

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОКОМПЛЕКСОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С ЦИКЛИЧЕСКИМИ ОЛИГОСАХАРИДАМИ, АНАЛИЗ ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ПИЩЕВОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

М.А. Капустин, А.С. Чубарова, Т.Н. Головач, В.Г. Цыганков*,
А.М. Бондарук*, В.П. Курченко

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь
**РУП «Научно-практический центр гигиены», Минск, Республика Беларусь*
e-mail: maximkapustin84@gmail.com, kurchenko@tut.by

Введение

Циклодекстрины были открыты более ста лет назад, однако разработки по их применению в качестве стабилизирующих и модифицирующих компонентов в производстве стали вестись лишь с 80-х годов 20 века. Впервые циклодекстрины были обнаружены А. Вилье в 1891 году. Французский ученый обнаружил в продуктах деградации крахмала специфические декстрины, устойчивые к кислотному гидролизу, как и целлюлоза, и не обладающими редуцирующими свойствами. Поэтому они и получили название «целлюлозины». В 1903 Ф. Шардингер выделил из продуктов ферментативной конверсии картофельного крахмала два соединения в кристаллической форме, изучил их свойства и дал им названия α -декстрин и β -декстрин (позднее α - и β -циклодекстрины) [1, 2, 3]. В 1935 году Крамер и Фрейденберг обнаружили и изучили γ -циклодекстрин [1, 4]. В течение последних десятилетий были выделены в чистом виде и охарактеризованы δ -, ϵ -, ζ -, η -, θ -циклодекстрины, образованные 9, 10, 11, 12 и 13 остатками глюкопиранозы. Установлено, что существуют циклодекстрины, состоящие из большего количества остатков глюкозы (до 31), но макроциклы, состоящие более чем из 13 остатков глюкозы, вследствие потери стабильной конформации не содержат упорядоченной неполярной полости в структуре молекулы и обладают иными физико-химическими свойствами. По количеству остатков глюкозы, в составе структурно упорядоченных молекул циклодекстринов кроме верхнего предела существует и нижнее ограничение. Молекула циклодекстрина не может быть сформирована менее чем 6 остатками глюкопиранозы за счет стерических затруднений [1, 4, 5, 6].

Циклодекстрины образуются в результате реакции внутримолекулярного трансгликозирования продуктов гидролиза крахмала. Катализирует реакцию фермент – циклодекстринглюканотрансфераза (ЦГТ). Циклодекстрины представляют собой уникальные природные наноструктуры снабженные гидрофобной внутренней полостью, и гидрофильной внешней поверхностью, так называемые молекулярные контейнеры, которые способны удерживать во внутренней полости неполярные, неионизированные молекулы вещества «гостя». Это приводит к образованию комплексов включения, что придает гидрофобным молекулам вещества «гостя» уникальное свойство растворяться в водной фазе за счет гидрофильной наружной поверхности молекулярного контейнера. Очевидно, что способность молекул вещества «гостя» встроится в полость олигосахаридов и стабильность образующегося комплекса включения зависят не только от полярности, и размера этих молекул, но также и от физико-химических свойств молекул циклодекстринов. Основной интерес исследователей к изучению циклодекстринов связан именно с их способностью образовывать комплексы включения с различными группами органических и неорганических соединений [1, 6, 7, 8].

1 Физико-химические свойства циклодекстринов

Циклодекстрины можно подразделять на две группы: нативные циклодекстрины и химически модифицированные циклодекстрины [9]. Циклические олигосахариды, полученные в результате биотехнологической конверсии крахмала (α -, β -, и γ -

циклодекстрины) различаются по количеству остатков глюкозы в составе молекулы. Принципиальная структура α -, β - и γ -циклодекстрина, показана на рисунке 1.

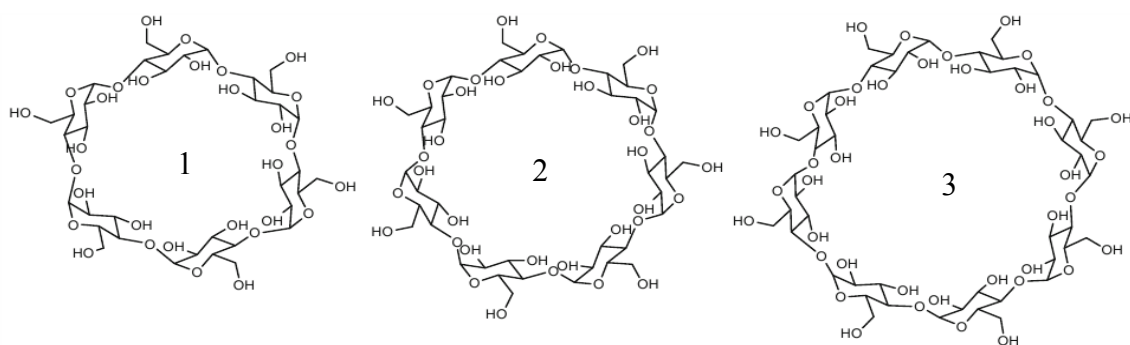


Рисунок 1 – Структурные формулы α -ЦД (1), β -ЦД (2) и γ -ЦД (3) [9, 10]

В твердом сухом состоянии эти циклодекстрины имеют вид белого кристаллического порошка. Для большинства циклодекстринов не установлено четкой температурной точки плавления. У наиболее изученных α -, β - и γ - циклодекстринов известны значения температуры плавления, которые находятся в диапазоне 240–265 °С [6]. Установлено, что при выдерживании при температуре свыше 200 °С эти соединения теряют стабильность и подвергаются термической деструкции [10, 11, 12]. Циклодекстрины (ЦД, CD) относятся к группе водорастворимых соединений, но не обладают высокой растворимостью при нормальной температуре вследствие относительно сильных внутримолекулярных водородных связей в кристаллической решетке [1]. Самой низкой растворимостью среди всех природных циклодекстринов обладает β -циклодекстрин.

Находясь в сухом кристаллическом состоянии, циклодекстрины не обладают высокой гигроскопичностью [13]. Однако в процессе кристаллизации циклодекстринов из водных растворов, молекулы воды активно включаются в полость тора, а также присутствуют в кристаллической структуре вещества, связываясь с внешней поверхностью молекул. При нормальных условиях удельное количество молекул воды ассоциированных с 1 молекулой циклодекстрина составляет: для α -циклодекстрина – 6.2 молекул, для β -циклодекстрина – 9.6 молекул, для γ -циклодекстрина – 14.2 молекул воды [13].

В таблице 1 приведены размеры молекулы и физические свойства трех основных типов нативных циклодекстринов.

Таблица 1 – Физические параметры и растворимость α -, β - и γ -циклодекстринов в различных растворителях [5, 6, 7, 9, 10].

Показатель		α - циклодекстрин	β -циклодекстрин	γ - циклодекстрин
Число остатков глюкозы		6	7	8
Молекулярная масса		972	1134	1296
Размеры молекулы (Å)	Диаметр полости тора	5,7	7,8	9,5
	Внешний диаметр	14,6	15,4	17,5
	Высота	7	7	7
Объем внутренней полости мол-лы, (Å ³)		174	262	427
Суммарный объем внутримолекуляр-ных полостей циклодекстрина, мл в 1 г/ в 1 моль		0,1/104	0,14/157	0,2/256
Растворимость, при 25 °С (г/100 мл)	вода (дистилл.)	14,5	1,85	23,2
	метанол-вода 50:50	1,2	0,3	2,8
	этанол-вода 50:50	0,9	1,3	2,1

<i>Продолжение таблицы 1</i>				
Показатель		α -циклодекстрин	β -циклодекстрин	γ -циклодекстрин
Растворимость, при 25 °С (г/100 мл)	пропанол-вода 50:50	0,8	1,1	0,7
	изопропанол-вода 50:50	4,7	2,6	0,6
	ацетон-вода 50:50	1,9	0,3	0,5
Растворимость в органических растворителях (г/100 мл)	диэтиловый эфир	–	–	–
	хлороформ	–	–	–
	изопропанол	–	–	>0.1
	ацетон	–	–	>0.1
	этанол	–	–	>0.1
	метанол	–	–	>0.1
	глицерин	–	4.3	нет данных
	пропиленгликоль	1	2	нет данных
	диметилсульфоксид	2	35	>20
	пиридин	7	37	нет данных
	этиленгликоль	9	21	нет данных
диметилформамид	54	32	нет данных	
Поверхностное натяжение (MN/m)		71	71	71
рКа, при 25 °С, потенциометрический метод определения		12,333	12,202	12,081
Константа диффузии (м/с), при 40 °С		3,443	3,232	3,000
Содержание воды в кристаллической форме циклодекстрина, %		10,2	13–15	8–18
Кол-во молекул воды в полости тора		6	11	17
$[\alpha]_{D, 25}$		150±0,5	162,5±0,5	177,4±0,5
Диапазон температур плавления, °С		255–260	255–265	240–245
Форма кристаллов (кристаллизация из воды)		гексагональные пластинки	моноклинные параллелограммы	квадратные призмы

Примечание: «←» - не растворимы.

Структура кристаллов циклодекстринов стабилизирована межмолекулярными водородными связями. В кристаллогидратном состоянии агрегаты молекул циклодекстринов имеют трубчатую или сетчатую форму, и, вследствие различной ориентации, образуют частицы, напоминающие по внешнему виду игловидные или призмовидные агломераты. Форма кристаллов зависит от степени гидратации. При удалении воды кристаллы переходят в аморфное состояние [11, 14]. При образовании комплексов включения происходит вытеснение молекул воды из полостей тора циклодекстринов в результате встраивания в полость тора соответствующей молекулы вещества «гостя» [14].

Циклодекстрины нерастворимы в большинстве органических растворителей, но способны растворяться в некоторых полярных апротонных растворителях (таблица 1) [12]. Температурная зависимость растворимости циклодекстрина может изменяться в результате процесса комплексообразования с молекулой вещества «гостя». Комплексы включения могут обладать большей растворимостью в воде, чем интактные циклодекстрины, при условии, что молекулы вещества «гостя» хорошо растворимы в воде. И, напротив, при образовании комплексов включения с гидрофобными молекулами вещества «гостя», растворимость циклодекстринов в воде может уменьшаться [11].

Несмотря на снижение растворимости молекул циклодекстринов (молекул «матрицы»), растворимость гидрофобного соединения в водных системах в составе комплекса включения может увеличиваться [15].

В структуре молекул циклодекстринов нет восстанавливающих концевых групп. Окисление перийодатом приводит к раскрытию глюкопиранозного кольца, при этом не образуется муравьиная кислота или формальдегид, что свидетельствует об отсутствии в молекулах циклических олигосахаридов свободных концевых групп.

2 Механизм образования наноструктур комплексов включения на основе циклодекстринов

Как было отмечено ранее, одним из наиболее интересных свойств циклодекстринов является способность образовывать комплексы с различными газообразными, жидкими и сухими веществами типа молекулярных комплексов – клатратов. Термин "клатрат" ввел Г. Пауэлл в 1948 г. Клатраты (от лат. *clathratus* – защищенный решеткой) образуются при включении молекул, называемых «гостями», в полости кристаллического каркаса, состоящего из молекул другого типа, называемых «хозяевами» (решетчатые клатраты), или в полость одной большой молекулы-хозяина (молекулярные клатраты). Молекулярные клатраты разделяются на кавитаты, когда в молекуле «хозяина» имеется полость в виде канала, и адикваты. В случае адикватов полость молекулы «хозяина» напоминает корзину. Комплексы образующиеся с циклодекстринами относятся к так называемым комплексам включения или кавитатам [16]. Пространственная геометрия молекул циклодекстрина позволяет различным соединениям размещаться во внутренней гидрофобной полости с образованием молекулярного комплекса включения типа гость-хозяин [1]. Стабильность формирующихся комплексов обусловлена образованием разнообразных нековалентных сил взаимодействия между молекулами циклодекстрина и «гостя»: Ван-дер-Ваальсовых, гидрофобных и др. [3, 5, 17].

Циклодекстрин в составе комплекса, защищает молекулу «гостя» от повреждения различными реактивными молекулами и тем самым снижает скорость окисления, стерических перегруппировок, гидролиза, рацемизации и ферментативной деструкции [6, 17].

Способность молекул циклодекстрина и молекул вещества «гостя» образовывать комплексы включения зависит от двух ключевых факторов [3].

