Journal of International Scientific Publications:
Materials, Methods & Technologies, Volume 7, Part 3
ISSN 1313-2539, Published at: http://www.scientific-publications.net

SILICON DIOXIDE-FLAVONOID COMPOSITES SYNTHESIZED BY MECHANOCHEMICAL METHOD

Elena G. Shapolova, Oleg I. Lomovsky,
Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS,
Kutateladze str. 18, Novosibirsk 630128, Russia

Abstract

The goal of investigation was to study of conditions and consequences of solid-state mechanochemical interaction of silicon dioxide with flavonoids such as dihydroquercetin and catechins of green tea. The flavonoid-based complexes containing silicon are the water-soluble form, its formation increasing solubility of the initial compounds.

Key words*: mechanochemistry, catechins, dihydroquercetin, silicon preparation, composite.*

1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое внимание уделяется биологически активным соединениям растительного происхождения для разработки лекарственных препаратов, функционального питания, косметических препаратов. В данном аспекте флавоноиды вызывают все больший интерес, что связано с широким спектром их физиологической активности и низкой токсичностью [1].

В ряде работ продемонстрирована антивирусная, антибактериальная, антиоксидантная активность флавоноидов [2, 3].

Из десяти классов флавоноидов хотелось бы особо отметить катехины и дигидрофлавонолы, находящие широкое применение при создании лекарственных средств и БАД. В отличие от других флавоноидов катехины являются наиболее восстановленными флавоноидными соединениями, как правило, не образуют гликозидов и легко окисляются. Поэтому в данной работе катехины использованы не в чистом в виде, а в матрице растительного сырья, оказывающей стабилизирующее действие.

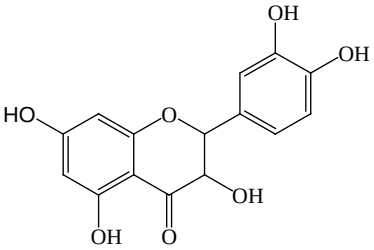
Одним из основных источников катехинов является зеленый чай. Верхние листья чайного куста содержат до 20 % фенольных соединений и 40 % экстрактивных веществ, нижние, более одревесневшие листья содержат до 10 % фенольных соединений и до 17 % экстрактивных веществ [4]. Концентрация катехинов составляет от 10 до 300 мг на грамм сухого чая. Около 95 % всех катехинов приходится на следующие соединения: эпикатехин (2-8 %), эпигаллокатехин (9-12 %), эпикатехин галлат (8-19 %) и эпигаллокатехин галлат (54-70 %) [5].

К флаванонолам, которые в природе встречаются в хвойных древесных породах, относится дигидрокверцетин.

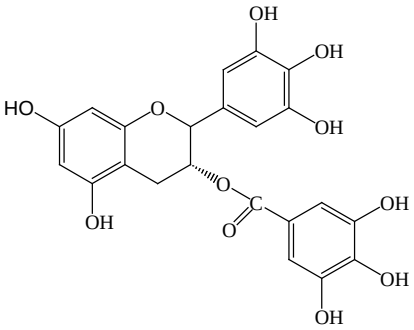
Фактором, определяющим свойства флавоноидов, является стереометрия. Катехины подвергаются эпимеризации, которая происходит вследствие обращения арильной группы. У флаванонолов аналогичные стереохимические соотношения, что и у катехинов. Таким образом, дигидрокверцетин можно использовать как чистое модельное соединение, аналогичное

ISSN 1313-2539, Published at: http://www.scientific-publications.net

катехинам зеленого чая, так как он содержит необходимые хелатирующие гидроксильные группы в *орто*-положении и имеет аналогичную стереометрию [6].



Дигидрокверцетин



Эпигаллокатехингаллат

Дигидрокверцетин является сильным антиоксидантом [7], обеспечивает защитные свойства организма, такие как гепато- и капилляропротекторные, противовоспалительные [8]. Недостатоком данного соединения является малая растворимость – 1 г/л, которая сказывается на биодоступности соединения.

Исследования фармакокинетики данного флавоноида показали, что при пероральном приеме дигидрокверцетина (500 мг/кг) в плазме крови он обнаруживается только в следовых количествах [9].

