

**ВПЛИВ МОДИФІКУВАННЯ ПОВЕРХНІ КРЕМНЕЗЕМУ
ПОЛІСАХАРИДАМИ НА ЙОГО СОРБЦІЙНУ ЗДАТНІСТЬ
ПО ВІДНОШЕННЮ ДО РУТОЗИДУ ВЕНОРУТОНУ**

**Т.В. Кулик¹, Т.В. Подуст¹, Б.Б. Паляниця¹, Л.Р. Азізова¹, М.І. Терець¹,
В.М. Барвінченко¹, Л.І. Михаловська²**

¹*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України,
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна*

²*Університет Брайтону, Школа фармації та біомолекулярних наук,
Брайтон, BN2 4GJ Великобританія*

Методом мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням визначено ізомерний склад рутозидів венорутону. Отримано ізотерми адсорбції венорутону на поверхні кремнезему та кремнезему, модифікованого хітозаном та декстраном. Знайдено, що адсорбційна здатність щодо венорутону зростає в ряду SiO₂-декстран < SiO₂-хітозан < кремнезем. Трикомпонентні матеріали на основі кремнезему, полісахаридів та венорутону були досліджені методами ІЧ-спектроскопії, температурно-програмованої десорбційної мас-спектрометрії та електронної спектроскопії в УФ та видимій областях. Встановлено, що на поверхні хітозан-кремнеземного сорбенту венорутон адсорбується як на гідроксильованих ділянках поверхні, так і на полімерних ланцюгах хітозану, а на поверхні кремнезему, модифікованій декстраном – лише на гідроксильованих ділянках.

Вступ

Венорутон (О-(β-гідроксиетил)-рутозида) вже понад 30 років широко використовується у кардіохірургії та фармації як ангіопротекторний засіб для зміцнення стінок капілярів, лікування варикозу вен. Він може бути застосований внутрішньовенно, перорально або аплікаційно [1]. Венорутон проявляє протизапальовальну та протинабрякову дію. Проявляє Р-вітамінну активність, підвищує тонус судин та зміцнює їх стінки. Зменшує проникність та ламкість капілярів. Знижує запалення стінки судини, обмежуючи прилипання тромбоцитів до її поверхні [1–3]. Відомо, що флавоноїди здатні зміцнювати клітинну мембрану та знижувати її проникність, що дозволяє попереджувати розповсюдження інфекцій, вірусів між клітинами живого організму у ході запального процесу [4]. Встановлено, що рутозида проявляють антиоксидантні властивості [5]. На сьогоднішній день проводяться активні дослідження механізму зниження проникності клітинної мембрани під впливом флавоноїдів, зокрема дослідження взаємодії флавоноїдів з біополімерами [4].

Модифіковані полісахаридами наноматеріали є перспективними для розробки препаратів пролонгованої дії та як носії лікарських засобів [6]. Передбачається, що трикомпонентні матеріали на основі кремнезему, полісахаридів та лікарської речовини зможуть вдало поєднувати цінні фізико-хімічні та біологічні властивості кожної з трьох компонент і можуть бути перспективними як препарати комбінованої дії, трансдермальні лікарські засоби, аплікаційні матеріали для лікування трофічних виразок тощо. Зокрема, полісахариди відзначаються своєю біосумісністю, а хітозан має гемостатичні, регенеруючі та ранозагоювальні властивості. Дослідження взаємодії венорутону з поверхнею гідроксильованого та модифікованого полісахаридами кремнезему важливе для розуміння процесів взаємодії оксирутинів з різноманітними поверхнями, в тому числі і з поверхнями біооб'єктів.

Оскільки адсорбційні дані надають можливість кількісно порівняти сорбційну здатність модифікованих матеріалів, то комплементарне застосування таких методів як

ТПД МС, ІЧ- та електронна спектроскопія дозволить на молекулярному рівні встановити, яким чином окремі компоненти взаємодіють між собою. З огляду на те, що венорутон – це суміш напівсинтетичних флавоноїдів моно-, ди-, три-, та тетрагідроксиетилрутозидів, доцільним є використання мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням, яке дозволить оцінити вміст окремих компонент суміші.

Отже, метою роботи було встановлення впливу модифікування поверхні кремнезему полісахаридами на його сорбційну здатність по відношенню до рутозидів венорутону, спрямоване на створення наукового підґрунтя для розробки складних композитних систем за участю кремнезему, полісахаридів та активної субстанції венорутону.

Експериментальна частина

Матеріали. В роботі були використані високодисперсний кремнезем (SiO₂, ГОСТ 14922-77, що є субстанцією для виробництва лікарського препарату «Силіксу») виробництва Калуського дослідно-експериментального заводу ІХП ім. О.О. Чуйка НАН України; лабораторні зразки високодисперсного кремнезему, модифікованого хітозаном (SiO₂-хітозан, вміст полімеру 60 мг/г) та декстраном (SiO₂-декстран, вміст полімеру 180 мг/г) та венорутон виробництва Novartis Consumer Health (Швейцарія).

Методи. Електроспрей мас-спектрометрія. Для мас-спектрометричного аналізу з іонізацією електророзпиленням використовували водно-метанольний (1:1) розчин венорутону з концентрацією аналіту 0,2 μмоль/л. Вимірювання проводили на приладі ESI TOF MS (Bruker Daltonics, Германия) у режимі реєстрації позитивно заряджених іонів.

Температурно-програмована десорбційна мас-спектрометрія (ТПД МС). ТПД МС дослідження проводили на монопольному мас-спектрометрі МХ-7304А (Суми, Україна) з іонізацією електронами, переобладнаному для проведення термодесорбційних вимірювань. Методика ТПД МС експерименту детально описана в роботах [7–10]. Зразок масою 0,1–20 мг поміщували на дно кварц-молібденової кювети і до початку експерименту відкачували при кімнатній температурі до тиску ~ 5·10⁻⁵ Па. Програмований лінійний нагрів зразка проводили зі швидкістю 10 °С/хв до температури ~ 750 °С. Леткі продукти термолізу через високовакуумний вентиль діаметром 5,4 мм напряду поступали в іонізаційну камеру мас-спектрометра, іонізувались та фрагментувались під дією електронів; після розділення за масами у мас-аналізаторі інтенсивність іонного струму продуктів десорбції та термолізу реєструвалась вторинно-електронним помножувачем ВЕП-6. Реєстрація та аналіз мас-спектрів проводився автоматизованою системою реєстрації та обробки даних на базі комп'ютера. Реєстрація мас-спектрів проводилися у діапазоні 1 – 210 а.е.м., впродовж ТПД МС експерименту записували близько 240 мас-спектрів.

Електронна спектроскопія в видимій та УФ-області. Електронні спектри в видимій та УФ-області реєстрували у діапазоні довжин хвиль (λ) 200 – 900 нм на спектрометрі Specord M-40 (Carl Zeiss, Йена, Германия). Для розчинів записували спектри у режимі пропускання; для порошків – у режимі дифузного відбиття.

ІЧ-спектроскопія. ІЧ-спектри поглинання в області 4000–400 см⁻¹ реєстрували на спектрометрі з Фур'є перетворенням Thermo Nicolet NEXUS. Спектри записували з роздільною здатністю 4 см⁻¹. Для якісної оцінки зразків використовували наважки зразків масою ~ 100–200 мг і записували ІЧ-спектри у режимі дифузного відбиття.

