

УДК 543.545, 541.49

Solubility Study of Betulonic Acid in the Presence of Hydroxypropyl- γ -cyclodextrin by Capillary Electrophoresis

**Olesya V. Popova^a, Viktoria V. Sursyakova^{*a},
Galina V. Burmakina^{a, b} Nikolay G. Maksimov^a,
Vladimir A. Levdansky^a and Anatoly I. Rubaylo^{a, b, c}**
*^aInstitute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS
FRC "Krasnoyarsk Science Center SB RAS"
50/24 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia
^bSiberian Federal University
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia
^cKrasnoyarsk Scientific Centre, SB RAS
50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

Received 23.03.2016, received in revised form 20.04.2016, accepted 19.05.2016

Solubility of betulonic acid in 40 mM hydroxypropyl- γ -cyclodextrin solution was studied by capillary electrophoresis. It was shown that the equilibrium of complexation reaction between betulonic acid and hydroxypropyl- γ -cyclodextrin was established for three days. The oxidation of betulonic acid by atmospheric oxygen was shown not to occur during the long stirring. The solubility of betulonic acid in 40 mM aqueous cyclodextrin solution was 410 ± 20 mg/l.

Keywords: capillary electrophoresis, betulonic acid, hydroxypropyl- γ -cyclodextrin, inclusion complexes, solubility.

DOI: 10.17516/1998-2836-2016-9-2-171-176.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: viktorija_vs@list.ru

Исследование растворимости бетулоновой кислоты в присутствии гидроксипропил- γ -циклодекстрина методом капиллярного электрофореза

**О.В. Попова^а, В.В. Сурсякова^а, Г.В. Бурмакина^{а,б},
Н.Г. Максимов^а, В.А. Левданский^а, А.И. Рубайло^{а,б,в}**

*^аИнститут химии и химической технологии СО РАН
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»*

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/24

^бСибирский федеральный университет

Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

^вКрасноярский научный центр СО РАН

Россия, 660036, Красноярск, ул. Академгородок 50

Методом капиллярного электрофореза изучена растворимость бетулоновой кислоты в 40 мМ растворе гидроксипропил- γ -циклодекстрина. Показано, что равновесие реакции комплексообразования между бетулоновой кислотой и гидроксипропил- γ -циклодекстрином (ГП- γ -ЦД) устанавливается в течение трех суток. Найдено, что присутствие или отсутствие кислорода в растворе ГП- γ -ЦД не влияет на динамику растворения бетулоновой кислоты. Определена растворимость бетулоновой кислоты в 40 мМ водного раствора гидроксипропил- γ -циклодекстрина, которая составляет (410 ± 20) мг/л.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, бетулоновая кислота, гидроксипропил- γ -циклодекстрин, комплексы включения, растворимость.

Введение

Бетулоновая кислота (рис. 1А) относится к пентациклическим тритерпеноидам лупанового ряда и обладает рядом полезных свойств, таких как антибактериальная, противовирусная, противораковая и анти-ВИЧ-активность [1, 2]. Однако, несмотря на широкий спектр действия, применение бетулоновой кислоты в фармацевтической промышленности весьма ограничено из-за низкой растворимости в воде [3].

К одному из способов повышения растворимости веществ в воде относится образование комплексов включения с циклодекстринами. Циклодекстрины (ЦД) – макроциклические соединения, состоящие из шести (α -ЦД), семи (β -ЦД) или восьми (γ -ЦД) остатков D-(+)-глюкопиранозы, объединенные в макроциклы α -D-1,4-гликозидными связями [4-7]. В образующихся структурах имеется полость тороидальной формы, обладающая гидрофобными свойствами. Все вторичные гидроксильные группы расположены на широком основании конуса, первичные – на противоположном конце. За счет такой структуры ЦД могут взаимодействовать с гидрофобными молекулами с образованием комплексов включения, типа «хозяин-гость», тем самым повышая их растворимость [8, 9]. В фармацевтической промышленности широко распространено использование различных производных циклодекстринов, например,