Для катехинов действующие концентрации в тканях организма, как правило, также не достигаются. Эффективная концентрация для действия катехинов составляет 20-100 μM [10]. При потреблении двух чашек зеленого чая максимальная концентрация в крови эпигаллокатехингаллата составила только 0.17 μM. Необходимые концентрации выше, чем найденные в естественных условиях при обычном потреблении продуктов, содержащих флавоноиды [3]. То есть бионакопление и повышение биодоступности является необходимым условием действия флавоноидов *in vivo*. Для решения данной проблемы возможно капсульное введение флавоноидов и использование соединений-носителей, обеспечивающих доставку биологически активного соединения в виде комплекса к пораженным участкам.

Разработка систем доставки лекарственных средств, которые в состоянии обеспечить относительно большое количество молекул препарата к предназначенным тканям или даже внутриклеточным органоидам, является в настоящее время одним из самых развивающихся направлений в фармацевтике. Среди многих соединений, которые были исследованы для доставки биологически активных веществ, особое место занимают соединения кремния. Аморфный диоксид кремния в работах [11, 12] рассматривается как доставщик лекарственных веществ в наноструктурированной форме. Показано, что соединения кремния обладают низкой токсичностью для тканей и органов, хорошей биологической совместимостью и легко выводятся из организма [13]. Кроме вышеперечисленных свойств использование соединений кремния связано с его биологической ролью в организме. По современным представлениям кремний необходим организму для обеспечения защитных функций, процессов обмена и дезинтоксикации. Доказано, что соединения кремния концентрируются в пораженных тканях.

Все больший интерес привлекает к себе механохимический подход как метод получения композитов биологически активного соединения с органическими и неорганическими носителями и комплексообразующими агентами. В данной работе в качестве вспомогательного вещества выбран аморфный диоксид кремния, который представляется перспективным

соединением для формирования композитных структур механохимическим методом. В работе [14] механохимическим методом получен композит на основе диоксида кремния и пирокатехина. Показано, что данный композит содержит поверхностные комплексы кремния с полифенолом. При растворении композита происходит выход в раствор хелатных комплексов кремния, что приводит к увеличению растворимости исходных соединений. Так как катехины и дигидрокверцетин содержат в своей структурной формуле пирокатехиновый фрагмент, то представляется возможным проведение твердофазного взаимодействия между данными флавоноидами и аморфным диоксидом кремния с целью получения композитов, обладающих повышенной растворимостью и биодоступностью.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Компоненты композитов: порошок зеленого чая *Camelia sinensis (L.)*, содержащий 12-15 % катехинов, производство *ООО* Торговый дом «Дагомысчай», Краснодарский край (ТУ 9191-003-00570186-04), дигидрокверцетин (98 %, Alfa Aesar), силикагель для хроматографии фракции 200-325*мкм.*

2.2. *Механическую обработку* смеси флавоноидов и диоксида кремния с различным массовым соотношением проводили в мельнице АГО-2 в течение 0,8-2 минут, расчетное ускорение рабочих тел – 20 g, энергонапряженность для режима 20 *g* составляет 5 Вт/г. Также обработку проводили в роликовой мельнице РМ-20 (ИХТТМ СО РАН, Новосибирск), представляющей собой проточный активатор с водяным охлаждением. Частота вращения составляла 1000 об./мин, что соответствует расчетной энергонапряженности 1 Вт/г. Время пребывания обрабатываемого материала в зоне воздействия – 40-60 секунд.

2.3. ВЭЖХ анализ флавоноидов

При анализе содержания катехинов в исходном растительном сырье воздушно-сухой чайный лист измельчали до размеров частиц менее 500 мкм; в случае анализа композитов измельчение не требовалось. Экстракцию образца проводили бидистиллированной водой с гидромодулем 1000 при комнатной температуре и постоянном перемешивании в течение 1 часа. Полученный экстракт центрифугировали при скорости 8000 мин$^{-1}$ 15 минут. Отфильтрованную надосадочную жидкость использовали для ВЭЖХ. В качестве элюента использовали смесь воды, ацетонитрила и фосфорной кислоты. Скорость элюирования составила 200 мкл/мин, температура элюирования 40 ˚С. Детекция проходила на длинах волн 210, 220, 230, 240, 250, 260, 300 нм. Анализ методом ВЭЖХ проводили на хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «ЭкоНова», Россия), оснащенном колонкой ProntoSil-10-5-118 и спектрофотометрическим детектором. Регистрацию хроматограмм проводили с помощью программы «E-Chrom» (ЗАО «ЭкоНова», Россия), количественную обработку результатов –с помощью программы «Мультихром».

