

УДК 615.371.01.1

СИНТЕЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ АНАЛОГОВ ХИТОЗАНА

© 2005 г. А.И. Сливкин, В.Л. Лапенко, А.А. Болгов

Воронежский государственный университет

Введение в структуру лекарственных веществ углеводов приводит к значительному снижению их вредного побочного действия на организм и увеличению биодоступности. Проведена разработка способов синтеза полимерных форм лекарств антимикобактериального действия путем иммобилизации изониазида и стрептомицина в структуру низкомолекулярных хитозанов с образованием соответствующих ковалентных связей. Получены полимерные производные салициловой и ацетилсалициловой кислот на основе олигохитозана с образованием солевых, ковалентных связей через 2-гидроксипропил спейсер.

Модификация медико-биологических свойств лекарственных веществ возможна путем введения в их структуру углеводных компонентов. При этом главным эффектом является снижение вредного побочного действия и увеличение гидрофильности лекарств. Разработаны способы получения продуктов конденсации изониазида с моносахарами и альдоновыми кислотами при образовании соответственно гидразонов и гидразидов. 1-изоникотинил-2-Д-глюкозилгидразон, отличающийся высокой гидрофильностью, обладает туберкулостатической активностью соответственно концентрации в его структуре гидразида изоникотиновой кислоты (ГИНК), но токсичность его в 10-12 раз ниже ГИНК [1]. Винильные полимеры с углеводными боковыми цепями, несущими в своей структуре свободные полуацетальные гидроксилы – поли-3-акрилоил-Д-глюкоза и поли-3-метакрилоил-Д-глюкоза – были использованы для создания соответствующих гидразонов на основе ГИНК. Эти аналоги, отличающиеся пониженной токсичностью, при сохранении антимикобактериальной активности лекарственной субстанции обладают пролонгацией биологического действия в организме [2, 3]. Подобные результаты достигнуты также при использовании в качестве полимерной матрицы для иммобилизации ГИНК карбоксиметилдекстранов с образованием связи лекарство-полимер через 2-гидроксипропил спейсер [4].

Углеводсодержащие аналоги на основе аминокликозидного антибиотика – стрептомицина были синтезированы с целью снижения его побочного действия на организм, в частности, ототоксичности. Развитие получило направление создания полимерных форм стрептомицина. Осуществлен синтез и проведены предварительные биологические исследования водорастворимого полистрептомицинкар-

боксилата, содержащего стрептомицин на полимерной матрице поли-6-метакрилоилдиметилглюконовой кислоте [5]. Гидрофильная полимерная форма стрептомицина получена также при использовании модифицирующего компонента карбоксиметилдекстрана. Показана возможность получения полимерных форм антибиотика с образованием солевых связей лекарство-полимер и ковалентных связей через 2-гидроксипропил спейсер. Отмечено трехкратное снижение острой токсичности антибиотика и пролонгация действия в организме [4]. Ранее проводившиеся исследования связаны также с разработкой способа введения анион-компонентов углеводной структуры в состав аминокликозидных антибиотиков. Описаны способы синтеза соответствующих солей со стрептомицином D-галактуроновой и D-глюкуроновой кислот а также комплексных солей с кальция глюконатом [6, 7].

Актуальным в настоящее время является поиск способов снижения токсичности производных салициловой кислоты, в частности ацетилсалицилата – известного противовоспалительного и тромборезистентного средства. Определенные успехи в данном направлении достигнуты путем создания полимерных форм ацетилсалициловой кислоты при использовании в качестве матрицы сополимеров N-винилпирролидона и N-винил-γ-аминомасляной кислоты. Иммобилизация лекарственной субстанции осуществляется путем образования ковалентных связей лекарство-полимер через 2-гидроксипропил спейсер. Основным достижением при этом является резкое снижение гастро- и нефротоксичности аспирина [8, 9]. Химическая иммобилизация салициловой кислоты с образованием соответствующих водорастворимых пленкообразующих солей проведена с применением хитозана. Полимерные салицилаты

проявляют противовоспалительные и ранозаживляющие свойства [10].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Иммобилизация изониазида в структуру хитозана.

