

УДК 544.774.4 + 615.243.4
DOI 10.25205/2541-9447-2020-15-1-98-105

Исследование комплексообразования калий висмут цитрата с полисахаридами

М. А. Михайленко^{1,2}, М. Р. Шарафутдинов^{1,2}, И. В. Ельцов³
М. В. Тренихин⁴, Б. П. Толочко^{1,2}

¹ Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН
Новосибирск, Россия

² Институт ядерной физики им. Г. И. Будкера СО РАН
Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский университет
Новосибирск, Россия

⁴ Центр новых химических технологий ИК СО РАН
Омск, Россия

Аннотация

Проведено исследование взаимодействия калий висмут цитрата (КВЦ) с полисахаридами различного строения – декстраном (линейный) и арабиногалактаном (разветвленный). Методом ЯМР показан донорно-акцепторный характер взаимодействия декстрана с КВЦ в растворах. Методами синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии показано формирование анизотропных нанокристаллов КВЦ в окружении декстрана.

Ключевые слова

калий висмут цитрат, декстран, арабиногалактан, синхротронное излучение

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (проект № 0237-2019-0001). При выполнении работы использовалось оборудование ЦКП «СЦСТИ» на базе ВЭПП-3 ИЯФ СО РАН, подержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0012). Авторы выражают благодарность д-ру хим. наук Ю. М. Юхину и канд. хим. наук Е. С. Найденко (ИХТТМ СО РАН) за предоставленный образец КВЦ.

Для цитирования

Михайленко М. А., Шарафутдинов М. Р., Ельцов И. В., Тренихин М. В., Толочко Б. П. Исследование комплексообразования калий висмут цитрата с полисахаридами // Сибирский физический журнал. 2020. Т. 15, № 1. С. 98–105. DOI 10.25205/2541-9447-2020-15-1-98-105

© М. А. Михайленко, М. Р. Шарафутдинов, И. В. Ельцов,
М. В. Тренихин, Б. П. Толочко, 2020

Investigation of Complexation of Bismuth Potassium Citrate with Polysaccharides

M. A. Mikhailenko^{1, 2}, M. R. Sharafutdinov^{1, 2}, I. V. Eltsov³
M. V. Trenikhin⁴, B. P. Tolochko^{1, 2}

¹ Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS
Novosibirsk, Russian Federation

² Budker Institute of Nuclear Physics SB RAS
Novosibirsk, Russian Federation

³ Novosibirsk State University
Novosibirsk, Russian Federation

⁴ Center of New Chemical Technologies, Boreskov Institute of Catalysis SB RAS
Omsk, Russian Federation

Abstract

The interaction of potassium bismuth citrate (PBC) with polysaccharides of various structures – dextran (linear) and arabinogalactan (branched) was investigated. The NMR method revealed the donor-acceptor character of the interaction of dextran with PBC in water solutions. Synchrotron radiation and transmission electron microscopy was shown the formation of the anisotropic PBC-nanocrystals the covered of dextran layers.

Keywords

potassium bismuth citrate, dextran, arabinogalactan, synchrotron radiation

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (project 0237-2019-0001).

When performing the work, the equipment of the SSTRC SB RAS on the basis of VEPP-3 (BINP SB RAS) was used. Support by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (identifier of the project is RFMEFI62117X0012).

The authors are grateful to Doctor of Sciences Yu. M. Yukhin and Candidate of Sciences E. S. Naydenko (ISSCM SB RAS) for the provided sample of PBC.

For citation

Mikhailenko M. A., Sharafutdinov M. R., Eltsov I. V., Trenikhin M. V., Tolochko B. P. Investigation of Complexation of Bismuth Potassium Citrate with Polysaccharides. *Siberian Journal of Physics*, 2020, vol. 15, no. 1, p. 98–105. (in Russ.) DOI 10.25205/2541-9447-2020-15-1-98-105

Калий висмут цитрат (КВЦ) и его аналоги применяются при лечении язвенной болезни, обладая антибактериальным действием на *Helicobacter pylori*, усиливая действие некоторых антибиотиков и ингибируя желудочную секрецию [1]. Дополнительно в экспериментах на модельных животных было показано, что в кислой среде из растворов КВЦ образуется пленка кристаллического субцитрата висмута, локализуемая в углублениях язв [2]. КВЦ практически не всасывается в кровь из желудочно-кишечного тракта. Ряд полисахаридов обладает аналогичным КВЦ действием.