Результати і обговорення

Оксирутини близькі за своєю будовою до природного флавоноїду рутину. На відміну від рутину гідроксильні групи венорутону частково чи повністю заміщені на гідроксиетильні. Таким чином вдається знизити гідрофобні властивості флавоноїду та

значно підвищити його розчинність у воді. Венорутон (троксерутин) – це стандартизована суміш напівсинтетичних флавоноїдів моно-, ди-, три-, та тетрагідроксиетилрутозидів (рис. 1). Головним компонентом у суміші є 3',4',7-три-О-(β-гідроксиетил)-рутозид (M_r=742,6 а.о.м.).

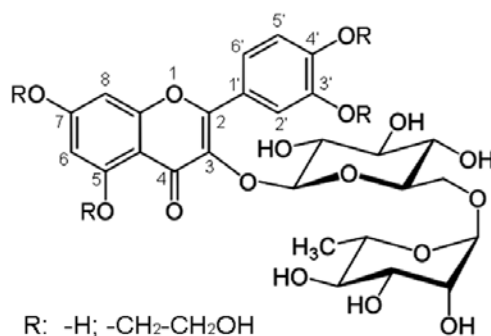


Рис. 1. Структурна формула венорутону.

Методом електроспрей мас-спектрометрії було проведено аналіз венорутону. Для аналізу використовували водно-метанольний розчин венорутону з концентрацією аналіту 0,2 μмоль/л. Вимірювання проводили у режимі реєстрації позитивних іонів. У мас-спектрі спостерігається найбільш інтенсивний пік з m/z 765, який відповідає молекулярному іону тригідроксиетилрутозиду (три-ГЕР), катіонованому натрієм ($[M+Na]^+$) (рис. 2.). Також присутні піки з m/z 721 та 809, що утворюються внаслідок катіонування натрієм молекулярних іонів дигідроксиетилрутозиду (ди-ГЕР) $[M_1+Na]^+$ та тетрагідроксиетилрутозиду (тетра-ГЕР) $[M_2+Na]^+$ відповідно. Піки з m/z 391, 435 та 479 утворюються внаслідок фрагментації ди-, три- та тетрагідроксиетилрутозидів відповідно в результаті відщеплення від гідроксиетилрутозидів (ГЕР) дисахариду рутинози (Рут). Згідно [11] дисоціація гідроксильних груп глікозидів флавоноїдів відбувається у послідовності 7-ОН>4'-ОН>3'-ОН>5-ОН. Оскільки ди-ГЕР мають гідроксильну групу у положенні 7, 3' або 4', то вони мають найвищі протондонорні властивості серед ізомерів венорутону (рис. 2.). Найнижчі протондонорні властивості гідроксильної групи у положенні 5 (ди-ГЕР та три-ГЕР) пояснюються участю цієї групи в утворенні внутрішньомолекулярного водневого зв'язку з карбонільною групою в положенні 4 (рис. 2.). За співвідношенням інтенсивності піків з m/z 721, 765 та 809 було розраховано вміст кожного ГЕР (табл. 1.). Показано, що головним компонентом суміші є три-ГЕР, вміст якого складає 67%. Вміст ди-ГЕР та тетра-ГЕР складає 19,5 та 13,5% відповідно. Співвідношення ди-ГЕР:три-ГЕР:тетра-ГЕР у венорутоні становить 0,29:1:0,2.

Таблиця 1. Вміст гідроксиетилрутозидів у венорутоні за даними електроспрей мас-спектрометрії.

ГЕР	m/z	Співвідношення	Вміст ГЕР, %
ди-ГЕР	721 $[M_1+Na]^+$	0,29	19,5
три-ГЕР	765 $[M+Na]^+$	1	67
тетра-ГЕР	809 $[M_2+Na]^+$	0,2	13,5

Адсорбцію ангіопротектора венорутону вивчали на поверхні вихідного та модифікованого полісахаридами високодисперсного кремнезему. Модифікований полісахаридами кремнезем був отриманий методом рівноважної адсорбції. Як сорбенти використовували кремнезем; кремнезем, модифікований хітозаном ($S_{\text{ВЕТ}}=266 \text{ м}^2/\text{г}$,

вміст хітозану 60 мг/г) та кремнезем, модифікований декстраном ($S_{\text{ВЕТ}}=235 \text{ м}^2/\text{г}$, вміст декстрану 180 мг/г).

При кількості хітозану на поверхні $\sim 60 \text{ мг/г}$, що відповідає плато на ізотермі адсорбції, безпосередньо зв'язані з поверхнею близько 10 % піранозних циклів полісахариду, тобто – 90 % піранозних циклів знаходяться на поверхні у вигляді петель і хвостів і є доступними для подальшої взаємодії [12]. Адсорбований хітозан міцно утримується на поверхні кремнезему. Дослідженням десорбції було встановлено, що при п'ятикратній заміні розчинника на поверхні кремнезему утримується понад 83 % адсорбованого полісахариду [13].

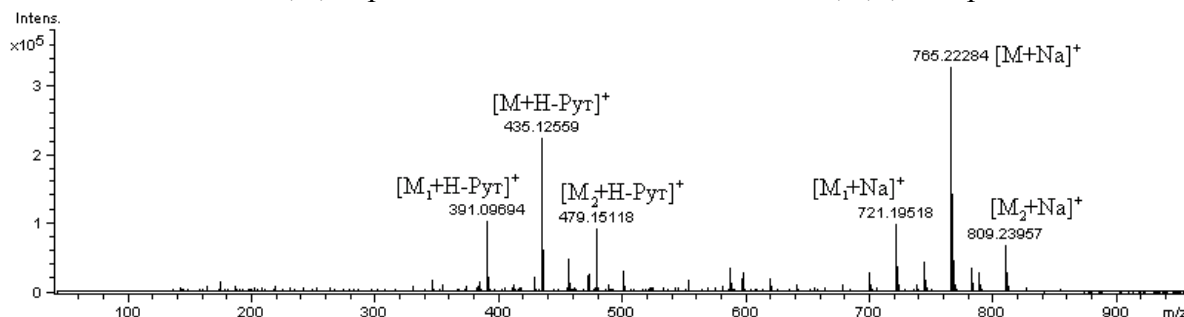
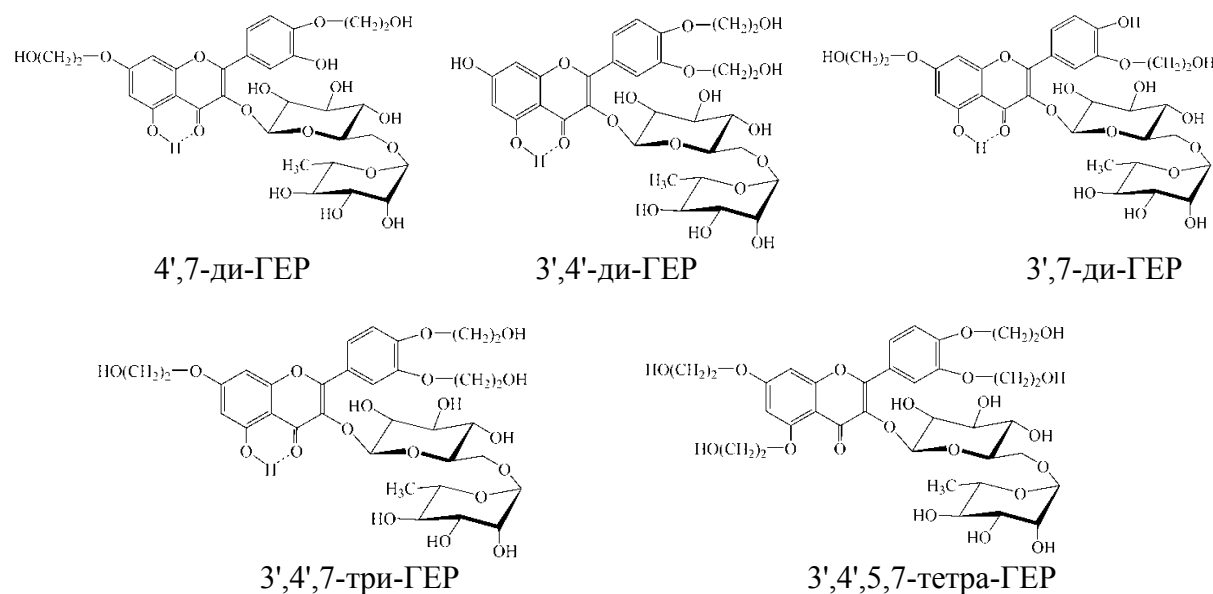


