

## ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ ФОРМЫ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

А.И. Сливкин, В.Л. Лапенко, А.А. Болгов, С.А. Атаманова

*Воронежский государственный университет*

Повышение гидрофильности и снижения токсичности ацетилсалициловой кислоты является актуальной задачей современной фармации. Получена новая водорастворимая полимерная форма данного лекарственного вещества путем проведения реакции сополимера N-винилпирролидона и N-винил-N-глицидил- $\gamma$ -аминоасляной кислоты с ацетилсалициловой кислотой. Предварительно были разработаны методы синтеза вышеуказанных сополимеров путем аналоговых превращений поливинилпирролидона или с помощью сополимеризации N-винилпирролидона с производными N-винил- $\gamma$ -аминоасляной кислоты. При проведении биологических испытаний были отмечено значительное увеличение анальгетической и антитромбозной активности полученного лекарственного аналога по сравнению с исходной ацетилсалициловой кислотой при снижении ulcerогенного действия на желудочно-кишечный тракт.

Актуальным является направление исследований, связанное с разработкой лекарственных форм ацетилсалициловой кислоты (АСК), отличающихся высокой гидрофильностью, пролонгацией действия в организме и пониженной гастро и нефротоксичностью. Положительные результаты в этих направлениях достигнуты путем механохимической обработки АСК, создания ее композиций с нетоксичными водорастворимыми полимерами, а также получение аналоговых структур, в составе которых лекарственный компонент фиксирован ковалентными или ионными связями.

Существующая технология получения АСК обеспечивает низкое значение дисперсности порошка, что является причиной замедленной скорости растворения и низкой терапевтической активности. Предложен способ получения высокоактивной АСК, заключающийся во введении дополнительной операции механохимической обработки в мельницах-активаторах (энергонапряженность 1-5 кВт/кг) в относительной влажности 70-100%. Длительность обработки при измельчении АСК 1-3 минуты. Удельная поверхность частиц порошка, достигаемая при этом 2-2.5 м<sup>2</sup>/г. Тот же показатель для исходной АСК 0.17-0.36 м<sup>2</sup>/г. Показана возможность получения диспергированного продукта в условиях отмеченной влажности, характеризующегося поверхностью модифициро-

ванной ОН-группами (подтверждено термограммами). Данные по изучению кинетики растворения оформлены в виде сравнительных диаграмм. Отмечено 5-кратное возрастание скорости растворения диспергированной АСК. Причиной возрастания этого показателя является значительное увеличение поверхности твердых частиц и их структурная неупорядоченность, приводящие к накоплению избыточной энергии за счет образования различных дефектов поверхности. Константы диссоциации механически обработанной АСК в воде в 3-10 раз больше, чем для исходного материала. Показано, что молекулы обработанной АСК образуют самоассоциаты новых конформаций. Этим объясняется возрастание концентраций насыщенных растворов в сравнении с концентрациями исходного лекарства [1,2].

Эффект возрастания скорости растворения АСК согласно патентуемому способу может быть достигнут путем ее измельчения совместно со смесью гидрофильных полимеров. Проведены исследования с различными структурными вариантами полимеров в числе которых микрокристаллическая целлюлоза, поливиниловый спирт, циклодекстрин, поливинилпирролидон (ПВП), полиэтиленгликоль (ПЭГ). Оптимальным вариантом является применение комбинаций ПВП (ММ 12.6 кДа) и ПЭГ (ММ 4-6 кДа) в соотношении от 1:9 до 9:1 и содержанием в смеси АСК до 30%. Измельчение производилось на лабораторной мельнице при комнатной температуре в течение 3 минут. Размер частиц 7-8 мкм

(диаметр частиц исходной АСК 700 мкм). Высокая скорость растворения АСК при совместном измельчении с двумя полимерами объясняется возрастанием дисперсности и формированием комплексов (водородные связи между ОН- и С=О-группами АСК с функционалами полимеров). При этом разветвленность поверхности способствует формированию и увеличению числа комплексов. Полимеры играют роль носителей, облегчающих растворение лекарственного вещества. Скорость перехода АСК в раствор из таблеток, содержащих указанные измельченные комплексы, в 7.2 раза больше, чем для таблеток, содержащих фармакопейную АСК [3]. Предложен способ повышения скорости растворения АСК, заключающийся в предварительном совместном истирании АСК и Na карбоната. При этом достигается превращение АСК в натриевую соль до 10%. При увеличении длительности обработки отмечается возрастание в образующейся смеси салициловой кислоты [4]. Комплексы сополимеров N-винилпирролидона и N,N,N,N-триэтилметакрилоилоксиэтиламмоний иодида (ММ 23-120 кДа) с додецилсульфатом Na, содержащие высокодисперсное металлическое серебро использовались для потенцирования действия АСК путем предварительного их внутрижелудочного введения. Необходимый терапевтический эффект достигается при снижении дозы АСК в 10-20 раз [5]. Полимерная лекарственная форма АСК, использующаяся в кардиологии, неврологии, ревматологии для снижения способности тромбоцитов к агрегации получена путем иммобилизации АСК (70-33%) на полимереносителе (22-32%) с включением в состав пластификатора глюкозы и др.. Лекарственное средство выполнено в виде буккальной формы – пластины, наносимой как аппликация на десну. Препарат способен вызывать стабильно выраженное снижение агрегации тромбоцитов, что является существенным фактором в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. Рассасывание буккальной формы длится 0.5-3 часа при сохранении биологической активности в течение суток при отсутствии препарата в крови. Последнее связано с необратимым селективным ингибированием циклооксигеназы [6].