Рассматривается применение полисахаридов с $\alpha(1-6)$ гликозидными связями для предотвращения закрепления различных бактериальных агентов на слизистых оболочках, в том числе и *Helicobacter pylori* [2]. Связывание полисахаридов обусловлено наличием в стенках бактерий фрагментов липоглюкановой природы с $\alpha(1-6)$ гликозидными связями [3; 4]. Аналогичный эффект используется в препарате на основе конъюгата изониазида с окисленным декстраном для лечения туберкулеза (декстрановый остаток служит средством доставки) [5] и, в так называемых растительных антибиотиках (препаратах из полисахаридов клеточной стенки дрожжей со строением, аналогичным декстрану), которые блокируют связывание бактерий со слизистыми оболочками желудочно-кишечного тракта [6]. Ранее с использованием синхротронного излучения было показано, что КВЦ в водных растворах может образовывать устойчивые агломераты [7].

Цель работы – исследование возможностей образования комплексов полисахаридов линейного и разветвленного строения с $\alpha(1-6)$ гликозидными связями с КВЦ, которые потенциально могут быть активны в противоязвенной терапии. В качестве полисахаридов были выбраны декстран и арабиногалактан (АГ) (рис. 1).

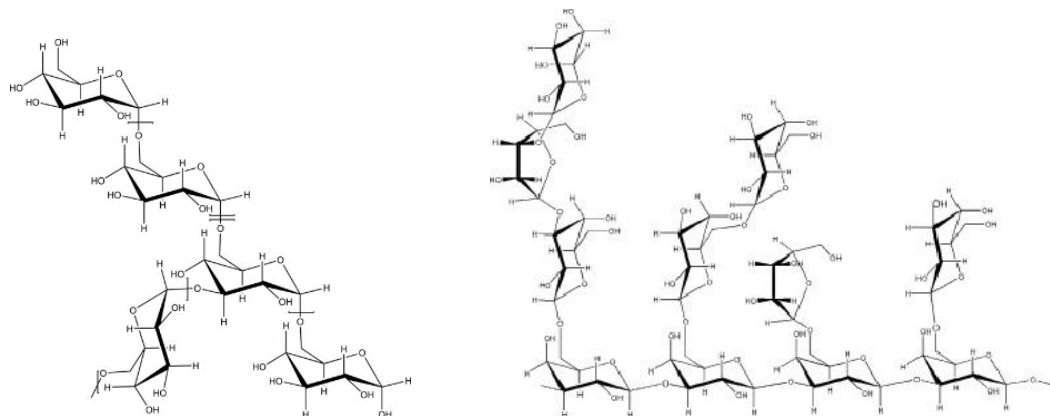


Рис. 1. Структура декстрана (слева) и арабиногалактана (справа)

Fig. 1. Structures of dextran (left) and arabinogalactan (right)

В структуре декстрана $\alpha(1-6)$ гликозидные связи присутствуют в основной цепи, в структуре АГ – в боковых.

Экспериментальная часть

Калий висмут цитрат был синтезирован в ИХТТМ СО РАН [8] и представлял субстанцию, используемую в производстве противоязвенного препарата в России. Арабиногалактан был выделен из *Larix Sibirica* [9]. Декстран был получен выделением из фармацевтического препарата путем высаживания спиртом с последующим фильтрованием и сушкой при пониженном давлении. В работе была использована высокомолекулярная фракция, полученная при добавлении эквивалентного объема этанола (выход 80 % от содержания декстрана в препарате).

Исследование влияния КВЦ и полисахаридов на взаимную растворимость осуществляли следующим образом. Готовили растворы полисахаридов заданной концентрации, к которым прибавляли заведомо избыточное количество КВЦ – 80 мг/мл. На начальных этапах происходило полное растворение КВЦ с образованием слегка опалесцирующих растворов. Через 5–10 часов при н. у. из растворов выпадал осадок. Растворы подвергались центрифугированию (ОПН-8, 8000 об./мин, 6400g, 15 мин).

