

## СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА ВКЛЮЧЕНИЯ ДИСУЛЬФИРАМА С ГИДРОКСИПРОПИЛ- $\beta$ -ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

**В.С. Тюкова<sup>@</sup>, аспирант, С.А. Кедик, заведующий кафедрой, А.В. Панов, доцент, В.В. Бондарь, студент, А.И. Лаврентьева, студент**

*Кафедра биотехнологии и промышленной фармации  
МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия  
<sup>@</sup> Автор для переписки, e-mail: sk-vika@yandex.ru*

*На основании проведенных исследований предложен метод получения комплекса включения дисульфирама с гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрином. Разработанная методология позволила получить комплекс включения в порошкообразном виде, изучить его физико-химические свойства и подтвердить образование комплекса включения методами порошковой рентгеновской дифракции и УФ-спектрофотометрии.*

**Ключевые слова:** гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин, дисульфирам, комплекс включения, порошковая рентгеновская дифракция, УФ-спектрофотометрия.

## STRUCTURE OF INCLUSION COMPLEX OF DISULFIRAM WITH HYDROXYPROPYL- $\beta$ -CYCLODEXTRIN

**V.S. Tyukova<sup>@</sup>, S.A. Kedik, A.V. Panov, V.V. Bondar, A.I. Lavrentieva**

*M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies,  
Moscow, 119571 Russia  
<sup>@</sup> Corresponding author e-mail: sk-vika@yandex.ru*

*Disulfiram is an inhibitor of superoxide dismutase, reduced lipid peroxidation, and can be an effective pharmaceutical substance for the treatment of cataracts. Unfortunately, the use of disulfiram in ophthalmology is limited due to its practically insoluble in water. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin is an effective solubilizing agent and has long been used in the pharmaceutical industry. Due to its structure hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin forms inclusion complexes with pharmaceutical substance which soluble in water is limited. In this paper it was investigated a new method of obtaining inclusion complex of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin with disulfiram. Inclusion complex prepared and isolated in powder form, the formation of inclusion complex and its physicochemical properties was confirmed by X-ray powder diffraction and UV-spectrophotometry.*

**Keywords:** hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, disulfiram, inclusion complex, X-ray powder diffraction, UV-spectrophotometry.

### Введение

Как известно, молекулы циклодекстринов имеют амфифильное строение (рис. 1) и образуют комплексы включения, поэтому эффективно используются в качестве солюбилизаторов лекарственных веществ, ограниченно растворимых в воде [1–4]. Зачастую в фармацевтической промышленности используют замещенные циклодекстрины, растворимость которых в воде лучше, чем исходных природных циклодекстринов. Наибольшее применение в

фармацевтической промышленности нашел частично замещенный поли(гидроксипропиловый)эфир  $\beta$ -циклодекстрина.

Исследовательская группа [5] на модели крыс UPL rats и ICR/f с наследственной катарактой показала, что перспективным антикатарактальным лекарственным веществом может быть ингибитор фермента ацетальдегиддегидрогеназы – дисульфирам, широко используемый в настоящее время для терапии антиалкогольной и наркотической зависимости. Авторы разработали глазные капли, в состав которых входит комплекс

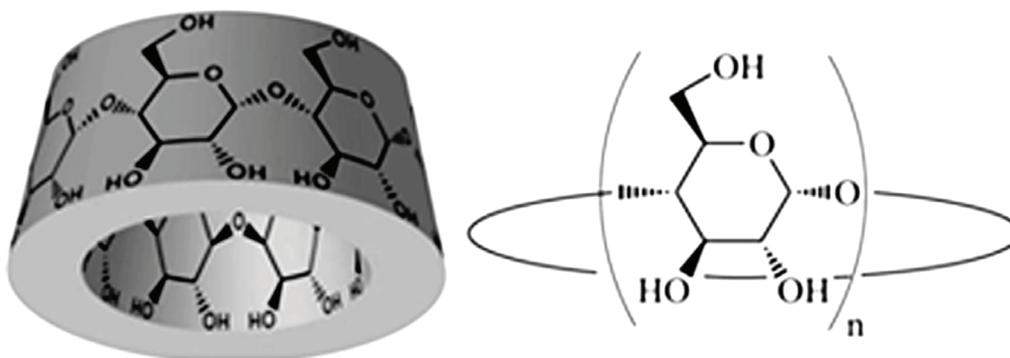


Рис. 1. Структура молекулы циклодекстрина.

