

М.В. Ольхович, А.В. Шарапова, С.В. Блохина

Марина Васильевна Ольхович (✉), Анжелика Валерьевна Шарапова, Светлана Витальевна Блохина
Лаб. 4-1 Физическая химия лекарственных соединений, Институт химии растворов им. Г.А. Крестова
Российской академии наук, ул. Академическая, 1, Иваново, Российская Федерация, 153045
E-mail: omv@isc-ras.ru (✉), avs@isc-ras.ru, svb@isc-ras.ru

ВЛИЯНИЕ 2-ГИДРОКСИПРОПИЛ- β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА РАСТВОРИМОСТЬ НОВЫХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Методом УФ-спектроскопии изучены процессы комплексообразования в системах 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин – цитотоксические вещества в интервале температур 293-315 К. Доказано образование супрамолекулярных соединений включения стехиометрического состава 1:1. Рассчитаны константы устойчивости комплексов и термодинамические параметры образования соединения включения 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин – трис(1-пентил-1H-индол-3-ил)метанол. Установлено, что полученный комплекс 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин – хлорид трис(1-пентилиндол-3-ил)метилия является неустойчивым.

Ключевые слова: комплексы включения, 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин, цитотоксичность, константа устойчивости, термодинамика

M.V. Ol'khovich, A.V. Sharapova, S.V. Blokhina

Marina V. Ol'khovich (✉), Angelica V. Sharapova, Svetlana V. Blokhina
Laboratory of Physical Chemistry of Medicinal Compounds, Institute of Solution Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Akademicheskaya str., 1, Ivanovo, 153045
E-mail: omv@isc-ras.ru (✉), avs@isc-ras.ru, svb@isc-ras.ru

EFFECT OF 2-HYDROXYPROPYL- β -CYCLODEXTRIN ON SOLUBILITY OF NOVEL CYTOTOXIC COMPOUNDS

Complexation processes in the systems of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin – cytotoxic substances within the temperature range of 293 – 315 K were studied by the UV-spectroscopy method. It was proved that complexation leads to the formation of supramolecular inclusion compounds with 1:1 component ratio. Stability constants of the complexes and thermodynamic parameters of the formation of the inclusion compound 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin – tris(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanol were calculated. The obtained complex of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin – tris(1-pentyl-1H-indol-3-yl) methylum chloride was found to be unstable.

Key words: inclusion complexes, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, cytotoxicity, stability constant, thermodynamics

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы внимание исследователей привлекают соединения, содержащие в структуре фрагмент трифенилметана [1-5]. Среди соединений такого типа были обнаружены вещества с антипролиферативной активностью. Авторами [6] был разработан метод получения симметричных трис(1-алкилиндол-3-ил)метанов и при их окислении получена серия солей трис(1-алкилин-

дол-3-ил)метилиев. Наиболее высокую цитотоксичность в полученном ряду солей проявил хлорид трис(1-пентил-1H-индол-ил)метилия. Было установлено, что данное соединение обладает противоопухолевой активностью на культурах клеток метастатической меланомы, резистентных к химиотерапии [7]. Основной проблемой клинического применения данных соединений является их низкая растворимость и плохая биодоступность. Одним из направлений на пути повышения

биодоступности и расширения возможности создания парентеральных и жидких пероральных лекарственных форм является создание растворимых комплексов включения на основе циклодекстринов (ЦД). ЦД способны формировать комплексы включения с большим количеством гидрофобных соединений, и такие комплексы успешно используются для повышения химической стабильности, растворимости и биодоступности многих препаратов [8].

Из многочисленных производных циклодекстринов 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин (2ГП-β-ЦД) имеет наибольшую растворимость в воде и биодоступность [9]. Кроме того, известны токсикологические исследования, показывающие, что 2ГП-β-ЦД хорошо переносится человеком при оральном и внутривенном введении [10].