Первый фактор – стерический. Феномен образования комплексов включения возможен лишь при стерическом соответствии структуры молекулы «гостя» и полости циклодекстрина. Этот фактор учитывает соответствие размеров внутренней полости молекулы циклодекстрина и размера молекулы, или определенной функциональной группы которую необходимо поместить в эту полость. При несоответствии этих параметров функциональная группа или молекула не сможет прочно закрепиться в полости тора циклодекстрина [18].

Высота внутренней полости тора α -, β - и γ -циклодекстринов одинакова, а внутренний диаметр определяется числом остатков молекул глюкозы в составе макроцикла. Эти параметры определяют возможность циклодекстринов взаимодействия с различными классами органических соединений. α -циклодекстрин может, как правило, образовывать комплексы со сложными молекулами или соединениями с алифатическими низкомолекулярными боковыми цепями; во внутреннее пространство β -циклодекстрина способны встраиваться сложные ароматические соединения и гетероциклы, а во внутренней полости γ -циклодекстрина могут разместиться более крупные молекулы (стероиды и макроциклические соединения) [5].

Второй фактор – термодинамическое взаимодействие между различными компонентами системы (циклодекстрином, молекулами вещества «гостя» и растворителем). Для формирования комплекса включения должно сформироваться такое состояние системы, при котором наиболее энергетически выгодным является размещение молекул «гостя» во внутренней полости циклодекстрина [5, 6, 18].

В гидрофобной полости циклодекстрина формируется определенная микросреда, энергетически благоприятная для размещения неполярных участков молекулы «гостя» и

образования кавитата [5, 6]. При формировании комплекса происходит динамическое образование и разрыв нековалентных связей и молекулы «гостя» находятся в равновесном состоянии в составе комплекса и в свободном состоянии в реакционной смеси.

Основным движущим фактором определяющим возможность образования комплексов включения, является недостаточная комплементарность водородных связей между молекулами воды с функциональными группами полости тора циклодекстрина [3, 18]. Это приводит к увеличению энтальпии молекул воды и происходит их высвобождение из полости циклодекстрина. Их место занимают гидрофобные молекулы, которые образуют с циклодекстринами неполярные связи.

Термодинамическая стабильность наноструктур кавитатов обеспечивается благоприятным расположением молекул вещества «гостя» в неполярных полостях молекул вещества «хозяина». Вследствие этого, возникновение слабых межмолекулярных взаимодействий приводит к энергетически выгодному изменению состояния образующих комплексы включения компонентов системы по сравнению с их энергией в свободном состоянии [7]. В результате образования наноккомплексов наблюдается снижение напряженности в структуре макромолекулы циклодекстрина и система приходит к более стабильному термодинамическому состоянию [3, 5, 7].

В общем виде можно выделить четыре энергетически выгодных этапа в процессе образования наноккомплексов при взаимодействии компонентов реакционной смеси, обеспечивающих смещения равновесия в сторону образования комплексов включения.

1. Вытеснение полярных молекул воды из неполярной полости тора молекулы циклодекстрина.

2. Образование водородных связей между вытесненными молекулами воды и молекулами воды снаружи тора.

3. Снижение сил отталкивания между гидрофобными молекулами «гостя» и водным окружением.

4. Формирование гидрофобных связей в результате самовстраивания молекулы вещества «гостя» в аполярную полость тора молекулы циклодекстрина [5, 18, 19].

Первичное равновесное состояние при формировании комплексов включения достигается в течение нескольких минут. Формирование конечного устойчивого равновесного состояния требует гораздо большего времени, в течение которого происходит конформационная модификация молекулы вещества «гостя» в составе наноккомплекса для формирования наиболее стабильных ван-дер-ваальсовых связей с функциональными группами внутренней полости циклодекстрина [5, 7, 20].

Наноструктуры кавитатов на основе циклодекстринов могут быть получены с использованием различных методических приемов. Выбор конкретного метода зависит от свойств матрицы и молекул вещества «гостя», кинетики достижения равновесного состояния в системе, свойств других компонентов реакционной смеси, а также от эффективности процесса формирования комплекса включения. Для протекания процесса образования наноструктур необходимо наличие в реакционной смеси хотя бы следовых количеств воды для инициации изменения термодинамического состояния системы [5].

3 Методы получения наноструктур комплексов включения на основе циклодекстринов

Комплексы включения получают с использованием различных термо-механических техник. Наноструктуры комплексов включения (кавитаты) могут образовываться при смешивании веществ либо в сухом кристаллическом состоянии, либо в суспензиях или растворах. Традиционно в качестве среды для реакции комплексообразования используется вода, но также могут быть использованы смеси с различными неводными растворителями [5, 6, 11].

Базовое молярное соотношение «гость»/циклодекстрин в реакционной смеси используемое для получения комплексов включения составляет 1:1. Данное молярное

соотношение может изменяться в зависимости от размера молекулы «гостя», а также от типа используемого циклодекстрина [10, 11, 16].

Существует несколько методов получения комплексов включения: метод сорастирания, метод соосаждения, метод сухого вымешивания, метод герметичного нагревания, метод комплексообразования в пастообразном состоянии, метод нейтрализации, метод распылительной сушки, метод заморозки, метод испарения растворителя [7, 11, 17].

3.1 Метод сорастирания

Этот метод напоминает процесс грануляции при котором в промышленном производстве можно использовать низко- и высокооборотистые миксеры [21]. При использовании данного метода в лабораторном производстве, комплексы включения можно получать в процессе перетирания пестиком в ступке смеси циклодекстрина с субстанцией вещества «гостя» при добавлении минимальных количеств воды. Время вымешивания зависит от свойств вещества субстрата. После завершения процесса комплексообразования смесь высушивается без дополнительной обработки, либо промывается небольшим количеством воды и отфильтровывается или центрифугируется.

В редких случаях при высушивании пасты вместо тонкодисперсного порошка формируется плотный спрессованный комок, что обусловлено свойствами субстрата. В такой ситуации полученную массу комплексов включения необходимо размолоть на шаровой мельнице до тонкодисперсного состояния.

Полученный порошок высушивается в эксикаторе, просеивается через сита и хранится в плотно закупоренной таре [5, 11, 22].

3.2 Метод соосаждения

Данный метод является наиболее широко используемым методом в лабораторной практике. Циклодекстрин растворяют в воде и при перемешивании раствора добавляют субстрат для включения в гидрофобную полость макроцикла. При использовании насыщенных растворов лиганда в процессе комплексообразования будет образовываться осадок кавитатов. Содержание β -циклодекстрина в растворе может достигать 20% при условии, что вещество субстрат является термостабильным. Sarkal и соавт. [23] получали комплексы включения малорастворимых в воде веществ с β -циклодекстрином методом совместного осаждения. При использовании данного метода целевое вещество растворяется в минимальном объеме органического растворителя (ацетон и др.) и полученный раствор добавляют по каплям к β -циклодекстрину, растворенному в минимальном количестве воды и термостатированному при 75 °С, при перемешивании на мешалке. Постепенно охлаждают до комнатной температуры при перемешивании. Перемешивание при данной температуре продолжается в течение часа, затем температуру реакционной смеси постепенно снижают. Осадок комплексов включения декантируют, отделяют центрифугированием, либо отфильтровывают, высушивают и хранят при температуре 25 °С и относительной влажности воздуха 40–50%. Полученный осадок комплекса включения можно промыть небольшим количеством воды или смешивающихся с водой органических растворителей (метанол, этанол, ацетон) [5, 11, 23]. Недостатком данного метода является тот факт, что при использовании органических растворителей может наблюдаться снижение степени включения целевого вещества в состав комплексов, а также трудности с масштабированием данного метода на производстве [11, 24]. Поэтому ряд исследователей считают метод сорастирания более предпочтительным для получения комплексов включения. Однако использование метода соосаждения позволяет получить очень чистый препарат комплекса включения в кристаллическом виде [11, 21]. Основным недостатком данного метода является использование больших объемов растворителя для солюбилизации лиганда, что повышает затраты на закупку крупногабаритных реакторов, расходы энергии на нагрев и охлаждение реакционной смеси. Обработка и утилизация больших объемов остаточных компонентов смеси также представляется затруднительным, но эта проблема может быть решена при организации безотходного производственного процесса с циклическим использованием

растворителя [11]. Отделенный осадок кавитатов можно промыть небольшим количеством воды, этанолом, метанолом или ацетоном. Промывка осадка может негативно повлиять на стабильность комплексов с некоторыми субстратами, поэтому перед масштабированием процесса необходимо уточнить влияние растворителей на стабильность кавитатов. Добавление в реакционную смесь неионных ПАВ может негативно отразиться на эффективности комплексообразования. Добавление в смесь этанола может усилить образование осадка кавитатов. Неионизированные молекулы субстрата образуют более прочные комплексы с циклодекстринами. В ряде случаев эффективность процесса комплексообразования с использованием субстрата с основными свойствами можно увеличить добавлением в смесь гидроксида аммония [11].

3.3 Метод сухого помола

Для некоторых субстратов комплексы включения можно получить в результате совместного перемешивания при нормальной температуре.

При сухом смешивании, целевое вещество добавляется к порошку циклодекстрина, перемешивается, а затем длительно перемалывается на специальных блендерах. Parlati др. получали сухие комплексы модифицированным методом помола безводной смеси с молярным соотношением реагентов 2:1 в течение 72 часов [25]. Этот метод показывает хорошие результаты при работе с маслами или жидкими веществами. Основным преимуществом этого метода является то, что вода не добавляется в реакционную смесь, а необходима только на стадии промывки готового комплекса. К недостаткам метода сухого помола относятся: риск спекания смеси при масштабировании процесса, недостаточно эффективное перемешивание реагентов, а также длительность времени обработки. Однако следует отметить, что время помола является переменной величиной и зависит от природы вещества, с которым необходимо получить комплекс включения [5, 11].

3.4 Метод герметичного нагревания

Данный метод может применяться для получения комплексов включения без добавления растворителей. Для получения комплексов готовится физическая смесь циклодекстрина и вещества «гостя». При использовании данного метода в реакционную смесь не добавляется вода или вносится ее минимальное количество. Для инициации процесса комплексообразования может быть достаточно воды, находящейся в связанном виде в составе кристаллогидратов циклодекстрина и субстрата, которая может составлять 20–25% от массы сухого остатка. Полученная смесь помещается в стеклянные флаконы, продувается азотом и герметично закупоривается, или запаивается в ампулах. Затем, ампулы выдерживаются при температуре от 60 до 150 °С. При использовании данного метода, на выход комплекса включения влияют такие факторы как температура инкубации, время нагревания, а также структура кристаллов циклодекстрина. Влажность смеси, степень перемешивания и время нагрева подбирается индивидуально для каждого субстрата [11, 19, 26].

3.5 Суспензионный метод

При использовании данного метода, в ходе приготовления реакционной смеси, циклодекстрин добавляется в воду в таком количестве, чтобы его массовая доля в растворе составляла 40–45% от общего веса смеси, а затем компоненты перемешиваются до состояния суспензии. После этого в реакционную смесь вносится целевое вещество и начинается процесс перетиравания. Циклодекстрин, частично находящийся в растворе, взаимодействует с веществом «гостем» и образуется осадок комплекса включения. Необходимо отметить, что для формирования комплексов включения не является обязательным условием переводить циклодекстрин в полностью растворенную форму. От общего количества лиганда вносимого в реакционную смесь порядка 40–50% может находиться в растворе и 50–60% – в нерастворенном состоянии. В водной фазе, насыщенной циклодекстрином протекает процесс комплексообразования и образующиеся кавитаты кристаллизуются и выпадают в осадок. Затем молекулы лиганда, включившиеся в состав комплексов замещаются в водной фазе

циклодекстрином, переходящим из кристаллического состояния в раствор. Такое замещение лиганда в водной фазе реакционной смеси продолжается до окончания процесса образования кавитатов. Полученный осадок комплексов включения отделяется с помощью тех же методов, что и при использовании техники соосаждения. Время необходимое для завершения процесса комплексообразования различается для каждого индивидуального вещества «гостя», а также зависит от интенсивности перетирания, и должно определяться перед масштабированием процесса.

В большинстве случаев суспензионное комплексообразование проводится при нормальной температуре, но для некоторых субстратов незначительное повышение температуры суспензии повышает эффективность процесса. При повышении температуры системы крайне важно не превышать пороговых значений, при которых равновесие процесса сместится в сторону диссоциации комплекса. Преимуществом данного метода является использование меньших объемов воды и, соответственно, реактора меньшего размера, а также тот факт, что процесс комплексообразования происходит при температуре около 20–25 °С и не требует нагрева системы до высоких температур. Для некоторых веществ небольшое повышение температуры приводит к увеличению выхода комплекса включения, но следует помнить, что излишний нагрев смеси приведет к снижению константы комплексообразования.