Рис. 2. Мас-спектр позитивних іонів венорутону, що утворилися внаслідок іонізації електророзпиленням ($C_{\text{венор.}}=0,2 \text{ моль/л}$; $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}=1:1$).

Адсорбцію венорутону з водних розчинів вивчали в статичних умовах. Для цього наважку сорбенту (0,1 г) заливали розчином венорутону (10 мл), перемішували і витримували при періодичному перемішуванні до встановлення адсорбційної рівноваги (при 20 °С). Попередньо було визначено, що адсорбційна рівновага встановлюється за 2 год. Після адсорбції суспензії центрифугували (8000 об/хв, 20 хв), здекантовували, а модифіковані зразки сушили при кімнатній температурі. Рівноважну концентрацію венорутону в розчині визначали спектрофотометрично (спектрофотоелектроколориметр КФК-3) при довжині хвилі $\lambda=340 \text{ нм}$ ($l=0,5 \text{ см}$), використовуючи калібрувальну криву. Величину адсорбції A (моль/г) розраховували за різницею концентрацій вихідного та рівноважного розчинів. Отримані ізотерми адсорбції венорутону з водного розчину на гідроксильованій та модифікованій полісахаридами поверхні кремнезему за класифікацією Джайлса відносяться до L-типу (рис. 3). Розраховано фізико-хімічні параметри адсорбції венорутону на поверхні кремнезему

($A_{\infty}=7,5$ $\mu\text{моль/г}$, $K=8,8 \times 10^3$ л/моль, $-\Delta G=21$ кДж/моль), на поверхні модифікованого хітозаном кремнезему ($A_{\infty}=5,3$ $\mu\text{моль/г}$, $K=6 \times 10^3$ л/моль, $-\Delta G=20$ кДж/моль) та на поверхні модифікованого декстраном кремнезему ($A_{\text{макс}}=0,8$ $\mu\text{моль/г}$). Як видно з даних, наведених в табл. 2, найвища адсорбція венорутону спостерігається на гідроксильованій поверхні кремнезему, найнижча – на модифікованій декстраном. Модифікування поверхні кремнезему хітозаном приводить до зниження величини граничної адсорбції венорутону \sim на 30 %, а модифікування декстраном \sim на 90 %, порівняно з гідроксильованою поверхнею (табл. 2). Для досліджень було взято кремнезем з ступенем покриття поверхні декстраном \sim 70% від моношару. Для такого зразка величина граничної адсорбції венорутону складає \sim 10% від величин адсорбції на гідроксильованій поверхні. Імовірно, венорутон адсорбується на ділянках поверхні кремнезему, не захищених полімерними ланцюгами декстрану, і не сорбується на поверхні покритій полісахаридом.

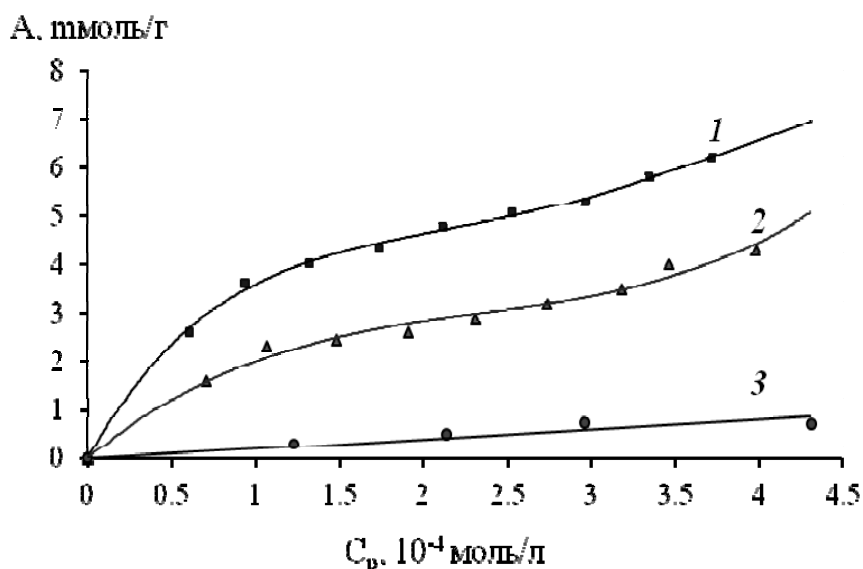


Рис. 3. Ізотерми адсорбції венорутону з водного розчину: 1 – на кремнеземі, 2 – на модифікованому хітозаном кремнеземі ($A_{\text{ХТЗ}}=60$ мг/г), 3 – на модифікованому декстраном кремнеземі ($A_{\text{декстр.}}=180$ мг/г).

Таблиця 2. Фізико-хімічні параметри адсорбції венорутону на гідроксильованій та модифікованій хітозаном поверхні кремнезему.

Зразок	A , $\mu\text{моль/г}$	K , л/моль	$-\Delta G$, кДж/моль	R^2
SiO_2	7,5	$8,8 \times 10^3$	21	0,98
SiO_2 -хітозан	5,3	6×10^3	20	0,95
SiO_2 -декстран	0,8	–	–	–

Для ІЧ-спектрофотометричних, мас-спектрометричних досліджень та реєстрації електронних спектрів у режимі дифузного відбиття були використані зразки венорутону в конденсованому стані; венорутону, адсорбованого на поверхні кремнезему ($A_{\text{венор}}=6,3$ $\mu\text{моль/г}$), модифікованого хітозаном кремнезему ($A_{\text{венор}}=5,0$ $\mu\text{моль/г}$) та модифікованого декстраном кремнезему ($A_{\text{венор}}=0,8$ $\mu\text{моль/г}$). ІЧ-спектри реєстрували в режимі дифузного відбиття для зразків, попередньо розтертих в агатовій ступці. В ІЧ-спектрах зразків венорутону, іммобілізованого методом рівноважної адсорбції на поверхні вихідного та модифікованого хітозаном кремнезему, зафіксовано характеристичні смуги поглинання коливань зв'язків γ -піронового кільця 1435, 1454, 1497, 1512 см^{-1} (рис. 4).