включения гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрина с дисульфидом [6–8]. Однако полученный в рамках этих работ комплекс включения не был выделен в качестве субстанции в порошкообразном виде и не был охарактеризован; кроме того, в рамках этих работ авторами не было подтверждено образование комплекса включения физико-химическими методами.

Поэтому целью настоящей работы было получение и выделение комплекса включения гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрина с дисульфидом и подтверждение его образования методами порошковой рентгеновской дифракции и УФ-спектрофотометрии.

### Экспериментальная часть

В работе использовали гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин (ГП- $\beta$ -ЦД) марки Cavitron w7hrp5 со степенью замещения 0.6 (Ashland) и фармацевтическую субстанцию дисульфирама (ДСФ) производства компании Sintexim, которая представляет собой кристаллы белого цвета, практически не растворимые в воде.

Комплекс включения получали постепенным растворением ГП- $\beta$ -ЦД и ДСФ в спирте этиловом при перемешивании и термостатировании. Навески ГП- $\beta$ -ЦД и ДСФ (в массовом соотношении компонентов 10:1 соответственно) загружали в коническую колбу, добавляли спирт этиловый и равномерно перемешивали при нагревании (65°C) до полного растворения ДСФ, после чего раствор охлаждали до комнатной температуры, фильтровали, органический растворитель удаляли на роторном испарителе. Фильтр сушили, взвешивали и оценивали количество дисульфирама, не включившегося в комплекс. Эффективность включения ДСФ в комплекс оценивали, принимая загрузку активного вещества за 100%.

Растворимость комплекса включения в воде определяли согласно методике, описанной в ГФ XII ОФС 42-0049-07 [9]. Поскольку массовая доля ДСФ в комплексе включения составляет десятую часть (согласно загрузке), то растворимость ДСФ, содержащегося в комплексе, в десять раз меньше относительно растворимости комплекса включения.

Рентгеноструктурный анализ проводили на дифрактометре ДРОН-3М с использованием  $\text{CuK}_\alpha$ -излучения. Определение параметров элементарной ячейки проведено на монокристалле фотометодом. Параметры элементарной ячейки определены по лауэграммам.

Исследования ДСФ, ГП- $\beta$ -ЦД и комплекса включения проводили методом порошковой рентгеновской дифракции (ПРД) на порошковом дифрактометре X'Pert Pro MPD. Дополнительно в качестве образца сравнения исследовали механическую смесь ДСФ и ГП- $\beta$ -ЦД, которая была получена смешением сухих исходных компонентов, взятых в том же стехиометрическом соотношении, что и для образования комплекса включения. Эксперимент проводился в одинаковых условиях для всех образцов – напряжение 50.0 кВ и ток 40.0 мА (2 kW) при скорости сканирования по  $2\theta$  0.008°/мин, в интервале углов  $2\theta$  5°–60°.

УФ-спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-104 в спектральном режиме, в диапазоне длин волн 200–350 нм с разрешением 1 нм при постоянной температуре 20°C. Полученные УФ-спектры обрабатывали с помощью программы UVWin (версия 5.1.0). Для количественного определения ДСФ в продуктах на основе комплекса включения методом УФ-спектрофотометрии готовили раствор образца в этаноле концентрацией 1 мг/мл (раствор А), из него отбирали аликвоту объемом 3 мл в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки спиртом этиловым (раствор В). Регистрировали не менее трех спектров поглощения раствора В.