Главным преимуществом данного метода является уменьшение необходимого объема растворителя и снижение затрат при масштабировании процесса [5, 11].

3.6 Метод нейтрализации

Данный метод применим для получения комплексов включения циклодекстрина с ионизирующимися веществами. При этом целевое вещество вносится в раствор циклодекстрина с кислотным или щелочным значением рН (для оснований используется кислая среда, для кислот – щелочная). После тщательного перемешивания раствора следует изменить рН среды для снижения растворимости вещества «гостя», после чего в реакционной смеси начинает образовываться осадок комплекса включения. Choi и соавт. [27] получили с использованием данного метода комплекс включения терфенадин:β-циклодекстрин с молярным соотношением 1:2, для увеличения биодоступности и усиления антигистаминного действия препарата. Константа комплексообразования для данного соединения была выше при низких значениях рН [11, 27].

3.7 Метод распылительной сушки

При данном методе комплексообразования активное вещество растворяется в определенном объеме 96% этанола, а циклодекстрин растворяется в двойном объеме воды, с доведенным значением рН. Оба раствора смешиваются и обрабатываются ультразвуком. Затем реакционная смесь высушивается на распылительной сушке для получения комплексов включения [28]. Недостатком данного метода является использование больших количеств органического растворителя, а также технологически сложного оборудования [11].

3.8 Метод сублимации

Данный метод представляет собой модифицированный метод сорастирания. На первом этапе готовится физическая смесь циклодекстрина и вещества «гостя», затем добавляется небольшое количество буферной смеси, смесь увлажняется и перетирается до состояния гомогенной суспензии, которую замораживают и лиофилизируют. Полученный препарат комплекса включения просеивают, упаковывают в герметичную тару и хранят при температуре 20 – 25 °С. Данный метод применим для промышленного использования при производстве комплексов включения с термонестабильными соединениями. К недостаткам данного метода относятся необходимость использования больших количеств воды и циклодекстрина, а также длительность процесса лиофилизации [17, 29, 30, 31].

3.9 Метод соиспарения

При использовании метода соиспарения для получения комплексов включения циклодекстрин и вещество «гость» растворяются в смеси органического растворителя и

воды, а затем инкубируются при температуре 28–30 °С в течение 24 часов при перемешивании на мешалке. После чего реакционная смесь концентрируется на роторном испарителе при пониженном давлении, фильтруется и высушивается под вакуумом в течение 24 часов; либо смесь выдерживается при перемешивании до испарения большей части органического растворителя [11, 32].

3.10 Экструзионный метод

Данный метод является разновидностью вымешивания при нагревании в непрерывной системе подачи компонентов смеси. Субстрат, лиганд и вода смешиваются перед загрузкой в систему или непосредственно в экструдере. Степень вымешивания, количество подведенного тепла к системе и время вымешивания можно контролировать при установке параметров барабана экструдера. В зависимости от содержания воды в смеси, препарат комплекса включения, получаемый экструзионным методом, высушивается при охлаждении, либо в специальных печах. Преимуществом метода является непрерывность процесса и использование небольших объемов добавляемой в смесь воды. Применимость данного метода ограничена использованием для получения комплексов с термостабильными субстратами [11].

4 Факторы, влияющие на эффективность образования наноструктур комплексов включения.

Процесс образования наноструктур комплексов включения с циклодекстринами носит стохастический характер. При этом в реакцию комплексообразования включается лишь часть молекул субстрата. Поэтому стехиометрическое соотношение субстрат:лиганд в системе редко принимает значение 1:1. В случае низкомолекулярного субстрата в одну молекулу циклодекстрина может встроиться несколько молекул вещества «гостя», а при использовании высокомолекулярных соединений в качестве субстрата, с одной молекулой «гостя» может связаться несколько молекул циклодекстрина [5].

На процесс комплексообразования может оказывать влияние не только способ получения кавитатов, но и ряд других физико-химических факторов [18, 33].

4.1 Влияние динамики растворения кристаллов циклодекстрина

Поскольку циклодекстрины находятся в кристаллической форме и обладают невысокой растворимостью, в особенности β -циклодекстрин, то при внесении вещества лиганда в реакционную смесь только молекулы расположенные на поверхности кристаллов могут включаться в процесс комплексообразования. С увеличением температуры смеси, растворимость циклодекстринов увеличивается и соответственно возрастает вероятность встречи и взаимодействия молекул субстрата и лиганда. Процесс комплексообразования протекает более интенсивно при условии, что лиганда растворим в реакционной смеси, либо находится в тонкодисперсном состоянии [5, 17].

4.2 Влияние температуры системы

Температурный фактор оказывает разнонаправленное воздействие на процесс комплексообразования. С одной стороны, при увеличении температуры повышается растворимость лиганда и большее число молекул участвует в образовании наноструктур комплексов включения. С другой стороны, повышение температуры понижает стабильность комплекса и смещает равновесие процесса в сторону распада наноструктур кавитатов. Термостабильность комплексов включения зависит от свойств субстрата и отличается для каждого вещества. Большинство комплексов подвергается диссоциации при температуре 50–60 °С, но некоторые кавитаты находятся в стабильном состоянии и при более высоких температурах, в особенности в случае образования прочных связей субстрат-лиганд в комплексе или при образовании малорастворимых кавитатов [5, 19].

4.3 Влияние природы растворителя

При выборе растворителя для субстрата и лиганда надо учитывать, что при низкой растворимости циклодекстрина в выбранном растворителе эффективность комплексообразования снизится. Также надо выбирать растворитель с учетом того, что

молекулы лиганда должны легко вытеснять его из внутренней полости тора молекул циклодекстринов. Также растворитель должен легко удаляться из реакционной смеси для получения сухого препарата. По всем этим показателям, оптимальным растворителем является вода. Но многие субстраты обладают низкой растворимостью в воде, тем самым снижая скорость образования кавитатов. В таком случае рекомендуется растворить вещество «гостя» в небольшом количестве органического растворителя, который бы не образовывал комплексов включения с циклодекстринами и легко удалялся из реакционной среды. В роли такого растворителя хорошо зарекомендовали себя этанол и диэтиловый эфир [3, 5, 9, 17].

Комплексообразование обычно осуществляют в водных растворах, хотя имеются сообщения о возможности проведения этого процесса в таких органических жидкостях как диметилсульфоксиде, диметилформамиде, глицерине, в которых циклодекстрины также неплохо растворимы. В качестве растворителей могут быть использованы и гидрофобные системы, нерастворяющие циклические олигосахариды, но растворяющие включаемую субстанцию. Таковыми служат метанол, этанол, амилацетат, ацетон и так далее. В последнем случае важную роль играют интенсивность процессов перемешивания. Используя на практике этот вариант синтеза соединений включения, следует, вместе с тем, учитывать тот факт, что и сам ацетон образует сольватный ассоциат с циклодекстрином, вследствие чего может конкурировать за свободное место в полости с предполагаемым гостем. Таким образом, говоря о выборе растворителя, в большинстве случаев отдавать предпочтение водным системам, для которых могут быть сформулированы нижеследующие рекомендации.

4.3.1 Получение комплексов в водных растворах ЦД.

Общий смысл этой процедуры заключается в том, что к подогретому водному раствору циклодекстрина постепенно добавляют "вещество - гость" или его раствор в полярном растворителе, например этиловом спирте, ацетоне. Дополнительный растворитель применяется в том случае, если вещество-гость имеет твердое агрегатное состояние. Чисто внешне, поведение системы может быть описано тремя схемами:

1. Гомофазная смесь → добавление комплексанта → гомофазная смесь.
2. Гомофазная смесь → добавление комплексанта → экспозиция в течение некоторого времени → образование осадка комплекса.
3. Гомофазная смесь → добавление комплексанта → немедленное образование осадка комплекса

В зависимости от того, каков характер комплексообразования, выбирается методическая стратегия, заключающаяся в правильном подборе времени реакции и физических условий ее проведения. В идеале, ее следует провести таким образом, чтобы добавленные порции комплексообразователя успели образовать соединение включения до выпадения кристаллического осадка, после чего снизить температуру и добиться его образования. С этой точки зрения варианты схем 1 и 2 являются более благоприятными в плане прогноза качества будущего комплекса. При «быстрой» кристаллизации комплекса получаемого из твердофазного соединения следует остерегаться образования смеси кристаллов комплекса с исходным «гостем».

Перемешивание. Для перемешивания могут быть использованы самые разные приспособления, от обычной магнитной мешалки, до высокоскоростного механического диспергатора или ультразвукового дезинтегратора. Чем выше степень гидрофобности субстанции, которая должна быть переведена в комплекс, или чем значительно плотнее она отличается от плотности воды, тем активнее следует перемешивать реакционную смесь. В некоторых случаях идеальными можно считать ультразвуковые перемешивающие устройства.

Температуру раствора следует подбирать, исходя из целесообразности повышения начальной концентрации реакционных ингредиентов, (например бета-циклодекстрина, растворимость которого ограничена), или с целью замедления реакции

комплексообразования (диссоциация комплекса в воде особенно активна при температурах выше 50-70 °С).

Скорость подачи комплексообразователя следует ограничивать в случае, если комплексант сильно гидрофобен, чтобы избежать расслоения системы. Ее следует также ограничивать, при высокой температуре.

Величина кислотности (щелочности) раствора имеет важное значение, когда комплексообразователь ионизирован. Следует подбирать такие значения рН, когда ионизация отсутствует – то есть с органическими кислотами работать в кислых растворах, с аминами в щелочных.

Приготовление комплексов в суспензии. Необязательно, чтобы перед приготовлением комплекса включения например в водной среде, циклодекстрин полностью находился в растворе. Очень часто при перемешивании суспензии ЦД и необходимой массы "молекулы гостя" в реакторе с мешалкой, комплексообразование заканчивается в течение 2–24 часов. Контроль процесса может быть осуществлен даже визуально – путем микроскопирования: специфические кристаллы ЦД исчезают и их заменяет аморфоподобная высокодисперсная масса. Факт кристаллообразования может быть подтвержден также методами рентгеноструктурного анализа. Считается, что для получения комплексов включения в промышленных условиях суспензионным методом является наиболее удобным.

Влияние количества воды в реакционной смеси. При увеличении объема воды в реакционной смеси растворимость субстрата и лиганда возрастает и скорость процесса образования кавитатов повышается. Однако, при избыточном добавлении воды в реакционную смесь, может сформироваться настолько разбавленный раствор, что вероятность контакта и взаимодействия циклодекстрина с молекулами вещества «гостя» становится крайне низкой. Поэтому не рекомендуется проводить реакцию образования комплексов включения в сильно разбавленных растворах [5]. При работе с высокомолекулярными гидрофобными веществами, такими как масла, напротив, рекомендуется проводить операции с разбавленными растворами, для снижения тенденции к мицеллообразованию. В этом случае сочетание разбавления с интенсивным перемешиванием помогает увеличить дисперсию масел и снизить тенденцию липидов к агрегации и тем самым повысить эффективность взаимодействия с лигандом. В разбавленных растворах молекулы липидов формируют с циклодекстринами более стабильные кавитаты [5, 8].

4.4 Влияние способности вещества комплексанта возгоняться из смеси

При использовании высоких температур при проведении процесса комплексообразования, многие летучие соединения могут быть потеряны из реакционной смеси. Поэтому при работе с такими субстратами рекомендуется использовать закрытые реакционные сосуды, либо оборудовать систему обратным холодильником [5, 19].

4.5 Влияние метода высушивания комплексов включения

Высушивание кавитатов с легко летучим и термонестабильным субстратом рекомендуется проводить при температурах до 100 °С (рекомендуемый диапазон температур 50–75 °С) [5, 19]. Высушивание комплексов включения можно проводить в различных сухожаровых печах или печах с жидким теплоносителем. В процессе сушки необходимо контролировать температуру во избежание диссоциации комплекса и деструкции термолабильного субстрата. В процессе обработки необходимо точно контролировать температуру, которая должна быть на несколько градусов ниже температуры кипения вещества субстрата [5]. При использовании распылительной сушки необходимо контролировать размер частиц комплексов включения, образующихся в процессе преципитации, для предотвращения закупорки форсунок сушилки крупными агрегатами. Также следует учитывать, что распылительная сушка при температурах свыше 100 °С не подходит для обработки кавитатов с легко летучими и термолабильными соединениями. Температура сушки должна быть на 3–5 °С ниже температуры кипения вещества «гостя» [5, 32, 33]. При обработке комплексов включения хорошо зарекомендовали себя метод

лиофильного высушивания и метод сушки в эксикаторе с гигроскопичным сорбентом. Поскольку обработка комплексов включения протекает при пониженных температурах – эти методы применимы для сушки кавитатов с термолабильными и легколетучими веществами. Также метод лиофильной сушки пригоден для получения в сухом виде высокорастворимых комплексов включения с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином, которые тяжело осадить из реакционной среды [5, 19, 21, 33].