Основной целью проводившихся исследований была разработка оптимальных вариантов синтеза водорастворимых полимерных форм АСК, обладающих повышенной анальгетической, противовоспалительной, жаропонижающей и тромболитической активностями и значительно пониженной гастро- и нефротоксичностью. В качестве полимеров-носителей использовались синтетические

сополимеры N-винилпирролидона (ВП) и N-винил- $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ВГАМК). Основная структурная особенность иммобилизаторов АСК на полимерах-носителях – образование ковалентных связей лекарство-полимер с использованием гидрофильного спейсера. В качестве исходных материалов, применявшихся в экспериментальных процессах, были ВП, поливинилпирролидон (ПВП) с ММ 12.5 кДа и АСК. Сопolíмеры ВП и ВГАМК, содержащие до 70% второго компонента могут быть синтезированы путем аналоговых превращений ПВП и путем сополимеризации ВП с производными ВГАМК. Получение сополимераналогов осуществляется путем взаимодействия ПВП с хлорметилоксираном (ЭПХ) при атмосферном давлении и 80°C. При разрыве пиррольного цикла образуются соответственные вторичноаминные и карбоксильные группировки. Одновременно имеет место присоединение хлоргидроксипропилового компонента путем замещения протона во вторичной аминной группе. Образовавшаяся третичноаминная группировка и свободная карбоксильная группа образуют ионную пару, о чем свидетельствует нейтральность водных растворов полимераналогов. Боковая цепь, присоединенная в результате этого процесса, имеет 1-хлор-2-гидроксипропил-структуру. Степень превращения ПВП зависит от избытка алкилирующего агента ЭПХ; в диапазоне от 1:2 до 1:4 имеет место колебание от 50 до 80%. Этот показатель возрастает также с увеличением длительности процесса от 3 до 6 часов. Оптимальная температура, приводящая к конверсии ПВП до 80% за 4-5 часов в присутствии катализатора ацетилхлорида (0.5-0.7% к массе ПВП) 50-75°C. В процессе аналогового превращения не исключена возможность изменения молекулярно-массового распределения, образования низкомолекулярной фракции. Гидрофильность сополимеров при возрастании степени превращения ПВП снижается. Легкорастворимыми в воде являются аналоги, характеризующиеся соотношением звеньев 1:1. Исключение из состава сополимера низкомолекулярных фракций проводилось методом селективного растворения и осаждения. Степень замещения устанавливалась путем аналогового превращения этого сополимера в щелочной среде с образованием соответствующего N-глицидил-производного. Количественная оценка этого превращения фиксировалась по выходу хлорида калия в среде этанола. Данный анализ позволяет также определить степень превращения ПВП в первичном взаимодействии его с ЭПХ и устано-

вить состав образующегося сополимера. Аналогичное превращение сополимера ВП с N-винил-N-хлоргидроксипропил-γ-аминомасляной кислотой (ВХГАМК) в структуру сополимера ВП с N-винил-N-глицидил-γ-аминомасляной кислотой (ВГГАМК) осуществлено в пределах 50-85% с выходом образующегося сополимера 60-90%. Разработан также способ обратного аналогового превращения сополимера ВП с ВГГАМК в сополимер ВП с ВХГАМК под действием HCl в спиртовой среде с практически количественным выходом. Синтезированные сополимераналоги отличаются по реакционной способности в условиях взаимодействия с карбоксилсодержащими компонентами [7].