Концентрации полисахаридов и КВЦ в растворах после отделения осадков определяли методом гельпроникающей хроматографии путем разбавления проб в 50 раз с использованием хроматографа Agilent 1200 с рефрактометрическим детектором 1260 Infinity (30 °C, PL aquagel-ОН 40 300*7.5 мм, 0,1 М LiNO₃, 1 мл/мин). Калибровка колонки осуществлялась с помощью стандартных образцов декстранов (Sigma-Aldrich) с ММ 10600, 20000, 41272, 70000.

Исследование взаимодействия КВЦ с полисахаридами методом ЯМР осуществлялось в D₂O с использованием спектрометра AVANCE III 500, частоты резонанса ¹H – 500.13MHz, ¹³C – 125.76 MHz (Bruker, Германия).

Образцы для дифрактометрических и электронно-микроскопических исследований готовили путем сушки осадков и выпаривания растворов при пониженном давлении.

Электронно-микроскопические исследования проводили с использованием микроскопа JEM-2100 (Jeol, Япония) с энергодисперсионным анализатором Inca-250 (Oxford Instruments, Великобритания).

Дифрактометрические исследования проводили с использованием станции «Дифракционное кино», длина волны 1,516 Å, комплекса ВЭПП-3/ВЭПП-4 (СЦТИ СО РАН, ИЯФ СО РАН) [10]. Регистрировали малоугловое рассеяние и классическую дифракцию.

Результаты и обсуждение

Исследование растворимости в смесях КВЦ и полисахаридов показало, что в случае АГ не отмечается значимого взаимного влияния. АГ не захватывается из раствора при выпадении избыточного количества КВЦ. Падение концентрации КВЦ при увеличении концентрации АГ в растворах также не отмечено.

На рис. 2 приведена зависимость количества остаточного количества декстрана и КВЦ от начальной концентрации декстрана в растворах. В случае растворов декстрана при малых концентрациях растворов (до 1–1,5 %) при выпадении избытка КВЦ декстран в растворах практически отсутствует. Увеличение концентрации декстрана в исходных растворах способствует уменьшению равновесной концентрации КВЦ.

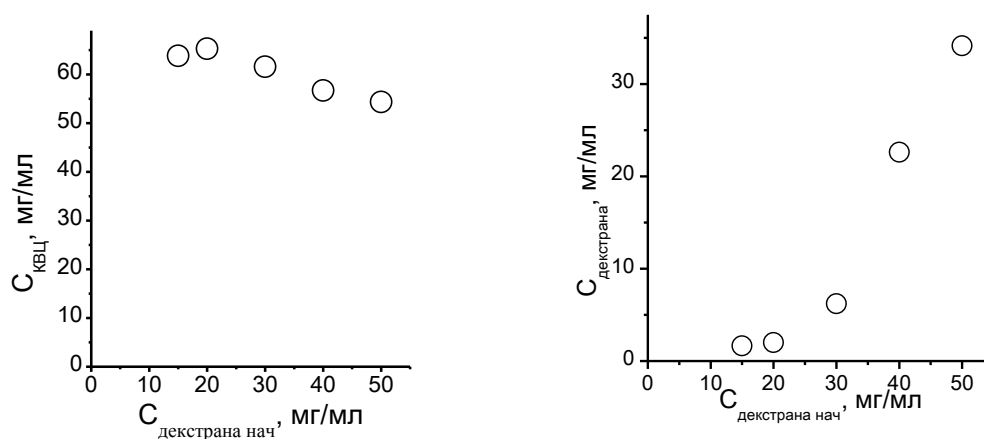


Рис. 2. Изменение концентраций в растворах смесей КВЦ и декстрана в зависимости от начальной концентрации декстрана

Fig. 2. Concentrations change in solutions of mixtures PBC and dextran depending on the initial concentration of dextran

Исследование растворов КВЦ с избытком декстрана методом ЯМР показывает наличие взаимодействия, выражающегося в сдвиге сигналов как декстрана, так и КВЦ, относительно их спектров в чистом виде. В спектрах ^{13}C сигналы декстрана сдвигаются в область более сильного поля, а сигналы КВЦ – в область слабого, что может являться свидетельством донорно-акцепторного взаимодействия.