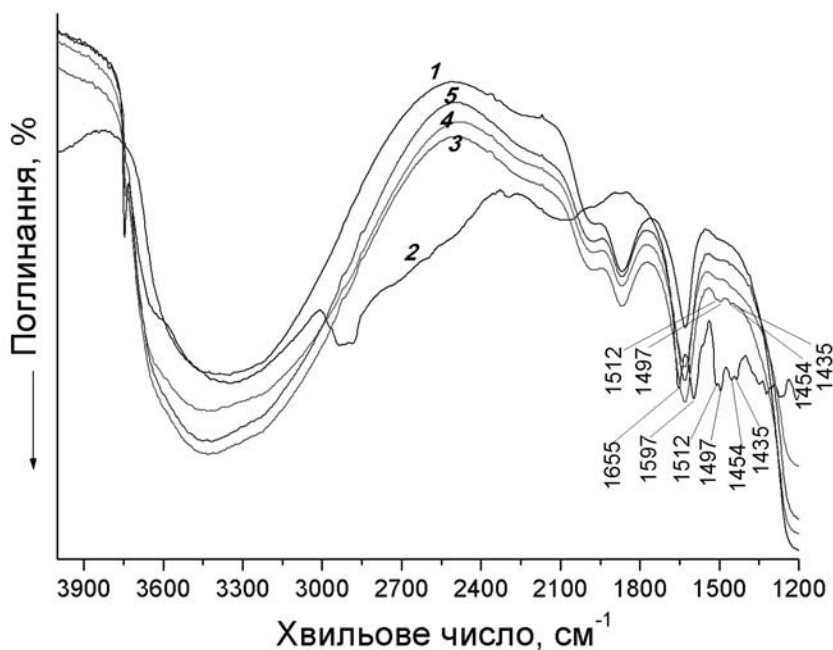


Рис. 4. ІЧ-спектри кремнезему (1), венуротону (2), венуротону, адсорбованого на поверхні кремнезему (3, $A_{\text{венор.}}=6,3$ $\mu\text{моль/г}$), модифікованого хітозаном кремнезему (4, $A_{\text{венор.}}=5,0$ $\mu\text{моль/г}$) та модифікованого декстраном кремнезему (5, $A_{\text{венор.}}=0,8$ $\mu\text{моль/г}$).

Методом ТПДМС досліджено термоліз зразків венуротону в конденсованому стані та адсорбованому на поверхні гідроксильованого і модифікованого хітозаном та декстраном кремнезему. Молекула венуротону складається з вуглеводної частини (рутинози) та хромонового ядра. Відповідно і термоліз перебігає в двох основних температурних діапазонах, що відповідають розкладу вуглеводного залишку $T_{\text{макс}}=230$ $^{\circ}\text{C}$ і аглікону $T_{\text{макс}}=370$ $^{\circ}\text{C}$ (рис. 5.). Раніше встановлено [14], що термічний розклад вуглецевого скелету хроному молекул венуротону відбувається за трьома основними напрямками, що відповідають термічному розкладу кілець А, В і С біофлаваноїдів. В мас-спектрах та на термограмах при термолізі венуротону спостерігаються фрагменти деструкції бензанельованого γ -пірону, що характеризуються такими масовими числами: тип А – 178, 164, 150, 137, 136, 108, 91 а.о.м., тип В – 141, 123, 112, 111, 96, 95 а.о.м.; тип С – 109, 110, 111 а.о.м. Крім того, присутність вуглеводного замісника в молекулі венуротону, призводить до появи ще одної стадії термолізу – розкладу вуглеводного замісника з виділенням в молекулярній формі γ -пірону, що характеризується присутністю в мас-спектрах ліній з m/z : 126, 97, 110.

На термограмах, що відповідають термолізу венуротону в конденсованому стані, розклад аглікону характеризують термодесорбційні криві з m/z 178, 164, 150 та 135, а розкладу вуглеводного залишку відповідають термодесорбційні криві з m/z 144, 126, 110, 97 та 72 (рис. 5.). Для аналізу термолізу зразків венуротону, адсорбованого на поверхні гідроксильованого та модифікованого полісахаридами кремнезему, були обрані характерні лінії в мас-спектрах, які відповідають термолізу вуглеводної частини флавоноїду – m/z 126, та термолізу вуглецевого скелету його хроному (бензанельованого γ -пірону) – m/z 150, 149, 137. Іонний фрагмент з m/z 126 відповідає термолізу вуглеводного залишку молекули венуротону (рутинози, $T_{\text{макс}}=130$ $^{\circ}\text{C}$) та термолізу декстрану ($T_{\text{макс}}=320$ $^{\circ}\text{C}$). Іонний фрагмент з m/z 107 характерний для термолізу хітозану.

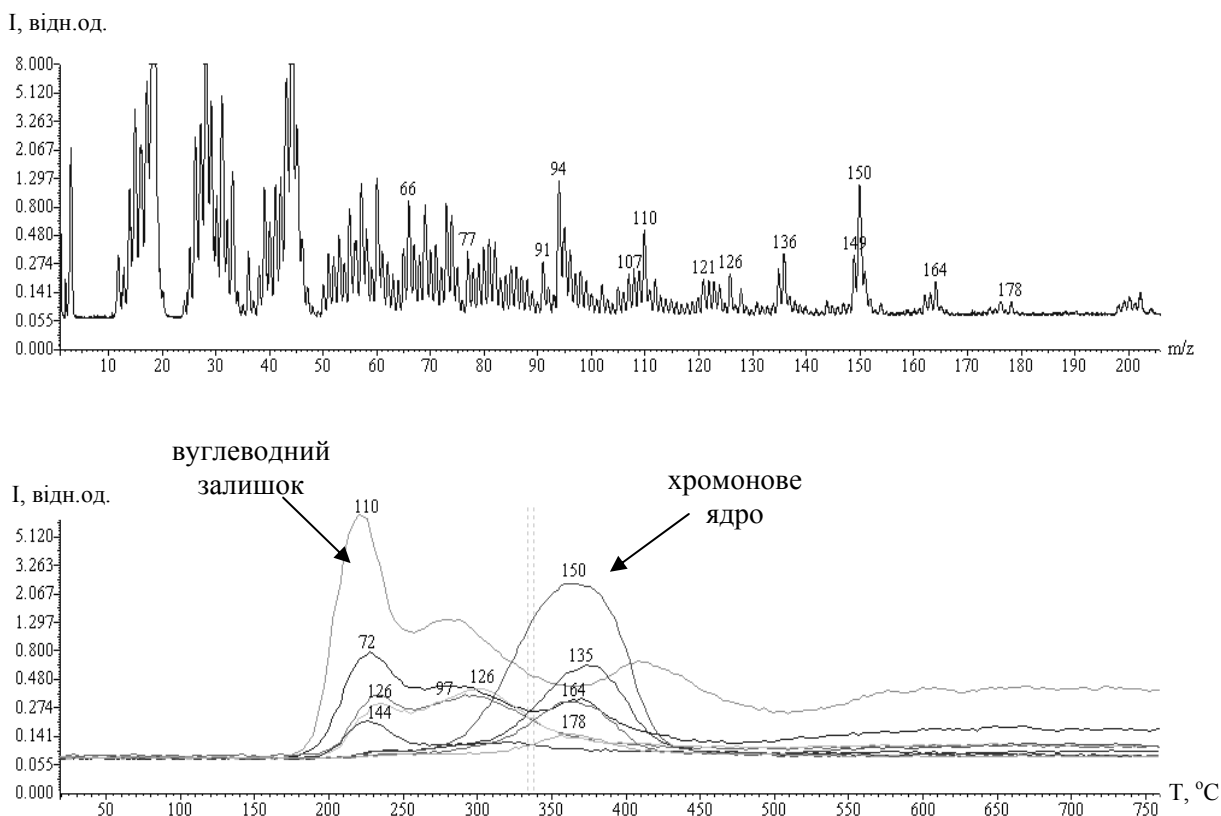


Рис. 5. Термоліз венорутону: мас-спектр при температурі 340 °С та термодесорбційні криві для m/z 178, 164, 150, 135 (хромонове ядро) та m/z 144, 126, 97, 110, 72 (вуглеводний залишок).