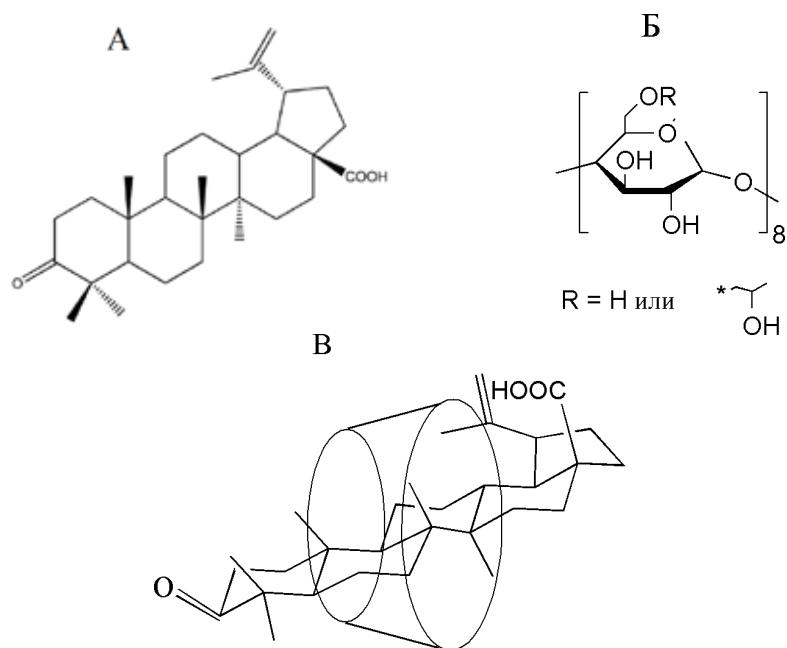


Рис. 1. Структурные формулы бетулоновой кислоты (А), ГП-γ-ЦД (Б) и образованного ими комплекса (В)

гидроксипропил-γ-циклодекстрина (ГП-γ-ЦД, рис. 1Б), который обладает более широкой полостью, чем α- и β-циклодекстрины, и благодаря наличию гидроксипропильных групп хорошо растворим в воде (317,3 мМ) [10]. Использование высоких концентраций ГП-γ-ЦД позволяет добиваться лучших результатов растворения молекул «гостей».

Для исследования комплексов включения различной природы широко применяется современный метод капиллярного электрофореза (КЭ) [11]. Ранее [12] нами был предложен способ исследования методом КЭ комплексов, образованных практически нерастворимыми соединениями, в частности комплексов включения бетулоновой кислоты с β-ЦД.

Целью данной работы являлось изучение растворимости бетулоновой кислоты в водном растворе ГП-γ-ЦД методом КЭ (рис. 1).

Экспериментальная часть

Все измерения проводили на приборе Красноярского регионального центра коллективного пользования СО РАН – системе КЭ с диодноматричным детектором Agilent ^{3D}CE G1600A (Agilent Technologies, Waldbronn, США). Использовали немодифицированный кварцевый капилляр с внутренним диаметром 50 мкм (150 мкм в районе детектора), общей длиной 64,5 см и эффективной длиной 56 см. Капилляр термостатировали при температуре 25 °С. Детектирование проводили в УФ-области при 200 нм. Применяли напряжение +10 кВ, давление 50 мбар, ввод пробы 50 мбар в течение 50 с. Сигнал детектора обрабатывали при помощи встроенного программного обеспечения HP ChemStation Rev.A.10.02. Ввод пробы гидродинамический при давлении 50 мбар.

Использовали реактивы не ниже ч.д.а. Гидроксипропил-γ-циклодекстрин с молекулярной массой 1576 г/моль и средним числом гидроксипропильных заместителей на одно глюкопиро-

нозное звено, равным 0,6, был приобретен в компании Sigma-Aldrich. Бетулоновая кислота синтезирована в Институте химии и химической технологии СО РАН. В качестве маркера электроосмотического потока (ЭОП) использовали 0,05%-ный раствор диметилсульфоксида. Все растворы готовили с применением деионизованной воды, полученной при помощи системы очистки воды Direct-Q 3 (Millipore, Франция) с электропроводностью менее $0,1 \cdot 10^{-6} \text{ Ом}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Использовали фоновый электролит на основе 10 мМ тетрабората натрия с добавкой 10%-ного этилового спирта, pH 9,3. В этих условиях из-за наличия этилового спирта в фоновом электролите происходит разложение комплекса бетулоновой кислоты и ГП- γ -ЦД и на электрофореграмме наблюдается пик бетулоновой кислоты.