### Результаты и их обсуждение

Комплекс включения ГП- $\beta$ -ЦД с ДСФ получили в виде порошка, что позволяет стандартизировать его в качестве фармацевтической субстанции. Масса фильтра после фильтрования раствора комплекса включения увеличивалась не более чем на 1% от массы загружаемого лекарственного вещества.

Образование комплекса включения косвенно можно подтвердить по растворимости в воде ДСФ,

содержащегося в комплексе включения. В результате исследований определили растворимость комплекса включения, которая соответствует концентрации  $5 \times 10^5$  мг/л. Так как доля ДСФ в комплексе включения составляет десятую часть (по загрузке), то растворимость ДСФ, содержащегося в комплексе, в 10 раз меньше растворимости в воде комплекса включения, что соответствует концентрации  $5 \times 10^4$  мг/л. Поскольку сам ДСФ в воде практически нерастворим (4.09 мг/л при 25°C [10]), можно заметить, что растворимость ДСФ, содержащегося в комплексе, увеличилась более чем в 10 000 раз.

В работе [11] образование комплекса включения подтверждали методом дифференциальной сканирующей калориметрии по отсутствию эндотермического пика в области температур 65–75°C, характеризующего плавление чистого ДСФ. Однако полученные результаты не позволяют охарактеризовать степень кристалличности и установить структуру комплекса.

Наиболее информативным методом, подтверждающим структуру вещества, является рентгеноструктурный анализ. С целью получения кристаллов, пригодных для сбора рентгеноструктурных данных, был проведен поиск условий кристаллизации комплекса включения. Кристаллы комплекса включения получали методом «висящей капли» посредством диффузии в парах при комнатной температуре с использованием лиофильно высушенного образца комплекса включения, растворенного в деионизированной воде (MilliQ) с концентрацией 60 мг/мл. Создавали условия, в ко-

торых раствор комплекса включения становился пересыщенным. Для этих целей в качестве осадителя использовали 1% водный раствор полиэтиленгликоля, 1% водный раствор натрия хлорида и их смесь в соотношении 1:1. Осадитель помещали на дно стаканчика, капля концентрированного раствора комплекса включения находилась на внутренней стороне стеклышка, плотно закрывающего этот стакан. За счет диффузии паров медленно увеличивалась концентрация осаждающего вещества в капле раствора комплекса включения.

Первые кристаллы появились через неделю. Лучшие кристаллы получены с использованием в качестве осадителя 1% водного раствора полиэтиленгликоля. В результате проведенных исследований получены монокристаллы, пригодные для рентгеноструктурного исследования, в ходе которого было установлено, что параметры элементарной ячейки кристалла соответствуют таковым для ДСФ. Таким образом, в результате проведенных экспериментов не удалось получить кристаллы комплекса. Затруднения при кристаллизации комплекса могут быть связаны с тем, что ГП-β-ЦД представляет собой смесь молекул с различной степенью замещения и распределения гидроксипропильных групп, ввиду отсутствия регулярности затруднена их упаковка в кристаллическую структуру.

Для подтверждения степени аморфности структуры комплекса включения был проведен рентгенофазовый анализ (рис. 2).

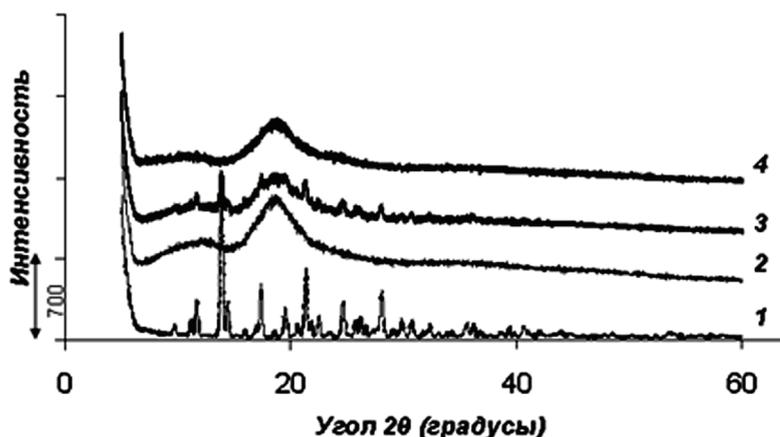


Рис. 2. Рентгендифракционные спектры чистого дисульфирама (1), гидроксипропил-β-циклодекстрина (2), их механической смеси (3) и комплекса включения (4).