А. 2 г хитозана со степенью полимеризации 9-10 и степенью деацетилирования (СД) 90% обрабатывали 40 мл 1 н спиртового раствора NaOH, промывали этанолом и вакуумировали. Полученный хитозан-основание, 0.25 г гидразида изоникотиновой кислоты (ГИНК) и 60 мл воды перемешивали при 70°C 60 минут. Остаток после вакуумирования образовавшегося раствора экстрагировали спиртом в отношении избытка ГИНК. Остаточный ГИНК определяли после вакуумирования экстракта в водной среде известным методом [11]. Содержание ГИНК в составе аналога хитозана определявшееся по разности его количества введенного в систему и остатка не вступившего в реакцию, составляет 5.7%.

Б. 2 г олигохитозана, полученного деполимеризацией пероксидным методом со степенью полимеризации 9-10 аминокангликозидных единиц в солевой форме (ацетат) при СД 90% в виде раствора в 20 мл воды и раствор 0.97 г эпихлоргидрина в 1 мл спирта перемешивали 30 минут при 25°C и 60 минут при 70°C. Фильтрат полученного раствора вакуумировали до уменьшения объема на 10-15% (50-60°C; -0.8-0.9 атм). 20 мл фильтрата, содержащего 1.7 г N-хлоргидроксипропилхитозана, 1.8 г ГИНК термостатировали при 20°C 20 мин и после введения 0.01 мл ацетилхлорида перемешивали при 70°C в течение 240 минут. Наблюдали усиление интенсивности окраски раствора (желтый цвет). Твердый остаток после вакуумирования фильтрата смеси экстрагировали спиртом (удаление избытка ГИНК). Высушенный в вакууме остаток после экстракции – водорастворимый слабоокрашенный порошкообразный продукт. Выход 1.82 г. Концентрацию связанного ГИНК в составе полученного аналога (23.5%) определяли в водном растворе известным методом [11].

2. Полимерные формы ацилатов стрептомицина.

А. 4 г хитозана с СД 80% и ММ 300-400 кДа в основной форме, 0.49 г стрептомицин сульфата в виде раствора в 60 мл воды перемешивали при 60-70°C в течение 120 минут. Смесь фильтровали. Определение концентрации сульфатных группировок проводили в отношении твердого остатка на фильтре и фильтрата (избыток антибиотика). Твердый компонент обрабатывали 0.1 н водным NaOH. Концентрацию SO_4^{2-} ионов в составе фильтрата определяли весовым методом после обработки 5% водным

раствором $BaCl_2$ по количеству соответствующего сульфата. Аналогичный метод использован для определения концентрации избытка стрептомицин-сульфата в составе первичного фильтрата. Концентрация стрептомицин-сульфата в составе полученного аналога 6.7%.

Б. Стрептомицин-основание получали путем обработки стрептомицин сульфата раствором 0.5 н щелочи в 60% водном этиловом спирте с последующим разделением смеси фильтрацией и вакуумированием фильтрата (остаток после вакуумирования – стрептомицин-основание).

1.1 г стрептомицина-основания в виде раствора в 9 мл воды и 1.04 г D-глюконовой кислоты в виде раствора в 7.3 мл воды перемешивали при 20°C 60 минут. Получен 12% водный раствор стрептомицин-глюконата.

1.2 г хитозана (ММ 1.6-1.7 кДа; СД 90%) в основной форме и 0.8 г стрептомицина глюконата (водный раствор) перемешивали при 65°C 60 минут. Раствор вакуумировали до образования сухого остатка – полимерной формы стрептомицина глюконата на основе хитозана. Выход 90%. Концентрация стрептомицина глюконата, присоединенного к структуре хитозана определяли путем оценки содержания соответствующих глюконоанионов путем их количественного связывания в виде кальция глюконата (весовой метод).

3. Иммобилизация салицилатов в структуру хитозана.

А. 5 г салициловой кислоты фармакопейной в виде раствора в 50 мл спирта и 9.8 г эпихлоргидрина в виде раствора в 10 мл спирта перемешивали при 20°C 60 минут и 120 минут при 70-75°C. Фильтрат вакуумировали до сухого остатка, который экстрагировали охлажденным эфиром. Остаток после вакуумирования перекристаллизовывали из смеси спирт-вода 1:4. Хлоргидроксипропилсалицилат – бесцветные кристаллы с температурой плавления 112-113°C. Выход 70.5%.