5 Влияние образования комплексов включения на стабильность субстрата

При образовании комплекса включения может изменяться стабильность молекул «гостя». Это явление в особенности выражено для водных растворов кавитатов циклодекстринов с соединениями, склонными к окислению и гидролизу. Скорость деградации снижается в результате включения в полость лиганда лабильных функциональных групп или целиком всей молекулы субстрата [34]. В реакционной смеси наблюдаемый уровень деструкции химически нестабильных соединений, образующих с циклодекстрином комплекс включения, представляет среднюю взвешенную величину деструкции свободного субстрата в реакционной смеси и субстрата в составе комплекса включения.

При комплексообразовании с циклодекстринами эффект стабилизации проявляется для таких соединений как стероидные эфиры, алкилирующие противораковые агенты простагландины, различных лекарственных соединений. Стабилизирующее действие циклодекстринов наблюдается как в водных растворах, так и в сухих лекарственных формах [3, 6, 17, 35]. При исследовании влияния комплексообразования с циклодекстринами на фотостабильность субстрата было показано, что при образовании кавитатов изменяется характер поглощения молекулами «гостя» электромагнитного излучения и течения первичных и вторичных фотохимических реакций [36]. Причем, отмечается как стабилизирующие, так и дестабилизирующие эффекты комплексообразования в зависимости от типа используемого циклодекстрина и условий эксперимента [5, 36, 37]. Отмечено, что в результате формирования наноструктур комплексов включения снижается интенсивность испарения летучих соединений [76], а также в присутствии молекул циклодекстрина позволяет избежать агрегации и снизить степень денатурации пептидов и белков [34, 35, 38, 39].

В некоторых случаях присутствие молекул циклодекстринов в системе оказывает дестабилизирующее действие на лекарственные соединения в результате прямого катализирующего воздействия, либо в результате увеличения растворимости субстрата в водных системах. Катализирующее действие может быть связано с депротонизацией -ОН групп, локализованных по кромке полости тора молекулы циклодекстрина [40, 41]. В таком состоянии циклодекстрины проявляют свойства характерные для углеводов и других полигидрокси-спиртов с сопряженными -ОН группами. Катализирующее действие проявляется и усиливается при повышении значений pH среды [37, 42].

6 Характеристика процесса диссоциации комплексов включения

После высушивания комплексы включения с циклодекстринами переходят в стабильное состояние и способны храниться в течение длительного времени при нормальной температуре и пониженной влажности [5, 19].

При помещении в водную фазу и нагревании кавитаты могут подвергаться диссоциации. При таких условиях молекулы воды способны вытеснять молекулы «гостя» из состава комплексов включения [43, 44]. Процесс распада комплекса протекает в два этапа: на первом этапе комплекс переходит в растворенную форму; на втором этапе – молекулы воды замещают молекулы субстрата в аполярной полости лиганда. При определенных значениях температуры устанавливается равновесное состояние между растворенными и нерастворенными комплексами включения, а также между диссоциировавшими и недиссоциировавшими кавитатами [5]. Следует учитывать, что если в состав комплекса включения входят молекулы нескольких различных субстратов, то некорректно полагать,

что при диссоциации комплекса соотношение освободившихся молекул субстратов будет аналогично их соотношению в исходной смеси. Комплекс с каждым из субстратов обладает индивидуальными показателями растворимости и скорости диссоциации. Если скорость и степень диссоциации для каждого субстрата в смеси значительно различается, то для формирования необходимого соотношения свободных молекул субстрата в системе необходимо изменить изначальное соотношение компонентов в реакционной смеси, что вызовет, соответственно, изменение качественного состава и свойств смеси комплексов включения [43, 45, 46].

7 Инструментальные методы анализа наноструктур комплексов включения с циклодекстринами

Для анализа физико-химических свойств комплексов включения циклодекстринов с веществами из различными классами органических и неорганических соединений, а также агрегатов комплексов включения, применяются различные инструментальные методы [11, 19, 21, 47]. Выбор конкретных методов анализа определяется физико-химическими свойствами вещества комплексанта и агрегатным состоянием комплексов включения [11]. Наноструктуры комплексов включения, образующиеся в результате субстрат-лигандного взаимодействия молекул вещества гостя с молекулами циклодекстринов, могут быть изучены и охарактеризованы, как находясь в сухой кристаллической форме, так и в состоянии растворов [48].

Для определения изменения свойств вещества лиганда и субстрата в результате образования наноконплексов кавитатов циклодекстринов, полученных в кристаллическом состоянии, можно применять методы термического анализа, методы микроскопии, спектральные, хроматографические методы и пр. [9, 11, 48].

7.1 Термический анализ

Данные, которые можно получить при использовании данного метода анализа, позволяют определить, подвергается ли вещество «гостя» фазовым переходам или изменениям молекулярной структуры в процессе градиентного увеличения температуры системы. Термический анализ представляет собой тандем дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и термогравиметрии (ТГА) и позволяет установить, действительно ли в реакционной смеси произошло образование комплексов включения, либо полученный продукт является физической смесью исходных компонентов [9, 49]. В процессе нагревания в широком температурном диапазоне, вещество может плавиться, испаряться, подвергаться деструкции, окислению или претерпевать полиморфные превращения.

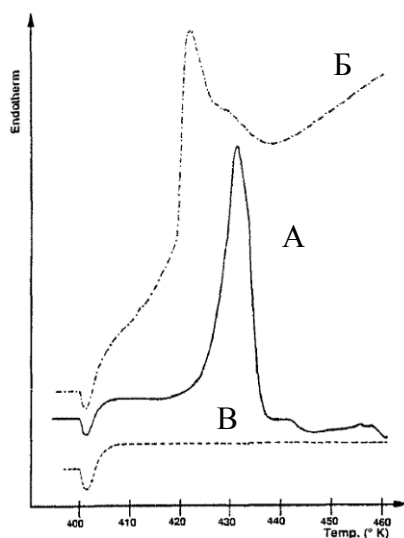


Рисунок 2 – ДСК-термограмма сальбутамола (А), физической смеси сальбутамола и β-циклодекстрина (Б), комплекса включения (В) сальбутамола и β-циклодекстрина (молярное соотношение 1:1) [50].

Отличия в характере фазовых переходов и энергии активации процесса деструкции веществ в составе комплексов включения по сравнению с нативными соединениями, или в составе физической смеси, свидетельствуют об образовании комплексов включения [9, 11, 19].

При сравнении термограмм комплексов включения, нативного циклодекстрина, нативного вещества «гостя» и физической смеси компонентов можно обнаружить сдвиги, изменение формы и интенсивности, а также исчезновение или появление отдельных пиков; изменения в динамике потери веса образца и смещение температурных границ этапов экзо- и эндотермических преобразований, что свидетельствует об образовании комплексов включения. В случае образования слабого взаимодействия между веществом «гостем» и веществом «хозяином» сдвиги пиков соответствующих эндотермическим процессам могут быть очень незначительными [9, 48].

К примеру, анализ комплексов салбутамола с β -циклодекстрином, полученных с помощью сублимационного метода, показал, что в физической смеси салбутамола и циклодекстрина наблюдается слабое межмолекулярное взаимодействие между молекулами субстрата и лиганда [19, 50].

Эндотермический пик начала термодеструкции салбутамола в составе физической смеси наблюдается при температуре 150 °С, а для интактного салбутамола – при 158 °С. При анализе комплекса включения салбутамола, полученного сублимационным методом, в анализируемом температурном диапазоне наблюдалось отсутствие пика термодеструкции вещества «гостя», что свидетельствует об образовании стабильного комплекса включения и прочных межмолекулярных связей (рисунок 2) [50].

Аналогичная картина наблюдается при анализе наноконкомпекса азелаиновой кислоты с гидроксипропил- β -циклодекстрином. В случае образования комплексов включения на термограмме отсутствовал эндотермический пик фазового перехода (плавления) азелаиновой кислоты при температуре 105 °С [48, 51].

При изучении комплексов включения ропивакаина и 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина методом ДСК, на термограммах наблюдаются отличия в характере термической активации фазовых переходов и температурах термодеструкции гидроксипропил- β -циклодекстрина, ропивакаина (РВК), физической смеси РВК/гидроксипропил- β -циклодекстрина (1:1) и комплекса включения РВК/гидроксипропил- β -циклодекстрина (1:1) [52] (рисунок 3).

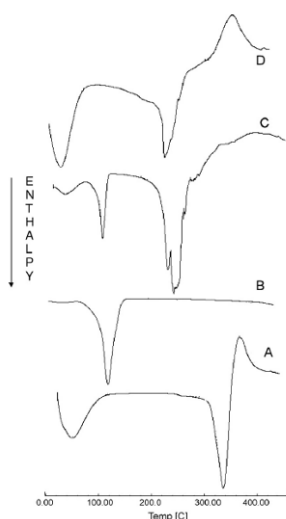


Рисунок 3 – ДСК-термограмма гидроксипропил- β -циклодекстрина (А), ропивакаина (В), физической смеси ропивакаина и гидроксипропил- β -циклодекстрина (С) (молярное соотношение 1:1), комплекса включения ропивакаина и гидроксипропил- β -циклодекстрина (D) (молярное соотношение 1:1) [52].

На термограммах гидроксипропил- β -циклодекстрина и ропивакаина присутствуют характерные эндотермические пики, возникающие при температуре 336.0 °С и 117.6 °С, соответствующие температурным точкам плавления этих соединений.

На термограмме гидроксипропил- β -циклодекстрина также присутствует эндотермический пик при температуре 50 °С, связанный с процессом дегидратации циклодекстрина и испарения молекул воды. При нагревании физической смеси анализируемых соединений на термограмме присутствуют эндотермические пики при температуре 246.5 °С и 116.0 °С, а в случае нагревания препарата комплекса включения на термограмме присутствует только один широкий пик, возникающий при температуре 248.2 °С [52].

Отсутствие на термограмме комплекса включения пиков, соответствующим фазовым переходам индивидуальных соединений и в составе физической смеси, свидетельствует об образовании стабильного комплекса включения между ропивакаином и гидроксипропил- β -циклодекстрином (рисунок 2) [52].

Необходимым параметром для выявления стабилизирующего эффекта процесса комплексообразования с циклодекстринами по отношению к веществу «гостю» является условие нахождения температуры фазового перехода вещества комплексанта в диапазоне до температуры 300 °С, при которой происходит термодеструкция молекул циклодекстринов. При анализе комплексов включения методом дифференциальной сканирующей калориметрии на хроматограмме может наблюдаться смещение температурных границ эндотермических пиков фазового перехода, связанных с плавлением вещества гостя. При комплексообразовании с циклодекстринами наблюдается увеличение температуры возгонки вещества «гостя» как минимум на 10 °С, что связано с увеличением энергетического барьера перехода молекул в газообразное состояние при взаимодействии с молекулами циклодекстринов [9, 11].

7.2 Сканирующая электронная микроскопия

Данный метод применяется для анализа изменения кристаллической структуры исходных соединений и наноструктур комплексов включения. Фактически, с использованием метода сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) нельзя подтвердить факт образования кавитатов, но возможно подтвердить присутствие в полученном препарате компонентов смеси [48, 49]. К примеру, β -циклодекстрин в кристаллическом состоянии имеет вид полигональных структур (моноклинных параллелограммы), а кристаллы ретиноевой кислоты имеют вид продолговатых игл [10, 49]. Метод СЭМ позволяет провести морфологическую характеристику кристаллов вещества: размер, форма и пр. [48, 53] (рисунок 4).

