



*Софийски университет „Св. Климент Охридски“*

---

Факултет по химия и фармация  
катедра Приложна неорганична химия

**Комплекси на включване на основата  
на нишесте**

Антоан Михайлов Рангелов

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертация представена за присъждане на образователна и  
научна степен „Доктор“ по професионално направление 4.2.

Химически науки (Химия на твърдото тяло)

**Научен ръководител: чл. кор. проф. дхн Тони Спасов**

София 2018

Дисертацията съдържа 122 страници, в които са включени 45 фигури, 4 таблици и 141 литературни източници.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от катедрения съвет на катедра Приложна неорганична химия към Факултета по химия и фармация на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, състоял се на 30.01.2018 г.

Антоан Рангелов е бил редовен докторант към катедра Приложна неорганична химия, ФХФ, СУ.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 27.04.2017 г. от 10:00 часа в заседателната зала на Факултета по химия и фармация на СУ „Св. Климент Охридски“

Факултет по химия и фармация  
катедра Приложна неорганична химия

**Комплекси на включване на основата  
на нишесте**

Антоан Михайлов Рангелов

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертация представена за присъждане на образователна и  
научна степен „Доктор“ по професионално направление 4.2.

Химически науки (Химия на твърдото тяло)

**Научен ръководител: чл. кор. проф. дхн Тони Спасов**

**Председател на научното жури: проф. дфн Светла Богданова**

***Научно жури:***

проф. дфн Светла Богданова  
проф. д-р Радостина Стоянова  
проф. дхн Таня Цончева  
доц. д-р Нели Косева  
чл. кор. проф. дхн Тони Спасов

## **I. Увод**

Комплексите на включване са обект на значителен интерес и интензивно изследване, поради разнообразните им свойства и широкото приложение в редица промишлености. Макромолекулите, изграждащи нишестето, могат да играят ролята на домакини в такива комплекси. Тази роля се изпълнява в по-висока степен от линейната амилоза и в по-ниска от разклонения амилопектин. Като гости в комплексите могат да участват различни органични и неорганични молекули. От особен интерес са комплексите с молекули, носители на ароматни и вкусови свойства, с биоактивни и лекарствени молекули. Включените в нишестето лиганди са до голяма степен защитени от факторите на околната среда, но могат да бъдат освободени при попадане в човешкия организъм. При правилен подбор на системата нишесте-лиганд, метода на получаване и крайната структура на комплекса е възможно таргетиране и контролиране на освобождаването на лиганда.

Настоящата дисертационна работа е фокусирана върху изследването на пшенично, царевично и картофено нишестета и техните комплекси с diazotен оксид, лизофосфатидилхолин и ибупрофен. Тези комплекси биха могли да намерят приложение като набухватели, начин за съхранение на биоактивни молекули и начин за таргетирано и контролирано освобождаване на лекарствени молекули при перорално приложение. Дисертационното изследване е насочено към модифициране на микроструктурата на нишестета с различен произход и изучаване на възможността за формиране на комплекси на включване на тяхна основа. Формулирани са следните изследователски задачи:

1. Физикохимично охарактеризиране на изходните нишестета.
2. Изследване на микроструктурните промени, настъпващи в нишестета с различен произход при термични и хидротермични и механохимични третираня.
3. Получаване и охарактеризиране на комплекси на включване на нишесте и diazotен оксид, лизофосфатидилхолин и ибупрофен.

## **II. Резултати и обсъждане**

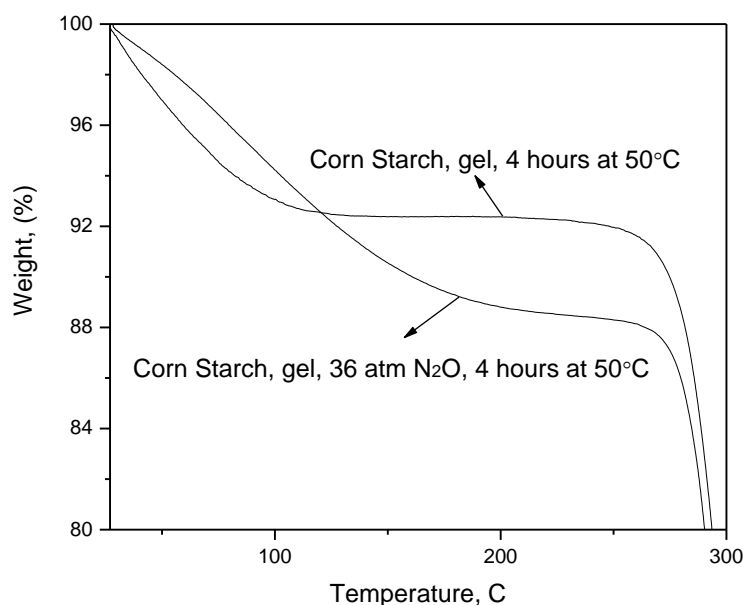
Обекти на дисертационното изследване са комплекси на включване на основата на нишесте. Поради голямото разнообразие в произхода, структурата и свойствата на скорбялата бяха избрани три от най-разпространените и използвани нишестета, а именно пшенично, картофено и царевично. За изследователски цели в областта на комплексите домакин-гост обикновено се използва или чиста амилоза, или нишесте, специално селектирано и/или модифицирано, с цел да има високо съдържание на амилоза (над 70%). Тези вещества обаче са трудни за получаване, имат висока цена и се получават в лимитирано количество, което обуславя употребата им за научни изследвания, но силно ограничава възможностите за промишлени приложения. Използваните в настоящата работа нишестета са широко разпространени, получават се и се използват в огромни количества, изцяло биоразградими и нетоксични са, което прави техните комплекси идеални кандидати за употреба в хранителната и фармацевтичната промишлености.

### **1. Хидротермичен метод**

Изследвана е възможността за получаване на комплекси на включване на диазотен оксид, лизофосфатидилхолин и ибупрофен в нишесте, използвайки хидротермичния метод. При този метод се провежда нагряване на нишесте в присъствие на вода и на молекули на лиганда. Водата действа като пластификатор (би могъл да се използва и друг такъв) и придава по-голяма мобилност на макромолекулите, изграждащи гранулата. Комбинацията от повишената температура и наличието на вода би могла да доведе до достатъчно голяма подвижност на полимерните вериги, основно на амилозата, така че да позволи структурни преформирания. Ако в системата присъства и подходящ лиганд е възможно и формирането на V-формата на амилозата. Тази спирална

форма, която се формира само при подходящи условия около молекулата на лиганда, се смята за типична форма на комплекс на включване.

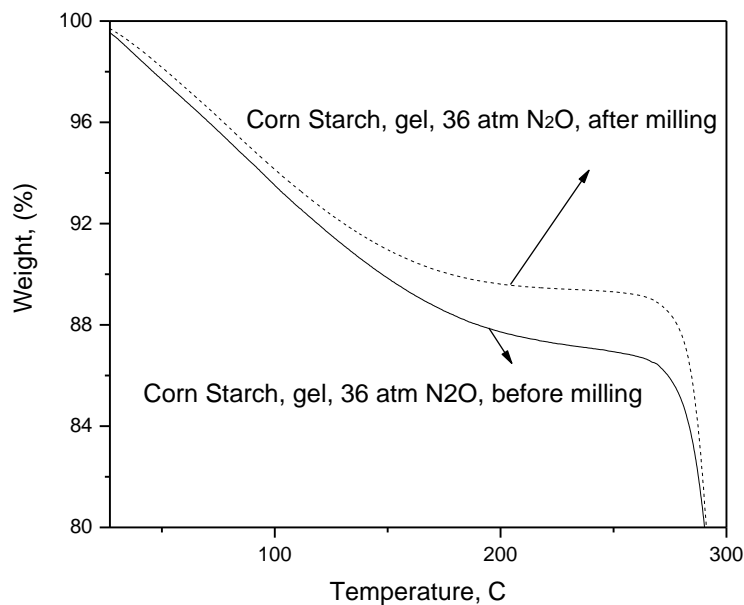
Формирането на комплекси с диазотен оксид е извършено чрез загряване на 10% суспензия на нишесте във вода в реактор за високо налягане от неръждаема стомана. В реактора е осигурено налягане от 36 атмосфери диазотен оксид. Нагряването е извършено до температура над тази на гелиране. След охлаждане на реактора налягането е понижено до атмосферно и пробите са сушени на въздух при стайна температура до постоянно тегло. За оценка на количеството включен газ на изсушените проби е проведен термогравиметричен анализ. Резултатите за царевичното нишесте са представени на Фигура 1. Като референт е използвана проба, гелирана при същите условия, с изключение присъствието на диазотен оксид.



**Фигура 1. Термогравиметрични криви на комплекси на царевично нишесте с диазотен оксид**

От термогравиметричната крива ясно се вижда значително по-голямото олекване на пробата, получена в присъствие на диазотен оксид, в сравнение с референтната проба преди да настъпи термичната деструкция. Интересно е да се

отбележи, че до температура около 130°C, която отговаря на края на отделянето на свързаната вода, съгласно проведените от нас термогравиметрични и калориметрични изследвания на изходните нишестета референтната проба губи по-голяма част от теглото си, в сравнение с комплекса. Това може да означава, че част от тази вода е заместена с молекули на диазотния оксид, който обаче не се отделя при тези температури, защото е по-здраво свързан с нишестените макромолекули. При температура над 130°C комплекса започва да губи тегло значително по-бързо като максималната разлика спрямо референтната проба достига около 4 тегловни %, преди да започне деструкция на нишестето. Известно е, че в присъствието на подходящ лиганд амилозата може да приеме своята спирална форма и да образува комплекси на включване от V-тип. Не всички комплекси на основата на нишесте демонстрират типичната V-структура. При сравнително ниски температури на формиране на комплекса и при слаби взаимодействия между лиганда и амилозата е възможно формиране на изолирани спирални сегменти, приютяващи молекулата гост, но случайно ориентирани помежду си. Ниските температури водят до висока скорост на зародишообразуване, в резултат на което спиралите бързо „замръзват“ на своите места, водейки до много ниска кристалност или пълна липса на такава. Двете проби изглеждат идентично рентгеноаморфни, но разликата в тяхното термично поведение дава основание да се смята, че полученият комплекс е именно от този неподреден тип. Подобни ефекти са наблюдавани и при другите нишестета, но в по-малка степен. Комплексът с диазотен оксид бе подложен на смилане с цел разрушаване на тези изолирани спирални. Резултатът от термогравиметричния анализ на смляната проба е представен на Фигура 2.