Перед работой капилляр последовательно промывали 0,1 М раствором NaOH в течение 2 мин, затем дважды по 2 мин деионизованной водой, 5 мин – раствором фонового электролита, между анализами – раствором фонового электролита в течение 2 мин. Новый капилляр промывали сначала 2 мин 1 М NaOH, далее как описано выше.

Навески бетулоновой кислоты помещали в 10-миллилитровые полипропиленовые пробирки с плотно закрывающимися крышками. В каждую пробирку приливали по 7 мл 40 мМ раствора ГП- γ -ЦД, далее раствор одной из пробирок продували в течение 15 мин аргоном, другую – кислородом, третью пробирку оставляли без изменения. После этого пробирки закрывали и помещали в специально изготовленную установку для перемешивания 10-миллилитровых пробирок. Перемешивание осуществляли при комнатной температуре в течение семи суток, периодически отбирая пробы для анализа из каждой пробирки. Отобранные пробы центрифугировали, фильтровали через шприцевые фильтры с размерами пор 0,45 мкм, снова центрифугировали и анализировали методом КЭ. Концентрацию бетулоновой кислоты определяли из градуировочных зависимостей. Градуировочные зависимости строили в координатах: площади пиков от концентрации кислоты на основе результатов ежедневной съемки стандартных растворов (50, 100, 250 и 500 мг/л).

Результаты и их обсуждение

Методом КЭ исследована растворимость бетулоновой кислоты в 40 мМ водном растворе ГП- γ -ЦД после перемешивания в течение 7 сут. На рис. 2 приведены электрофореграммы бетулоновой кислоты при разном времени перемешивания в растворе ГП- γ -ЦД на воздухе. Площадь пика бетулоновой кислоты возрастает на протяжении трех суток перемешивания за счет образования комплекса включения (рис. 1B), по истечении этого времени в системе бетулоновая кислота-ГП- γ -ЦД устанавливается равновесие.

Ранее нами было показано, что равновесие в реакции комплексообразования между бетулоновой кислотой и β -ЦД устанавливается в течение двух часов и более длительного перемешивания не требуется [12]. Медленная растворимость бетулоновой кислоты с ГП- γ -ЦД может быть обусловлена либо медленной кинетикой растворения, либо возможными побочными процессами, протекающими со скоростями, сравнимыми со скоростью растворения вещества, например окислением исследуемого вещества. Для того чтобы исключить влияние этих процессов, исследована растворимость бетулоновой кислоты в атмосфере кислорода, аргона и на воздухе. На рис. 3 приведены зависимости растворимости бетулоновой кислоты от времени перемешивания в этих условиях. Как видно на рис. 3, наличие или отсутствие кислорода не

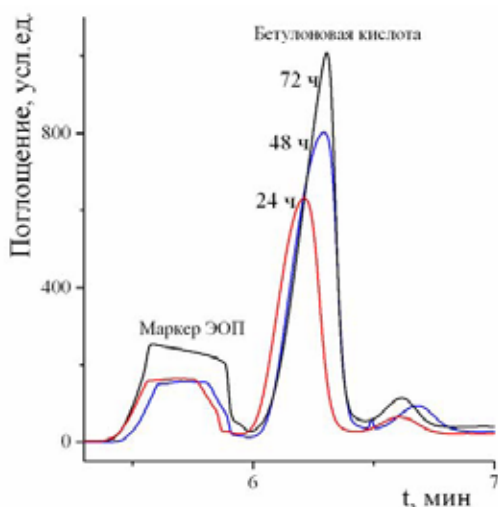


Рис. 2. Электрофореграммы бетулоновой кислоты, полученные через 24-72 ч перемешивания в 40 мМ растворе ГП-γ-ЦД