Целью представленного исследования является получение устойчивых комплексов включения лекарственных соединений трис(1-пентил-1Н-индол-3-ил)метанол и хлорид трис(1-пентил-индол-3-ил)метилия с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином с улучшенной растворимостью и изучение термодинамики процесса комплексообразования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Соединения трис(1-пентил-1Н-индол-3-ил)метанол (I) и хлорид трис(1-пентил-индол-3-ил)метилия (II) были синтезированы по методике, описанной в работе [6]. Строение и чистота полученных соединений были подтверждены методами спектроскопии (ИК-, УФ-, ПМР-), ТСХ, ВЭЖХ, элементным анализом.

2ГП-β-ЦД был получен Aldrich (CAS Registry N 128446-35-5; ≥ 0,97 массовой доли чистоты). В качестве водной фазы использовался фосфатный буфер с pH 7,4, моделирующий среднее значение pH плазмы крови. Буферный раствор получали путем смешивания растворов соответствующих концентраций солей натрия и калия фосфорной кислоты (Na₂HPO₄·12H₂O и KH₂PO₄ марки «х.ч.»). Кислотность растворов измеряли с использованием pH-ион-электроанализатора типа ОР-300, Radelkis, Будапешт, стандартизованно по значениям pH 6,86 и 9,22.

Изучение растворимости комплексов включения заключалось в количественном определении растворимости исследуемого соединения при различных концентрациях циклодекстрина. На основе полученных данных были построены диаграммы фазовой растворимости [11]. Избыточное количество исследуемого соединения добавляли в фосфатный буферный раствор с 2ГП-β-ЦД. Концентрация 2ГП-β-ЦД варьировались от 0

до 0,2 моль/л. Приготовленные растворы помещали в стеклянные пробирки и перемешивали в воздушном термостате в интервале температур 293-315 К в течение 72 ч. После установления равновесия растворы центрифугировали и отфильтровывали с применением фильтра Millex®HA (Ирландия) 0,20 μm. Концентрацию растворенных соединений определяли с помощью спектрофотометра Cary50 (Varian) с использованием 1 см кварцевой кюветы.

Стехиометрию комплексов устанавливали методом изомолярных серий (метод Джоба) [12]. Измерения проводили на серии растворов, в которых общая сумма молярной концентрации циклодекстрина и исследуемых соединений была постоянна, а их соотношение изменялось.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Структурные формулы исследуемых соединений I и II представлены на рис. 1.

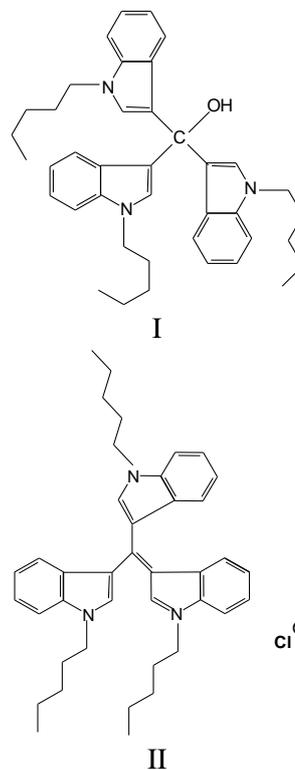


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых соединений
Fig. 1. Structural formulae of the compounds I, II

Для изучения процессов растворения соединений I и II в присутствии 2ГП-β-ЦД были построены диаграммы растворимости данных веществ с различными концентрациями циклодекстрина. На рис. 2 представлены диаграммы фазовой растворимости исследуемых соединений при температуре 298 К. Установлено, что максимальная растворимость соединения I достигается

в растворе 2ГП-β-ЦД с концентрацией 0,179 моль/л, при этом наблюдается увеличение растворимости в 37 раз. Растворимость соединения II в растворе 2ГП-β-ЦД (0,051 моль/л) увеличилась в 137 раз. Значительное увеличение растворимости свидетельствует о том, что между 2ГП-β-ЦД и препаратами происходит взаимодействие и образуются комплексы. Для всех полученных комплексов включения наблюдалось линейное увеличение растворимости соединений с возрастанием концентрации 2ГП-β-ЦД, поэтому полученные фазовые диаграммы могут быть рассмотрены как диаграммы A_L-типа [11]. Линейность данных зависимостей свидетельствует об образовании комплексов состава 1:1 между исследуемыми соединениями и 2ГП-β-ЦД.