**Фигура 2. Термогравиметрични криви на комплекс царевично нишесте-газ преди и след смилане**

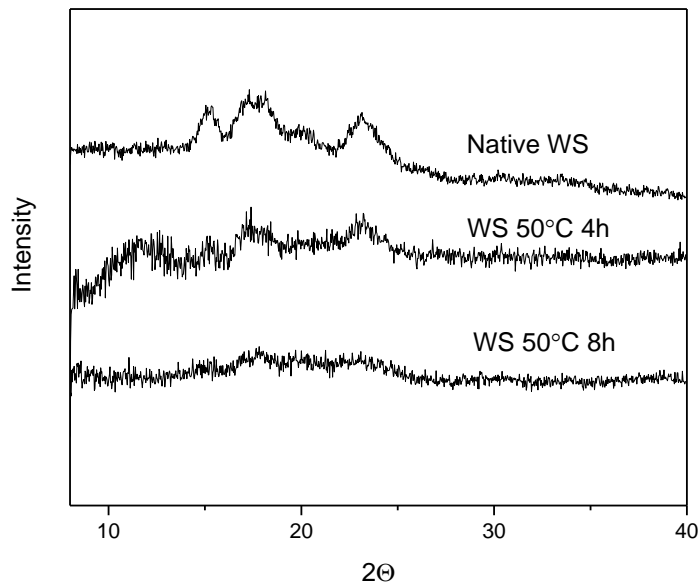
От кривата се вижда, че процесът на олекване следва идентичен ход, както несмиланата проба, но теглото, което смляната проба губи по време на нагряване значително по-малко. Отново разликата е най-голяма при по-високите температури, където би следвало да се наблюдава отделяне на диазотния оксид. Това може да се обясни с разрушаване на изолираните, случайно ориентирани нано-спирали по време на процеса на смилане, което е довело до отделяне на съхранения в спиралите газ. Това от своя страна води до по-малко олекване на пробата при нагряване по време на анализа.

### **Получаване на комплекси с лизофосфатидилхолин**

Синтезирани са комплекси на включване на основата на пшенично нишесте с лизофосфатидилхолин, използвайки хидротермичния метод. Изследвани са структурата и термичното поведение на получените комплекси и е направена оценка на степента на комплексообразуване. За да се изясни влиянието на хидротермичното третиране върху пшеничното нишесте е проведен

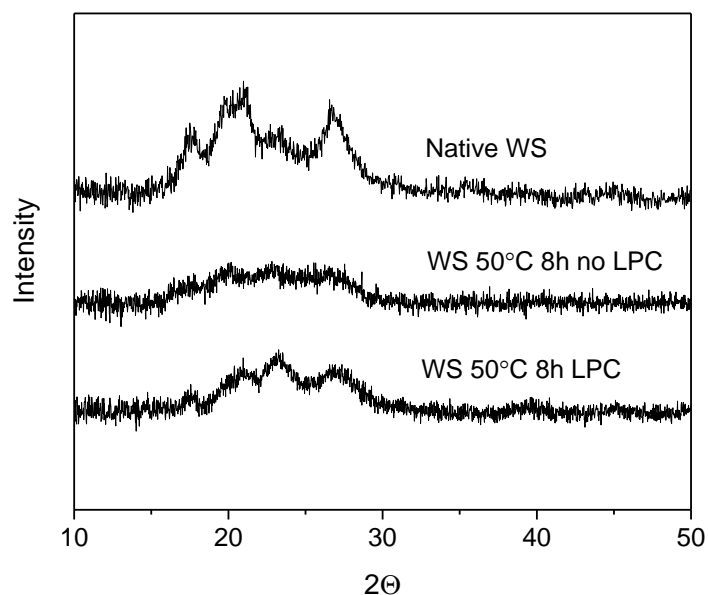


рентгеноструктурен анализ на гранули, третирани при различно време. Резултатите са представени на Фигура 3.



**Фигура 3. Дифрактограми на пшенично нишесте след хидротермично третиране**

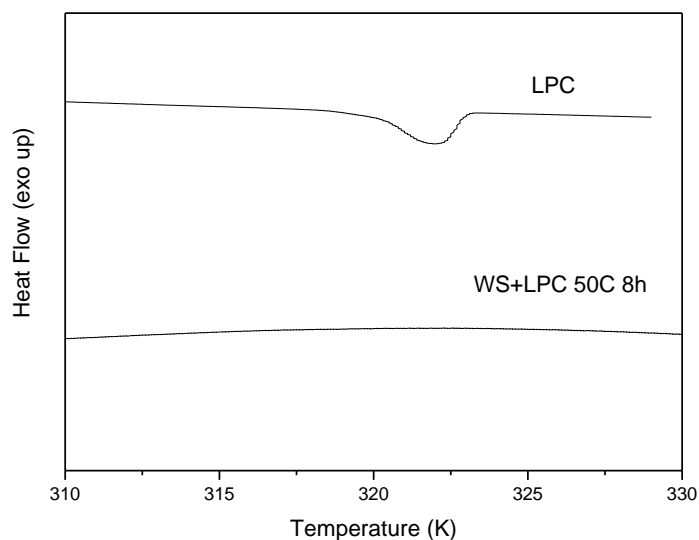
Изходното пшенично нишесте демонстрира типичните за кристалност от тип А дифракционни пикове. При пробата, подложена на хидротермично третиране при 50°C в продължение на 4 часа се забелязва значително понижение в интензитета на кристалните пикове, а при пробата, нагрявана 8 часа, тези пикове почти не се забелязват и тя изглежда на практика рентгеноаморфна. Очевидно е, че при тези условия се постига постепенно разрушаване на подредените участъци в гранулите. Тъй като в системата няма подходящ лиганд подвижните макромолекули не формират спиралната V-структура. По различен начин протича процесът когато към системата е добавено известно количество подходящ лиганд, какъвто е лизофосфатидилхолина. Дифрактограмата на комплекса, получен по хидротермичния метод с лизофосфатидилхолин е представена на Фигура 4.



**Фигура 4. Дифрактограми на пшенично нишесте след хидротермично третиране в присъствие и отсъствие на лизофосфатидилхолин**

При пробата, приготвена в присъствие на липид, се вижда понижение в интензитета на кристалните пикове, съответстващи на структурата на гранулите, но това понижение е по-малко в сравнение с понижението, наблюдавано при липса на лиганд. Това дава основание да се смята, че липидът или формираните с него комплекси имат протективен ефект върху структурата на гранулите. Вижда се, че най-интензивният пик е при дифракционен ъгъл  $23^\circ$ , който е типичен за V-спиралната структура на амилозата (за това измерване по технически причини е използван кобалтов източник на лъчение, на което се дължи отместването на дифракционните ъгли към по-високи стойности, в сравнение с меден източник). Това означава, че при тези условия амилозните макромолекули притежават необходимата мобилност, за да се придвижат и образуват спирала около молекулите на липида.

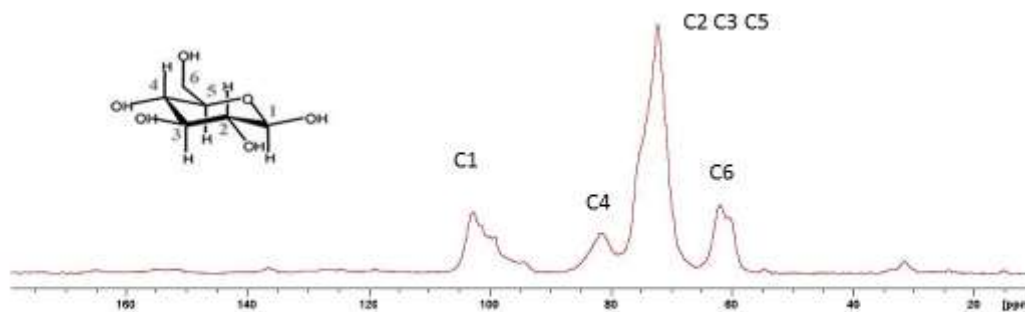
Термичното поведение на комплекса пшенично нишесте-лизофосфатидилхолин и на чистия липид е допълнително изследвано с помощта на диференциална сканираща калориметрия. Калориметричните криви са представени на Фигура 5.



**Фигура 5. Калориметрични криви на лизофосфатидилхолин и комплекс нишесте-липид**

На термограмата на чистия липид ясно се вижда ендотермичният пик на стапяне при температура 321К. Енталпията на стапяне е 46.6 J/g, което съответства на процеса на стапяне на липида по литературни данни. За очакване е при наличие на неучаствал в комплексообразуване свободен липид в термограмата на комплекса да се види ендотермичен пик на топене. Отсъствието на този пик на топене дава основание да се смята, че на практика цялото количество лизофосфатидилхолин е участвало във формирането на комплекси на включване с нишестените макромолекули.

Полученият комплекс е изследван с твърдофазен  $^{13}\text{C}$  ядрено-магнитен резонанс. Резултатите са показани на Фигура 6.