Осадок, формирующийся при выпадении избыточного количества КВЦ с захватываемым декстраном, имеет вид вискоз. На дифрактограммах осадков (рис. 3) присутствуют рефлексы с очень высокой интенсивностью в области $d \sim 8,7$ Å.

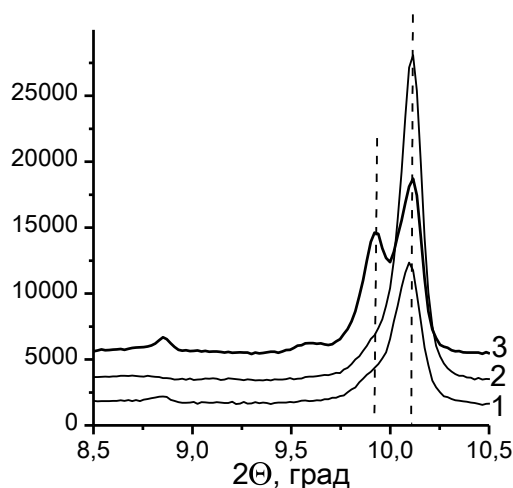


Рис. 3. Дифрактограмма осадков КВЦ с декстраном.

Начальная концентрация декстрана: 1 – 50 мг/мл, 2 – 30 мг/мл, 3 – 15 мг/мл

Fig. 3. X-ray diffraction patterns of PBC precipitation with dextran.

The initial concentration of dextran: 1 – 50 mg/ml, 2 – 30 mg /ml, 3 – 15 mg/ml

Ранее при рассмотрении структуры калий-аммоний висмут цитрата было обнаружено наличие 3-х типов димеров $[(\text{Bi}(\text{cit})_2\text{Bi})^{2-}]$ [11]. Данные димеры образуют двумерную структуру посредством мостиков лимонной кислоты между атомами Bi с преимущественно ковалентным характером связей. Трехмерная структура образуется в направлении [001] благодаря ионным связям остатков лимонной кислоты с катионами K^+ и NH_4^+ и водородным связям входящих в структуру молекул воды.

Обычно для порошковых дифрактограмм цитратов висмута характерным и самыми интенсивными являются рефлексы $d = 14\text{--}15 \text{ \AA}$ (рефлекс(002) для [11]). На полученных дифрактограммах вследствие сильной анизотропии кристаллов наблюдается другая интенсивность рефлексов с $d = 8,76$ и $17,5 \text{ \AA}$. Наиболее интенсивным является рефлекс с $d = 8,76 \text{ \AA}$, из известной структуры [11] это расстояние наиболее близко к отражениям (111). По мере уменьшения концентрации декстрана проявляются дополнительные отражения с $d = 4,60$ и $9,20 \text{ \AA}$. При рассмотрении полуширин рефлексов также можно выделить группы рефлексов, совпадающие по последовательности появления по мере уменьшения начальной концентрации декстрана в растворах. По аналогии с известной структурой [11] можно заключить, что присутствие даже небольших количеств декстрана блокирует рост кристаллов в направлении [001], в котором происходит связывание двумерной структуры $[(\text{Bi}(\text{cit})_2\text{Bi})^{2-}]$ с преимущественно ковалентным типом связей в трехмерную структуру.

Дифрактограммы пленок полученных при испарении растворов также имеют аномально высокую интенсивность рефлексов в области $d \sim 8,7 \text{ \AA}$. По мере уменьшения остаточной концентрации декстрана в них наблюдается появление дополнительных рефлексов, которые, возможно, относятся к исходной фазе КВЦ.

Электронно-микроскопические исследования пленок (рис. 4), полученных при испарении растворов, показывают наличие плоских кристаллических частиц размерами $10\text{--}20 \text{ нм}$ в окружении аморфной матрицы. Данные локального элементного анализа (соотношение $\text{C} : \text{K} : \text{Bi}$) подтверждают, что данные нанокристаллы являются КВЦ.