Аналогичный метод использован для получения хлоргидроксипропилового сложного эфира ацетилсалициловой кислоты кристаллизацией из смеси спирт-вода 1:10. Выделены кристаллы с температурой плавления 116-119°C. Выход 75%.

Б. 1.1 г хитозана (550-600 кДа; СД 90%), 1.64 г салициловой кислоты (фармакопейной) и 75 мл водно-спиртовой смеси 7:1 термостатировали при 70°C 180 минут. Образовавшийся раствор при 20°C переходит в двухфазную систему, которую разделяли фильтрацией. Вакуумирование раствора приводит к образованию водорастворимого аморфного пленко-

образующего продукта – соли салициловой кислоты и хитозана. Выход 81%. Остаток после фильтрации – смесь избытка салициловой кислоты и полимерных компонентов системы.

В. 3.9 г глюконата хитозана в виде раствора в 22 мл воды и 2 г хлоргидроксипропилсалициловой кислоты в виде раствора в 8 мл спирта перемешивали при 75°C 5 часов. Фильтрат окрашенной смеси вакуумировали до сухого остатка, который экстрагировали спиртом. Остаток после фильтрации – стеклообразный окрашенный продукт растворимый в воде – N-2-гидроксипропилсалицилоил глюконат хитозана. Выход 75%.

Г. 1.9 г хитозана гидрохлорида со степенью полимеризации 10-11 ангидроглюкозных единиц и СД 90% в виде водного раствора в 10 мл воды, 3 г хлоргидроксипропилацетилсалициловой кислоты и 0.02 мл ацетилхлорида в виде раствора в водно-спиртовой смеси 4:1 перемешивали при 70°C 120 минут. Образовавшаяся однофазная система при понижении температуры до 50°C переходит в гетерогенную смесь. После вакуумирования реакционной массы остаток обрабатывался избытком спирта. Образовавшуюся суспензию фильтровали. Остаток на фильтре – твердый аморфный слабоокрашенный водорастворимый продукт – N-2-гидроксипропил-ацетилсалицилоилхитозан гидрохлорид. Выход 5,1 г.

Д. 4.5 г хлоргидроксипропилхитозана ацетата в виде раствора в 88 мл воды, 3.3 г ацетилсалициловой кислоты и 0.02 мл ацетилхлорида в 15 мл спирта перемешивали при 70°C 150 минут. Фильтрат раствора вакуумировали. Сухой остаток экстрагировали спиртом. Разделение твердой и жидкой фаз проводили центрифугированием. Получен аморфный слабоокрашенный растворимый в воде продукт – N-2-гидроксипропилацетилсалицилоилхитозан ацетат. Выход 64%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментально определялась возможность иммобилизации изониазида в структуру низкомолекулярных хитозанов в условиях конвертирования глюкозидного гидроксила с образованием гидразона и присоединением лекарственной субстанции через 2-гидроксипропил-спейсер. Максимальная массовая концентрация ГИНК, присоединенного к хитозану одновременно отмечена при использовании в качестве матриц олигомерных гомологов аминокликана. Взаимодействие лекарственной субстанции с полимером производилось при использовании в качестве матриц N-хлоргидроксипропил аналогов олигохитозанов с СД до 90%, вводимых в реакционную систему в виде ацетатов. Реакционный

процесс проводился в водной среде. ГИНК вводился в реакционную смесь в количестве соответствующем содержанию реакционноспособных функционалов в структуре полимерных матриц с избытком при соотношении 2.5:1. Максимальная эффективность, контролировавшаяся далее путем определения массового содержания фиксированного ГИНК в структуре образующихся лекарственных полимеров, достигалась термостатированием системы при 70°C в течение 240 минут. Принцип выделения и очистки лекарственных полимеров, обеспечивающий также установление аналитических показателей – исчерпывающая экстракция образовавшейся твердой фазы этанолом. Содержание связанного ГИНК определялось идентичными по точности иодометрическими способами – в отношении концентрации остаточного и фиксированного в структуре полимера ГИНК. Максимальная массовая концентрация связанного ГИНК (23.5%) достигнута при использовании олигомерных матриц хитозана.