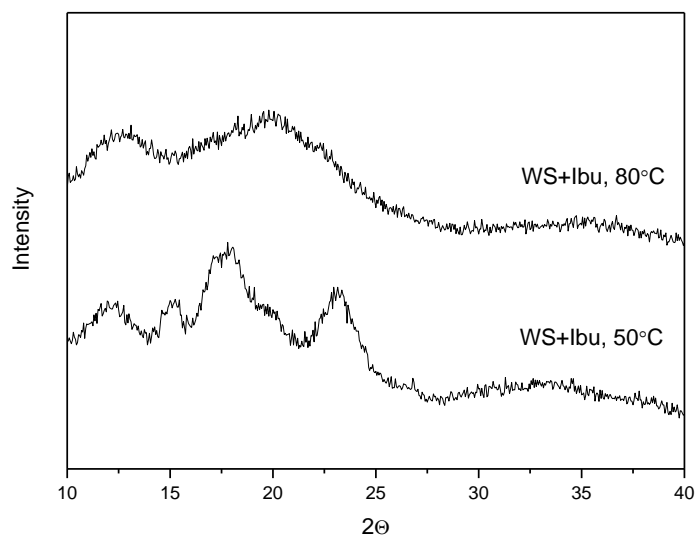


**Фигура 6.**  $^{13}\text{C}$  ядрено-магнитен резонанс на комплекс на включване нишесте-липид

Полученият спектър добре съответства на литературни данни за V-структурата на амилозата. Пиковете при 102.7, 81.4, 74.9, 71.9 и 61.6 ppm отговарят съответно на C1, C4, C3, C2-C5 и C6 въглеродните атоми в молекулата на глюкозата, характерни за  $V_{61}$ -формата на амилозата. Дублетният сигнал в района на C1-въглеродния атом може да се дължи на наличието на малко количество участваща в комплексообразуването B-тип амилоза, в допълнение към комплекса амилоза-липид. Пикът при 31.6 ppm се дължи на средноверижните метиленови групи в молекулата на лизофосфатидилхолина. Отместването на този пик от 32.5-33.0 ppm, където обикновено се наблюдават химичните отмествания на средноверижните метиленови групи в липидните молекули, потвърждава не само наличието на лизофосфатидилхолин в пробата, но и това, че се намира в свързано състояние.

### Получаване на комплекси с Ибупрофен

Използвайки хидротермичния метод са синтезирани комплекси на включване на нишесте с ибупрофен. Дифрактограмите на две проби на нишесте и ибупрофен, подложени на хидротермично третиране са представени на Фигура 7.

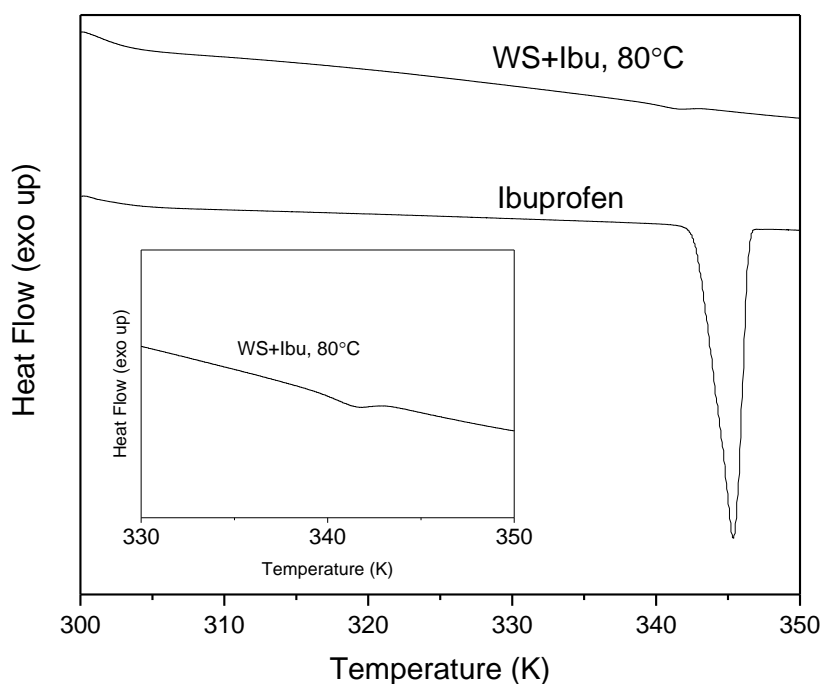


**Фигура 7. Дифрактограми на пшенично нишесте и ибупрофен при различно третиране**

Двете проби са третирани при едни и същи условия, с изключение на температурата - едната проба е държана при температура под  $T_{\text{гел}}$ , а другата при температура, надвишаваща  $T_{\text{гел}}$  при конкретните условия. Както вече е показано, в присъствие на подходящ лиганд с висок афинитет към амилозата, каквито са липидите например и в частност лизофосфатидилхолина, комплексообразуване може да бъде постигнато и при условия, при които не се стига до гелиране на нишестето в реакционната система. Не такъв изглежда случаят с молекулата на ибупрофена. На рентгенограмата на пробата, получена при  $50^{\circ}\text{C}$ , добре се виждат пиковете, отговарящи на частично-кристалната структура на гранулите, но не се забелязват пикове, съответстващи на V-спиралата на амилозата. При пробата, получена при  $80^{\circ}\text{C}$ , не се наблюдават пиковете, съответстващи на гранулната структура, което е за очакване, имайки предвид, че тази температура се намира над  $T_{\text{гел}}$ , но се виждат два широки пика с максимуми съответно при  $13^{\circ}$  и  $20^{\circ}$  дифракционен ъгъл. Подобни пикове са наблюдавани от други автори при образуване на комплекси на чиста амилоза с алкохоли. Образуването на комплекс в този случай може да се обясни със състоянието на лиганда. При  $50^{\circ}\text{C}$  въпреки наличието на достатъчна мобилност на амилозните

макромолекули, потвърдено от предходните експерименти, ибупрофенът се намира в твърдо състояние, тъй като има температура на топене  $73^{\circ}\text{C}$  и с много ниска разтворимост във вода, което изглежда не позволява формирането на комплекси на включване. При достигане на  $80^{\circ}\text{C}$ , която е над температурата на гелиране, не само макромолекулите имат по-висока мобилност, но и ибупрофенът е разтворен, което позволява на амилозните макромолекули да образуват спирала около молекулите на лиганда.

За да се оцени степента на включване на ибупрофен в комплекса е използвана диференциална сканираща калориметрия. Термограмата е представена на Фигура 8.



**Фигура 8. ДСК криви на стапяне на чист ибупрофен и неучаствал в комплексобразуване ибупрофен**

В кривата на чистия ибупрофен се наблюдава ендотермичен пик на топене с максимум при около 343К. Енталпията на топене на ибупрофена, определена от ДСК кривата е 127 J/g. В кривата на комплекса също се забелязва ендотермичен пик при същата температура, дължащ се на неучаствалото в процеса на комплексообразуване количество ибупрофен. По енталпията на топене на остатъчното количество ибупрофен и знаейки какво количество се съдържа в реакционната смес е направена оценка за степента на включване на лиганда в комплекс. Определеното по този начин количество съответства на около 18% от вложеното количество, което означава, че степента на комплексообразуване, оценена спрямо лиганда е 82%. Друг подход за количествена оценка на степента на включване на лиганда в комплекси е промиване на пробата с разтворител и последващо измерване на количеството ибупрофен в промивния разтвор. Подходящ разтворител в случая е етиловият алкохол, тъй като той отлично разтваря ибупрофена и не разтваря нишестето. Освен това резултатите, представени в дисертационния труд, дават основание да се смята, че етанолът не притежава пластификаторни свойства спрямо нишестето и в пренебрежимо малка степен би повлиял структурата на комплекса, което го прави добър избор за осъществяване на тази количествена оценка. Пробата е промита за кратко с известно количество абсолютен етанол при стайна температура, след което концентрацията на ибупрофен в новополучения разтвор е определена с помощта на UV/VIS спектрофотометричен анализ. Калибрационна крива е построена непосредствено преди измерванията. Откритото по този начин количество ибупрофен за комплекса, получен по хидротермичен метод при 80°C, съответства на около 39% от общото количество вложен ибупрофен в пробата. Този резултат е в много добро съответствие с откритото с помощта на диференциална сканираща калориметрия количество- 18% от вложения ибупрофен в пробата. Разликата от 21% може да се обясни: ибупрофенът има много добра разтворимост в етанола. Възможно е при процеса на промиване с етанол част от молекулите на лиганда, участвали в комплексообразуване, в участъци с по-ниска степен на подреденост, да са извлечени от спиралните структури на амилозата и да са попаднали в промивния разтвор. Подобен ефект

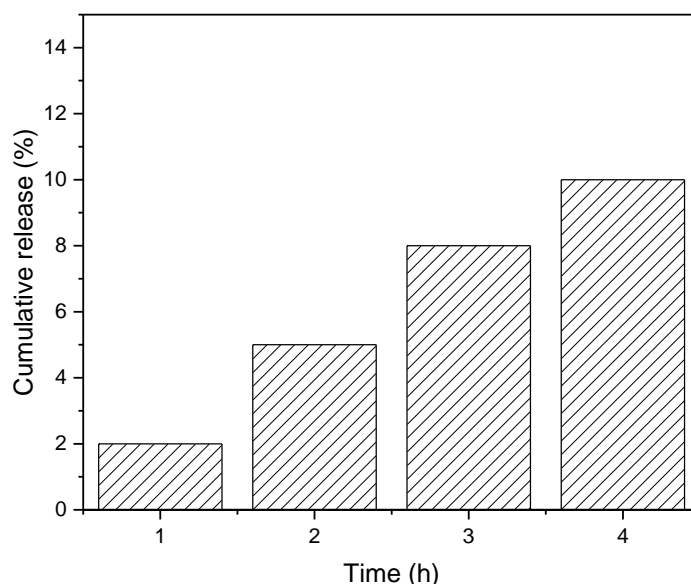
не би могъл да се очаква при измерването на енталпията на топене, където за очакване е да се открие само количеството ибупрофен, което не е влязло в амилозните спирали.