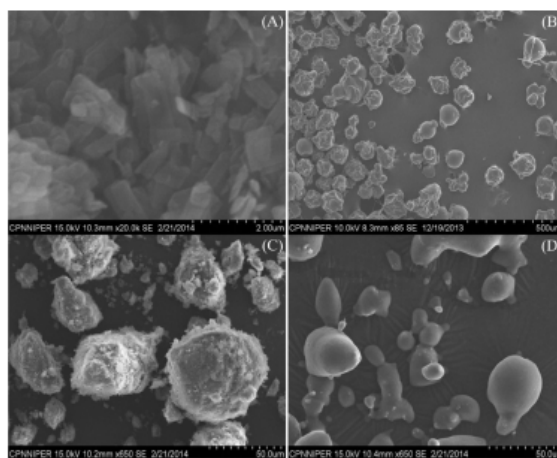


Рисунок 4 – Фото кристаллов эрлотиниба (А), сульфобутилэфир- β -циклодекстрина (В) их физической смеси (С) и комплексов включения (D) [54]

(сканирующий электронный микроскоп Hitachi S-3400 N, образцы зафиксированы на алюминиевой подложке с золото-палладиевым покрытием, ускоряющее напряжение 15кВ).

В отдельных случаях форма кристаллов физической смеси и комплексов включения не имеют значительных различий (как для комплекса кетопрофена и β -циклодекстрина) [53], в других случаях (кристаллы физической смеси и кавитатов эрлотиниба и сульфобутилэфир- β -циклодекстрина) можно выявить явные отличия в морфологии формирующихся кристаллов комплекса и физической смеси веществ [49, 54].

7.3 Рентгеноструктурный анализ

Применение данного метода анализа возможно в двух вариантах: метод дифрактометрии Дебая–Шеррера на порошках и метод получения рентгеновских дифракционных изображений монокристаллов по методу Лауэ. С применением метода Дебая–Шеррера проводится анализ порошка чистых веществ, физической смеси компонентов и порошка кристаллов комплексов включения [9, 48, 55].

При сравнении дифрактограмм важным является соблюдение точной воспроизводимости условий кристаллизации образцов, для получения объективных результатов анализа. При использовании различных методов получения комплексов включения на дифрактограммах будут наблюдаться различные паттерны рассеяния рентгеновского излучения. При образовании кристаллов комплексов включения на дифрактограмме возможно появление или исчезновение отдельных характеристических пиков, их сдвиг либо сужение, что связано с изменением расстояния между атомами и их взаимного расположения по сравнению с нативным веществом [9, 11, 56]. С использованием метода Лауэ проводится анализ ультратонкой структуры монокристалла, выращенного в определенных строго воспроизводимых условиях. При этом возможно определить все расстояния между отдельными атомами с точностью до 0,01 Å как внутри молекулы, так и между атомами в составе разных молекул), а также с точностью до 0,5° – величины валентных углов [9, 55].

Сравнение полученных данных позволяет сделать вывод об изменении структуры кристаллов, произошедших в результате процесса образования комплексов [49, 54] (рисунок 5). Отсутствие четко выраженных пиков в дифрактограмме сульфобутилэфир- β -циклодекстрина свидетельствует о формировании аморфной структуры в кристаллическом состоянии [54].

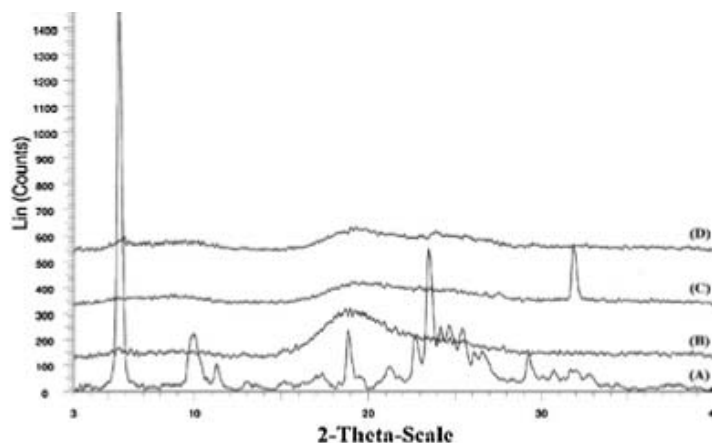


Рисунок 5 – Дифрактограмма кристаллов эрлотиниба (А), сульфобутилэфир- β -циклодекстрина (В) их физической смеси (С) и комплексов включения (D) [54].

7.4 ИК-Фурье спектроскопия

Метод ИК-спектроскопии позволяет достоверно подтвердить факт образования комплексов включения, при условии заполнения полости тора более 25% молекул циклодекстринов от общего числа макроциклов в образце. В противном случае характеристические изменения в

ИК-спектрах вещества комплексанта не проявляются на фоне полос поглощения циклодекстринов, поскольку ИК-спектр циклодекстринов не претерпевает значительных

изменений в результате образования комплексов включения. Поэтому данный метод анализа не может использоваться как единственный метод для подтверждения или опровержения формирования комплексов включения, но может применяться в комплексном анализе с использованием различных подходов [9, 55, 57]. Метод ИК-спектроскопии подходит для анализа комплексов включения с соединениями, в структуре молекул которых содержится несколько карбонильных или сульфонильных групп [48, 57]. При анализе ИК-спектров комплексов включения четко наблюдаются изменения, связанные с образованием водородных связей. При этом полосы поглощения соответствующих функциональных групп смещаются в низкочастотную область. При этом возрастает интенсивность и увеличивается ширина полос поглощения. Наиболее выраженные изменения в спектре поглощения ИК-излучения наблюдаются при участии -ОН групп в образовании водородных связей при формировании комплексов включения. При образовании кавитатов, межмолекулярные водородные связи, формировавшиеся с участием молекул вещества «гостя», разрываются и полосы поглощения образца смещаются в высокочастотную область [48].

Так, например, при анализе комплексов включения эрлотиниба с сульфобутилэфир- β -циклодекстрином были установлены следующие закономерности. Нативный сульфобутилэфир- β -циклодекстрин имеет полосы поглощения ИК-излучения 3431 см^{-1} , 2934 см^{-1} , 1163 и 1022 см^{-1} , обусловленные валентными колебаниями О-Н, С-Н, С-Н и С-О связей соответственно. Анализ характера поглощения ик-излучения образцом физической смеси эрлотиниба и сульфобутилэфир- β -циклодекстрина выявил суперпозицию полос в спектре поглощения. Изменения характера поглощения наблюдались в диапазоне длин волн 3408 и 1030 см^{-1} , и не затронуло диапазон длин волн 3277 и 1633 см^{-1} , что свидетельствует о слабом взаимодействии молекул циклодекстрина и эрлотиниба. При образовании комплекса включения сульфобутилэфир- β -циклодекстрина с эрлотинибом, в спектре поглощения исчезли полосы поглощения на длинах волн 3277 и 1022 см^{-1} , характерные для нативного эрлотиниба. Также на длинах волн 1634 и 3418 см^{-1} изменился характер поглощения ИК-излучения. Это обусловлено образованием связей между молекулами субстрата и лиганда в составе комплексов включения [54] (рисунок 6).

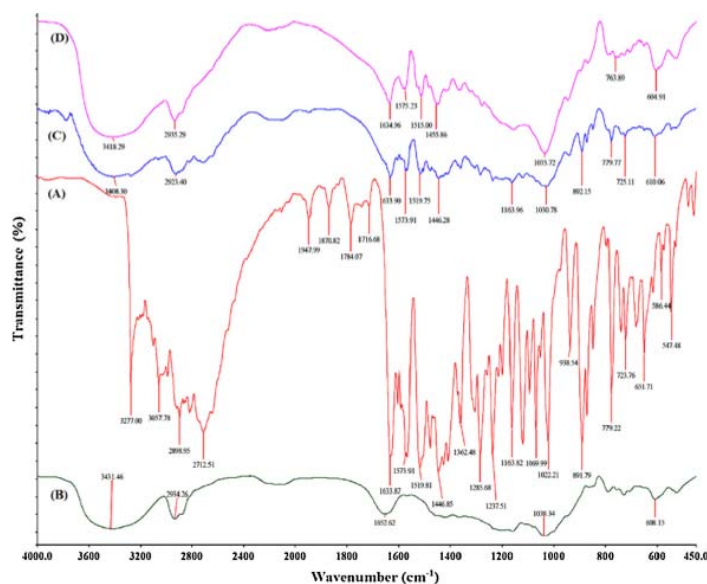


Рисунок 6 – Спектр поглощения ИК-излучения образцами эрлотиниба (А), сульфобутилэфир- β -циклодекстрина (В) их физической смеси (С) и комплексов включения (D) [54].

Для характеристики свойств кавитатов циклодекстринов, находящихся в растворенном состоянии можно применять методы электрохимии, а также спектральные и хроматографические методы анализа [48].

7.5 Методы полярографии, кондуктометрии и поляриметрии

Полярография применима для анализа изменения состояния вещества в составе комплексов включения, при условии, что в результате комплексообразования происходит изменение характера электронного распределения в молекулах вещества «гостя», по сравнению с нативными молекулами этого вещества, находящимися в одинаковых водных фазах [48, 58].

Метод кондуктометрии позволяет зафиксировать изменение проводимости системы при образовании комплексов включения амфифильных молекул вещества «гостя» с молекулами циклодекстринов. Так, например, при образовании комплексов анионных сурфактантов с циклодекстринами происходит резкое снижение проводимости системы [9, 48].

Метод поляриметрии позволяет достоверно подтвердить образование комплексов включения циклодекстринов с различными соединениями. Циклодекстрины образованы нативными или модифицированными остатками глюкозы и являются оптически активными соединениями. Изменение удельного вращения раствора циклодекстринов в системе с веществом «гостем» свидетельствует об образовании межмолекулярных связей и изменении содержания свободного циклодекстрина [48, 54].

7.6 ЯМР-спектроскопия

Для анализов комплексов включения применяют методы спектроскопии протонного магнитного резонанса на ядрах ^1H и спектроскопии ядерного магнитного резонанса на ядрах ^{13}C . Наиболее информативным методом подтверждения формирования комплексов включения является метод ^1H -ЯМР-спектроскопии [9, 48, 59, 60]. Этот метод анализа позволяет зафиксировать выраженный химический сдвиг в колебательных спектрах Н-3 Н-5 протонов, ориентированных внутрь полости тора, что обусловлено размещением молекулы вещества «гостя» в гидрофобной полости циклодекстрина. При этом в колебательных спектрах Н-1, Н-2 и Н-4 атомов, локализованных на внешней поверхности молекулы, наблюдаются незначительные химические сдвиги [48]. Метод ^{13}C -ЯМР-спектроскопии позволяет зафиксировать химические сдвиги в электронном окружении атомов углерода полости молекулы циклодекстрина, образующиеся в результате ван-дер-ваальсового и электростатического взаимодействия молекул вещества «гостя» с молекулами вещества «хозяина» [60]. При увеличении концентрации вещества «гостя» в системе наблюдается пропорциональное усиление химического сдвига в колебательных спектрах, вследствие смещения равновесного состояния в сторону образования комплексов включения [48, 60].

7.7 ЭПР-спектроскопия

Этот метод применим для анализа изменений значения постоянной сверхтонкой структуры радикалов в водных системах, обусловленных изменением полярности среды окружения радикала при вхождении его в неполярную полость циклодекстрина и формировании комплекса включения [48, 60].

7.8 Электронная спектроскопия

При помощи данного метода можно определить изменение характера поглощения электромагнитного излучения молекулами, присутствующими в системе, вызванные изменениями их состояния и характера взаимодействия друг с другом [9, 48, 55, 61]. При образовании комплексов включения может изменяться окружение хромофорных групп молекул вещества «гостя», вызванное их перемещением в неполярную полость тора молекул циклодекстрина. Вследствие образования связей с атомами водорода на внутренней поверхности циклодекстрина и (или) удаления сольватационной водной оболочки происходит перераспределение электронных плотностей и перестройка энергетических состояний электронов в хромофорных группах молекул вещества «гостя» [48, 49, 60]. Визуально такие изменения проявляются в спектрах поглощения раствора нативного вещества «гостя» и образца комплекса включения. В результате образования комплексов включения могут наблюдаться незначительные гипсохромные или батохромные сдвиги в

спектре или изменение интенсивности поглощения без изменения характеристической волны пиков [48, 60, 62]. При образовании водородных связей, стабилизирующих структуру комплексов включения, происходит снижение энергии неспаренных электронов (n-орбиталь) и наблюдается незначительный сдвиг полосы поглощения в коротковолновую область спектра (гипсохромный сдвиг). Так, при образовании комплексов включения гидрокортизона бутирата с (2, 6-ди-О-метил)- β -циклодекстрином в спектре поглощения наблюдается сдвиг максимума поглощения на 1.1 нм [48, 63]. При образовании комплексов включения в растворе при разрыве водородных связей между молекулами нативного вещества «гостя» в спектре поглощения могут наблюдаться bathochromные сдвиги полос поглощения. Так, при образовании комплексов включения 1,8-дигидроксиантрахинона с γ -циклодекстрином наблюдается сдвиг максимума поглощения на 1.2 нм в длинноволновую область спектра [48, 64]. Также при образовании комплексов включения возможно отсутствие изменений в спектре характеристических длин волн, но наблюдается изменение интенсивности поглощения ЭМИ. Так, в случае образования комплексов включения β -циклодекстрина с бропирамином наблюдалось увеличение интенсивности пика, а в случае образования кавитатов β -циклодекстрина с пуриновыми нуклеозидами – снижение интенсивности поглощения ЭМИ без изменения характеристических длин волн [48, 65].

