

А. В. Душкин<sup>1</sup>, Е. С. Метелева<sup>1</sup>, Т. Г. Толстикова<sup>2</sup>, А. В. Павлова<sup>2</sup>,  
М. В. Хвостов<sup>2</sup>

## ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНОХИМИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

<sup>1</sup> Институт химии твердого тела и механохимии (ИХТТМ) СО РАН, Новосибирск, Россия;

<sup>2</sup> Новосибирский институт органической химии СО РАН, Новосибирск, Россия

Исследованы изменения молекулярно-массовых характеристик макромолекул полисахаридов — арабиногалактана, гидроксипропилкрахмала 200/0,5, фибрегама, декстранов 10, 40 и 70 при механохимической обработке. Обоснована предпочтительность “мягких” условий механической обработки (~1g), не приводящей к деструкции макромолекул полисахаридов. Дополнительным преимуществом такого режима механической обработки является возможность его масштабирования на промышленные проточные мельницы. Механохимическая обработка не оказала отрицательного воздействия на параметры токсичности изученных полисахаридов. Токсикологическое исследование механообработанных арабиногалактана, гидроксипропилкрахмала 200/0,5, фибрегама, декстранов 10, 40 и 70 показало, что изученные полисахариды и продукты их механохимической обработки можно отнести к 4 классу малотоксичных веществ.

**Ключевые слова:** полисахариды; механохимия; молекулярно-массовое распределение; гель-хроматография; токсичность.

Водорастворимые полисахариды находят широкое применение в медицине и пищевой промышленности. Одной из основных физико-химических характеристик этих полимеров являются молекулярные массы, изменяющиеся в широких пределах от  $\sim 10^3$  до  $\sim 10^7$  Да. В технологических процессах получения продуктов на основе таких полимеров, их макромолекулы могут подвергаться механическим воздействиям, приводящим к частичной деструкции — разрыву цепей. В результате происходит уменьшение средней молекулярной массы и возрастает полидисперсность [1]. Эти деструктивные изменения могут быть наиболее выражены в “сухих” технологических процессах, например, измельчении, таблетировании, смешении и т.д. Примером таких процессов является механохимическое твердофазное получение супрамолекулярных комплексов лекарственных веществ с водорастворимыми полимерами (полисахаридами) — основы лекарственных средств повышенной эффективности [2]. При этом результатом частичной деструкции полимеров может быть изменение их токсикологических характеристик, которые необходимо контролировать в процессе создания новых лекарственных препаратов и (пищевых) продуктов.

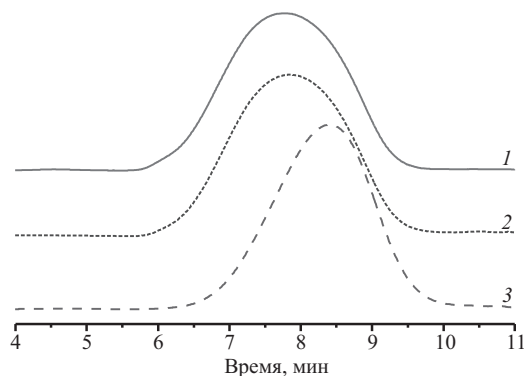
В настоящей работе проведено изучение молекулярно-массовых характеристик полисахаридов — декстранов 10, 40, 70, гидроксипропилкрахмала 200/0,5, арабиногалактанов из лиственницы и камеди акации при их механической обработке ударно-стирающими воздействиями в ротационной и планетарной мельницах. Ранее [1] деструкцию полимеров изучали по изменению вязкости растворов, но интерпретировать полученные данные нужно с большой осторожностью, так как изменения вязкости могут иногда быть результа-

том агрегации молекул. Такой тиксотропный эффект обычно обратим, в то время как деструкция ведёт к необратимому разрыву связей. В связи с вышесказанным для изучения деструкции (снижения молекулярной массы) полимеров в исследуемых системах мы использовали не вискозиметрический метод, а метод гелипроникающей хроматографии. Также изучены токсикологические характеристики полученных обработанных материалов.