Проведено е и измерване на тоталното количество ибупрофен в пробата, посредством пълна хидролиза на нишестето. Накратко измерването се осъществява по следната схема: промитите с етанол и изсушени комплекси се нагряват в затворен съд при 100°C за 5 часа в присъствие на сярна киселина с концентрация 3M. След охлаждане разтворът се разрежда с вода и неутрализира с бариев карбонат. Полученият разтвор се смесва в съотношение 1:1 с етанол и количествено се определя ибупрофенът с помощта на UV/VIS спектрофотометър. Определеното по този начин количество съответства на 58% от вложеното в съответното количество проба ибупрофен. Този резултат е в много добро съответствие с резултатите от останалите измервания на количеството комплексообразувал ибупрофен. По време на промиването са отстранени около 39% от тоталното количество ибупрофен в пробата, което представлява сумата от нереагиралото количество лиганд и от слабо свързаното или извлечено от амилозните спирали, намиращи се по повърхността на частиците. Останалото под формата на комплекси на включване количество ибупрофен бива освободено по време на пълната хидролиза. Малка част от разликите по всяка вероятност се дължат на загуби по време на процесите на получаване, сушене, промиване и тн. Въпреки това теоретично вложеният ибупрофен се открива в голяма степен след пълна хидролиза на комплексите.

Целта на комплексите на нишесте с ибупрофен е да доставят лекарството до червата, където под действието на храносмилателните ензими, най-вече амилазата, да се стигне до постепенна хидролиза на комплексите и освобождаване на лекарствената молекула. По този начин се прави опит за минимизиране на взаимодействието на лекарството със стомашната лигавица и респективно на честотата и тежестта на локални НЛР. За да се постигне това е необходимо минимално освобождаване на лекарството в стомаха. Стабилността на комплекса, получен по хидротермичния подход, е изследвана в симулирана



стомашна среда. Накратко, известно количество от промития с етанол комплекс се поставя в затворен съд с 0.1M солна киселина с рН=1.2. Съдът се поставя в инкубатор, позволяващ поддържане на 37°C и леко разклащане при 50 оборота. След определено време (1, 2, 3 и 4 часа) пробата се неутрализира с натриева основа и с UV/VIS спектрофотометър се определя количеството отделен ибупрофен. Резултатите за освобождаването на лекарствената молекула в симулирана стомашна среда са представени на Фигура 9. Процентите са спрямо количеството, за което е установено, че остава в комплекса на включване след промиване с етанол.



**Фигура 9. Кумулативно освобождаване на ибупрофен в симулирана стомашна среда от хидротермично получен комплекс**

В заключение може да се каже, че хидротермичният метод успешно е използван за получаване на комплекси на включване на нишесте с diazotен оксид, лизофосфатидилхолин и ибупрофен. Изследвано е влиянието на термичното и хидротермично третиране при различни условия върху структурата на нишестета с различен произход и са охарактеризирани

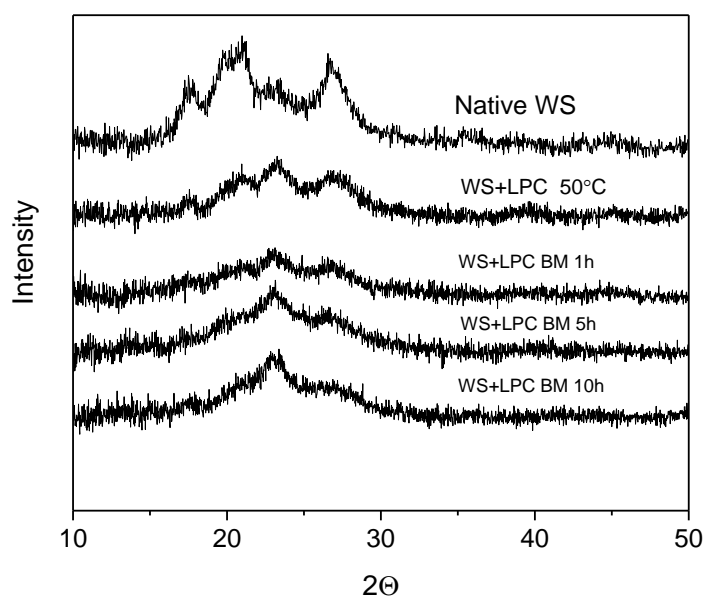
получените комплекси. За всички комплекси са направени количествени оценки за степента на включване на лиганда. От получените резултати може да се каже, че методът е подходящ за получаване на комплекси на нишесте с различни лиганди, включително и лекарствени молекули, но е необходимо подробно изследване и добро разбиране върху множеството фактори, влияещи върху процеса.

## 2. Механохимичен метод

Влиянието на процеса на смилане върху някои свойства на различни нишестета е изследвано, но до момента възможността за формиране на комплекси на включване на основа на нишесте по механохимичен път не е проучвана. В тази глава е използван механохимичен подход за синтезиране на комплекси на включване на нишесте с лизофосфатидилхолин и ибупрофен и е направено сравнение с комплекси, получени по хидротермичния метод. Изследвано е и влиянието на количеството и вида на добавения пластификатор върху структурните промени, настъпващи по време на процеса на смилане.

Приложеният механохимичен подход се състои в поставяне на известно количество от съответното нишесте, лиганд и пластификатор в стоманен реактор за топково смилане, заедно с определен брой и вид стоманени топчета. Така заредените реактори са поставени в планетарна топкова мелница, където реакционната смес е подложена на смилане при известни обороти и време. Като пластификатори са използвани вода, етанол, и различни по концентрация водни разтвори на етанол.

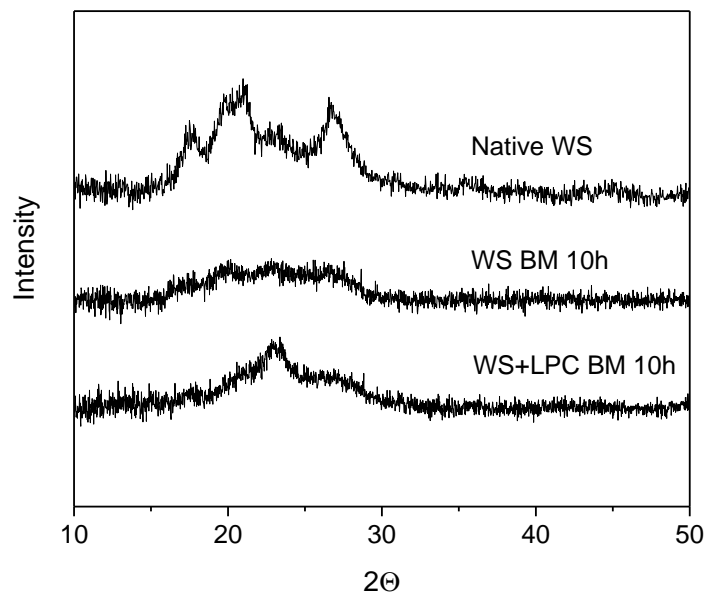
Дифрактограмите на комплекси на нишесте с лизофосфатидилхолин са представени на Фигура 10.



**Фигура 10. Дифрактограми на комплекси нишесте-лизофосфатидилхолин**

На рентгенограмата на нативното нишесте се вижда типичната частично-кристална структура на гранули от тип А. Дори само след един час топково смилане в присъствие на лиганд и пластификатор вода се забелязва значително понижаване на интензитета на пиковете, съответстващи на кристалната структура, както и появата на нов пик при дифракционен ъгъл  $23^\circ$ , който съответства на спиралната структура на амилозата и е типичен за комплексите на включване. Тук е използван кобалтов източник на лъчение, поради което този пик се наблюдава при ъгъл  $23^\circ$ , при използване на медно лъчение пикът се среща при ъгъл  $20^\circ$ . С увеличаване на времето на смилане от 1 час на 5 часа интензитетът на този пик нараства, а ширината намалява, което се вижда отчетливо и при пробата, смилана 10 часа. *He* и колектив са постигнали значително понижение на интензитета на кристалните пикове при топково смилане на нишесте, като са постигнали на практика рентгеноаморфен материал само след няколко часа на смилане при идентични условия. Това е в добро съответствие и с описаните в тази глава резултати. Присъствието на подходящ лиганд в реакционната смес, обаче, води до запазване на кристалност, дори и след 10 часово смилане. Това дава основание да се смята, че действително

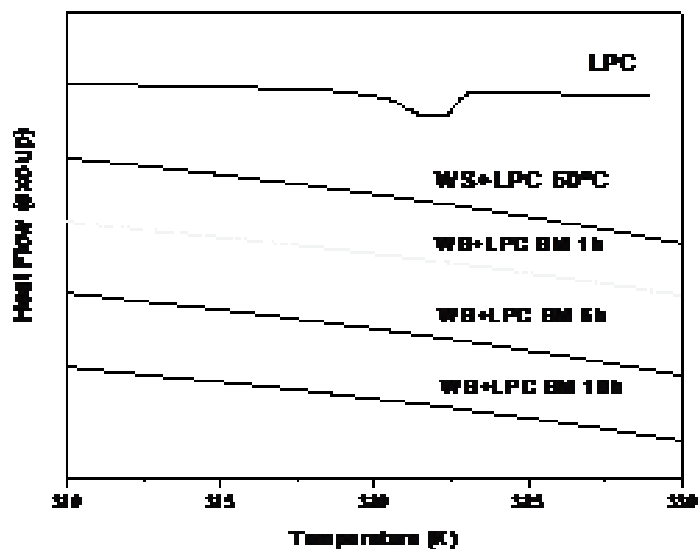
механичното третиране на реакционната смес е причина за протичане на реакцията на комплексообразване. За да се изследва възможността тези структурни промени да се дължат само на механичната обработка, бе проведен рентгеноструктурен анализ и на реакционна смес, в която отсъства лиганд, третирана при същите условия. Дифрактограмите са представени на Фигура 11.