На дифрактограмме чистого ДСФ (1) наблюдается выраженная серия интенсивных пиков, что характеризует его кристаллическую структуру, в то время как на дифрактограмме чистого ГП-β-ЦД (2) интенсивные пики отсутствуют, что указывает на рентгенаморфное состояние. На дифрактограмме механической смеси (3) видно как серия интенсивных пиков, идентифицирующих кристаллическую структуру ДСФ, так и аморфное гало, соответствующее

аморфной природе ГП-β-ЦД. Однако, на дифрактограмме комплекса включения (4) интенсивные пики не наблюдаются, что говорит об отсутствии кристаллической структуры ДСФ как таковой и его полном включении во внутреннюю полость ГП-β-ЦД.

На УФ-спектрах растворов, содержащих ДСФ (рис. 3), в области 200–250 нм наблюдается смещение длины волны максимума поглощения в зависимости от полярности растворителя, в котором

регистрируется спектр. Для водного раствора ДСФ максимум поглощения наблюдается при 209 нм, а для раствора ДСФ в неполярном гексане – при 218 нм. В то же время для водного раствора комплекса включения, содержащего ДСФ, имеет место смещение указанного максимума до 216 нм. Очевидно, это связано с сольватохромным эффектом [12], обуслов-

ленным тем, что в растворе комплекса включения ДСФ находится во внутренней гидрофобной [13] полости ГП-β-ЦД. В пользу этого предположения свидетельствует и то, что максимум поглощения раствора ДСФ в неполярном гексане (218 нм) весьма близок к максимуму поглощения раствора ДСФ в составе комплекса включения (216 нм).

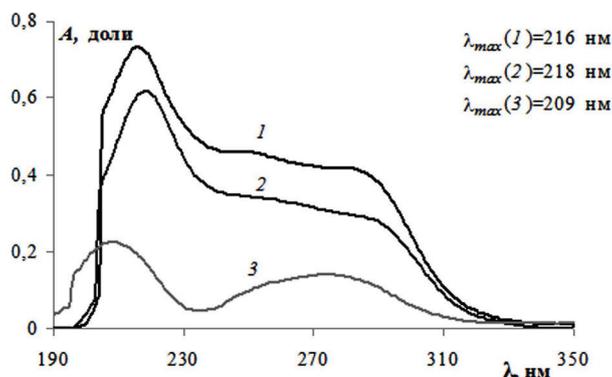


Рис. 3. УФ-спектры водного раствора продукта, содержащего комплекс включения (1), раствора дисульфирама в гексане (2) и низкоконцентрированного раствора дисульфирама в воде (3).

Приведенные УФ-спектры еще раз подтверждают, что в растворах исследуемого продукта, содержащего комплекс включения, ДСФ присутствует, причем в концентрациях, превышающих предел растворимости дисульфирама в воде.

Поскольку растворимость в воде ДСФ в составе комплекса включения сильно возрастает, возникает необходимость разработки методики количественного определения ДСФ в продуктах на основе комплекса включения. С этой целью был предложен метод УФ-спектрофотометрии.

Для определения количественного содержания ДСФ в комплексе включения в качестве растворителя использовали этанол, эффективно растворяющий как комплекс включения, так и исходный ДСФ. Поскольку в области 200–350 нм поглощение ГП-β-ЦД отсутствует, его не учитывали.

Для количественного определения ДСФ на основании пяти стандартных растворов различных концентраций ДСФ в спирте этиловом (0,04–0,012 мг/мл, не менее трех параллельных спектрофотометрических измерений) был построен градуировочный график (рис. 4).