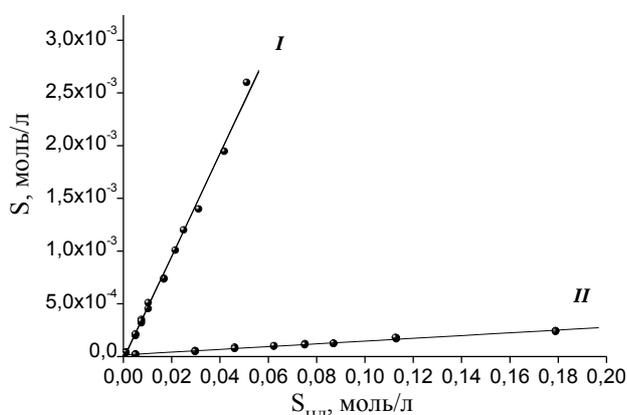


Рис. 2. Диаграммы фазовой растворимости соединений I, II в присутствии 2ГП-β-ЦД при T = 298 К
Fig. 2. Phase-solubility diagram of compounds I, II in the presence of 2HP-β-CD in buffer at 298 K

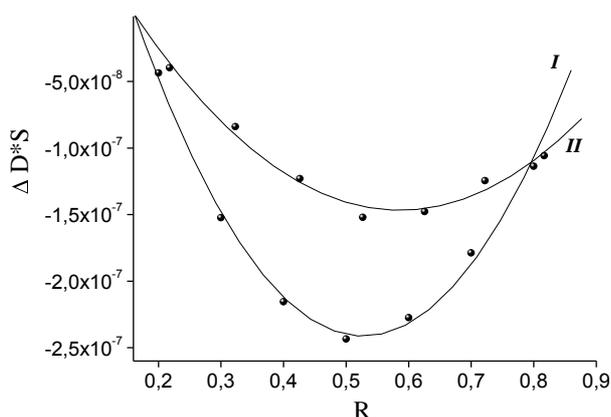


Рис. 3. Кривые Джоба для процесса комплексообразования соединений I-II с 2ГП-β-ЦД при температуре 298 К
Fig. 3. Job's curves for complexation of 2HP-β-CD with compounds I - II in buffer at 298 K

Стехиометрия полученных комплексов включения 1:1 была подтверждена методом Джоба [12]. Для этого строился график измеряемой оптической плотности раствора, пропорциональной образованию комплекса, от мольных долей

обоих компонентов. На рис. 3 представлены кривые Джоба исследуемых систем, для которых при мольном соотношении 0,5 наблюдается минимум, что соответствует формированию комплекса 1:1.

По данным диаграммы растворимости, используя уравнение (1), рассчитывали константу устойчивости комплексов включения 1:1:

$$K = \frac{\text{slope}}{S_0(1 - \text{slope})} \quad (1)$$

Константы устойчивости комплексов включения при 298 К для соединений I и II были равны $252,9 \pm 2,8$ л/моль и $2404,6 \pm 5,4$ л/моль соответственно.

Для проверки стабильности полученных комплексов была изучена кинетика растворения соединений I и II. Кинетические зависимости растворимости представлены на рис. 4.