**Фигура 11. Дифрактограми на механохимично третирани проби в присъствие и отсъствие на лизофосфатидилхолин**

От рентгенограмата ясно се вижда, че 10 часово смилане на нишесте в присъствие на вода, но не и на лиганд, води до получаване на практически аморфен материал, като пиковете, съответстващи на кристалната структура на изходните гранули, са почти незабележими. Наличието на лизофосфатидилхолин прави възможно образуването на комплекси на включване, на които се дължи типичният за V-структурата на амилозата пик при ъгъл 23°.

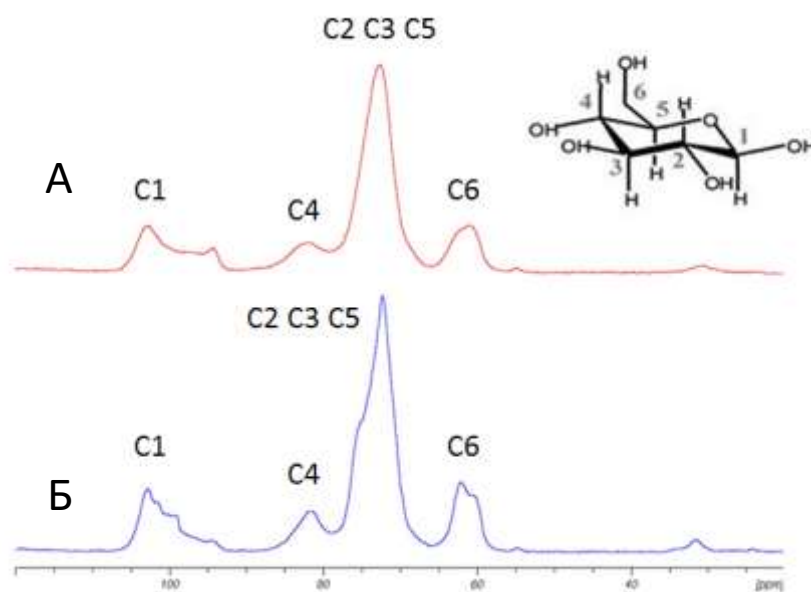
За да се изследва степента на участие в образуване на комплекси на лизофосфатидилхолина пробите са изследвани с диференциална сканираща калориметрия. Калориметричните криви са представени на Фигура 12.



**Фигура 12. Калориметрични криви на комплекси нишесте-лизофосфатидилхолин, получени при различни методи**

Измерванията са проведени в температурни интервали, обхващащи температурата на стапяне на чистия лизофосфатидилхолин. Също така, за да се провери чувствителността на апарата, е проведено измерване на механична смес от нишесте и липид, в количества, много по-ниски от очакваните в пробата. Вижда се, че нито при хидротермично полученият комплекс, нито при механохимично получените комплекси, получени при различни времена на смилане, се забелязва ендотермичният пик на топене на липида. Това дава основание да се смята, че практически цялото количество лизофосфатидилхолин е участвало в образуване на комплекс. Въпреки различните структури, видими от рентгенограмите на комплексите, подложени на различни времена на смилане, от калориметричните криви се вижда, че дори само 1 час смилане при тези условия е достатъчно, за да осигури пълно включване на лиганда в макромолекулите на домакина.

Двата комплекса са изследвани и с помощта на твърдофазен  $^{13}\text{C}$  ядрено-магнитен резонанс. Резултатите за химичните отмествания са представени на Фигура 13.



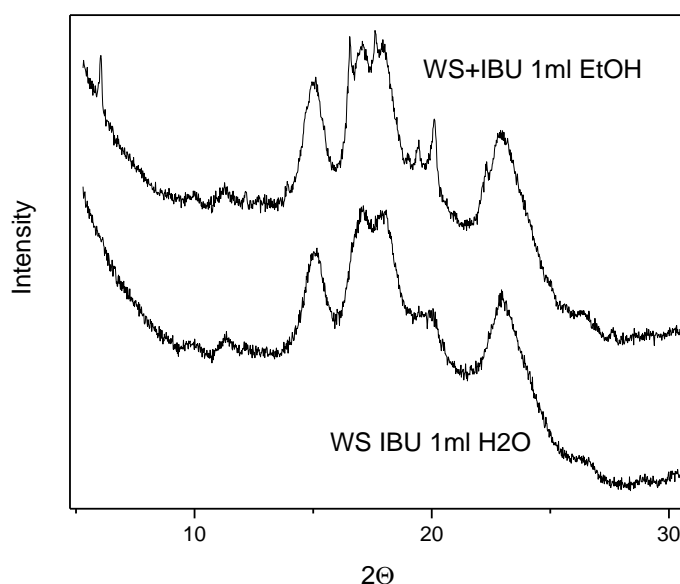
**Фигура 13.  $^{13}\text{C}$  ядрено-магнитен резонанс на комплекси на включване нишесте-липид, получени по механохимичен (А) и хидротермичен (Б) метод**

И двата комплекса демонстрират резонанси, типични за спиралната структура на амилозата и много подобни на тези, докладвани от други автори в литературата. Пиковете при 102.7, 81.4, 74.9, 71.9 и 61.6 ppm отговарят съответно на C1, C4, C3, C2-C5 и C6 въглеродните атоми, характерни за V-структурата на амилозата. Дублетният сигнал при C1 региона на хидротермично получения комплекс може да се обясни с наличието на В-тип амилоза в пробата. Химичните отмествания в областта 95-100 ppm на механохимично получения комплекс могат да се дължат на наличието на ниско-подредени или аморфни комплекси, в допълнение към кристалните комплекси в пробата, което съответства и на резултатите от рентгеноструктурния анализ. Това е за очакване и се потвърждава и от другите използвани методи. И при двата комплекса се наблюдава отместеният пик при 31.6 ppm, характерен за средноверижните

метиленови групи в липида, който потвърждава наличието на свързан лизофосфатидилхолин в изследваните проби.

### **Получаване на комплекси нишесте-ибупрофен и изследване способността на етанолът да действа като пластификатор**

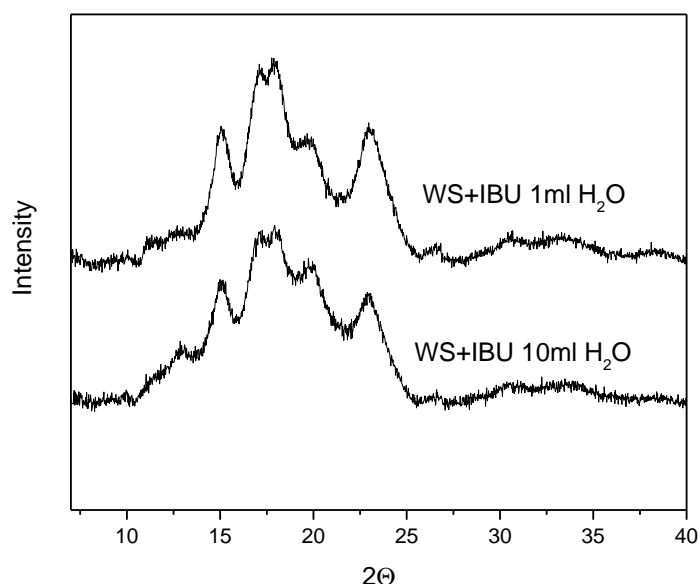
За да се изследва разликата в процесите на смилане и образуване на комплекси в присъствие на различен пластификатор е проведено механохимично третиране на идентични проби при еднакви условия, с изключение на вида на течната фаза. Използвано е еднакво количество вода и етанол, а рентгенограмите са представени на Фигура 14.



**Фигура 14. Дифрактограми на проби нишесте-ибупрофен, смилани при различен пластификатор при еднакви улсовия (2 часа, 300 об/мин)**

В рентгенограмата на пробата, използваща като течна фаза етилов алкохол, се отчитат незначителни промени в гранулната структура, както и в пиковите на кристалния ибупрофен, което е за очакване и съответства на предходните резултати. При промяна на течната фаза от етанол на вода се вижда, че относителният интензитет на кристалните пикове, отговарящи на частично-

кристалната гранулна структура, е значително понижен. Също така пиковите на кристалния ибупрофен не се забелязват, но се забелязва слабо изразен пик при около  $20^\circ$  дифракционен ъгъл, загатващ образуване в малка степен на V-формата на амилозата. Изглежда, че количеството пластификатор не е достатъчно, за да осигури достатъчна мобилност на достатъчен брой макромолекули, за да позволи по-пълно преподреждане в спиралната форма на амилозата. За да се провери тази хипотеза е проведен опит с различни количества пластификатор вода. Рентгенограмите на получените комплекси са представени на Фигура 15.