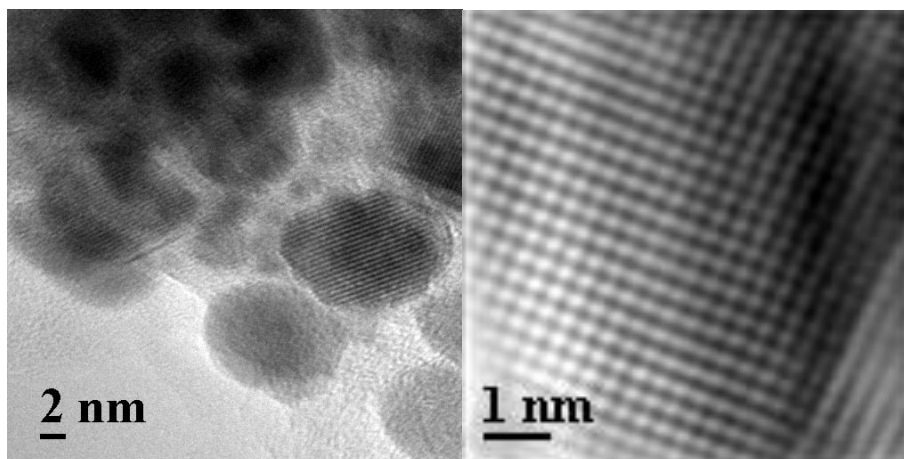


Рис. 4. Электронно-микроскопические снимки пленок, полученных при испарении растворов с концентрацией декстрана ~ 5 мг/мл и КВЦ ~ 60 мг/мл

Fig. 4. TEM images of films obtained by evaporation of solutions with a concentration of dextran ~ 5 mg / ml and PBC ~ 60 mg / ml

Выводы

Получен комплекс декстрана с КВЦ, представляющий собой нанокристаллы КВЦ в окружении аморфной матрицы полисахарида. Межмолекулярное взаимодействие декстрана с КВЦ в растворах приводит к формированию кристаллов КВЦ с выраженной анизотропией.

Список литературы

1. **Lambert J. R., Midolo P.** The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1997, no. 11 (suppl), p. 27.
2. **Koo J., Ho, J., Lam S. K., Wong, J., Ong B.** Coating of Gastric Ulcer by Tripotassium Dicitrate Bismuthate in the Rat. *Gastroenterology*, 1982, vol. 82, no. 5, p. 864.
3. **Xia L.-J., Yang Z.-B., Huang W. et al.** Characterization and flocculation mechanism of high efficiency microbial flocculant TJ-F1 from *Proteus mirabilis*. *Chin. J. Biol.*, 2010, vol. 23, no. 10, p. 1055.
4. **Icatlo F.C., Goshima H., Kimura N., Kodama Y.** Acid-dependent Adherence of *Helicobacter Pylori* Urease to Diverse Polysaccharides. *Gastroenterology*, 2000, vol. 119, no. 2, p. 358.
5. **Arkhipov S. A., Shkurupy V. A., Troitsky A. V. et al.** Phagocytic Activity of Macrophages against Liposomes with Conjugates of Oxidized Dextran and Isonicotinic Acid Hydrazide during Modeling of Phagocytosis Disturbances *In Vitro*. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2009, vol. 148, no. 4, p. 689.
6. **Ломовский О. И., Королев К. Г., Бычков А. Л., Колдыбаев С. Г.** Патент РФ № 2406516 // Бюлл. изобрет. 2010. № 35.
7. **Mikhailenko M. A., Tolochko B. P., Sharafutdinov M. R. et al.** The resistant agglomerate formation of bismuth ammonium potassium citrate in water solutions and their investigation by SAXS and ablation with using powerful terahertz radiation. *Physics Procedia*, 2016, vol. 84, p. 386.
8. **Юхин Ю. М., Найдено Е. С., Афонина Л. И., Найдено Н. М.** Патент РФ № 2496719 // Бюлл. изобрет. 2013. № 30.
9. **Кузнецова С. А., Кузнецов Б. Н., Михайлов А. Г., Скворцова Г. П.** Патент РФ № 2273646 // Бюлл. изобрет. 2006. № 10.

10. **Piminov P. A. et al.** Synchrotron Radiation Research and Application at VEPP-4. *Physics Procedia*, 2016, vol. 84, p. 19.
11. **Li W., Jin L., Zhu N. et al.** Structure of Colloidal Bismuth Subcitrate (CBS) in Dilute HCl: Unique Assembly of Bismuth Citrate Dinuclear Units ([Bi(cit)2Bi]2-). *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, vol. 125, no. 41, p. 12408.