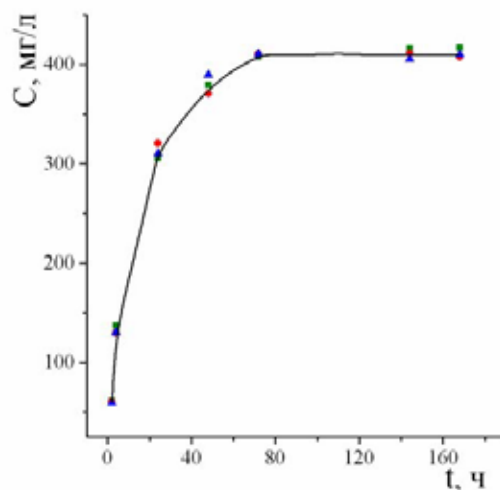


Рис. 3. Зависимость растворимости бетулоновой кислоты в присутствии ГП-γ-ЦД от времени перемешивания в атмосфере: ■ – воздуха; ▲ – кислорода; ● – аргона

влияет на увеличение концентрации бетулоновой кислоты в процессе перемешивания. Более медленная кинетика растворения бетулоновой кислоты в присутствии ГП-γ-ЦД по сравнению с β-ЦД, вероятно, связана с наличием у ГП-γ-ЦД гидроксипропильных групп, вызывающих стерические затруднения при образовании комплекса с бетулоновой кислотой.

Таким образом, выявлено, что присутствие или отсутствие кислорода в растворе ГП-γ-ЦД не влияет на кинетику растворения бетулоновой кислоты; равновесие устанавливается в течение трех суток. Растворимость бетулоновой кислоты в 40 мМ растворе ГП-γ-ЦД равна 410 ± 20 мг/л ($n = 3$, $P = 0,95$). Полученное значение значительно превышает растворимость бетулоновой кислоты в воде без добавок ЦД (2,7 мг/л [12]).

Список литературы

1. Ledeti I., Bosca C.S., Cosma C., Badea V., Todea A., Bercean V.-N. Study on obtaining 3-oxolup-20(29)-en-28-oic acid (betulonic acid) from (3β)-lup-20(29)-en-3,28-diol (betulin). *Revista de Chimie (Bucharest) 2014*. Vol. 65(11), P. 1289-1293.
2. Sorokina I.V., Tolstikova T.G., Zhukova N.A., Petrenko N.I., Schults E.E., Uzenkova N.V., Grek O.R., Pozdnyakova S.V., Tolstikov G.A. Betulonic acid and its derivatives, a new group of agents reducing side effects of cytostatics. *Doklady Biological Science 2004*. Vol. 399(2), P. 274-277.
3. Symon A.V., Veselova N.N., Kaplun A.P., Vlasenkova N.K., Fedorova G.A., Lyutik A.I., Gerasimova G.K., Shvets V.I. Synthesis and antitumor activity of cyclopropane derivatives of betulinic and betulonic acids. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry 2005*. Vol. 31(3), C. 286-291.
4. Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Review 1998*. Vol. 98, P. 1743-1753.
5. Zhou J., Ritter H. Cyclodextrin functionalized polymers as drug delivery systems. *Polymer Chemistry 2010*. Vol. 1(10), P. 1552–1559.

6. Loftsson T., Brewster M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. I. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Science* 1996. Vol. 85(10), P. 1017-1025.
7. Szenté L., Szejtli J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999. Vol. 36(1), P. 17-28.
8. Soica C.M., Peev C.I., Ciurlea S., Ambrus R., Dehelean C. Physico-chemical and toxicological evaluations of betulin and betulinic acid interactions with hydrophilic cyclodextrins. *Farmacia* 2010. Vol. 58(5), P. 611-619.
9. Claude B., Morin P., Lafosse M., Andre P. Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triterpene acids complexes with derivatized β - and γ -cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2004. Vol. 1049(1-2), P. 37-42.
10. Loftsson T., Jarho P., Masson M., Jarvinen T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2005. Vol. 2(2), P. 335-351.
11. Wu S.-H., Ding W.-H. Application of cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis to determine the apparent binding constants and thermodynamic parameters of the alkyl-naphthalene derivatives. *Electrophoresis*. 2005. Vol. 26 (18), P. 3528-3537.
12. Popova O.V., Sursyakova V.V., Burmakina G.V., Levdansky V.A., Rubaylo A.I. Determination of stability constants of inclusion complexes of betulin derivatives with β -cyclodextrin by capillary electrophoresis. *Doklady Chemistry* 2015. Vol. 461(1), P. 67-69.