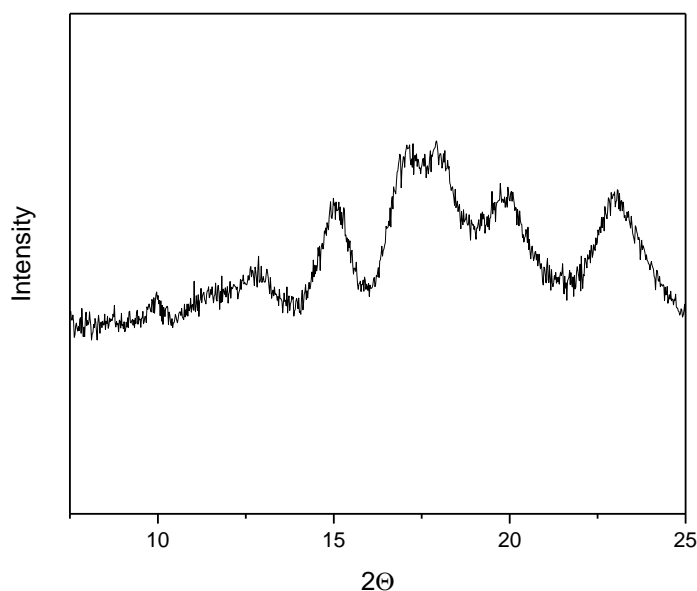


**Фигура 15. Дифрактограми на системи нишесте-ибупрофен с различно количество пластификатор, смилани при еднакви условия (2 часа, 500 rpm)**

Вижда се, че промяната на количеството подходящ пластификатор води до значителни промени в структурата на получените комплекси. В рентгенограмите и на двете проби не се забелязват пикове, дължащи се на кристален ибупрофен. Също така при комплекса, получен с по-голямо количество вода в системата, кристалните пикове, съответстващи на гранулната



структура, имат много по-нисък принос към рентгенограмата, за сметка на по-голям принос на аморфната фаза. Очевидно е и нарастването на интензитета на пика при  $20^\circ$  дифракционен ъгъл, отговарящ на спиралната форма на амилозата. Изглежда, че по-голямото количество пластификатор осигурява необходимата подвижност на макромолекулите и те се препореджат около лиганда, формирайки комплекс на включване. След оптимизиране на реакционните условия е получен комплекс нишесте-ибупрофен, чиято рентгенограма е представена на Фигура 16.

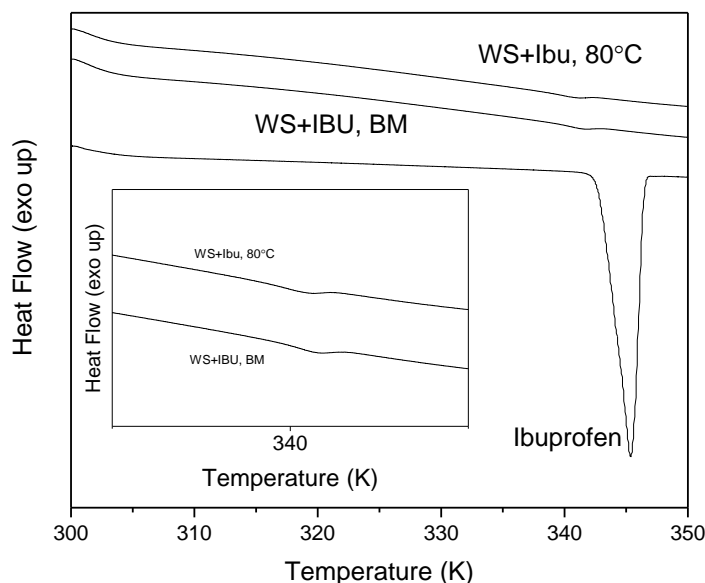


**Фигура 16. Дифрактограма на комплекс нишесте-ибупрофен, получен по механохимичен път**

От рентгенограмата на комплекса, получен с използване на вода като течна фаза и пластификатор, ясно се вижда интензивният пик при дифракционен ъгъл  $19.8^\circ$ , който съответства на спиралната структура на амилозата. Също така се забелязва и другият характеристичен за V-амилозата пик при  $13^\circ$  дифракционен ъгъл, което е знак, че получените комплекси са с висока степен на подредане, което е интересен резултат, имайки предвид методът за получаване. На рентгенограмата не се забелязват пиковете, дължащи се на кристалния

ибупрофен, което е индикация, че лекарствените молекули са се включили в структурата на комплексите. Подобно заключение изглежда логично, имайки предвид, че присъствието на лиганд е необходимо условие за формиране на V-амилозните спирали при тези условия на третиране, както вече бе показано. Предложеният механохимичен метод за получаване на комплекси на основата на нишесте дава добри резултати за изследваните лиганди и позволява включването на лекарствени молекули в амилозните спирали.

Комплексът е охарактеризиран, използвайки същите подходи, както при комплекса нишесте-ибупрофен, получен по хидротермичния подход. Също така е направена съпоставка между комплексите, получени по двата различни метода. Кривите от диференциалната сканираща калориметрия са представени на Фигура 17.



**Фигура 17. ДСК криви на стапяне на чист ибупрофен и на несвързан ибупрофен**

ДСК е добър метод за количествена оценка на нереагирало количество лиганд. Използвайки енталпията на топене на чистия ибупрофен е определено, че в пробата се откриват 13% от теоретично максималното количество, което може

да се смята за неучаствал в комплексообразуване лиганд. Този резултат добре съответства на данните от рентгеноструктурния анализ, откъдето личи високата степен на образуване на V-конформацията на амилозата. За сравнение количеството, открито по същия метод при хидротермично получения комплекс е 18%. Това е индикация за по-висока степен на включване при механохимичния подход при конкретните условия на получаване.

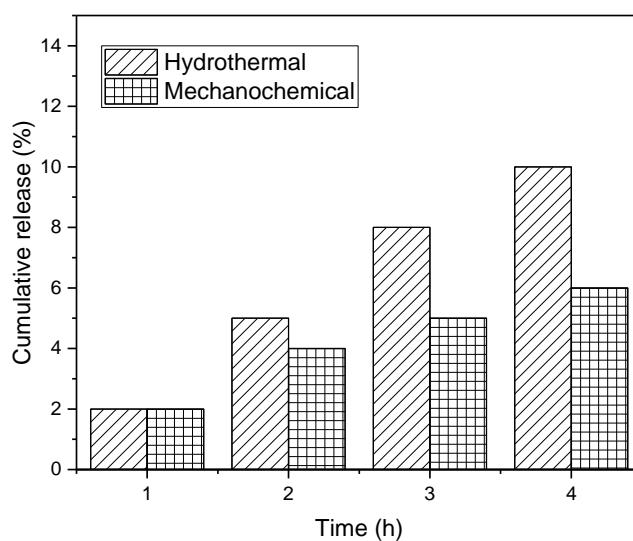
Допълнителна информация за взаимодействието между молекулите на домакина и госта е получена чрез промиване на комплекса с етилов алкохол и количествено определяне на разтворения лиганд, подобно на това при хидротермичния метод на синтез. Използвани са същите условия на промиване и същата методология на спектрофотометрично определяне на количеството ибупрофен. Определеното по този начин количество лиганд е 20.5%. Разликата между стойността от ДСК и тази от промиването вероятно се дължи на извличане на малка част от ибупрофен, включен в амилозни спирали, или намиращ се по повърхността на частиците в некристализирало състояние, което прави калориметричното му откриване невъзможно. Тази разлика е значително по-малка при механохимичния метод (7.5%), отколкото при хидротермичния (21%). Това би могло да се обясни с разликите в частично-кристалните структури на двата комплекса, получени по различни методи. По-ниската степен на подреденост, установена при комплекса, получен след гелиране, способства за по-голямо взаимодействие между частиците на комплекса и етанола за времето на промиване, тъй като е известно, че по-малко подредените зони са достъпни за течна фаза в сравнение с по-високо подредените. Именно поради това и по-кристалните комплекси са по-устойчиви към киселинна и ензимна хидролиза. Повишеното взаимодействие между етанола и частиците на комплекса, както и по-малката подреденост на амилозните спирали една спрямо друга, могат да доведат до извличане на по-голяма част от свързания лиганд, което обуславя по-голямата разлика в количествата ибупрофен, определени чрез ДСК и промиване. Запазването на част от гранулната структура, както и по-високата степен на подреденост на амилозните спирали, за която се съди по

сравнително по-високата интензивност и по-малка ширина на пиковете, могат значително да ограничат достъпа на етанола до вътрешните участъци от частиците. По този начин извличане може да се осъществи само от амилозни спирали, намиращи се по повърхността, които би следвало да са значително по-малко. Това води до наблюдава по-малка разлика в количествата ибупрофен, определени по двата метода за механохимично получения комплекс. Резултатите от определянето на количеството включен ибупрофен са представени на Таблица 1.

Метод на получаване на комплекса	ДСК	Разтваряне в етанол	След хидролиза (на промита проба)
Хидротермичен	18%	39%	58%
Механохимичен	13%	20,50%	76%

**Таблица 1. Количество Ибупрофен, определено по различни методи в различни комплекси**

Тоталното количество ибупрофен в комплекса е установено по метода на пълната хидролиза в кисела среда. Резултатите са представени на една диаграма с тези от хидротермичния метод на Фигура 18.



**Фигура 18. Кумулативно освобождаване на ибупрофен в симулирана стомашна среда от двата комплекса**

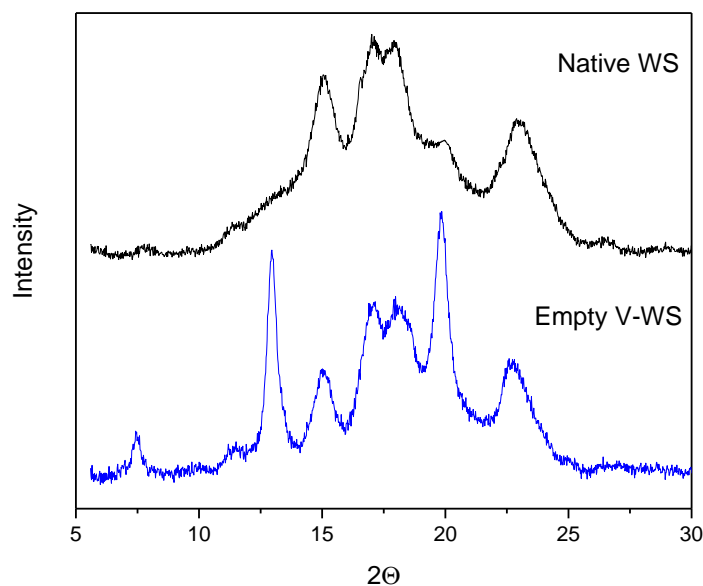
От Фигура 18 се вижда, че комплексът нишесте-ибупрофен, получен по механохимичен метод притежава значително по-висока резистентност към киселинна хидролиза в условия, наподобяващи стомашна среда, в сравнение с този, получен по хидротермичния метод. Това се обуславя от структурата на двата комплекса - сравнително неподреденият комплекс, получен по време на гелиране, е по-лесно достъпен за киселинна атака в сравнение с механохимичния комплекс, при който е запазена и значителна част от гранулната структура. Тези резултати изглеждат логични в контекста на изследвани от други автори хидролизни процеси на комплекси с различни лиганди и структури и дават основание да се смята, че механохимичният подход би могъл да се използва за получаване на комплекси на включване с висока степен на подреденост и устойчивост в стомашна среда, подходящи за носители на лекарствени молекули.