References

1. **Lambert J. R., Midolo P.** The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1997, no. 11 (suppl), p. 27.
2. **Koo J., Ho, J., Lam S. K., Wong, J., Ong B.** Coating of Gastric Ulcer by Tripotassium Dicitrato Bismuthate in the Rat. *Gastroenterology*, 1982, vol. 82, no. 5, p. 864.
3. **Xia L.-J., Yang Z.-B., Huang W. et al.** Characterization and flocculation mechanism of high efficiency microbial flocculant TJ-F1 from *Proteus mirabilis*. *Chin. J. Biol.*, 2010, vol. 23, no. 10, p. 1055.
4. **Icatlo F.C., Goshima H., Kimura N., Kodama Y.** Acid-dependent Adherence of *Helicobacter Pylori* Urease to Diverse Polysaccharides. *Gastroenterology*, 2000, vol. 119, no. 2, p. 358.
5. **Arkhipov S. A., Shkurupy V. A., Troitsky A. V. et al.** Phagocytic Activity of Macrophages against Liposomes with Conjugates of Oxidized Dextrans and Isonicotinic Acid Hydrazide during Modeling of Phagocytosis Disturbances *In Vitro*. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2009, vol. 148, no. 4, p. 689.
6. **Lomovsry O. I., Korolev K. G., Bychkov A. L., Kondybaev S. G.** Patent of Russian Federation no.2406516. *Bull. Inv.*, 2010, no. 35.
7. **Mikhailenko M. A., Tolochko B. P., Sharafutdinov M. R. et al.** The resistant agglomerate formation of bismuth ammonium potassium citrate in water solutions and their investigation by SAXS and ablation with using powerful terahertz radiation. *Physics Procedia*, 2016, vol. 84, p. 386.
8. **Yukin Yu. M., Naydenko E. S., Afonina L. I., Naydenko N. M.** Patent of Russian Federation no. 2496719. *Bull. Inv.*, 2013, no. 30.
9. **Kuznetsova S. A., Kuznetsov B. N., Mikhaylov A. G., Skvortsova G. P.** Patent of Russian Federation no. 2273646. *Bull. Inv.*, 2006, no. 10.
10. **Piminov P. A. et al.** Synchrotron Radiation Research and Application at VEPP-4. *Physics Procedia*, 2016, vol. 84, p. 19.
11. **Li W., Jin L., Zhu N. et al.** Structure of Colloidal Bismuth Subcitrate (CBS) in Dilute HCl: Unique Assembly of Bismuth Citrate Dinuclear Units ([Bi(cit)2Bi]2-). *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, vol. 125, no. 41, p. 12408.

Материал поступил в редколлегию

Received

02.09.2019

Сведения об авторах / Information about the Authors

Михайленко Михаил Александрович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН (Новосибирск, Россия)

Mikhail A. Mikhailenko, Candidate of Sciences (Chemistry), Senior researcher, Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation)

mikhailenko@solid.nsc.ru

Шарафутдинов Марат Рашидович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН (Новосибирск, Россия)

Marat R. Sharafutdonov, Candidate of Sciences (Chemistry), Senior researcher, Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation)

marats@solid.nsc.ru

Ельцов Илья Владимирович, кандидат химических наук, доцент, старший преподаватель, факультет естественных наук, Новосибирский государственный университет (Новосибирск, Россия)

Iliya V. Eltsov, Candidate of Sciences (Chemistry), Assistant professor, Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russian Federation)

eiv@fen.nsu.ru

Тренихин Михаил Викторович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Центр новых химических технологий Института катализа СО РАН (Омск, Россия)

Mikhail V. Trenikhin, Candidate of Sciences (Chemistry), Senior researcher, Center of New Chemical Technologies Boreskov Institute of Catalysis SB RAS (Omsk, Russian Federation)

tremv@yandex.ru

Толочко Борис Петрович, доктор химических наук, заведующий лабораторией, главный научный сотрудник, Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН (Новосибирск, Россия)

Boris P. Tolochko, Doctor of Sciences (Chemistry), Head of laboratory, Chief Scientist, Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation)

b.p.tolochko@inp.nsk.su