2.4. Спектрофотометрическое определение водорастворимых мономерных форм кремния Анализ содержания мономерных форм кремния проводили фотометрическим методом на приборе спектрофотометр UNICO-2800 (США).

В пробирку на 5 мл отбирали 700 мкл исследуемого раствора. Затем добавляли раствор молибдата аммония (0,5 М) 150 мкл и выдерживали 10 минут, для того чтобы образовался желтый кремне-молибденовый комплекс. После этого к раствору прибавляли 3,15 мл воды и 300 мкл смеси аскорбиновой (0,4 М) и щавелевой кислот (0,7 М). Через 30 минут проводили фотометрическое измерение при длинах волн 810 и 1000 нм. Для построения калибровочных

кривых использовались стандартные растворы силиката натрия с концентрациями 400-3200 мкг/мл.

2.5. Спектрофотометрическое определение дигидрокверцетина

К 5 мл анализируемого раствора дигидрокверцетина добавляли 0,2 г цинковой пыли и, после перемешивания, 1 мл смеси кислот, состоящих из концентрированных соляной кислоты, уксусной кислоты и воды в соотношении 3:3:1 (об. %). В качестве растворителя для дигидрокверцетина использовали этиловый спирт. Затем полученную смесь выдерживали 1 минуту в термостате на водяной бане при 50˚С. Смесьизвлекали из термостата и перемешивали в течение 1 минуты. Оставляли смесь на 3 минуты, затем отфильтровывали и через 2 минуты фотометрировали при длине волны 550 нм на спектрофотометре. Построение калибровочного графика проводили аналогично с использованием градуировочных растворов в диапазоне концентраций от 10^{-5} до 10^{-4} М.

Спектры КР записывали на приборе Bruker RFS100/S (Германия). Дифрактограммы записывали на приборе Bruker D8 Advance (Германия), излучение CuK*α*. Люминесцентно-спектроскопический анализ проводили на приборе «МСФУ-6» («ЛОМО», Санкт-Петербург). Электронномикроскопическое исследование выполняли на растровом электронном микроскопе Hitachi TM-3000 (Япония).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Механохимическое получение композита на основе диоксида кремния и дигидрокверцетина

Для проведения взаимодействия дигидрокверцетина и диоксида кремния с целью получения композитов проводили механическую обработку диоксида кремния и дигидрокверцетина (10:1 масс.) в планетарной мельнице. Выбраны времена и интенсивности механического воздействия, не приводящие к деградации флавоноида, что подтверждено данными ВЭЖХ.

При обработке дигидрокверцетина совместно с диоксидом кремния происходит полное исчезновение рефлексов флавоноида (рис. 1). Причиной исчезновения характерных отражений кристаллической фазы дигидрокверцетина может быть аморфизацая и молекулярное диспергирование дигидрокверцетина в избытке твердой фазы диоксида кремния.

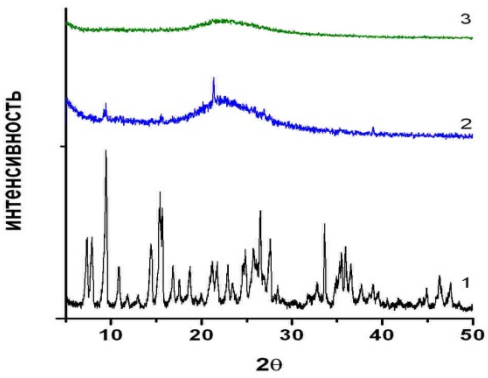


Рисунок 1. Рентгенограммы: 1 – исходного дигидрокверцетина, 2 – смеси дигидрокверцетина и силикагеля, совместно растертых в ступке (10 минут), 3 – смеси дигидрокверцетина и силикагеля после механической обработки в планетарной мельнице (2 минуты)

При механической обработке дигидрокверцетина с диоксидом кремния помимо аморфизации происходит изменение химического состояния дигидрокверцетина. Об этом свидетельствует изменение длины волны люминесценции дигидрокверцетина: происходит появление нового пика на 480 нм с высокой интенсивностью, пик на 560 нм частично сохраняется, о чем свидетельствует асимметричность нового пика в длинноволновой области (рис. 2). Чистый диоксид кремния прозрачен в данной области измерений. Данные результаты позволяют предположить взаимодействие дигидрокверцетина с диоксидом кремния с получением поверхностных комплексов.