В заключение може да се каже, че успешно са получени комплекси на включване на нишесте с лизофосфатидилхолин и ибупрофен. Предложеният механохимичен метод в присъствие на течна среда от пластификатор дава много

добри резултати и получените комплекси са охарактеризирани и сравнени с тези, получени хидротермично. Изследвано е влиянието на вида и количеството пластификатор, времето и интензивността на смилане върху структурата на нишестето и процеса на комплексообразуване. Установена е по-висока степен на включване и по-висока устойчивост към симулирана стомашна среда в сравнение с хидротермично получения комплекс с ибупрофен.

### **3. Получаване на гранули, съдържащи празни V-спирали**

През 2014г. Kong и Ziegler предлагат нов метод за получаване на комплекси на включване на основата на нишесте, който се основава на предварително получаване на празни V-спирали и последващо включване на молекулата гост. Като домакини те използват нишесте с високо съдържание на амилоза (около 70%), както и чиста амилоза. И двете вещества са с много висока цена, което ги прави на практика неизползваеми за мащаби по-големи от лабораторните. Използваните от тях методи за получаване са два: единият включва пълно разтваряне на домакина в диметилсулфоксид (ДМСО), а другият диспергиране във вода при 150°C. И в двата случая следва смесване с етилов алкохол, което води до получаване на комплекс на включване. По време на процеса на съхнене етанолът напуска комплекса без да променя структурата, оставяйки по този начин празни V-амилозни спирали. И двата метода водят до пълно разрушаване на изходната гранулна структура. Използвайки проведените от нас изследвания върху процесите на топене и гелиране, както и влиянието на различни пластификатори, са получени гранули, съдържащи празни амилозни спирали при запазена гранулна структура. Рентгенограмата на получения материал е представена на Фигура 19.

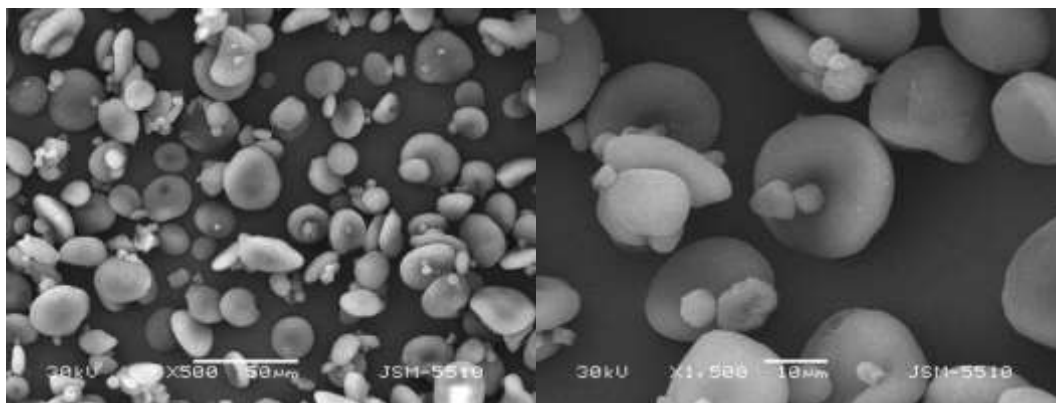


**Фигура 19. Дифрактограми на нативно нишесте и нишесте, съдържащо празни V-спирали**

На рентгенограмата на получения материал ясно се виждат дифракционни пикове с висок интензитет при  $7.5^\circ$ ,  $13^\circ$  и  $20^\circ$ , които са типични за V-амилозата. Виждат се също и пиковите при  $15^\circ$ ,  $17^\circ$ ,  $18^\circ$  и  $23^\circ$ , които съответстват на гранулната структура на изходното нишесте. Относителният интензитет на характерните за гранулната архитектура пикове е почти непроменен спрямо този при нативното нишесте, което означава, че структурата на гранулитите, дължаща се най-вече на амилопектиновите макромолекули е успешно запазена. Забелязва се обаче значително понижение в относителния принос на аморфната част от гранулитите, която се дължи най-вече на амилозните полимерни вериги, съпътствано с появата на пиковите на V-амилозата с висока интензивност и малка полуширина. Това дава основание да се смята, че амилозата е преминала от не подредено към високо подредено състояние на спирала, почти без да е засегната гранулната цялост. Това може да се обясни с различната достъпност на аморфните и кристалните зони в гранулитите за пластификатор. Подходящият избор на вид и количество на пластификатора, температура и време, позволява понижение на температурата на разстъкляване на аморфните участъци и

преминаването им във високоеластично състояние, правейки възможни значителните структурни преобразувания, видими на рентгенограмата. Същевременно подредените участъци имат минимално взаимодействие с пластификатора и не достигат до температурата си на топене, което обуславя и минималните промени в кристалните пикове в рентгенограмата.

Частиците на получения материал са наблюдавани с помощта на сканиращ електронен микроскоп. Изображенията от SEM са представени на Фигура 20.

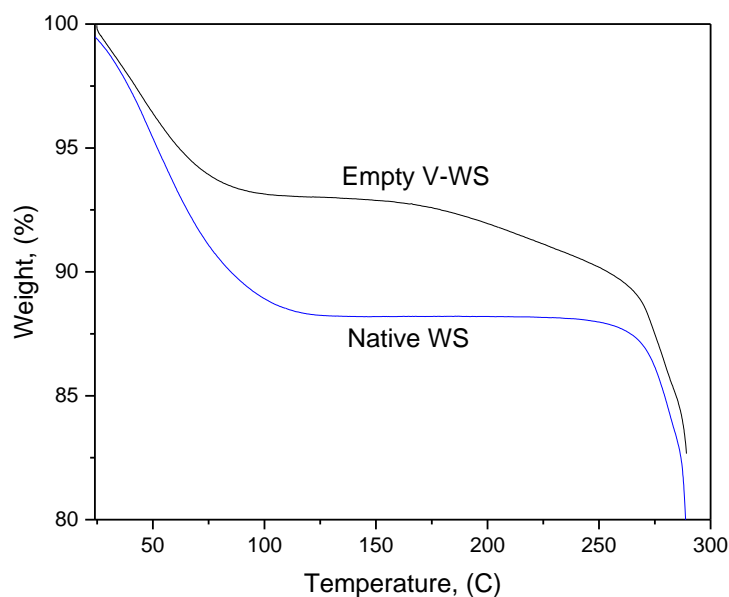


**Фигура 20. SEM изображения на гранули, съдържащи празни V-спирали**

От микроскопските наблюдения се вижда, че няма голяма разлика в строежа на новополучения материал и на изходното пшенично нишесте. Частиците са запазили своята цялост и наподобяват по форма и размери тези на нативните гранули. Отново се забелязва склонност към слепване на частиците в по-големи агломерати.

Термичното поведение и стабилност на новополучения материал са изследвани с помощта на термогравиметричен анализ и сравнени с тези на изходното нишесте. Термогравиметричните криви са представени на Фигура 21.



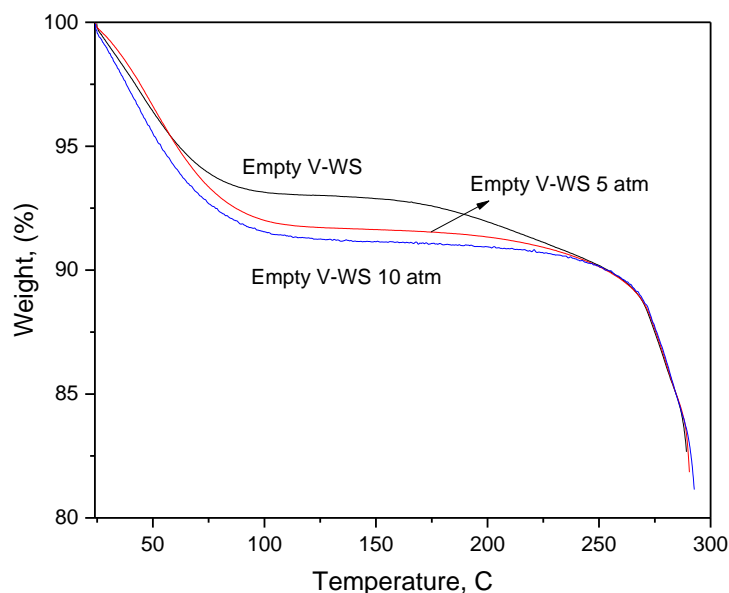


**Фигура 21. Термогравиметрични криви на нативно нишесте и нишесте, съдържащо празни V-спирали**

От кривите се вижда значителна разлика от 5% във влагосъдържанието на нативното нишесте и на гранулите с празни хеликси. Този резултат може да се обясни с предизвиканите структурни промени, довели до значително понижение в количеството на аморфните участъци в гранулите, потвърдено от рентгеноструктурния анализ. Районите от гранулата с по-висока степен на подреденост съдържат по-малко количество вода, на което се дължи и пониското влагосъдържание на по-високо кристалната проба. Термичната стабилност на двете проби изглежда много близка и процесите на деструкция започват при температури около 270°C и за двете изследвани проби.