Указанные выше сополимеры, а также поли-ВХГАМК могут быть получены проведением процессов сополимеризации и гомополимеризации соответствующих мономеров. Разработан способ синтеза ВХГАМК путем взаимодействия ВП с ЭПХ в присутствии катализатора ацетилхлорида. Ранее был осуществлен модельный синтез N-хлоргидроксипропилпирролидона с образованием соответствующего N-хлоргидроксипропил-производного γ-аминомасляной кислоты (ГАМК). Модификация винильного мономера, как и превращение ВП, с практически количественным выходом производных происходит в присутствии каталитических количеств ацетилхлорида при 50-70°C. Винильный мономер на основе ГАМК представляет собой жидкость, перегоняющуюся без разложения в вакууме (-7 кПа) при 50-60°C. Образующаяся ВХГАМК при обработке спиртовым раствором щелочи может быть превращена в соответствующий N-винилглицидил-аналог. Соплимеры ВП и ВХГАМК получены путем полимеризации в блоке или в растворе в присутствии 1% инициатора ДАК в течении 4 часов при 80°C с количественным выходом. Переход к сополимераналогам с глицидилсодержащими боковыми цепями осуществляется обработкой в среде спиртовой щелочи. Указанное превращение является основой для аналитического способа уточнения состава сополимера.

Процесс иммобилизации в структуру подготовленных сополимеров-носителей осуществлялся двумя путями. В первом случае использовалась Na-соль АСК, полученная обработкой АСК бикарбонатом Na в спирто-водной среде при пониженной температуре. Соответствующий сополимераналог, несущий в своей структуре присоединенную ковалентными связями АСК, образуется при взаимодействии сополимера и соли АСК в спиртовой среде при 50-70°C с количественным выде-

лением кристаллического NaCl, оценка массы которого служит показателем для расчета конверсии исходной соли АСК и количественного содержания ее в структуре водорастворимого полимераналога. Полимерная форма АСК образуется также путем взаимодействия субстанции с указанными выше сополимерами ВП и ВХГАМК в присутствии катализатора ацетилхлорида (50-70°C). Для иммобилизации АСК использовались, в основном, сополимеры состава 1:1. Присоединение АСК в структуру звеньев хлоргидроксипропил-ГАМК происходит путем образования сложноэфирных связей через 2-гидроксипропил-спейсер.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ХИМИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### 1. Получение сополимера ВП и ВГГАМК.

20 г ЭПХ, 12 мл этанола, 0.04 мл ацетилхлорида вводили через капельную воронку в раствор 6.0 г ПВП в 75 мг воды при перемешивании; смесь термостатировали при 50-70°C в течение 4 часов. Остаток после вакуумирования реакционной массы экстрагировали эфиром и сушили в вакууме.

Выделенный твердый аморфный продукт (5.8 г) растворили в 70 мл этанола, содержащего 1.2 г КОН. Раствор термостатировали при 25°C 4 часа, фильтровали; остаток на фильтре KCl – 1.4 г. Фильтрат вакуумировали; остаток (4.1 г) – твердый водорастворимый продукт – сополимер ВП и ВГГАМК (1:1).

### 2. Получение полимерной формы АСК.

3.7 г сополимера ВП с ВГГАМК (1:1), 2.2 г АСК и 0.02 мл ацетилхлорида в 40 мл этанола перемешивали при 50°C в течение 60 минут и при 70°C 240 минут; раствор вакуумировали при 70°C (-7 кПа). Полученное сиропобразное вещество экстрагировали ацетоном и эфиром, остаток вакуумировали в тех же условиях до образования затвердевшей бесцветной пены, после измельчения которой выделен порошкообразный продукт, растворимый в воде и спирте. Выход 2.6 г (43%). Найдено, %: N 5.91.  $(C_6H_9NO_7)_5(C_{18}H_{22}NO_7)_5$ . Вычислено, %: N 6.13. Содержание иммобилизованной АСК, определявшееся титрованием раствора сополимера в спирте водным раствором КОН, а также методом ИК-спектрального анализа, составляло 39.3% (масс).

3. Определение растворимости полимерной формы АСК (АСП) проводили в сравнении с субстанцией АСК (ФС 422688-94, Yilin Pharmaceutical, Китай). Навеску АСП (1 г), предварительно растертую в мелкий порошок, вносили в 10 мл дис-

тиллированной воды и встряхивали до полного растворения при 20°C. Через 3 минуты в растворе не обнаруживались частицы вещества невооруженным глазом. Субстанция АСК в количестве 1 г, растертая в мелкий порошок и внесенная в аналогичный растворитель, при встряхивании (20°C) полностью растворялась в объеме дистиллированной воды 1000 мл. АСП относится к легкорастворимым веществам согласно требованиям Государственной Фармакопеи, тогда как субстанция АСК – к малорастворимым; АСП превосходит по растворимости АСК примерно в 100 раз.