### *Экспериментальная часть*

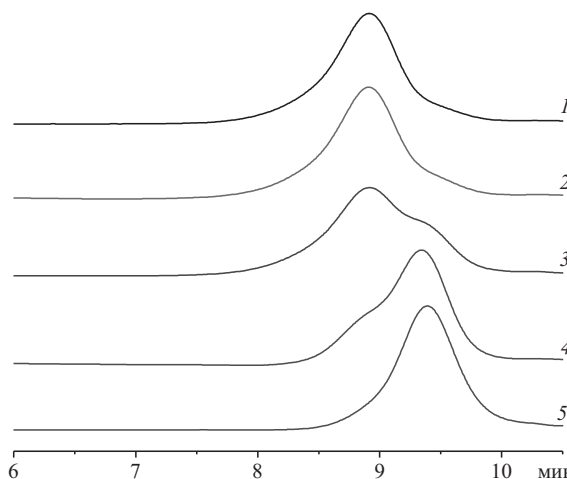
Нами использовались фармакопейные субстанции декстранов — 10, 40, 70, гидроксипропилкрахмал (ГЭК) 200/0,5, применяющиеся в медицине для приготовления инфузионных растворов. Арабиногалактан (АГ), выделенный из лиственницы сибирской по методу [3, 4], сертифицированный по ТУ 9363-015-39094141-03, зарегистрированный как сырьё для производства БАД. Фибрегам (гликопротеин из камеди акации), производства французской компании CNI — Коллоид Натюрель Интернасьональ, макромолекулы которого состоят из 95 – 99 % арабиногалактана и 1 – 5 % протеинов, также использующийся в качестве пищевой добавки.

Были использовано три режима механохимической обработки. “Мягкая” обработка проводилась в ротационной (валковой) мельнице ВМ-1 с барабаном, имеющим фторопластовую футеровку. В качестве мелющих тел использовались стальные шары (марка стали ШХ-15), диаметром 15 мм, загрузка 675 г. Ускорение мелющих тел — 1 g (свободное падение). Объём барабана — 300 мл. Общая загрузка обрабатываемой субстанции составляла 20 г, время обработки от 2 до 24 ч. Для интенсивной “жесткой” обработки использовали



**Рис. 1.** Гель-хроматограммы раствора ГЭК исходного – (1), обработанного в мельнице VM-1 в течение 4 ч – (2), и в мельнице АГО-2 в течение 20 мин – (3).

планетарную мельницу АГО-2. Режим обработки: ускорение мелющих тел — 40 g, масса обрабатываемой субстанции 3 г, объём барабана — 40 мл, мелющие тела — стальные шары, диаметр 6 мм, загрузка 75 г. Время обработки составляло 10–20 минут. Для еще более интенсивной обработки использовали мельницу VM-1 с металлическим барабаном объёмом 2000 мл. В качестве мелющих тел использовались стальные шары (марка стали ШХ-15), диаметром 15 мм, загрузка 2700 г и 880 г стальных шаров, диаметром 3 мм. Ускорение мелющих тел — 1 g (свободное падение). Общая загрузка обрабатываемой субстанции составляла 20 г, время — 48 ч.



**Рис. 2.** Гель-хроматограммы 0,02 вес. % раствора арабиногалактана 1 – исходного; 2 – обработанного в ротационной мельнице в течение 2 ч; 3 – в течение 24 ч; 4 – в планетарной мельнице в течение 20 мин; 5 — в ротационной мельнице в течение 48 ч (смешанная шаровая загрузка – наиболее интенсивный режим механической обработки).

Молекулярно-массовое распределение (ММР) образцов исследовали методом гелипроникающей хроматографии (ГПХ) на жидкостном хроматографе Agilent 1200 с колонкой PL aqual-ОН 40, 300 × 7,5 мм. Температура колонки + 30 °С. Детектор рефрактометрический. В качестве растворителя и элюента использовали водный раствор 0,1 М LiNO<sub>3</sub>, скорость потока – 1 мл/мин. Калибровку проводили по стандартам декстранов фирмы Sigma-Aldrich с молекулярными мас-

#### Характеристики молекулярно-массового распределения полисахаридов

Образец	Способ получения	M <sub>n</sub> , кДа	M <sub>w</sub> , кДа	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>	Весовые доли макромолекул, кДа	
					10 %	90 %
Фибрегам	исх.	146,6	256,7	1,8	< 75,9	< 528,2
	м/о* в АГО-2 20 мин	31,4	55,2	1,8	< 16,3	< 113,5
	м/о в VM-1 4 ч	120,3	231,6	1,9	< 60,3	< 478,4
Арабиногалактан	исх.	13,9	17,3	1,2	< 9,0	< 27,9
	м/о в АГО-2 20 мин	9,3	11,2	1,2	< 6,1	< 18,4
	м/о в VM-1 4 ч	13,1	16,3	1,2	< 8,1	< 26,2
Гидроксиэтилкрахмал	исх.	47,9	116,9	2,4	< 20,9	< 265,3
	м/о в АГО-2 20 мин	26,6	55,2	2,1	< 12,7	< 118,9
	м/о в VM-1 4 ч	45,6	105,5	2,3	< 20,0	< 237,6
Декстран 70	исх.	30,9	76,4	2,5	< 14,0	< 174,7
	м/о в АГО-2 20 мин	22,7	54,8	2,4	< 10,4	< 123,5
	м/о в VM-1 4 ч	29,6	73,5	2,5	< 13,4	< 169,2
Декстран 40	исх.	24,6	38,0	1,5	< 13,3	< 72,3
	м/о в АГО-2 20 мин	19,5	31,9	1,6	< 10,4	< 61,3
	м/о в VM-1 4 ч	24,3	37,4	1,5	< 13,0	< 71,2
Декстран 10	исх.	8,3	13,4	1,6	< 4,2	< 26,4
	м/о в АГО-2 20 мин	8,0	12,1	1,5	< 41,9	< 22,7
	м/о в VM-1 4 ч	8,3	13,4	1,6	< 4,2	< 26,3