На гідроксильованій та модифікованій декстраном поверхні кремнезему термоліз венорутону проходить у одному низькотемпературному інтервалі з максимумом швидкості виділення летких продуктів термолізу при $T_{\text{макс}} \approx 130$ °С (рис. 6, рис. 7). В цьому інтервалі спостерігаються продукти деструкції вуглеводної частини (m/z 126) та хромонового ядра (m/z 150, 149, 137). Максимум швидкості термолізу вуглеводного залишку зсувається в низькотемпературну область на 100 °С, а хромонового ядра – на 240 °С порівняно з конденсованим станом (рис. 6, рис. 7). На модифікованій хітозаном поверхні кремнезему термоліз венорутону відбувається в двох діапазонах, які відповідають розкладу на гідроксильованій поверхні з $T_{\text{макс}} \approx 130$ °С та розкладу на полімерних ланцюгах $T_{\text{макс}} \approx 340\text{--}350$ °С (рис. 8).

Імовірно, венорутон на модифікованому декстраном кремнеземі адсорбується лише на гідроксильованих ділянках, не захищених ланцюгами полімеру, і не сорбується на полімері. На модифікованій хітозаном поверхні венорутон адсорбується, очевидно, як на гідроксильованих ділянках, так і на полімерних ланцюгах.

Було розраховано енергію активації термічних перетворень венорутону на гідроксильованій та модифікованій полісахаридами поверхні за наближеною формулою Редхеда [15]. Виявлено значне зниження енергії активації процесу термодесорбції венорутону з поверхні кремнезему (84 кДж/моль) порівняно з термолізом венорутону в конденсованому стані (вуглеводний замісник – 105 кДж/моль, аглікон – 134 кДж/моль). Термічна стабільність агліконового фрагменту, адсорбованого на полімерних ланцюгах хітозан-кремнеземного адсорбенту, порівняно з конденсованим станом зменшилася (127 кДж/моль), натомість стабільність вуглеводного фрагменту зросла (127 кДж/моль) (табл. 3).

Для УФ-спектроскопічних досліджень були використані водні розчини венорутону з концентрацією 0,46 ммоль/л ($l=0,1$ см). Кислотність розчинів контролювали з допомогою скляного електроду універсального іономіру И-160М. На рис. 9 наведені електронні спектри поглинання розчинів венорутону при різних значеннях рН. Для таких же розчинів, але з додаванням хітозану, також були зняті спектри поглинання в ультрафіолетовій та видимій областях. Розчин венорутону при рН=6,5 характеризується смугами поглинання з максимумами при $\lambda_{\text{макс1}}=256$ нм та $\lambda_{\text{макс2}}=352$ нм. Відомо, що молекулярна форма кверцетину у водно-етанольних розчинах має смугу поглинання з $\lambda_{\text{макс}}=367$ нм (рН=4,9), дианіонна – $\lambda_{\text{макс}}=389$ нм (рН=9,0), трианіонна – $\lambda_{\text{макс}}=414$ нм (рН=13,0) [16]. При переході до аніонних форм кверцетину відбувається батохромний зсув смуги поглинання. Розчин венорутону при рН=6,5 характеризується смугами поглинання з максимумами при $\lambda_{\text{макс1}}=256$ нм, $\lambda_{\text{макс2}}=352$ нм, що відповідають молекулярній формі флавоноїду. Розчини венорутону при рН=10,5 та при рН=12,8 характеризується смугами поглинання з максимумами при $\lambda_{\text{макс1}}=265$ нм, $\lambda_{\text{макс2}}=358$ нм та $\lambda_{\text{макс2}}=370$ нм відповідно. Отже, для розчину венорутону при зростанні основності середовища при рН=10,5 та при рН=12,8 спостерігаємо батохромний зсув смуги поглинання $\lambda_{\text{макс2}}$ на 9 нм та 18 нм відповідно (рис. 12, табл. 4), що свідчить про появу аніонних форм ізомерів венорутону, очевидно за рахунок ди-ГЕР (4',7-ди-ГЕР, 3',4'-ди-ГЕР та 3',7-ди-ГЕР).

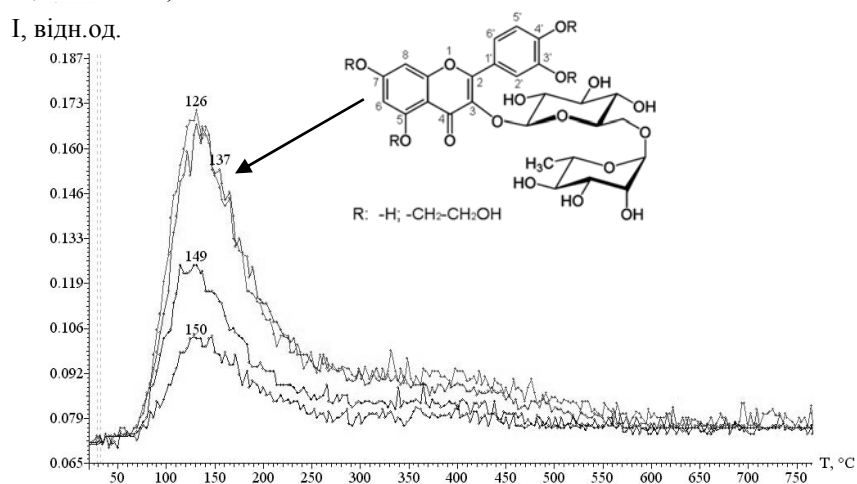


Рис. 6. Термоліз венорутону на поверхні кремнезему.

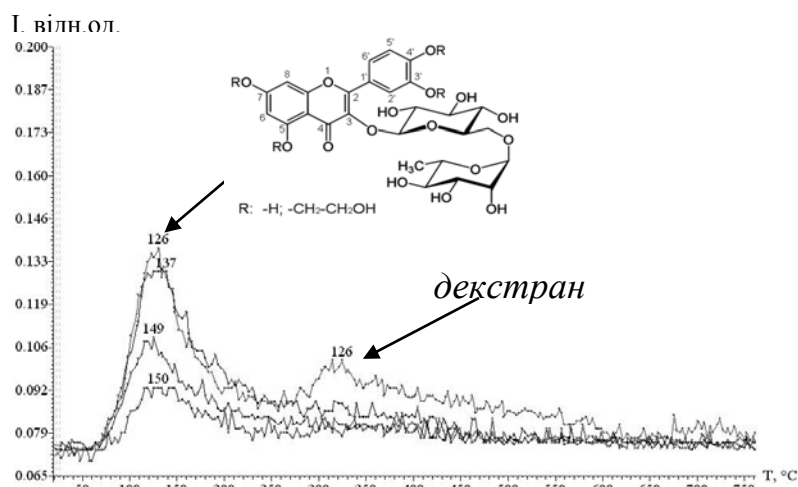


Рис. 7. Термоліз венорутону на поверхні кремнезему, модифікованого декстраном.

Таблиця 3. Енергії активації термічного розкладу венорутону та венорутону, адсорбованого на поверхні вихідного і модифікованого полісахаридами кремнезему.