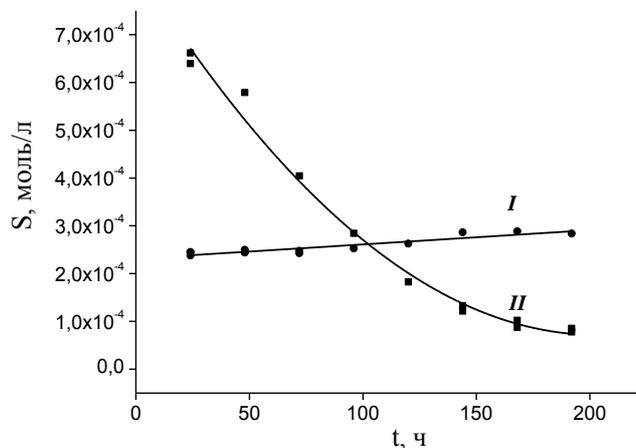


Рис. 4. Кинетические зависимости растворимости соединений I и II в присутствии различных концентраций 2ГП-β-ЦД
Fig. 4. Kinetic dependences of solubility for compounds I, II in the presence of various concentrations of 2HP-β-CD

Как видно из рис. 4, комплекс включения соединения I с 2ГП-β-ЦД устойчив в течение длительного времени. Растворимость соединения II в присутствии 2ГП-β-ЦД со временем уменьшается. Экспериментально было установлено, что соединение II в растворе буфера pH 7,4 полностью гидролизуеться в течение 60 ч, и его растворимость уменьшается с $2,12 \cdot 10^{-5}$ моль/л до $6,32 \cdot 10^{-7}$ моль/л. В присутствии 2ГП-β-ЦД повышенная растворимость соединения II сохраняется в течение длительного времени и не опускается ниже растворимости индивидуального соединения, что можно объяснить солубилизирующим действием циклодекстрина.

Для устойчивого комплекса включения соединения I были построены диаграммы фазовой растворимости при различных температурах. Установлено, что растворимость соединения в присутствии 2ГП-β-ЦД увеличивается с повыше-

нием температуры. Это может быть обусловлено освобождением молекул воды, связанных в полости циклодекстрина [13].

В табл. 1 представлены значения параметров уравнения 1 и константы устойчивости полученного комплекса включения соединения I при различных температурах. Установлено, что константы устойчивости уменьшаются с ростом температуры, что характерно для экзотермического процесса комплексообразования [14, 15].

Таблица 1

Значения параметров уравнения 1 и константы устойчивости комплекса 2ГП-β-ЦД с соединением I в буфере pH 7,4

Table 1. The values of the parameters of equation (1) and the stability constants of the complex 2HP-β-CD with the compound I in buffer pH 7.4

T/K	$S_0 \cdot 10^6$, моль/л	slope · 10 ³	K, л/моль	Коэффициент корреляции, R
293	2,50	1,533±0,018	614,13± 7,36	0,9996
298	6,32	1,596±0,017	252,94±2,78	0,9998
303	11,30	1,637±0,018	145,12±1,59	0,9994
311	23,68	1,601±0,015	67,72±0,63	0,9991
315	39,47	1,748±0,014	44,28±0,35	0,9987

Термодинамические и структурные характеристики комплексообразования позволяют оценить сольбилизирующее и стабилизирующее действие циклодекстрина и степень изменения физико-химических свойств молекул “гостей”, введенных в полость циклодекстрина. Термодинамические параметры образования комплекса включения 2ГП-β-ЦД – соединение I были получены из логарифмической зависимости константы устойчивости от обратной температуры, которое описывается уравнением: $\ln K = (30,94 \pm 2,24) + (10905 \pm 681) \cdot T$ с коэффициентом корреляцией $R = 0,9972$.

Для вычисления значений энтальпии и энтропии процесса комплексообразования использовалась интегральная форма уравнения Вант-Гоффа [16]:

$$\ln K = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}, \quad (2)$$

где ΔH^0 и ΔS^0 – энтальпия и энтропия процесса комплексообразования, соответственно, T – температура, R – газовая постоянная.

Изменение энергии Гиббса было рассчитано с использованием уравнения:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (3)$$

Полученные термодинамические параметры представлены в табл. 2.