7.9 Флуоресцентная спектроскопия

Данный метод исследования позволяет зафиксировать изменение характера перехода электронов в молекулах вещества из основного состояния в возбужденное и обратно при облучении светом с различными длинами волн. Показано, что при образовании комплексов включения наблюдаются изменения в спектре поглощаемого излучения и в спектре и интенсивности флуоресценции [9, 19, 48, 49].

Так, в результате образования водородных связей между молекулой 1,8-дигидроксиантрахинона при ее фиксации в гидрофобной полости тора γ -циклодекстрина, наблюдается смещение длины волны испускаемого света с 571 на 595 нм и увеличение интенсивности флуоресценции [64]. Межмолекулярное взаимодействие 1,8-дигидроксиантрахинона с β -циклодекстрином вызывает меньшее увеличение интенсивности флуоресценции. В случае использования в качестве комплексообразователя α -циклодекстрина, наблюдается полное отсутствие вышеописанных эффектов. Это позволяет сделать заключение, что образовании стабильных кавитатов 1,8-дигидроксиантрахинона с циклодекстринами происходит только при включении флюорохромной группы в полость тора γ -циклодекстрина. Полное включение флюорохромного участка молекулы 1,8-дигидроксиантрахинона в полость β -циклодекстрина затруднено стерически, а в случае α -циклодекстрина – комплексообразование невозможно, в результате несоответствий конформационной структуры молекулы вещества «гостя» и размеров полости тора шестичленного глюкопиранозного макроцикла [48, 64].

7.10 Спектроскопия кругового дихроизма

Данный метод позволяет оценить изменения в КД спектре молекул вещества «гостя», происходящие при включении в полость циклодекстринов. При формировании кавитатов, в результате образования водородных связей с функциональными группами циклодекстринов, может изменяться оптическая активность хиральных молекул и они начинают по другому поглощать свет, поляризованный по правому и левому кругу (эффект Коттона) [21, 49, 55]. При взаимодействии ахиральных молекул вещества «гостя» с хиральными остатками глюкозы молекул циклодекстринов и их несимметричной локализации в полости тора, может наблюдаться появление полос кругового дихроизма в спектре оптически неактивного вещества [21, 48, 55]. В зависимости от структуры молекулы вещества комплексанта возможны варианты ее расположения в полости молекулы циклодекстрина [2, 48], обуславливающие различный характер изменений в КД спектре. Так, наблюдается отличие в характере ориентации молекулы 1- и 2-замещенного нафталина. Молекула нафталина, модифицированного в положении 1 располагается в полости тора экваториально (рисунок 12

А), а при модификации в положении 2 – аксиально (рисунок 12 Б). При аксиальном расположении ароматической молекулы вещества «гостя» (параллельно z-оси цилиндрической молекулы циклодекстрина) наблюдается положительное вращение плоскости поляризованного света, а при экваториальном расположении – отрицательный угол вращения [48, 55].

7.11 Кислотно-основное потенциометрическое титрование

Данный метод позволяет определить наиболее стабильное и эффективное взаимодействие различных форм молекул, способных к таутомерным взаимопревращениям с переносом протонов внутри молекулы (прототропной таутомерии), с молекулами циклодекстринов, как показано на рисунке 7 [48, 55, 66].

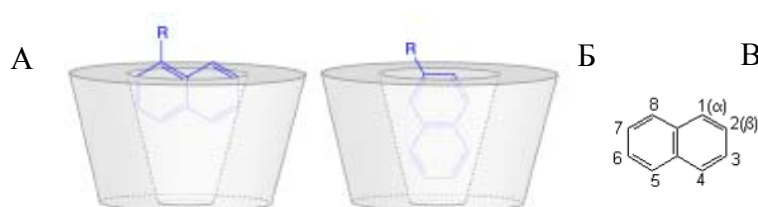


Рисунок 7 – Схема возможной ориентации 1- и 2- замещенных производных нафталина при включении в полость тора циклодекстринов (А, Б) и нумерации атомов в цикле (В)[2].

Известно, что в неионизированной форме молекулы более гидрофобны и наиболее эффективно встраиваются в неполярную полость циклических олигосахаридов. При образовании комплексов включения с молекулами вещества «гостя», имеющих группы, диссоциирующие по кислотному типу, величина значения их рКа возрастает, а в случае образования комплексов с веществами, обладающими основными свойствами – значение рКа уменьшается [48, 60].

Так, при титровании в атмосфере N_2 серии стандартных растворов иматиниба (1–1.5 мМ), содержащих эквивалентное количество HCl и 0.15M NaCl при исходном значении рН=2, стандартным раствором NaOH (0.005M) в присутствии различных количеств β-циклодекстрина, было выделено 5 прототропных таутомеров, имеющих различное сродство к гидрофобной полости тора. Взаимодействие полностью протонированных таутомерных форм иматиниба с гептаглюкопиранозным кольцом практически не обнаруживалось, поскольку их концентрация в растворе в исследованном диапазоне значений рН была крайне низка [60, 66]. Зная концентрацию молекул субстрата и лиганда в системе, с использованием полученных кривых титрования, можно рассчитать соотношение компонентов в комплексе включения и рассчитать константы стабильности образующихся кавитатов. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что наиболее стабильные комплексы включения со стехиометрическим соотношением компонентов 1:1, образуются при нейтральном заряде молекул иматиниба, обладающих наибольшим сродством к неполярной полости тора [55, 60, 66].

7.12 Микрокалориметрия

Изменения термодинамических характеристик системы, наблюдающиеся в результате образования комплексов включения, можно зафиксировать с помощью микрокалориметрических методов [9, 55, 67]. Изменения энтальпии и энтропии системы связаны с перестройкой гидратных оболочек вокруг молекул вещества гостя, вытеснением молекул воды из гидрофобной полости циклодекстринов, а также с уменьшением амплитуды вращения остатков моносахаридов вдоль осей гликозидных связей при образовании кавитатов [5, 48].

Так, с помощью метода изотермической микрокалориметрии, исследовался характер изменения энтальпии 2.5 мМ раствора β-циклодекстрина (в натрий-фосфатном буфере рН=7.4) при титровании 0.25 мМ раствором неорганических озонидов, для определения влияния ионной силы раствора на стабильность образующихся комплексов включения.

Стехиометрическое соотношение компонентов в процессе комплексообразования составляло 1:1. Константа стабильности комплекса составила 10^2 – 10^4 M^{-1} в диапазоне температур 25–37 °C [67].

7.13 Тонкослойная хроматография

С применением хроматографии в тонком слое сорбента возможно установить изменения подвижности молекул вещества «гостя» и молекул циклодекстринов, связанные с образованием комплексов включения [48]. При проведении хроматографического анализа, коэффициент удержания индивидуальных соединений и в составе комплекса может изменяться. При проведении хроматографического разделения в различных системах растворителей могут быть получены различные результаты. Так вещества могут полностью потерять подвижность и остаться на линии старта, либо, в процессе обратимого взаимодействия в слое элюата, пройти меньшее расстояние по сравнению со стандартами нативных соединений, либо полностью диссоциировать в системе растворителей [19, 48, 55]. При проведении хроматографии в системах, содержащих различные количества циклодекстринов, возможно рассчитать термодинамические параметры процесса комплексообразования [48]. Так, при анализе комплексов включения диклофенака и индометацина с β -циклодекстрином показано, что коэффициент удержания этих соединений отличается для нативных веществ и в составе комплексов включения [48].

7.14 Тест на смачиваемость и растворимость

Наиболее часто используемыми методами для характеристики изменения скорости смачиваемости и растворимости сухого препарата нативного вещества «гостя» по сравнению с сухим препаратом комплекса включения являются метод вращающегося диска и метод диспергированного вещества [48, 60]. В первом случае из порошка вещества спрессовывают таблетки стандартной формы и веса, с четко фиксированной площадью поверхности. Эти таблетки размещаются в ячейках на вращающемся с определенной скоростью диске, погружаемом в среду растворителя [60, 68]. Через равные промежутки времени осуществляется отбор проб растворителя и определяется количество вещества, содержащегося в растворе. Второй метод отличается от первого тем, что в известный объем растворителя вносят анализируемый препарат в виде порошка [48]. При исследовании смачиваемости и диспергируемости комплексов включения индометацина с β -циклодекстрином в таблетированной форме показано, что динамика растворимости препарата зависит от метода получения кавитатов. При использовании метода сублимации для получения комплексов включения при стехиометрическом соотношении компонентов 1:2 смачиваемость и диспергируемость таблетированных форм комплекса включения возросла на 60%, а при использовании метода сорастирания – до 95% [48, 60, 69].

8 Области использования циклодекстринов

При комплексообразовании с циклодекстринами молекулы вещества «гостя» переходят в наноструктурированное («инкапсулированное») состояние, при котором каждая молекула субстрата, размещается в полости нативной или модифицированной молекулы циклодекстрина [2, 9, 11]. Это вызывает значимые изменения физико-химических свойств молекул связываемого циклодекстринами вещества: увеличивается стабильность соединений, чувствительных к воздействию кислорода или света [9, 11, 19]; изменяется реакционная способность и активность молекул субстрата; происходит стабилизация легко летучих соединений [9, 16, 18, 19]; увеличивается растворимость ряда веществ [5, 6, 9, 55]; реализуется возможность перевода жидкостей в порошкообразную форму [2, 9, 19, 70]; повышается устойчивость субстрата к биодеградации микроорганизмами [9]; маскируются неприятные запахи и вкус [2, 9, 49]; изменяется цвет или интенсивность окраски соединений; может наблюдаться каталитическая активность циклодекстринов и пр. [9, 49, 55]. Такие свойства циклодекстринов и их производных делает их пригодными к применению в аналитической химии, сельском хозяйстве, фармацевтике, пищевом и косметическом производстве [5, 9, 11, 49].

8.1 Перспективы практического использования циклодекстринов в пищевой промышленности

ЦД являются продуктами ферментативной модификации крахмала. Это открывает широкие возможности их применения в пищевой промышленности, в первую очередь для улучшения потребительских качеств продуктов: повышения питательной ценности, вкусовых качеств, реологических свойств, увеличения срока сохранности. Циклодекстрины можно использовать в пищевом производстве для сохранения или модификации цвета и органолептических свойств продуктов питания. Эти макроциклические соединения способны образовывать комплексы включения с молекулами жирных кислот, пряно-ароматических соединений, пищевых красителей, витаминов и пр. [9, 19].

Чаще всего ЦД применяют как пищевые добавки. В экспериментах на животных при кормлении препаратами ЦД, меченного ^{14}C , показано, что ЦД практически полностью усваиваются в организме, и это указывает на их питательную ценность. Имеются данные о том, что ЦД как пищевые добавки регулируют обмен липидов и понижают уровень холестерина в организме. Во многих странах, в том числе Франции, Нидерландах, Бельгии разрешено использование ЦД в пищевой промышленности в качестве пищевых добавок.

Вещества, определяющие вкус и аромат пищи, зачастую не обладают высокой стабильностью и разлагаются в процессе хранения, термической обработки и пр. Отмечено, что комплексообразование с ЦД приводит к стабилизации ароматобразующих веществ и БАВ пряно-ароматических растений. Изготовление комплексов таких веществ с ЦД решает многие вопросы технологии изготовления приправ, их хранения, разработки БАД для диетического питания и т.п. Сухие комплексы ЦД с пищевыми компонентами достаточно стабильны, а в водной среде диссоциируют с высвобождением активных компонентов.

Приготовление комплексов бета-ЦД с пряно-ароматическими соединениями и веществами, определяющими органолептические свойства пищи – успешно применяемый процесс в ряде пищевых производств. Так, в Венгрии производится серия экстрактов пряно-ароматических растений (укроп, лук, чеснок, тмин) в форме комплексов включения с бета-ЦД, которые отличаются высокой стабильностью и выраженными органо-лептическими свойствами.