Зразок	Структурний фрагмент	m/z	$T_{\text{макс}}, ^\circ\text{C}$	E^\ddagger , кДж · моль ⁻¹
Венорутон	вуглеводний замісник	126	230	105
	аглікон	150	370	134
SiO ₂ -венорутон	вуглеводний замісник	126	130	84
	аглікон	150	130	84
SiO ₂ -декстран-венорутон	вуглеводний замісник	126	130	84
	аглікон	150	130	84
SiO ₂ -хітозан-венорутон	вуглеводний замісник	126	130	84
	аглікон	150	130	84
	вуглеводний замісник	126	340	127
	аглікон	150	340	127

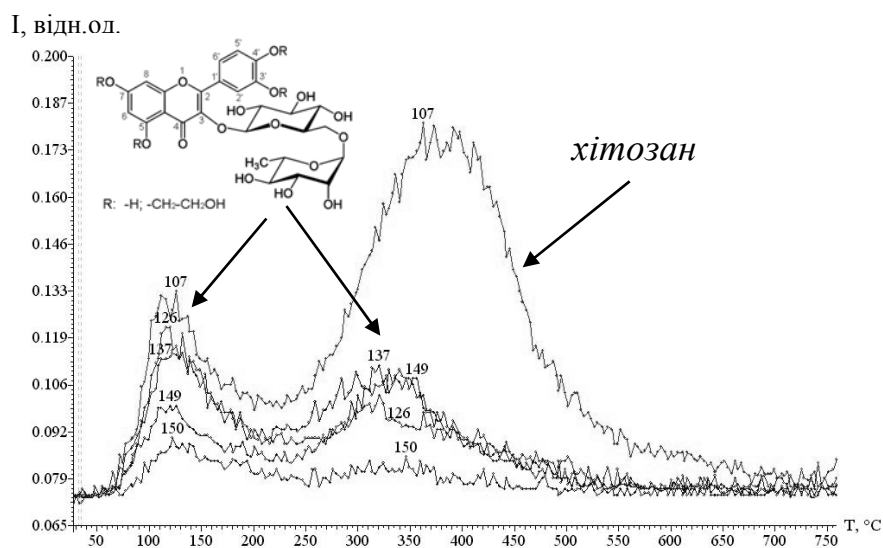


Рис. 8. Термоліз венорутону на поверхні кремнезему, модифікованого хітозаном.

На рис. 10 приведені електронні спектри в УФ та видимій областях для розчинів венорутону з хітозаном при різних значеннях рН. У присутності полісахариду в лужному середовищі також спостерігається батохромний зсув смуг поглинання (табл. 4). Отже, у присутності хітозану при зростанні основності середовища вище рН=10 також відбувається поява аніонних форм ди-ГЕР.

Було отримано зразки кремнезему та кремнезему, модифікованого хітозаном, з адсорбованим венорутонном. Адсорбцію проводили з розчинів з різним значенням рН середовища. На рис. 11 приведені електронні спектри дифузного відбиття для порошків кремнезему та модифікованого хітозаном кремнезему з адсорбованим венорутонном. Для всієї серії зразків спостерігаємо два максимуми поглинання при $\lambda_{\text{макс1}}=261$ нм та $\lambda_{\text{макс2}}=361$ нм, які свідчать про те, що флавоноїд адсорбується в молекулярній формі.

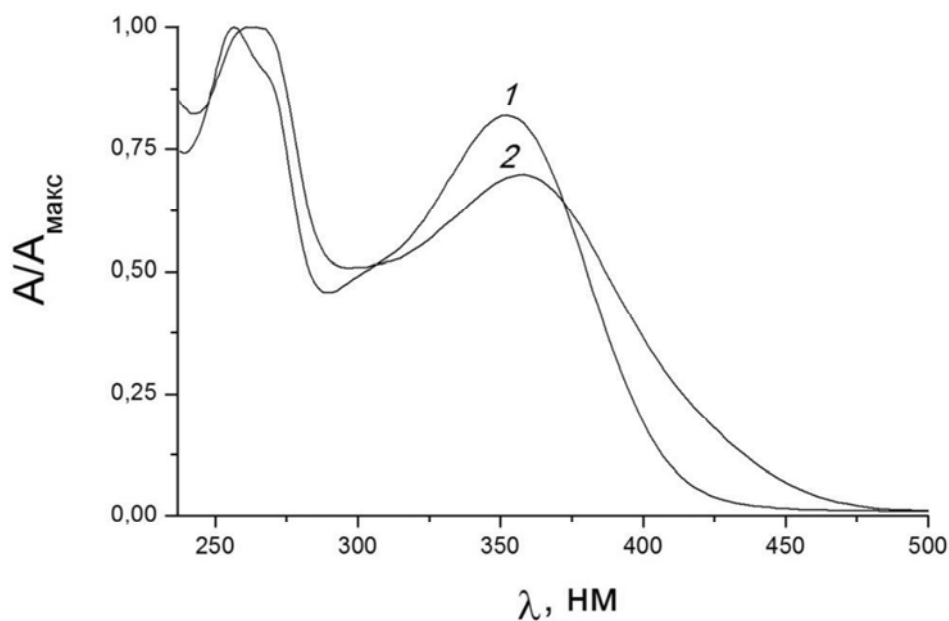


Рис. 9. Нормовані електронні спектри в УФ та видимій області розчину венорутону ($C_{\text{венор.}}=0,46$ ммоль/л) при рН=6,5 (1) та при рН=10,5 (2).

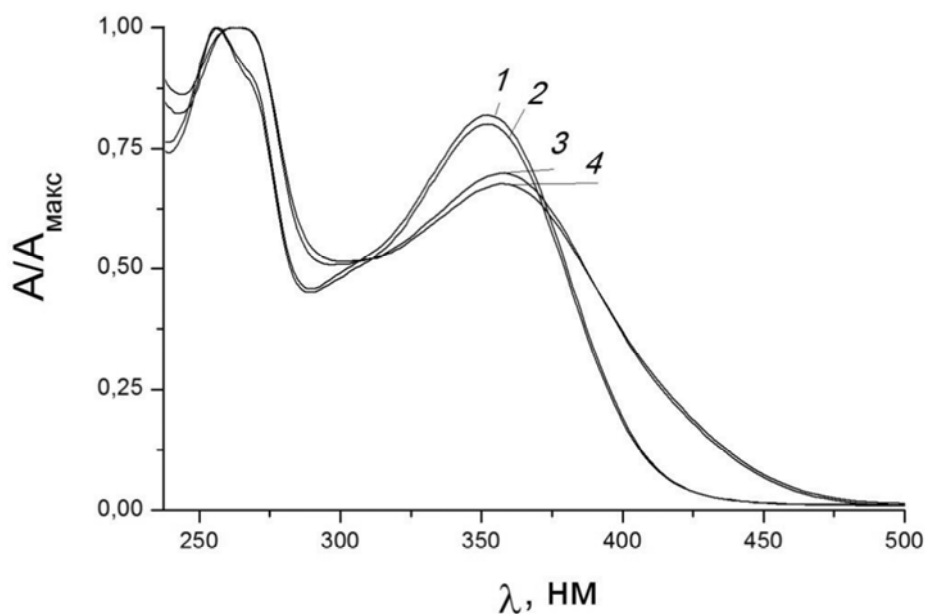


Рис. 10. Нормовані електронні спектри в УФ та видимій області розчину венорутону ($C_{\text{венор.}}=0,46$ ммоль/л) при рН=6,5 (1) та при рН=10,5 (3) та розчину венорутону з хітозаном ($C_{\text{ХТЗ}}=0,2$ мг/мл, $C_{\text{венор.}}=0,46$ ммоль/л) при рН=6,5 (2) та при рН=10,5 (4).