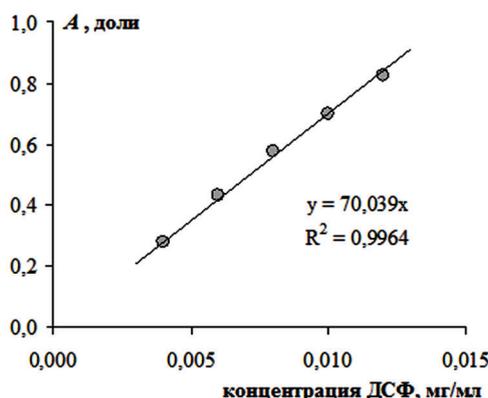


Рис. 4. Зависимость оптической плотности раствора от концентрации дисульфирама в спирте этиловом.

С использованием этого графика количественное содержание ДСФ в комплексе включения рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{C * V_1 * 10}{V_0 * m_{нав}} * 100 \quad (5)$$

где  $X$  – количественное содержание ДСФ в комплексе включения, %;  $C$  – концентрация дисульфирама в комплексе включения, найденная по градуировочному графику, мг/мл;  $V_0$  – аликвота пробы препарата, используемая для приготовления испытуемого раствора, мл;  $V_1$  – объем мерной колбы, используемой для приготовления испытуемого раствора, мл;  $m_{нав}$  – навеска комплекса, мг; 10 – коэффициент пересчета в мг.

Результаты количественного определения ДСФ для трех образцов полученного продукта приведены в таблице. Дополнительно представлены данные

о загрузке компонентов для получения комплекса включения и остатке кристаллического (нерастворенного) ДСФ на фильтре.

Количественное содержание дисульфирама в комплексе включения, количество загруженного и оставшегося на фильтре дисульфирама для трех серий образцов комплекса включения дисульфирама с гидроксипропил-β-циклодекстрином

Наименование	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Количество ДСФ, загруженного для получения комплекса включения, г	3.0011	2.9993	3.0005
Количество ДСФ, оставшегося на фильтре после фильтрования комплекса включения, г	0.0060	0.0047	0.0083
Количественное содержание ДСФ, оставшегося на фильтре, %	0.22	0.16	0.28
Количественное содержание дисульфирама в комплексе включения, %	9.34	8.27	9.15

### Заключение

В ходе данной работы был получен комплекс включения ДСФ с ГП-β-ЦД. Полученный продукт удалось выделить в виде порошка и, согласно методике, описанной в Государственной Фармакопее, классифицировать его как «легко растворимый в воде». Подлинность образования комплекса подтвердили методом порошковой рентгеновской дифракции по отсутствию интенсивных пиков, характеризующих кристаллическую структуру ДСФ, на рентгенограмме комплекса включения. Также образование комплекса включения подтверждено методом УФ-спектрофотометрии по смещению максимума поглощения пика ДСФ в зависимости от полярности растворителя. Разработана методика количественного определения ДСФ в комплексе включения УФ-спектрофотометрическим методом.

### Список литературы:

1. Astray G., Gonzalez-Barreiro C., Mejuto C., Rial-Otero R., Simal-Gandara J. // *Food Hydrocolloids*. 2009. V. 23. P. 1631–1640.
2. Del Valle E.M.M. // *Process Biochemistry*. 2004. V. 39. P. 1033–1046.
3. Chaudhary A., Nagaich U., Gulati N., Sharma V.K., Khosa R.L. // *J. Adv. Pharmacy Education & Research*. 2012. V. 2 (1). P. 32–67.
4. Saenger W., Jacob J., Gessler K., Steiner T., Hoffmann D. [et al.] // *Chem. Rev.* 1998. V. 98. P. 1787–1802.
5. Nagai N., Takeda M., Ito Y., Takeuchi N., Kamei A. // *Biol. Pharm. Bull.* 2007. V. 30 (8). P. 1529–1534.
6. Nagai N., Ito Y., Takeuchi N. // *Biol. Pharm. Bull.* 2008. V. 31 (5) P. 981–985.
7. Nagai N., Ito Y., Takeuchi N. // *Biol. Pharm. Bull.* 2011. V. 34 (7). P. 1005–1010.
8. Nagai N., Ito Y., Takeuchi N. // *Biol. Pharm. Bull.* 2012. V. 35 (2). P. 239–245.
9. Государственная фармакопея Российской Федерации. Ч. 1. 12-е изд. М.: Научный центр экспертизы

средств медицинского применения, 2008. 704 с.