ЦД при добавлении к пищевым продуктам могут маскировать нежелательный привкус. Так, плоды цитрусовых содержат флавоноидные соединения, придающие сокам и сиропам цитрусовых горечь; добавление ЦД значительно улучшает качество продуктов. Кроме того, в результате комплексообразования ЦД с веществами, обуславливающими мутность соков, достигается увеличение их прозрачности и, как следствие повышение товарной ценности. Для этих целей предлагается также использовать фильтрацию соков через колонну, заполненную полимерным носителем с иммобилизованным бета-циклодекстрином.

Добавление ЦД или смеси ЦД улучшает вкусовые качества, повышает механические характеристики мясных продуктов. ЦД могут также уменьшать специфические запахи и улучшать вкусовые качества продуктов, получаемых из микробной биомассы, из белковых гидролизатов, из сои. Добавка ЦД к продуктам из молочной сыворотки предохраняет белок от денатурации, добавление к костной муке снижает её неприятный запах. Рекомендуется использовать ЦД для сохранения аромата и цвета ряда пищевых добавок, для улучшения вкусовых качеств чая, виски, экстрактов трав, для уменьшения гигроскопичности кондитерских изделий, для фиксации летучих компонентов эфирных масел и для оптимизации различных пищевых технологий. С использованием ЦД возможно изготавливать сухие алкогольные напитки, ароматизированные табачные изделия и пр.

Известно также стабилизирующий эффект ЦД в отношении пищевых эмульсий и пен. Разветвлённые ЦД рекомендуется использовать в качестве эффективных эмульгаторов. Имеются сведения, что в упакованных пищевых продуктах комплекс этанола с ЦД используется в качестве консерванта и ингибирует для роста плесневых грибов.

Технология комплексообразования эфирных масел пряно-ароматических растений с циклодекстринами может составить конкуренцию методу инкапсулирования, широко применяемому для сохранения и пролонгирования аромата в составе парфюмерных композиций, отдушек и натуральных пищевых ароматизаторов. Добавление циклодекстринов в хлебобулочную и мясную продукцию улучшает консистенцию готовых продуктов [5, 18]. При добавлении в состав продуктов питания, циклодекстрины маскируют горький привкус, неприятный запах, и сохраняют аромат изделий, предназначенных для длительного хранения [5, 11, 18, 33]. В результате инкапсулирования, циклодекстрины защищают ароматобразующие соединения от деструкции в процессе заморозки, оттаивания и обработки микроволновым излучением. Во многих странах β -циклодекстрин входит в перечень разрешенных к применению пищевых добавок [9]. Порошок циклодекстрина обладает сладковатым вкусом и его можно использовать в качестве самостоятельного подсластителя. Добавление циклодекстрина к традиционно используемым пищевым подсластителям, позволяет усилить их действие и использовать в меньшей концентрации, а также уменьшает выраженность горького послевкуса, остающегося после употребления стевиозида, глицирризина, рибозозида и пр. [49]. В последнее время появляются работы по внедрению циклодекстринов в производство алкогольных напитков – виски, пива и др. [5], в составе соков из плодов цитрусовых для снижения интенсивности горького привкуса, обусловленного содержащимися в цитрусовых лимоноидами и флавоноидами [18, 19]. Добавление циклодекстрина в количестве 1–4% по массе позволяет предотвратить процесс потемнения фруктовых и овощных соков и пюре, вызываемого окислением фенольных соединений полифенолоксидазой [5, 18]. Причем показано, что циклические олигосахариды взаимодействуют как с фенольными соединениями, переводя их в недоступную для активного центра фермента форму, так и напрямую с полифенолоксидазой [71]. Циклодекстрины могут использоваться при переработке пищевого сырья, например, для удаления холестерина из молока, масла, яичного желтка [5, 18]. Показано, что при внесении в молоко до 1 % этих макроциклических лигандов удается связать до 80% холестерина, содержащегося в исходном сырье [72]. Также, с помощью циклодекстринов возможно связать и удалить из масел свободные жирные кислоты, что позволяет улучшить термостабильность масел при жарке: уменьшается количество образующегося дыма, пены, снижается скорость образования продуктов сгорания и формирования бурого цвета масла [33]. Добавление циклодекстринов и их разветвленных производных к муке при приготовлении теста позволяет повысить его эластичность и улучшить качество производимых макаронных изделий и основы для пиццы [5]. При добавлении макроциклических олигосахаридов к шоколаду, конфетам, кремам и прочей кондитерской продукции удается увеличить сроки хранения и улучшить органолептические свойства готовых изделий [18].

Перспективным представляется использование бета-циклодекстрина для получения наноструктурированных форм жирорастворимых витаминов. Витамин D₃ практически не растворим в водных средах. Растворимость холекальциферола может быть значительно увеличена за счет комплексообразования с бета-ЦД при одновременном увеличении его биологической активности, стабильности и улучшении биодоступности. В свободном виде витамин разрушается при 80 °С в течении 24 ч, однако в составе комплексов включения при той же температуре после 43 суток воздействия сохраняется около 50% исходной активности холекальциферола.

Комплекс витамина К₃ с бета-ЦД также отличается повышением водорастворимости и увеличению термостабильности. В составе комплексов включения 2-метил-1,4-нафтохинон разрушается лишь при температуре 300 °С. В форме комплекса этот синтетический витамин не реагирует с аминокислотами и может вводиться в состав премиксов.

Витамин А и его производные, стабилизированные бета-ЦД, также используются в пищевой промышленности. Комплекс витамина Е с гамма-СД отличается повышенной растворимостью и биодоступностью. Используется как добавка к пищевым продуктам.

Для получения клатратов витаминов с циклодекстринами предлагается способ их получения основанный на методе сорастирания. Этот метод напоминает процесс грануляции при котором в промышленном производстве можно использовать низко- и высокооборотистые миксеры. При использовании данного метода в лабораторном производстве, комплексы включения можно получать в процессе перетира пестиком в ступке смеси циклодекстрина с субстанцией вещества «гостя» (витаминов D3, K3, A, C и E) при добавлении небольшого количества воды. Время вымешивания зависит от физико-химических свойств витаминов. После завершения процесса комплексообразования смесь высушивается без дополнительной обработки, либо промывается небольшим количеством воды и отфильтровывается, либо лиофильно высушивается. При высушивании пасты комплексов включения вместо тонкодисперсного порошка формируется плотный спрессованный комок, что обусловлено свойствами витаминов. В такой ситуации полученную массу комплексов включения необходимо размолоть с использованием шаровых мельниц до тонкодисперсного состояния. Полученный порошок высушивается в эксикаторе, просеивается через сита и хранится в плотно закупоренной таре.

Заключение

В результате комплексообразования с циклодекстринами происходит изменение физико-химических свойств и биодоступности различных классов биологически активных соединений. Процесс комплексообразования приводит к увеличению стабильности термолабильных соединений и торможению процесса фотоокисления и термодеструкции витаминов, биологически активных веществ и пр. В результате комплексообразования повышается точность дозировки и гомогенность распределения жирорастворимых соединений в готовом продукте при переводе вещества гостя в порошкообразную форму. Существуют различные методы получения комплексов включения наноструктур циклодекстрина с биологически активными соединениями: сорастирание, соосаждение, сухой помол, герметичное нагревание, суспензионный метод, метод нейтрализации, метод распылительной сушки, сублимация, экструзия и пр. Для контроля физико-химических свойств комплексов включения рекомендуется использовать методы термического анализа, сканирующей электронной микроскопии, рентгеноструктурного анализа, ИК-спектроскопии, ЯМР-, КД-, ЭПР-спектроскопии, микрокалориметрии и пр. Представляется перспективным использовать циклодекстрины для получения комплексов включения с биологически активными веществами пряно-ароматических растений, ароматобразующими веществами, жирорастворимыми (А, D E, К) и водорастворимыми (С, В₁₂) витаминами. Перевод таких соединений в сухую порошкообразную форму сопровождается повышением их фото и термостабильности, а также увеличением биодоступности, что позволяет использовать наноструктурированные БАВ в составе диетического и функционального питания и пищевых добавок.

Список литературы

1. Szejtli, J. Past, present and future of cyclodextrin research / J. Szejtli // *Pure and Applied Chemistry*. – 2004. – Vol. 76, № 10. – P. 1825–1845.
2. Crini, G. Review: A history of cyclodextrins / G. Crini // *Chemical Reviews*. – 2014. – Vol. 114, № 21. – P. 10940–10975.
3. Loftsson, T. Cyclodextrins in drug delivery / T. Loftsson [et al.] // *Expert opinion on drug delivery*. – 2005. Vol. 2, № 2. – P. 335–351.
4. Larsen, K.L. Large cyclodextrins / K.L. Larsen // *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* / – 2002. – Vol. 43, № 1. – P. 1–13.
5. Martin Del Valle, E.M. Cyclodextrins and their uses: a review. / E.M. Martin Del Valle // *Process Biochemistry* / – 2004. – Vol. 39, № 9. – P. 1033–1046.

6. Loftsson, T. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization / T. Loftsson, M. Brewster // *Journal of pharmaceutical Sciences*. – 1996. – Vol. 85, № 10. – P. 1017–1025.
7. Miranda, J.C. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs / J.C. Miranda [et al.] // *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2011. – Vol. 47, № 4. – P. 665–681.
8. Shikhar, G. Solubility studies of the β -cyclodextrins inclusion complexes: a review / G. Shikhar [et al.] // *International research journal of pharmacy*. – 2012. – Vol. 3, № 10. – P. 178–181.
9. Dodziuk, H. Cyclodextrins and Their Complexes. Chemistry, Analytical Methods, Applications / H. Dodziuk. – Warsaw: Willey-VCH, Weinheim, 2006. – 504 p.
10. Капустин, М.А. Получение и свойства комплексов включения циклодекстрина с диметилловым эфиром фталевой кислоты / М.А. Капустин, Н.В. Гавриленко, В.П. Курченко // *Труды БГУ*. – 2011. – Том 6, ч. 2. – С. 126–133.
11. Das, S.K. Cyclodextrins – the molecular container / S.K. Das [et al.] // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2013. – Vol. 4, № 2. – P. 1694–1720.
12. Szejtli, J. Cyclodextrin Technology / J. Szejtli. – Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1988. – 441 p.
13. Sabadini, E. Solubility of cyclomaltoo-ligosaccharides (cyclodextrins) in H₂O and D₂O: a comparative study / E. Sabadini, T. Cosgrove, F.D.C. Egidio // *Carbohydrate Research*. – 2006. – Vol. 341, № 2. – P. 270–274.
14. Frumming, K. Cyclodextrins in Pharmacy / K. Frumming, J. Szejtli. – Dordrecht–Boston: Kluwer Academic Publishers, 1994. – 218 p.
15. Rahaman, M.S. Hand Book of Food Preservation / M.S. Rahaman. – 2. ed. – Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2007. – 1086 p.
16. Кнунянц, И.Л. Химическая энциклопедия: В 5 т. / Гл. ред. И. Л. Кнунянц [до 1992 г.], Н. С. Зефирова [с 1995 г.]. – М.: Сов. энцикл., 1990. – Т. 2. – С. 493.
17. Manoj, M.N. The Cyclodextrins: A Review / M.N. Manoj, M.S. Dinesh, V.J. Parag // *Journal of Current Pharmaceutical Research*. – 2012. – Vol. 10, № 1. – P. 1–6.
18. Dardeer, H.M. Importance of cyclodextrins into inclusion complexes / H.M. Dardeer // *International Journal of Advanced Research*. – 2014. – Vol. 2, № 4. – P. 414–428.
19. Marques, H. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles / H. Marques // *Flavour and fragrance journal*. – 2010. – Vol. 25, № 5. – P. 313–326.
20. Flasiński, M. X-ray grazing incidence diffraction and Langmuir monolayer studies of the interaction of beta-cyclodextrin with model lipid membranes / M. Flasiński [et al.] // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2010. – Vol. 348, № 2. – P. 511–521.
21. Miller, L.A. Practical considerations in development of solid dosage forms that contain cyclodextrin / L.A. Miller, R.L. Carrier, I. Ahmed // *Journal of Pharmaceutical Sciences* / – 2007. – Vol. 96, № 7. – P. 1691–1707.
22. Cirri, M. Development of fast-dissolving tablets of flurbiprofen-cyclodextrin complexes / M. Cirri [et al.] // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2005. – Vol. 31, № 7. – P. 697–707.
23. Sapkal, N.P. Evaluation of some methods for preparing gliclazide- β -cyclodextrin inclusion complexes // N.P. Sapkal [et al.] // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* / – 2007. – Vol. 6, № 4. – P. 833–840.
24. Shimpi, S. Cyclodextrins: application in different routes of drug administration / S. Shimpi, B. Chauhan, P. Shimpi // *Acta Pharmaceutica* – 2005. – Vol. 55, № 2. – P. 139–156.
25. Parlati, S. Preparation and application of a β -cyclodextrin-disperse/reactive dye complex / S. Parlati [et al.] // *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* / – 2007. – Vol. 57, № 1. – P. 463–470.
26. Wang, Q.F. Preparation of inclusion complex of paeonol and β -cyclodextrin by sealed-control temperature method / Q.F. Wang [et al.] // *China Journal of Chinese Materia Medica*. – 2007. – Vol. 32, № 3. – P. 218–221.