Таблица 2

Термодинамические параметры комплекса включения 2ГП-β-ЦД с соединением I (1:1) в буфере pH 7,4 при 298 К

Table 2. Thermodynamic parameters of the formation complex 2HP-β-CD with a compound I in buffer pH 7.4 at 298 K

K, л/моль	ΔG , кДж/моль	ΔH , кДж/моль	$T\Delta S$, кДж/моль
252,9±2.8	-13,7 ± 0,1	-90,7 ± 5,2	-76,9 ± 4,4

Отрицательные значения изменения энергии Гиббса и энтальпии показывают, что процессы взаимодействия соединения I с 2ГП-β-ЦД самопроизвольны и экзотермичны. Отрицательные значения ΔH свидетельствуют о достаточно сильных межмолекулярных взаимодействиях при комплексообразовании, которые связаны не только с силами ван-дер-Ваальса, но и с образованием водородных связей [17]. Как утверждают авторы [14, 15], эти взаимодействия являются результатом проникновения гидрофобного гостя в полость циклодекстрина, а также дегидратацией молекул гостя.

Отрицательные изменения энтропии процесса комплексообразования можно объяснить уменьшением трансляционной и вращательной степеней свободы молекулы гостя при внедрении в макрополость циклодекстрина и созданием более упорядоченной системы. Превышение (по абсолютной величине) энтальпийной составляющей над энтропийной показывает, что процесс включения является энтальпийно-определяемым.

ВЫВОДЫ

С помощью УФ-спектроскопии было изучено поведение фармакологически активных веществ в буферном растворе, содержащем различные концентрации 2ГП-β-ЦД. Установлено, что растворимость препаратов линейно возрастает с увеличением концентрации 2ГП-β-ЦД. Линейное увеличение растворимости можно отнести к образованию комплексов включения между соединениями I, II и 2ГП-β-ЦД со стехиометрией 1:1. Выявлено, что полученный комплекс 2ГП-β-ЦД – соединение II в буферном растворе с pH 7,4 является неустойчивым. Однако, повышенная растворимость соединения II в присутствии 2ГП-β-ЦД сохраняется в течение длительного времени, что объясняется сольбилизирующим действием циклодекстрина. Для комплекса включения соединения I были рассчитаны константы устойчивости, а также основные термодинамические параметры процесса комплексообразования. Сделан вывод, что процесс образования супрамолекулярного комплекса 2ГП-β-ЦД – вещество I является экзо-

термическим и энтальпийно-определяемым. Результаты данного исследования показали возможность использования 2ГП-β-ЦД для значительного увеличения растворимости исследованных препаратов в водных растворах, что приведет к уменьше-

нию необходимой дозировки, а, следовательно, понижению токсичности предлагаемых препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-43-03085_рег_центр_а).

ЛИТЕРАТУРА

1. **Dothager R., Putt K.S., Alien B.J., Leslie B.J., Nesterenko V., Hergenrother P.J.** // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 8686-8696.
2. **Palchaudhuri R., Henrother P.J.** // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 5888-5891.
3. **Palchaudhuri R., Nesterenko V., Hergenrother P.J.** // J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. P. 10274-10281.
4. **Cuchelkar V., Kopečková P., Kopeček J.** // Mol. Pharm. 2008. V. 5. P. 776-786.
5. **Al-Qawasmeh R.A., Lee Y., Cao M-Y., Gu X., Vassilakos A., Wright J.A., Young A.** // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004. V. 14. P. 347-350.
6. **Lavrenov S.N., Luzikov Y.N., Bykov E.E., Reznikova M.I., Preobrazhenskaya M.N., Stepanova E.V., Glazunova V.A., Volodina Y.L., Tatarsky Jr.V.V., Shtil A.A.** // Bioorg. Med. Chem. 2010. V. 18. P. 6905-6913.
7. **Соломко Э.Ш., Лавренов С.Н., Иншаков А.Н., Абрамов М.Е., Преображенская М.Н., Степанова Е.В.** // Саркома. 2012. № 3. С. 48-52.
8. **Del Valle E.M.M.** // Process. Biochem. 2004. V. 39. P. 1088-1046.
9. **Brewster. M.E., Loftsson T.** // Adv. Drug Deliv. Rev. 2007. V. 59. P.645-666.
10. **Gould S., Scott R.S.** // Food Chem. Toxicol. 2005. V. 43. P. 1451-1459.
11. **Higuchi T., Connors K.A.** // Adv. Anal. Chem. Instrum. 1965. V. 4. P. 117-212.
12. **Job P.** // Ann. Chim. 1928. V. 9. P. 113-203.
13. **Jadhav G.S., Vavia P.R.** // Int. J. Pharm. 2008. V. 352. P. 5-16.
14. **Tommasini S., Raneri D., Ficarra R., Calabro M.L., Stancanelli R., Ficarra P.** // J. Pharm. Biomed. Anal. 2004. V. 35. P. 379-387.
15. **Rekharsky M.V., Inoue Y.** // Chem. Rev. 1998. V. 98. P. 1875-1917.
16. **Loftsson T., Duchêne D.** // Int. J. Pharm. 2007. V. 329. P. 1-11.
17. **Eid E.E. M., Abdula A. B., Sulimand F. E. O., Sukarie M.A., Rasedeef A., Fataha R.S.** // Carbohydr. Polym. 2011. V. 83. P.1707-1714.