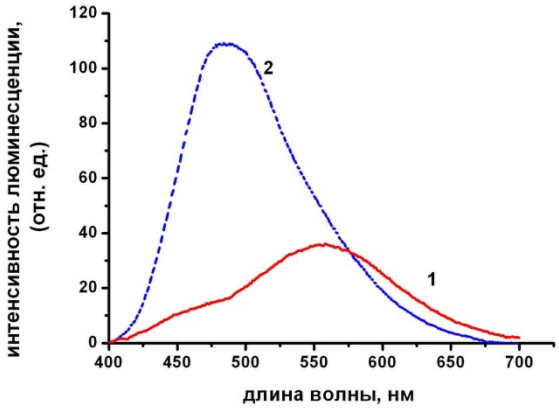


Рисунок 2. Характерные спектры люминесценции: 1 – дигидроквецетин, 2 – совместно активированные дигидрокверцетин и силикагель

Проведено исследование растворов композита дигидрокверцетина и диоксида кремния методом спектроскопии КР. На спектре КР раствора диоксида кремния и композита на основе диоксида кремния и дигидрокверцетина можно выделить две основные области. Первая область (около 3400 $см^{-1}$) относится к валентным полосам группы ОН воды, вторая область (коротковолновая) характеризует формы кремния, находящиеся в растворе. Сигнал от дигидрокверцетина не значителен вследствие малой концентрации данного соединения в растворе.

Первой отличительной особенностью спектра КР композита является смещение пика с 470 см до 450 $см^{-1}$. Пик соответствует колебанию ν_s O-Si-O атома кремния, находящегося в положении Q_4 (скелетного тетраэдра) Такой сдвиг, с одной стороны, можно объяснить изменением одного из заместителей, например при сорбции дигидрокверцетина, а также изменением строения тетраэдра (изменением длин связей, валентных углов). Пик 780 $см^{-1}$ характеризует симметричные колебания тетраэдра $Si(OH)_4$ (мономерной формы кремния), для композита он сдвинут в низкочастотную область и имеет несколько расщеплений. Наблюдается также появление новых пиков на 602, 655, 715 $см^{-1}$ (рис. 3).

ISSN 1313-2539, Published at: http://www.scientific-publications.net

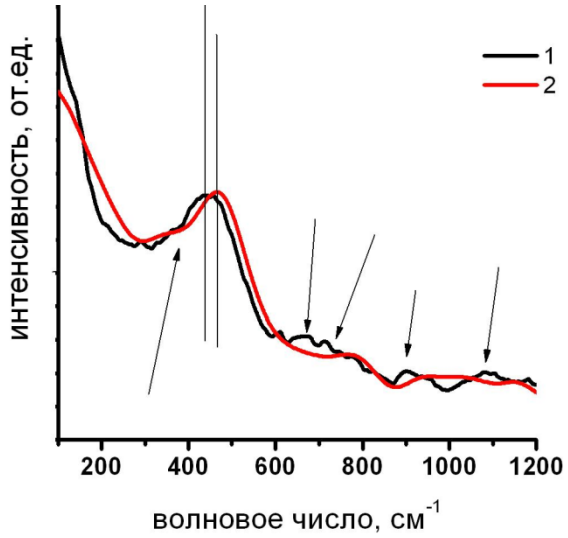


Рисунок 3. Характеристичная область КР-спектров растворов: 1 – механически активированного диоксида кремния, 2 – композита на основе диоксида кремния и дигидрокверцетина

По литературным данным пики в области от 550 до 690 $см^{-1}$ свидетельствуют о присутствии шестикоординированного кремния, хелатированного О-лигандами и имеющего октаэдрическое строение. Как видно из приведенного графика, наибольшей интенсивностью обладает пик на 650 $см^{-1}$. К примеру, октаэдру $[SiF_6]^{2-}$ соответствует пик на 646 $см^{-1}$, который имеет схожее строение с $Si(OR)_6^{2-}$ [15]. Таким образом, при растворении композитов происходит образование хелатных шестикоординированных комплексов кремния с дигидрокверцетином. Получение растворимых комплексов возможно благодаря образованию поверхностных комплексов на стадии механической обработки.