Специфичната повърхност на частиците, съдържащи празни V-спирали е охарактеризирана с помощта на BET тест, използвайки азот като адсорбат. Измерените стойности показват, че при пробата с празни спирали се наблюдава над два пъти увеличение на специфичната повърхност спрямо изходното нишесте: съответно 0.67 m<sup>2</sup>/g и 0.29 m<sup>2</sup>/g. Имайки предвид, че по време на наблюденията със сканиращ електронен микроскоп не е забелязана разлика в

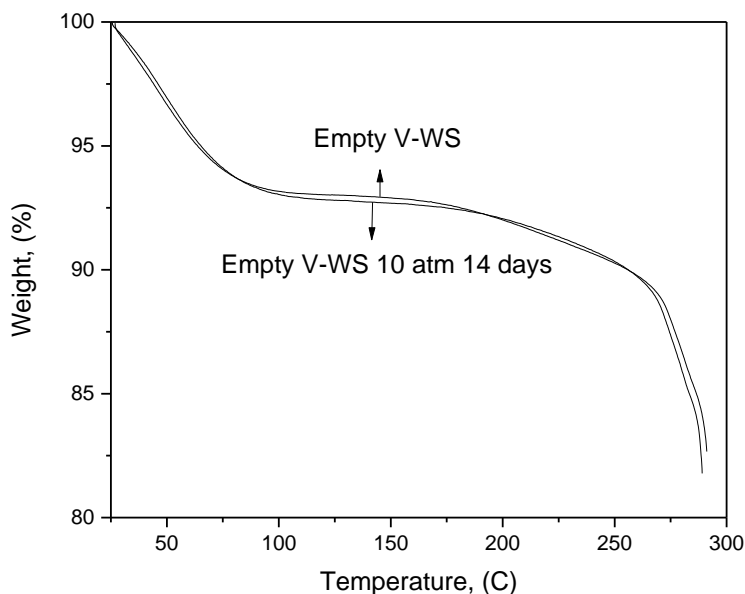
размера на частиците, може да се заключи, че развитата повърхност се дължи именно на новополучените празни спирали. Това дава основание да се изследва възможността за формиране на комплекси на включване с диазотен оксид и да се прави сравнение с изходния материал. Използван е същият метод на третиране с диазотен оксид под известно налягане при стайна температура. При нативното пшенично нишесте поставянето под налягане води до отделяне на част от свързаната влага, което се вижда като по-малко олекване по време на нагряване в термогравиметричната крива. Резултатите от ТГ анализа на новополучените гранули, съдържащи празни спирали и третирани с различни налягания, са представени на Фигура 22.



**Фигура 22. Термогравиметрични криви на комплекси на нишесте, съдържащо празни спирали с диазотен оксид, получени при различно налягане**

От получените криви се вижда, че дори при ниски налягания се постига включване между 1 и 2% газ в пробите. Също така се забелязва, че при пробата, третирана с 10 atm олекването е по-голямо, респективно количеството включен газ е по-голямо. Термичната стабилност не се повлиява от налягането,

упражнено върху пробите, и при трите проби деструкцията следва практически един и същ ход. За да се установи стабилността на получения комплекс, съдържащ диазотен оксид, е проведено ново термогравиметрично измерване, 14 дни след отварянето на пробата, съдържаща по-голямо количество газ. Кривите са представени на Фигура 23.



**Фигура 23. Термогравиметрични криви на комплекс нишесте-дiazотен оксид след двуседмичен престой**

Както се вижда разликите в кривата на изходния материал и на комплекса, престоял две седмици на стайна температура, са минимални. Това е индикация, че взаимодействието между газовите молекули и нишестето не е достатъчно силно, за да бъдат стабилни комплексите за дълъг период от време и след премахване на налягането газът напуска системата. Предстои оптимизиране на реакционните условия и прилагане на двата разгледани в дисертационния труд метода с цел получаване на комплекси с газ с по-висока стабилност за нуждите на хранително-вкусовата промишленост. Също така и тестване на други газове за потенциално взаимодействие с празните амилозни спирали с цел по-пълно изследване на потенциала на новополучения материал да сорбира газове. В

момента се разработват методи за натоварване на частиците, съдържащи празни V-спирали с различни биоактивни и лекарствени молекули. Проведените до момента експерименти с ибупрофен дават интересни и обещаващи резултати. От особено значение изглежда е изборът на подходяща течна среда за провеждане на включването. Опитите с вода, която е отличен пластификатор и в която ибупрофенът има пренебрежима разтворимост, не само не водят до включване на лекарствената молекула в спиралите, но дори се наблюдава разрушаване на структурата на изходния материал. Проведените опити с чист етанол показват бързо включване на ибупрофен в количества от порядъка на 2-3% спрямо теглото на изходния материал, което не се променя с времето. Ибупрофенът има много висока разтворимост в етанол и вероятно при конкретните условия няма достатъчна движеща сила за осъществяване на попълно включване. В момента се работи по оптимизиране на условията, особено на вида на разтворителя (водни разтвори на етанол) и температурата, с цел постигане на по-висока степен на включване на лекарството в празните спирали.

В заключение може да се каже, че полученият материал, притежаващ запазена гранулна структура и празни V-спирали, доколкото е известно на автора е без аналог в литературата и демонстрира интересни и обещаващи свойства за включване на газове и лекарствени молекули. Подобни комплекси биха били от особен интерес за хранително-вкусовата и фармацевтична индустрии, поради ниската цена на материалите, екологичността на методите за получаване, използването само на продукти, напълно съвместими с човешкия организъм, възможността за постигане на висока устойчивост към стомашна среда, контролиране и таргетиране на процесите на освобождаване и други фактори.

### **III. Изводи**

- 1) Морфологията, микроструктурата, термичното поведение и стабилност, влагосъдържанието и параметрите на процеса на гелиране на изходните нишестета са изследвани с помощта на сканираща електронна микроскопия, рентгено-дифракционен анализ, термогравиметрия и диференциална сканираща калориметрия.
- 2) Изследвано е влиянието на термично третиране в присъствие на диазотен оксид под налягане върху микроструктурата на нишесте и възможността за включване на газ в изходните гранули.
- 3) Получени са комплекси на включване на нишесте с диазотен оксид, лизофосфатидилхолин и ибупрофен, използвайки хидротермичен метод на синтез. Изследвано е влиянието на реакционните условия върху микроструктурата и термичното поведение на изходния материал. Получените комплекси са охарактеризирани и са оценени степента на включване и стабилността в симулирана стомашна среда.
- 4) Разработен е нов метод за получаване на комплекси на включване на основата на нишесте, използвайки механохимично смилане в присъствие на течна фаза. Изследвано е влиянието на смилането в присъствие на различен по вид и количество пластификатор, както и при различно време и интензивност на смилане. Успешно са получени комплекси на включване на нишесте с лизофосфатидилхолин и ибупрофен. Комплексите са охарактеризирани и сравнени с тези, получени хидротермично.
- 5) Успешно е получен материал със запазена гранулна структура, съдържащ празни V-амилозни спирали и с над два пъти по-голяма специфична повърхност спрямо изходното нишесте. Новополученият материал е охарактеризиран с помощта на рентгенова дифракция, сканираща електронна микроскопия, BET-тест и термогравиметрия. Материалът демонстрира обещаващи свойства като сорбент и домакин в комплекси на включване.

#### **IV. Приноси**

- 1) Получени са комплекси на включване на нативно нишесте с диазотен оксид с потенциално приложение като набухvatел в хранително-вкусовата промишленост.
- 2) Успешно са синтезирани и охарактеризирани комплекси на включване на нативно нишесте с ибупрофен, използвайки хидротермичен метод.
- 3) Предложен и разработен е нов метод за синтез на комплекси на включване на основата на нишесте - високоенергетично топково смилане в присъствие на течна фаза. Изследвано е влиянието на вида и количеството пластификатор, времето и интензитета на смилане върху формирането на комплексите. Получените по новия метод комплекси с лизофосфатидилхолин и ибупрофен са охарактеризирани и сравнени с комплекси синтезирани по друг метод.
- 4) Получен е нов материал на базата на нативно пшенично нишесте със запезена гранулна структура, наличие на празни V-амилозни спирали и увеличена повърхност, с потенциал за приложение като сорбент и домакин в комплекси на включване.

**Списък на публикациите на докторанта:**

1. **Rangelov, A.**, Stoyanov, S., Arnaudov, L. and Spassov, T., 2017. Novel mechanochemical approach for wheat starch-LPC complex formation. *Journal of Cereal Science*, 76, pp.72-75.
2. **Rangelov, A.**, Arnaudov, L., Stoyanov, S. and Spassov, T., 2017. Gelatinization of industrial starches studied by DSC and TG. *Bulgarian Chemical Communications*, 49 (2), pp.422-429.
3. Spassov, T., Gyurov, S., Stefanov, G., **Rangelov, A.**, Drenchev, L. and Russew, K., 2016. Thermo-mechanical study of bulk glass forming Zr-Cu-Ni-Al alloys. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 443, pp.103-107.

**Доклади:**

“*Starch-based inclusion complexes: formation and characterization*”, Humboldtians and scientific progress in the Central and East European countries. November 16–18, 2017, Sofia (Bulgaria)

“*Formation and characterization of inclusion complexes based on Starches*”, International Workshop Advanced Materials, Pomorie, Bulgaria, 10-13 September 2017.

“*Комплекси на включване на основата на нишесте*”, Научна сесия на Факултет по Химия и Фармация при СУ „Св. Климент Охридски“, 24.11.2016.

“*Нишестето като домакин при комплекси на включване*”, Научен семинар, Гюлечица, 2-4 Юни 2017г.

“*Selective dissolution of bulk glass forming Zr-based alloys*”, T. Spassov, L. Mihaylov, A. Rangelov, A. Inoue, Second International Symposium on Nanoporous Materials by Alloy Corrosion, 23.09- 27.09.2016, Lake Bostal, Germany