REFERENCES

1. **Dothager R., Putt K.S., Alien B.J., Leslie B.J., Nesterenko V., Hergenrother P.J.** // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 8686-8696.
2. **Palchaudhuri R., Henrother P.J.** // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 5888-5891.
3. **Palchaudhuri R., Nesterenko V., Hergenrother P.J.** // J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. P. 10274-10281.
4. **Cuchelkar V., Kopečková P., Kopeček J.** // Mol. Pharm. 2008. V. 5. P. 776-786.
5. **Al-Qawasmeh R.A., Lee Y., Cao M-Y., Gu X., Vassilakos A., Wright J.A., Young A.** // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004. V. 14. P. 347-350.
6. **Lavrenov S.N., Luzikov Y.N., Bykov E.E., Reznikova M.I., Preobrazhenskaya M.N., Stepanova E.V., Glazunova V.A., Volodina Y.L., Tatarsky Jr.V.V., Shtil A.A.** // Bioorg. Med. Chem. 2010. V. 18. P. 6905-6913.
7. **Solomko E.Sh, Lavrenov S.N., Inshakov A.N., Abramov M.E., Preobrazhenskaya M.N., Stepanova E.V.** // Sarkoma. 2012. V. 3. P. 48-52.
8. **Del Valle E.M.M.** // Process. Biochem. 2004. V. 39. P. 1088-1046.
9. **Brewster. M.E., Loftsson T.** // Adv. Drug Deliv. Rev. 2007. V. 59. P.645-666.
10. **Gould S., Scott R.S.** // Food Chem. Toxicol. 2005. V. 43. P. 1451-1459.
11. **Higuchi T., Connors K.A.** // Adv. Anal. Chem. Instrum. 1965. V. 4. P. 117-212.
12. **Job P.** // Ann. Chim. 1928. V. 9. P. 113-203.
13. **Jadhav G.S., Vavia P.R.** // Int. J. Pharm. 2008. V. 352. P. 5-16.
14. **Tommasini S., Raneri D., Ficarra R., Calabro M.L., Stancanelli R., Ficarra P.** // J. Pharm. Biomed. Anal. 2004. V. 35. P. 379-387.
15. **Rekharsky M.V., Inoue Y.** // Chem. Rev. 1998. V. 98. P. 1875-1917.
16. **Loftsson T., Duchêne D.** // Int. J. Pharm. 2007. V. 329. P. 1-11.
17. **Eid E.E. M., Abdula A. B., Sulimand F. E. O., Sukarie M.A., Rasedeef A., Fataha R.S.** // Carbohydr. Polym. 2011. V. 83. P.1707-1714.

Поступила в редакцию 26.01.2016 г.

Принята к опубликованию 10.03.2016 г.