Образование комплексов при растворении композита приводит к увеличению растворимости исходных соединений. Спектрофотометрическим методом показано, что растворимость диоксида кремния и дигидрокверцетина увеличивается примерно в 2 раза по сравнению с образцами, подвергнутыми механической активации индивидуально.

В работе [14] приведены данные об увеличении растворимости диоксида кремния при создании композитов с пирокатехином механохимическим методом до 5 раз. Данную разницу в повышении растворимости можно объяснить несколькими факторами. Во-первых, размерным фактором – в процессе механической обработки большее количество молекул пирокатехина может взаимодействовать с диоксидом кремния с образованием поверхностных комплексов. Во-вторых, в случае использования дигидрокверцетина имеют место стерические ограничения для осуществления взаимодействия, так как флавоноид имеет несколько колец с различными заместителями, и для осуществления взаимодействия ему нужно подойти к поверхности диоксида кремния и развернуться определенным образом. В-третьих, при растворении композита взаимодействие между компонентами осложняется малой растворимостью дигидрокверцетина.

Подобных эффектов стоит ожидать и от катехинов зеленого чая, обладающих схожим пространственным строением, но большой растворимостью. К тому же в случае использования

катехинов из зеленого чая ситуация осложняется наличием лигноцеллюлозной матрицы, ограничивающей массоперенос.

3.2. Получение композитов на основе диоксида кремния и катехинсодержащего растительного сырья

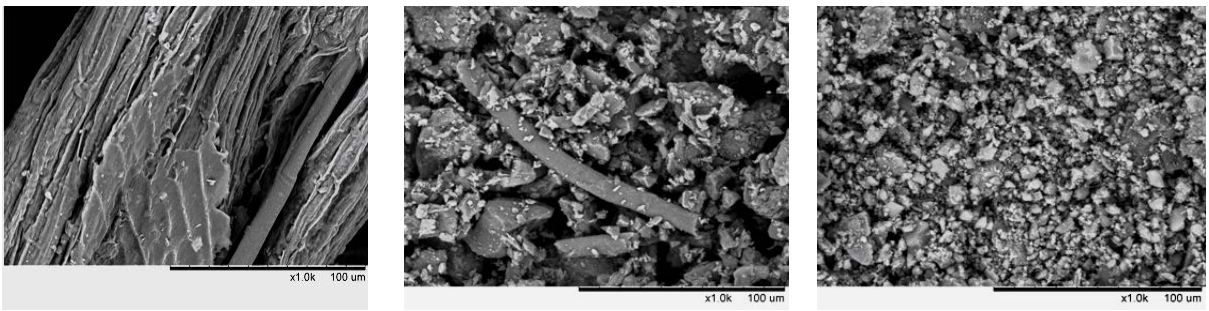
Большая часть биологически активных соединений, в том числе и катехины, сосредоточена внутри клетки и изолирована от внешних физико-химических воздействий прочной клеточной стенкой. Поэтому необходимыми условиями получения из растительного сырья биологически активного соединения с целью его использования для создания композитов являются разрушение клеточных стенок и образование развитой границы раздела между частицами сырья и реагентом.

Механическая активация растительного сырья позволяет интенсифицировать процессы выделения биологически активных соединений путем разрушением супрамолекулярных структур и клеточных стенок [16].

С другой стороны, известно, что механическая обработка растительного сырья характеризуется пороговыми значениями интенсивности и длительности обработки, при достижении которых может наблюдаться деградация органических компонентов. В работе [17] показано, что при высокоэнергетических режимах обработки, характерных для планетарной мельницы, происходит быстрая деградация катехинов. Механическая активация порошка зеленого чая в планетарной мельнице АГО-2 в течение 60 *с* при 20 g не приводит к уменьшению концентрации галлокатехинов.

С учетом вышеперечисленных фактов и литературных данных по обработке растительного сырья в качестве механического активатора также выбрана роликовая мельница, обеспечивающая оптимальный тип обработки с небольшой энергонапряженностью (1 Вт/г). Сдвиговый и истирающий тип воздействия позволяет разрушать клеточные стенки для облегчения извлечения биологически активных соединений, не приводя к существенной деградации катехинов.