В программу проводившихся исследований была включена комплексная задача, заключающаяся в создании полимерной формы ацилатов стрептомицина на основе хитозанов с пониженной ММ, также с предварительным включением в состав модифицированной субстанции анионов на углеводной основе. Синтез глюконата стрептомицина осуществлялся путем взаимодействия основания антибиотика с D-глюконовой кислотой. Глюконовая кислота используется в процессе обработки стрептомицина в виде 8-14% водных растворов. Стрептомицина глюконат образуется при смешивании соответствующих водных растворов при мольном соотношении анионоактивного и катионоактивного компонентов 1:1. Критерием завершения процесса нейтрализации являлся показатель рН образовавшейся смеси (6-6.5). При температуре окружающей среды стрептомицина глюконат в виде порошкообразного гигроскопичного продукта, растворимого в воде и 40-50% этаноле, выделен после удаления летучих компонентов реакционной смеси с выходом близким к количественному на массу исходного стрептомицина основания.

Механизм возможного присоединения стрептомицина ацилата к полимерной матрице – олигохитозану основан на соответствующей реакционной способности первичных аминогрупп в структуре хитозана и альдегидной группировки в составе углеводной части стрептомицина с образованием основания Шиффа. Разработаны способы химической конденсации стрептомицина сульфата или глюконата и хитозана со средней степенью полимеризации 8-12 аминоклюкозных единиц (СД 90%). Оптимальными параметрами процесса в условиях растворе-

ния олигомера хитозана в основной форме в водном растворе глюконата стрептомицина является термостатирование при 60-65°C в течение 60 минут. Мольное соотношение аминоксодержащего и альдегидсодержащего компонентов 10:1. Определение концентрации связанных ацилатов антибиотика в составе хитозана проводилось путем количественной оценки содержания соответствующих анионов в структуре присоединенных лекарственных компонентов – сульфата и глюконата – с образованием на их основе бариевых и кальциевых солей.

Раздел исследований по разработке способов иммобилизации салициловой и ацетилсалициловой кислот в структуру хитозана проводился с целью совершенствования способа присоединения лекарства к полимеру с образованием ионных и ковалентных связей. Использование хитозана с высокой степенью полимеризации в условии солеобразования с салициловой кислотой показало возможность получения водорастворимых пленкообразующих аналогов при практически полном конвертировании первичных аминогрупп. Полимерные формы салицилатов с ковалентными связями лекарство-полимер синтезированы при введении в структуру этих аналогов 2-гидроксипропил спейсера. Это оказалось возможным осуществить двумя методами. N-2-гидроксипропилсалицилоилхитозаны получены на основе солевых форм низкомолекулярного хитозана – глюконата и ацетата – с применением ацилалкилирующих реагентов – сложных хлоргидроксипропиловых эфи-

ров салицилатов. Идентичные по структуре водорастворимые салицилоил и ацетилсалицилоил производные хитозана синтезировали так же в условиях взаимодействия N-хлоргидроксипропил аминоглюкана с салициловой и ацетилсалициловой кислотами. Концентрация ковалентно связанных салицилатов в полученных полимераналогах 31-32%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авторское свидетельство СССР № 1112742 от 13.01.1983.
2. Авторское свидетельство СССР № 1051899 от 1.07.1983.
3. Авторское свидетельство СССР № 561377 от 15.02.1977.
4. Сливкин А.И., Лапенко В.Л., Сироткина Г.Г. // Химико фармацевтический журнал 1999 г.-№ 12 с. 34-37.
5. Авторское свидетельство СССР № 799355 от 22.09.1980.
6. Патент Япония № 950 от 15.02.1958.
7. Патент США № 2583534 от 29.01.1958.
8. Патент Россия № 2201234 от 27.03.2003.
9. Патент Россия № 2095064 от 10.12.2004.
10. Тихонов В.Е., Краюхина М.А., Гнатюк Н.Г. и др. // Новые достижения в исследовании хитина и хитозана: Матер. VI междун. Конф., Москва-Щелково, 22-24 окт. 2001г., М.: ВНИРО, 2001.-С.235-236.
11. Государственная фармакопея СССР, Хизд. М.: Медицина, 1968.