\* Механическая обработка (м/о)

сами — 5, 12, 25, 80, 150, 270 и 410 кДа. Для обработки полученных результатов и расчета ММР использовали программу Agilent GPC Data Analysis (в предположении линейной зависимости  $\lg M_w$  — время удерживания). Для описания ММР использовали характеристики средней величины молекулярного веса, предложенные Лэнсингом и Кремером [5] — среднечисловой молекулярный вес  $M_n$ , а также средневесовой молекулярный вес  $M_w$ . Отношение  $M_w/M_n$  использовалось как критерий степени полидисперсности исследуемых полимеров.

Определение острой токсичности проводили на белых беспородных мышах весом 20 – 25 г, полученных из вивария Института цитологии и генетики СО РАН и содержащихся в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и стандартному гранулированному корму. Изучаемые полисахариды вводили однократно внутрижелудочно в диапазоне доз от 1000 до 6000 мг/кг. Значение параметров  $LD_{50}$  вычисляли по методу Кербера [6]. Состояние животных оценивали по внешнему виду, поведению, а также с помощью интегральных показателей по изменению массы тела (весы “ОНАУС”, США), температуры тела (электро-физиологический комплекс LabLinc, Couloubrn Instruments, США), спонтанной двигательной активности и исследовательской реакции (автоматическая регистрация двигательных актов в камере TruScan, Couloubrn Instruments, США); физиологические показатели регистрировали через 1 сут и 14 сут после введения. По окончании эксперимента проводили вскрытие животных с макроскопическим патоморфологическим исследованием внутренних органов.

### *Результаты и их обсуждение*

Полученные хроматограммы приведены на примере гидроксиэтилкрахмала (ГЭК) (рис. 1). Расчетные характеристики молекулярно-массовых распределений исследованных полисахаридов до и после механической обработки приведены в таблице.

Из этих результатов следует, что при использовании интенсивного режима механической обработки (планетарная мельница) происходит значительное снижение молекулярных масс полисахаридов и небольшое изменение их полидисперсности  $M_w/M_n$  [7]. По мере увеличения молекулярной массы  $M_w$  исходных полимеров, степень механодеструкции повышается, что согласуется с литературными данными [1]. Интересно отметить, что макромолекулы с высокой степенью “разветвления” — ГЭК и АГ, деструктируются на приблизительно равные фрагменты. Интересно отметить, что во всех полисахаридах не происходит значительного увеличения степени полидисперсности, вероятно из-за преимущественной механодеструкции их высокомолекулярных фракций. Очевидно, что характер механодеструкции связан со строением макромолекул полисахаридов и физико-химическими механизмами разрыва их цепей. В [8] была предложена модель механодеструкции линейных синтетических полимеров,

которая предполагала, что наибольшую вероятность разрыва при механическом воздействии имеют звенья, находящиеся в середине макромолекулы. При качественном рассмотрении, характер механодеструкции ГЭК и АГ близок к этой модели. В случае декстранов и фибрегама механизм механодеструкции может быть иной. Однако, не смотря на содержательность полученных результатов, для их детальной интерпретации необходимы дальнейшие исследования, которые выйдут за рамки настоящей работы.

Отдельного обсуждения заслуживают результаты, полученные по арабиногалактану из древесины лиственницы. При использовании “интенсивного — жесткого” режима механической обработки (планетарная мельница и ротационная мельница со смешанной шаровой загрузкой) происходит значительное снижение молекулярной массы макромолекул арабиногалактана. Согласно полученным хроматограммам (рис. 2), его макромолекулы  $M_w = 17,3$  кДа ( $M_n = 13,9$  кДа) количественно “разбиваются” на 2 практически равных фрагмента  $M_w = 8,3$  кДа ( $M_n = 7,7$  кДа). Причем степень полидисперсности  $M_w/M_n$  при этом уменьшается до 1,08. Полученные данные позволяют предположить, что нативные макромолекулы АГ состоят из двух одинаковых по молекулярной массе фрагментов, связанных относительно непрочной связью, подвергающейся разрыву в условиях интенсивной механической обработки. Интересно отметить, что макромолекулы АГ с  $MM \approx 9$  кДа также являются основным продуктом химической деструкции АГ из канадской лиственницы [9].