Диоксид кремния в процессе механической обработки играет роль не только реагента, но и абразивного вещества, которое способствует разрушению тканей и клеточных стенок (рис. 4). При этом одновременно с разрушением происходит перенос освободившихся катехинов на поверхность диоксида кремния, содержащего активные центры, с образованием поверхностных комплексов.



1 2 3

Рисунок 4. Микрофотографии: 1 – частиц исходного зеленого чая, 2 – механически активированного зеленого чая, 3 – композита на основе диоксида кремния и зеленого чая

По данным РФА при механической обработке зеленого чая происходит существенная аморфизация целлюлозной составляющей растительных тканей, что свидетельствует о разупорядочении структуры. Индекс кристалличности уменьшается с 51 до 32. Разупорядочение структуры и образование протяженной границы раздела фаз обеспечивают полноту химических превращений, протекающих с участием катехинов.

В результате механохимической обработки катехинов в матрице растительного сырья с диоксидом кремния получены композиты, содержащие поверхностные комплексы. При растворении данных композитов происходит увеличение растворимости диоксида кремния до 3 раз, увеличение выхода катехинов − на 40 %. Стоит отметить, что удельная поверхность композита − 98 $м^2/г$, в то время как для активированного диоксида кремния удельная поверхность в 2 раза больше − 178 $м^2/г$. Таким образом, увеличение растворимости диоксида кремния не связано с размерными характеристиками образцов, а определяется химическим взаимодействием с флавоноидами.

Как было показано в работе [14], механохимическое взаимодействие между двухатомным фенолом − пирокатехином и диоксидом кремния осуществляется посредством силанольных групп, располагающихся на поверхности диоксида кремния. Увеличение числа силанольных групп приводит к увеличению степени твердофазного механохимического взаимодействия и выхода комплексных соединений.

Установлено, что количество водорастворимых комплексов для композита на основе диоксида кремния и флавоноидов из растительного сырья так же коррелирует с количеством силанольных групп (рис. 5). Данное обстоятельство свидетельствует об образовании поверхностных комплексов между полифенольными катехинами зеленого чая и силанольными группами диоксида кремния на стадии механической обработки.

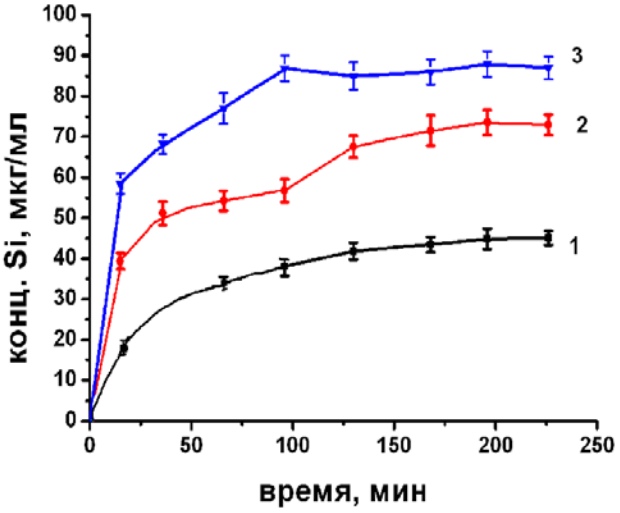


Рисунок 5. Кривые растворения: 1 – активированный диоксид кремния, 2 – совместно активированный диоксид кремния и порошок зеленого чая, 3 – совместно активированный гидроксилированный диоксид кремния и порошок зеленого чая

4. ВЫВОДЫ

1. Твердофазным механохимическим методом получены композиты на основе аморфного диоксида кремния и флавоноидов: дигидрокверцетина и катехинов в матрице зеленого чая.

2. При механохимическом взаимодействии дигидрокверцетина и полифенольных соединений катехинового ряда в матрице растительного сырья с диоксидом кремния наблюдаются эффекты, аналогичные эффектам, полученным в системе диоксид кремния – пирокатехин.

3. Композиты с поверхностными комплексами характеризуются повышенной концентрацией мономерных форм кремния при растворении за счет выхода хелатных комплексных соединений кремния.