Очевидно, адсорбція рутозидів венорутону у молекулярній формі головним чином відбувається за рахунок три-ГЕР та тетра-ГЕР. Для венорутону на поверхні хітозан-кремнеземного сорбенту в електронних спектрах спостерігаємо плече в області 440 нм, що свідчить про присутність іонізованої форми венорутону. Це може бути свідченням того, що адсорбція венорутону на поверхні кремнезему відбувається в молекулярній формі, а на полімерних ланцюгах – в іонізованій формі за рахунок ди-ГЕР (рис. 11, рис. 12).

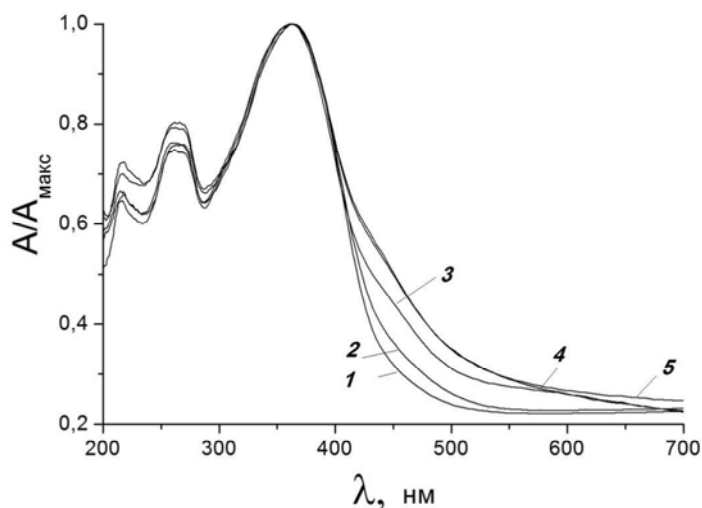


Рис. 11. Електронні спектри дифузного відбиття в УФ та видимій областях, нормовані до $\lambda_{\text{макс}}$: 1 – SiO₂-венорутон (з pH=5,8); 2 – SiO₂-венорутон (з pH=7,2); 3 – SiO₂-хітозан-венорутон (з pH=3); 4 – SiO₂-хітозан-венорутон (з pH=6,5); 5 – SiO₂-хітозан-венорутон (з pH=8,4).

В той же час на поверхні сорбенту кремнезем-хітозан венорутон сорбується на незахищеній полімерними ланцюгами поверхні кремнезему у молекулярній формі, що підтверджується присутністю у в спектрах дифузного відбиття смуги поглинання $\lambda_{\text{макс}2}=361$ нм, як і у випадку вихідного кремнезему. Разом з тим реалізується адсорбція аніонних форм ди-ГЕР (4',7-ди-ГЕР, 3',4'-ди-ГЕР та 3',7-ди-ГЕР) за рахунок комплексоутворення між фенольними гідроксильними групами венорутону та аміногрупами хітозану (X-PhO⁻...⁺NH₃R) (рис. 11, рис. 12). Причому на поверхні сорбенту кремнезем-хітозан полісахарид знаходиться в такій формі, яка дозволяє утворювати комплекси аміногруп з фенольними гідроксильними групами венорутону (X-PhO⁻...⁺NH₃R) навіть при кислих значеннях pH.

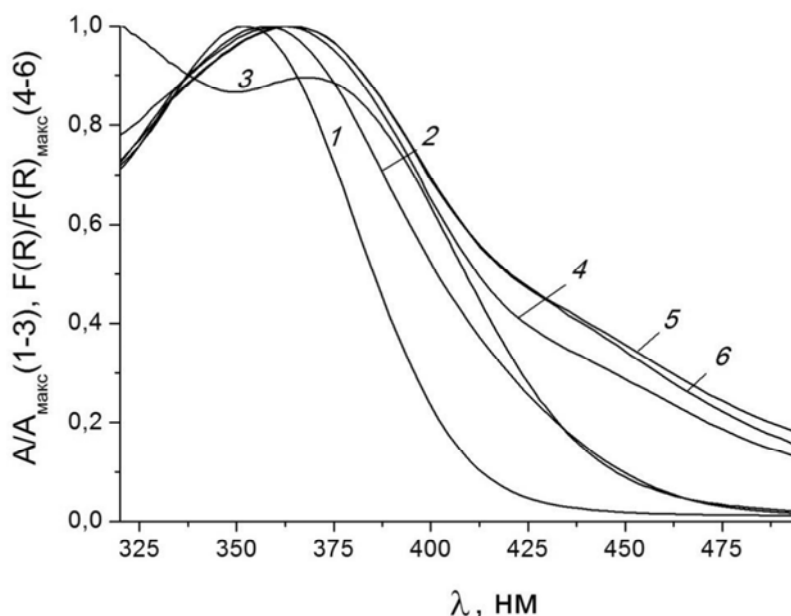


Рис. 12. Нормовані електронні спектри в УФ та видимій областях розчину венорутону ($C_{\text{венор.}}=0,46$ ммоль/л) при pH=6,5 (1), pH=10,5 (2), pH=12,6 (3) та спектри дифузного відбиття для порошоків, отриманих методом рівноважної адсорбції з розчинів при різних значеннях pH: SiO₂-хітозан-венорутон, pH=3 (4), SiO₂-хітозан-венорутон, pH=6,5 (5) та SiO₂-хітозан-венорутон, pH=8,4 (6).

Таблиця 4. Спектральні характеристики розчинів венорутону та венорутону в присутності хітозану в залежності від величини рН.

Зразок	$\lambda_{\text{макс1}}$, нм	$\lambda_{\text{макс2}}$, нм	$\Delta\lambda_{\text{макс2}}$, нм
Р-н венорутону (рН=6,5)	256	352	–
Р-н венорутону (рН=10,5)	265	358	6
Р-н венорутону з хітозаном (рН=6,5)	256	352	–
Р-н венорутону з хітозаном (рН=10,5)	265	358	6
Р-н венорутону з хітозаном (рН=12,6)	–	370	18
Порошок SiO ₂ -венорутон (з рН=5,8)	261	361	9
Порошок SiO ₂ -венорутон (з рН=7,2)	261	361	9
Порошок SiO ₂ -хітозан-венорутон (з рН=3)	261	361	9
Порошок SiO ₂ -хітозан-венорутон (з рН=6,5)	261	361	9
Порошок SiO ₂ -хітозан-венорутон (з рН=8,4)	261	361	9

Висновки

З метою розробки нових лікарських засобів досліджено адсорбцію рутозидів венорутону на кремнеземі та модифікованому полісахаридами кремнеземі. Методом електроспрей мас-спектрометрії визначено ізомерний склад рутозидів. Показано, що основним компонентом венорутону є тригідроксиетилрутозид. Встановлено, що адсорбційна здатність щодо венорутону зростає в ряду SiO₂-декстран < SiO₂-хітозан < кремнезем. Методами ТПД МС та електронної спектроскопії в УФ та видимій областях підтверджено комплексоутворення між хітозаном та дигідроксиетилрутозидами венорутону на поверхні хітозан-кремнеземного сорбенту при адсорбції венорутону як з лужного розчину, так і з кислого середовища. Виявлено значне зниження енергії активації процесу термодесорбції венорутону з поверхні кремнезему (84 кДж/моль) порівняно з термолізом венорутону в конденсованому стані (вуглеводний замісник – 105 кДж/моль, аглікон – 134 кДж/моль). Термічна стабільність агліконового фрагменту, адсорбованого на полімерних ланцюгах хітозан-кремнеземного адсорбенту, порівняно з конденсованим станом зменшується, натомість стабільність вуглеводного фрагменту зростає. Встановлено, що на поверхні хітозан-кремнеземного сорбенту венорутон адсорбується як на гідроксильованих ділянках поверхні, так і на полімерних ланцюгах хітозану, а на поверхні кремнезему, модифікованій декстраном – лише на гідроксильованих ділянках.

