st., Novosibirsk, 630128 Russia*

*⁶ Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS
50/24, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

*⁸ Siberian Federal University,
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

The composites of betulin with polyvinylpyrrolidone (PVP) and polyethylene glycol (PEG) were obtained by mechanochemical methods. The physico-chemical properties of the composites were studied. The composites are characterized by increased concentration of betulin at dissolution in water. It was shown that the composites are non-toxic.

Keywords: betulin, composites of betulin, polyvinylpyrrolidone (PVP), polyethylene glycol (PEG), the physico-chemical properties of the composites, toxicity.