4. Совместная механическая обработка с диоксидом кремния увеличивает растворимость дигидрокверцетина и выход катехинов. Полученные композиты обладают большей эффективностью воздействия, чем исходные вещества, что позволяет сократить затраты при производстве препаратов в фармацевтической и косметической промышленности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жигарев, Г.Ф., Очиров, О.И., Кривигина, Е.В., Лудупова, Е.Ю., Ангапов, Т.Ф. Лекарственные средства на основе фенольных веществ растений. Рациональные основы применения лекарственных растений в современной медицине. *Сибирский медицинский журнал.* 2009, № 4, с. 113-114.
2. Cushnie, T.P., Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agent.* 2005, V. 26, pp. 343-356.
3. Sutherland, B.A., Rahman, R.M., Appleton, I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2006, V. 17, pp. 291-306.
4. Цоциашвили, И.И., Бокучава М.А. Химия и технология чая. М.: «Агропромиздат», 1989, 391 с.
5. Яшин, Я.И., Яшин, А.Я., Черноусова, Н.И. Хроматография чая. *Химия и жизнь*. 2005, № 3, с. 50-53.
6. Бабкин, В.А., Остроухова, Л.А., Трофимова, Н.Н. Биомасса лиственницы: от химического состава до инновационных продуктов. Новосибирск: СО РАН, 2011, 236 с.
7. Teselkin, Iu.O., Zhambalova, B.A., Babenkova, I.V., Tiukavkina, N.A. Antioxidant properties of dihydroquercetin. *Biofizika*. 1996, V. 41, No. 3, pp. 620-624.
8. Kolhir, V.K., Bykov, V.A., Baginskaja, A.I., Sokolov, S.Y., Glazova, N.G., Leskova, T.E., Sakovich, G.S., Tjukavkina, N.A., Kolesnik, Yu.A., Rulenko, I.A. Antioxidant activity of a dihydroquercetin isolated from Larix gmelinii (Rupr.) Rupr. wood. *Phytotherapy research*. 1996, V. 10, pp. 478-482.
9. Tjukavkina, N.A., Geodakyan, S.V., Kolesnik, Y.A., Kolhir, V.K., Zjuzin, V.A., Sokolov, S.J. Experimental pharmacokinetics of biologically active plant phenolic compounds III. Pharmacokinetics of dihydroquercetin. *Phytotherapy Research*. 2006, V. 7, No. 2, pp. 208-210.

10. Yang, C.S., Maliakal, P., Meng, X., Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002, V. 42, pp. 25-54.
11. Smirnova, I., Suttiruengwong, S., Arlt. W., Feasibility study of hydrophilic and hydrophobic silica aerogels as drug delivery systems. *Journal of Non-Crystalline Solids.* 2004. V. 350, pp. 54-60.
12. Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A., Nava-Arzaluz, M.G., Piñón-Segundo, E. Silica xerogels as pharmaceutical drug carrie. *Expert. Opin. Drug. Deliv.* 2009, V. 5, pp. 485-498.
13. Seleem, M.N., Munusamy, P.,Ranjan, A., Alqublan, H., Pickrel, G., Sriranganatha, N. Silica-antibiotic hybrid nanoparticles for targeting intracellular pathogens. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 2009, V. 53, No. 10, pp. 4270-4274.
14. Шаполова, Е.Г., Королев, К.Г., Ломовский, О.И., Механохимическое взаимодействие диоксида кремния с хелатирующими полифенольными соединениями и получение растворимых молекулярных форм кремния. *Химия в интересах устойчивого развития*. 2010. Т. 18, № 5, с. 663-668.
15. Earley, J.E., Fortnum, D., Wojcicki, A., Edwards, J.O. Constitution of aqueous oxyanions: perrhenate, tellurate and silicate ions. *J. Am. Chem. Soc.* 1951, V. 81, pp. 1295-1301.
16. Lomovsky, O.I., Lomovsky, I.O. Mechanochemically assisted extraction. Chapter in Enhancing Extraction Processes in the Food Industry ed. by Lebovka, N., Vorobiev, E., Chemat. F. CRC Press, 2011, 570 p.
17. Ломовский, И.О. Устойчивость катехинов зеленого чая в твердой фазе и водном растворе. *Химия в интересах устойчивого развития.* № 20, 2012, с. 253-258.