27. Choi, H.G. Terfenadine-beta-cyclodextrin inclusion complex with antihistaminic activity enhancement / H.G. Choi [et al.] // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2001. – Vol. 27, № 8. – P. 857–862.

28. Figueiras, A. Preparation and physicochemical characterization of omeprazole: methyl-beta-cyclodextrin inclusion complex in solid state / A. Figueiras [et al.] // *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. – 2007. – Vol. 57, № 1. – P. 173–177.

29. Cao, F. The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes / F. Cao, J. Guo, Q. Ping // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2005. – Vol. 31, – № 8. – P. 747–756.

30. Perez, A.I.R. Drug solubilization and delivery from cyclodextrin-pluronic aggregates / A.I.R. Perez [et al.] // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* / – 2006. – Vol. 6, № 9–10. – P. 3179–3186.

31. Loftsson, T. Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance Complexation efficiency / T. Loftsson, M.E. Brewster // *Journal of Pharmaceutical Sciences* / – 2012. – Vol. 101, – №. 9. – P. 3019–3032.

32. Vesna, N.D. Photostability of piroxicam in the inclusion complex with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin / N.D. Vesna [et al.] // *Hemijaska Industrija*. – 2014. – Vol. 68, № 1. – P. 107–116.

33. Hedges, A.R. Industrial Applications of Cyclodextrins / A.R. Hedges // *Chemical Reviews*. – 1998. – Vol. 98, № 5. – P. 2035–2044.

34. Rajeswari, C. Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review / C. Rajeswari [et al.] // *AAPS PharmSciTech*. – 2005. – Vol. 6, № 2. – P. E329–E357.

35. Kang, F.R. Lysozyme stability in primary emulsion for PLGA microsphere preparation: effect of recovery methods and stabilizing excipients / F.R. Kang [et al.] // *Pharmaceutical Research*. – 2002. – Vol. 19, No. 5. – P. 629–663.

36. Tonnesen, H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs / H.H. Tonnesen // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2001. – Vol. 225, № 1–2. – P. 1–14.

37. Alsarra, I.A. Effect of beta-cyclodextrin derivatives on the kinetics of degradation of cefotaxime sodium in solution state / I.A. Alsarra [et al.] // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2007. – Vol. 17, № 5. – P. 353–357.

38. Uekama, K. Cyclodextrin drug carrier systems / K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie // *Chemical Reviews*. – 1998. – Vol. 98, № 5. – P. 2045–2076.

39. Sigurjonsdottir, F.J. Influence of cyclodextrins on the stability of the peptide salmon calcitonin in aqueous solution / F.J. Sigurjonsdottir, T. Loftsson, M. Masson // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1999. – Vol. 186, № 2. – P. 205–213.

40. Jarho, P. Cyclodextrin-catalyzed deacetylation of spironolactone is pH and cyclodextrin dependent / P. Jarho, D. Vander Velde, V.J. Stella // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2000. – Vol. 89, № 2. – P. 241–249.

41. Loftsson, T. Cyclodextrin-accelerated degradation of β -lactam antibiotics in aqueous solutions / T. Loftsson, B. J. Olafsdottir // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1991. – Vol. 67, № 2. – P. R5–R7.

42. El-Badry, M. Study of omeprazole stability in aqueous solution: influence of cyclodextrins / M. El-Badry [et al.] // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2009. – Vol. 19, № 5. – P. 347–351.

43. Uekama, K. New perspectives in cyclodextrin pharmaceutical applications cyclodextrins derivatives as new drugs carriers / K. Uekama, T. Irie // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1990. – Vol. 271, № 4. – P. 155–165.

44. Kurkov, S. Cyclodextrins / S. Kurkov, T. Loftsson // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2013. – Vol. 453, № 1. – P. 167–180.

45. Stella, V.J. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery / V.J. Stella, R.A. Rajewski // *Pharmaceutical Research*. – 1997, – Vol. 14, № 5, – P. 556–567.

46. Stella, V.J. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes / V.J. Stella [et al.] // *Advanced Drug Delivery Review*. – 1999. – Vol. 36, № 1. – P. 3–16.
47. Patil, P. Self-assembled cyclodextrin nanoparticles as drug carrier / P. Patil, S. Rojekar // *International Journal of Pharma and Bio Sciences* / – 2014. – Vol. 5, № 4. – P. 569–588.
48. Singh, R. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes – a review / R. Singh [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Science and Technology* / – 2010. – Vol. 2, № 3. – P. 171–183.
49. Maazaoui, R. Applications of cyclodextrins: formation of inclusion complexes and their characterization / R. Maazaoui, R. Abderrahim // *International Journal of Advanced Research* / – 2015. – Vol. 3, № 2. – P. 757–781.
50. Marques, C.H.M. Studies of cyclodextrin inclusion complexes. I. The salbutamol-cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC / H.M.C. Marques, J. Hadgraft, I.W. Kellaway // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1990. – Vol. 63, № 3. – P. 259–266.
51. Manosroi, J. Enhancement of the release of azelaic acid through the synthetic membranes by inclusion complex formation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin/ J. Manosroi [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2005, – Vol. 293, № 1–2. – P. 235–240.
52. Araujo, D.R. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex / D.R. Araujo [et al.] // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2008. – Vol. 33, № 1. – P. 60–71.
53. Swaminathan, S. Cyclodextrin-based nanosponges encapsulating camptothecin: Physicochemical characterization, stability and cytotoxicity / S. Swaminathan [et al.] // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2010. – Vol. 74, № 2. – P. 193–201.
54. Devasari, N. Inclusion complex of erlotinib with sulfobutyl ether- β -cyclodextrin: Preparation, characterization, in silico, in vitro and in vivo evaluation / N. Devasari [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – Vol. 134. – P. 547–556.
55. Bekers, O. Cyclodextrins in the pharmaceutical field / O. Bekers [et al.] // *Drug Development and Industrial Pharmacy* / – 1991. – Vol. 17, № 11. – P. 1503–1549.
56. Al-Marzouqi, A. H. Phase solubility and inclusion complex of itraconazole with β -cyclodextrin using supercritical carbon dioxide / A.H. Al-Marzouqi [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2006. – Vol. 95, № 2. – P. 292–304.
57. Jadhav, G.S. Physicochemical, in silico and in vivo evaluation of a danazol-beta-cyclodextrin complex / G.S. Jadhav, P.R. Vavia // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2008; – Vol. 352, № 1–2. – P. 5–16.
58. Sinha, V.R. Complexation of celecoxib with beta-cyclodextrin: characterization of the interaction in solution and in solid state / V.R. Sinha [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2005. – Vol. 94, № 3. – P. 676–687.
59. Franco, C. Studies on coumestrol/ β -cyclodextrin association: inclusion complex characterization / C. Franco [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2009. – Vol. 369, № 1–2. – P. 5–11.
60. Javery, S. Preparation and characterization of Cyclodextrin inclusion complexes: a review / S. Javery, A. Dosh // *International journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences*. – 2014. – Vol. 3, № 3. – P. 674–691.
61. Iacovino, R. β -Cyclodextrin Inclusion Complex to Improve Physicochemical Properties of Pipemidic Acid: Characterization and Bioactivity Evaluation/ R. Iacovino [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2013. – Vol. 14, № 7. – P. 13022–13041.
62. Капустин, М.А. Клатратные комплексы бета-циклодекстрина с синтетическими простаноидами / Капустин М.А. [и др.] // *Биомика*. – 2013. – Т. 5, №1. – С. 1–5.
63. Chun I.K. Inclusion complexation of hydrocortisone butyrate with cyclodextrins and dimethyl- β -cyclodextrin in aqueous solution and in solid state / I.K. Chun, D.S. Yun // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1993, – Vol. 96, № 1–3. – P. 91–103.

64.Smulevich, G. Inclusion Complex Formation of 1,8-Dihydroxyanthraquinone with Cyclodextrins in Aqueous Solution and in Solid State / G. Smulevich [et al.] // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1988. – Vol. 77, № 6. – P. 523–526.

65.Xiang, T.X. Inclusion complexes of purine nucleosides with cyclodextrins : II. Investigation of inclusion complex geometry and cavity microenvironment / T.X. Xiang, B.D. Anderson // International Journal of Pharmaceutics. – 1990. – Vol. 59, № 1. – P. 45–55.

66.Beni, S. Cyclodextrin/imatinib complexation: binding mode and charge dependent stabilities / S. Beni [et al.] // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2007. – Vol. 30, № 2. – P. 167–174.

67.Perry, C.S. The binding interaction of synthetic ozonide antimalarials with natural and modified β -cyclodextrins / C.S. Perry [et al.] // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2006. – Vol. 95, № 1. – P.146–158.

68.Могилюк, В. Тест «растворение» для твердых лекарственных форм. / В. Могилюк / Фармацевтическая отрасль. – 2015. – № 2 (49), – С. 56–59.

69.Lin, S.Z. Indomethacin and cyclodextrin complexes. / S.Z Lin [et al.] / International Journal of Pharmaceutics. – 1991. – Vol. 69, – № 3. – P. 211–219.

70.Buschmann, H.J. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review / H.J. Buschmann, E. Schollmeyer // Journal of cosmetic science. – 2002. – Vol. 53, № 3. – P. 185–191.

71.Gacche, R.N. Kinetics of inhibition of polyphenol oxidase mediated browning in apple juice by beta-cyclodextrin and L-ascorbate-2-triphosphate / R.N. Gacche, G.B. Zore, V.S. Ghole // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. – 2003, – Vol. 18, № 1. – P. 1–5.

72.Maskooki, A.M. Effect of cholesterol removal processing using β -cyclodextrin on main components of milk / A.M. Maskooki [et al.] // International Journal of Food Science. – 2013. – Vol. 2013, № 5. – P. 1–6.

METHODS OF ACTIVE COMPOUNDS WITH CYCLIC OLIGOSACCHARIDES NANOCOMPLEXES OBTAINING, ANALYSIS OF IT PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES AND USE IN FOOD PRODUCTION

**M.A. Kapustin, A.S. Chubarova, T.N. Halavatch, V.G. Cigankov*,
A.M. Bondaruk*, V.P. Kurchenko**

Belarusian State University, Minsk, The Republic of Belarus

**RUE "Scientific and Practical Centre of Hygiene», Minsk, Republic of Belarus*

e-mail: maximkapustin84@gmail.com, kurchenko@tut.by

As a result of the complexation with cyclodextrins there the changes of the physico-chemical properties and bioavailability of various classes of biologically active compounds can be achieved. Process of complexation increases stability of thermo labile compounds, decreases photooxidation process and inhibits thermal degradation of vitamins, biologically active substances and etc. As a result of complexation dosing accuracy and homogeneity of the distribution of fat-soluble compounds in the final product increase, while of translating the liquid guest substance in powder form. There are various methods for obtaining of the nanostructures of inclusion complexes of cyclodextrin with biologically active compounds: cogrinding, coprecipitation, dry milling, hermetic heating, the slurry method, neutralization method, spray drying, sublimation, extrusion, etc. In order to control the physico-chemical properties of inclusion complexes different methods can be recommended: methods of thermal analysis, scanning electron microscopy, X-ray diffraction, infrared spectroscopy, NMR, EPR spectroscopy, calorimetry and so on. It seems promising to use cyclodextrins to obtain inclusion complexes with biologically active substances of aromatic plants, smellforming substances, fat-soluble (A, D, E, K) and water-soluble (C, B₁₂) vitamins. The conversion of these compounds in a dry powder form is accompanied by an increase in it photo and thermal stability, as well as increased bioavailability, which allows to use such nanostructured bioactive substances in the composition of dietary and functional food, different dietary supplements.