10. Дисульфирам (Disulfiramum) // Интернет-справочник лекарств [http://avitsena.com.ua/ru/spravochnik\\_lekarstv/d/disulfiram.html](http://avitsena.com.ua/ru/spravochnik_lekarstv/d/disulfiram.html) (2015)

11. Кедик С.А., Тюкова В.С., Панов А.В., Жаворонков Е.С., Krohn S.D. // Труды XIV ежегодной международной молодежной конф. ИБХФ РАН–ВУЗЫ «Биохимическая физика». Москва, 2014. С. 215–217.

12. Водолазская Н.А., Исаенко Ю.В., Гога С.Т. // Учеб.-метод. пособие по курсу «Химические равновесия в ультрамикрорегетерогенных системах» для студентов IV курса, специализирующихся на кафедре физической химии химического факультета. 2006. С. 37.

13. Fromming K.H., Szejtli J. Dordrecht: Kluwer, 1994. 224 p.

### References:

1. Astray G., Gonzalez-Barreiro C., Mejuto C., Rial-Otero R., Simal-Gandara J. // *Food Hydrocolloids*. 2009. V. 23. P. 1631–1640.
2. Del Valle E.M.M. // *Process Biochemistry*. 2004. V. 39. P. 1033–1046.
3. Chaudhary A., Nagaich U., Gulati N., Sharma V.K., Khosa R.L. // *J. Adv. Pharmacy Education & Research*. 2012. V. 2 (1). P. 32–67.
4. Saenger W., Jacob J., Gessler K., Steiner T., Hoffmann D. [et al.] // *Chem. Rev.* 1998. V. 98. P. 1787–1802.
5. Nagai N., Takeda M., Ito Y., Takeuchi N., Kamei A. // *Biol. Pharm. Bull.* 2007. V. 30 (8). P. 1529–1534.
6. Nagai N., Ito Y., Takeuchi N. // *Biol. Pharm. Bull.* 2008. V. 31 (5) P. 981–985.
7. Nagai N., Ito Y., Takeuchi N. // *Biol. Pharm. Bull.* 2011. V. 34 (7). P. 1005–1010.
8. Nagai N., Ito Y., Takeuchi N. // *Biol. Pharm. Bull.* 2012. V. 35 (2). P. 239–245.
9. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossyskoy Federatsii. Gl. 1. 12-e izd. (State pharmacopoeia of Russian Federation. Ch. 1. 12th ed.). M.: Nauchny centr ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya, 2008. 704 p.

10. Disulfiram (Disulfiramum) // Internet-spravochnik lekarstv [http://avitsena.com.ua/ru/spravochnik\\_lekarstv/d/disulfiram.html](http://avitsena.com.ua/ru/spravochnik_lekarstv/d/disulfiram.html) (2015).

11. Kedik S.A., Tyukova V.S., Panov A.V., Zhavoronok Ye.S., Krohn S.D. // Trudy XIV ezhegodnoy mezhdunarodnoy molodezhnoy konferentsii IBKhF RAN–VUZY «Biokhimicheskaya fizika». Moscow, 2014. P. 215–217.

12. Vodolazskaya N.A., Isayenko Yu.V., Goga S.T. // Uchebno-metodicheskoye posobiye po kursu «Khimicheskiye ravnovesiya v ultramikroeterogennykh sistemakh» dlya studentov IV kursa, spetsializiruyushchikhsya na kafedre fizicheskoy khimii khimicheskogo fakulteta. 2006. P. 37.

13. Fromming K.H., Szejtli J. Dordrecht: Kluwer, 1994. 224 p.