Из таблицы также следует, что в “мягких” условиях механической обработки можно практически избежать механодеструкции исследуемых полисахаридов. По нашему мнению, именно эти условия механической обработки в большинстве случаев являются предпочтительными, так как с точки зрения перспектив использования изученных композиций в составе БАД и лекарственных средств, в технологических процессах их приготовления желательно избегать заметного изменения молекулярно-массовых характеристик полимерных материалов, так как в противном случае могут потребоваться дополнительные испытания и стандартизация продуктов. Однако использование имеющихся ротационных мельниц с энергонапряженностью  $1g$  ограничивает производительность процесса наработки материала несколькими килограммами в час. Увеличить производительность возможно при использовании “проточных” мельниц непрерывного действия. В ИХТТМ СО РАН разработан ряд таких виброцентробежных мельниц, отличающихся размерами и производительностью. Это дополнительное преимущество такого режима механической обработки [10].

В результате токсикологических исследований механообработанных полисахаридов показано, что однократное внутрижелудочное их введение в дозах от 500 до 6000 мг/кг гибели животных не вызывало. Внешний вид, поведение и состояние опытных животных соответствовало фоновым показателям во всем диапа-

зоне доз. У животных не отмечено статистически значимых изменений температуры тела по сравнению с контролем, прирост массы тела был равномерным во всех группах. Введение всех полисахаридов не оказывало существенного влияния на состояние центральной нервной системы опытных животных. В результате патоморфологического анализа, проведенного после вскрытия мышей через 14 сут после введения полисахаридов, не было выявлено патологических изменений органов грудной и брюшной полости. Для всех полисахаридов среднесмертельная доза (ЛД<sub>50</sub>) составила больше 6000 мг/кг при однократном внутривенном введении мышам.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Н. К. Барамбойм, *Механохимия высокомолекулярных соединений*, Химия, Москва (1978).

2. Е. С. Метелева, А. В. Душкин, Т. Г. Толстикова и др., *Известия РАН, Сер. хим.*, № 6, 1274 – 1282 (2008).
3. Патент РФ № 2256668; *Бюл. изобрет.*, № 20 (2005).
4. Е. Н. Медведева, В. А. Бабкин, О. А. Макаренко и др., *Химия растит. сырья*, № 4, 17 – 23 (2004).
5. С. Р. Рафиков, С. А. Павлова, И. И. Твердохлебова, *Методы определения молекулярных весов и полидисперсности высокомолекулярных соединений*, Издательство академии наук СССР, Москва (1963), сс. 7 – 20.
6. М. Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Медгиз, Ленинград (1963), сс. 152.
7. В. И. Евсеенко, А. В. Душкин, Е. С. Метелева и др., *Тез. докл. VIII всероссийск. конф.*, Уфа (2010), сс. 163 – 164.
8. Norman Grassie and Gerald Scott, *Cambridge University Press*, 201 – 207 (1985).
9. James H. Prescott, Philip Enriquez, Chu Jung, et al., *Carbohydrate Res.*, № 278, 113 – 128 (1995).
10. А. В. Душкин, *Дис. доктора хим. наук*, Новосибирск (2005).

Поступила 27.07.11

## GEL-PENETRATION CHROMATOGRAPHY AND TOXICOLOGICAL STUDY OF MECHANOCHEMICAL TRANSFORMATIONS OF WATER-SOLUBLE POLYSACCHARIDES

A. V. Dushkin<sup>1</sup>, E. S. Meteleva<sup>1</sup>, T. G. Tolstikova<sup>2</sup>, A. V. Pavlova<sup>2</sup>, and M. V. Khvostov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia;

<sup>2</sup> Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Changes in the molecular mass characteristics of a series of macromolecular polysaccharides including arabinogalactan (from larch), HES 200/0.5, fibregam, and dextrans 10, 40 and 70 during mechanochemical treatment have been studied. Results justify “soft” conditions of mechanical treatment (~1g), which does not lead to degradation of macromolecules. An additional advantage of such processing conditions is the possibility of scaling them to industrial flow mill. The mechanochemical treatment had no negative effects on the toxicity parameters of polysaccharides studied. Toxicological studies of processed arabinogalactan, HES 200/0.5, fibregam, and dextrans 10, 40 and 70 showed that these polysaccharides and their products of mechanochemical treatment can be attributed to class 4 low-toxicity substances.

**Key words:** Polysaccharides, mechanochemistry, molecular weight distribution, gel-penetration chromatography, toxicity