Робота виконана за часткової підтримки 7 Рамкової Програми, проект IRSES NANOBIO MAT (PIRSES-GA-2013-612484).

Література

1. Wadworth A. N. Hydroxyethylrutosides: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in venous insufficiency and related disorders / A.N. Wadworth, D. Faulds // *Drugs*. – 1992. – V. 44, N 6. – P. 1013–1032.
2. The protective effect of Venoruton and its main constituents on acute doxorubicin-induced cardiotoxicity / S.A. van Acker, R. Towart, B.C. Husken [et al.] // *Phlebology Suppl.* 1993. –V. 1. – P. 31–32.
3. Oxeutins (Venoruton): efficacy in chronic venous insufficiency – a double-blind, randomized, controlled study / V. Petruzzellis, T. Troccoli, C. Candiani [et al.] // *Angiology*. – 2002. – V. 53. – P. 257–263.
4. Havsteen B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids / B.H. Havsteen // *Pharmacol. Therapeutics*. – 2002. – V. 96, N 2–3. – P. 67–202.

5. Haenen G.R. The antioxidant properties of five O-(β -hydroxyethyl)-rutosides of the flavonoid mixture Venoruton / Haenen G.R., Jansen F.P., and Bast A. // *Phlebology*. Suppl. 1 – 1993. – P. 10–17.
6. Lemarchand C. Polysaccharide-decorated nanoparticles / C. Lemarchand, R. Gref, P. Couvreur // *Eur. J. Pharmac. Biopharmac.* – 2004. – V. 58, N 2. – P. 327–341.
7. Исследование взаимодействия коричной кислоты с поверхностью кремнезема методом десорбционной масс-спектрометрии / Т.В. Кулик, В.М. Барвинченко, Б.Б. Паляница и др. // *Журн. физ. химии.* – 2007. – Т. 81, № 1. – С. 88–95.
8. Interactions between bioactive ferulic acid and fumed silica by UV-vis spectroscopy, FT-IR, TPD MS investigation and quantum chemical methods / T.V. Kulik, N.A. Lipkovska, V.N. Barvinchenko [et al.] // *J. Colloid Interface Sci.* – 2009. – V. 339, N 1. – P. 60–68.
9. Исследование взаимодействия кумаринов и их гетероциклических производных с поверхностью кремнезема методом десорбционной масс-спектрометрии / Т.В. Кулик, В.В. Ищенко, Б.Б. Паляница [и др.] // *Масс-спектрометрия.* – 2007. – Т.4, №3. – С. 179–186.
10. A TPD-MS study of the interaction of coumarins and their heterocyclic derivatives with a surface of fumed silica and nanosized oxides $\text{CeO}_2/\text{SiO}_2$, $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$, $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ / K.S. Kulyk, V.V. Ishchenko, B.B. Palyanytsya [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2010. – V. 45, N 7. – P. 750–761.
11. Mielczarek C. / Acid-base properties of selected flavonoid glycosides / C. Mielczarek // *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* – 2005. – V. 25, N 2–3. – P. 273–279.
12. Supramolecular structures of chitosan on the surface of fumed silica / T.V. Kulyk, B.B. Palyanytsya, T.V. Borodavka [et al.] // *Nanomaterials and Supramolecular Structures, Physics, Chemistry and Application* / [Eds. A.P. Shpak, P.P. Gorbyk]. – Springer, 2010. – P. 259–269.
13. Бородавка Т.В. Дослідження адсорбції хітозану на поверхні кремнезему / Т.В. Бородавка, Т.В. Кулик, Б.Б. Паляница // *Наноматеріали в хімії, біології та медицині: Всеукр. конф. мол. вч. (24–25 травня, 2006 р.).* – К., 2006. – С. 32–34.
14. Исследование взаимодействия кумаринов и их гетероциклических производных с поверхностью кремнезема методом десорбционной масс-спектрометрии / Т.В. Кулик, В.В. Ищенко, Б.Б. Паляница [и др.] // *Масс-спектрометрия.* – 2007. – Т.4, №3. – С. 179–186.
15. Кислюк М.У. Термопрограммированная десорбция и термопрограммированная реакция – методы изучения кинетики и механизма гетерогенных каталитических процессов / М.У.Кислюк, В.В.Розанов // *Кинетика и катализ.* – 1995. – Т. 36, № 1. – С. 89–98.
16. Іванько Л.С. Імобілізовані на кремнеземі антрахінони, флавоноїди та краун-ефіри як твердофазні реагенти для визначення Sn(IV), Tl(III), Zr(IV) та флуориду: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. хім. наук: спец. 02.00.02 “аналітична хімія” / Л.С. Іванько – Київ, 2001. – 18 с.

ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТИ КРЕМНЕЗЕМА ПОЛИСАХАРИДАМИ НА ЕГО СОРБЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К РУТОЗИДУ ВЕНОРУТОНУ

**Т.В. Кулик¹, Т.В. Подуст¹, Б.Б. Паляница¹, Л.Р. Азизова¹, М.И. Терец¹,
В.Н. Барвинченко¹, Л.И. Михаловска²**

¹*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины,
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина*

²*Университет Брайтона, Школа фармации и биомолекулярных наук, Брайтон, BN2 4GJ
Великобритания*

Методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением определен изомерный состав рутозидов венорутонна. Получены изотермы адсорбции венорутонна на поверхности кремнезема и кремнезема, модифицированного хитозаном и декстраном. Найдено, что адсорбционная способность по венорутону растет в ряду SiO₂-декстран < SiO₂-хитозан < кремнезем. Трехкомпонентные материалы на основе кремнезема, полисахаридов и венорутон были исследованы методами ИК-спектроскопии, температурно-программируемой десорбционной масс-спектрометрии и электронной спектроскопии в УФ и видимой областях. Установлено, что на поверхности хитозан-кремнеземного сорбента венорутон абсорбируется как на гидроксильированных участках поверхности, так и на полимерных цепях хитозана, а на поверхности кремнезема, модифицированной декстраном – только на гидроксильированных участках.

THE EFFECT OF SILICA SURFACE MODIFICATION BY POLYSACCHARIDES ON ITS SORPTION ABILITY TO VENORUTON RUTOSIDE

**T.V. Kulik¹, T.V. Podust¹, B.B. Palianytsia¹, L.R. Azizova¹, M.I. Tereth¹,
V.M. Barvinchenko¹, L.I. Mikhalovska²**

¹*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine,
17 General Naumov Str. Kyiv, 03164, Ukraine*

²*University of Brighton, School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, BN2 4GJ Brighton,
United Kingdom*

The isomeric ratio of venoruton rutosides was defined using electrospray ionisation mass spectrometry. The adsorption isotherms of venoruton onto surface of silica and silica modified by chitosan and dextran were obtained. It has been founded that adsorption ability increases in the line silica-dextran < silica-chitosan < silica. Three-component materials composed of silica, polysaccharides and venoruton were investigated using IR spectroscopy, temperature-programmed desorption mass spectrometry and UV-vis spectroscopy. It was find out that on the surface of chitosan modified silica venoruton is adsorbed both on the hydroxylated surface and on chitosan polymeric chains, while on the surface of dextran modified silica venoruton is adsorbed only on the hydroxylated surface.