#### 4. Взаимодействие хлорметилоксирана с ВП.

15 г (0.135 моль) ВП (0.014 моль) с  $t_{кип} = 65-66^\circ\text{C}$ ,  $n_D^{20} = 1.5117$  и 20 мл воды загрузили в реактор, снабженный перемешивающим устройством и обратным холодильником. Смесь 51 г (0.54 моль) ЭПХ, 0.03 мл ацетилхлорида и 10 мл спирта ввели при 20-25°C в раствор ВП. Перемешивание продолжали в условиях термостатирования при 50°C 1 час и при 75°C 4 часа. По окончании реакции образовался гомогенный слабощелочной раствор (рН 7.5). Воду и летучие органические компоненты отогнали из реакционной смеси при 50-60°C в вакууме (-7 кПа). Остаток после вакуумирования – сиропообразный слабоокрашенный продукт, растворимый в воде и низших спиртах. Выход 27.9 г (90%) (в расчете на образование ВХГАМК).

#### 5. Получение ВГГАМК.

3.5 г (0.016 моль) ВХГАМК и 16 мл 1 н спиртового раствора КОН (соотношение реагентов 1:1) перемешивали в стеклянном реакторе при 20-25°C в течение 4 часов; наблюдали образование кристаллической фазы (КСІ). Осадок отделяли фильтрацией на стеклянном фильтре с бумажной прокладкой и высушивали до постоянной массы; выделено: масса КСІ 0.95 г (79%). Фильтрат вакуумировали (-7 кПа) в условиях термостатирования при 50-55°C. Выделена ВГГАМК – сиропообразный растворимый в воде и низших спиртах продукт. Выход 2.3 г (78%).

#### 6. Получение поли-ВХГАМК.

2.53 г (0.01 моль) ВХГАМК загрузили в реактор с обратным холодильником. В массу мономера ввели 0.025 г (1%) ДАК. Термостатирование при 20-25°C продолжали в течение 30 минут. Смесь термостатировали 4 часа при 100°C. Наблюдали постепенное увеличение вязкости системы. Выделили твердый пластичный продукт, растворимый в воде и спирте поли-ВХГАМК;  $[\eta] = 1.64$  дл/г в водном растворе. Выход 2.5 г (98.8%).

#### 7. Получение поли-ВГГАМК.

2 г поли-ВХГАМК (0.009 моль) смешали с 9 мл 1 н спиртового раствора КОН при 20-25°C, наблюдали образование кристаллической фазы (седиментация КСІ), смесь термостатировали в этих условиях при перемешивании в течение 4 часов. Кристаллический осадок отделяли фильтрацией и высушивали до постоянной массы. Выделено 0.6 г КСІ, что составляет 89% в расчете на полный переход хлоргидроксипропил-группировок в глицидил-заместители. Фильтрат вакуумировали при 50-55°C (-7 кПа). Выделена поли-ВГГАМК – твердый пластичный продукт, растворимый в воде и низших спиртах. Выход 1.52 г (91%).

#### 8. Имобилизация АСК в структуру поли-ВГГАМК.

0.7 г (0.004 моль) АСК и 6 мл этанола загрузили в реактор, снабженный перемешивающим устройством и обратным холодильником. Смесь 1.1 г поли-ВГГАМК (0.057 моль), 0.01 мл ацетилхлорида и 10 мл этанола ввели при 20-25°C в раствор АСК. Перемешивание продолжали в условиях термостатирования при 50°C 1 час и при 75°C 4 часа. По окончании реакционного процесса образовался гомогенный раствор с оранжевым оттенком. Спирт и другие летучие компоненты отогнали из реакционной смеси при 50-60°C в вакууме (-7 кПа). Остаток после вакуумирования представлял собой твердый вязкий продукт, растворимый в воде и низших спиртах. Выход 1.58 г (89%).

Определение концентрации присоединенной АСК проводилось путем титрования лекарственного полимера 0.1 н NaOH при 7°C после его предварительной экстракции смесью спирта и эфира (1:5). Результаты титрования свидетельствуют о массовой концентрации АСК в структуре полимера около 32%.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Опыты по изучению влияния испытуемой субстанции на анальгетическую активность проводились на фоне внутрибрюшинного введения 3% раствора уксусной кислоты в дозе 300 мг/кг массы тела животного. Исследования данного полимерного водорастворимого аналога АСК и субстанции АСК проведены по известной методике [8]. Все вещества вводили внутривенно металлическим зондом в эквивалентных дозах. Результаты сравнительной оценки приведены в таблице 1.

В результате проведенных испытаний установлено, что полимерный водорастворимый аналог

Таблица 1

Влияние АСК и АСП в дозе 50, 100 мг/кг массы тела крыс при внутрижелудочном введении на болевую реакцию ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Группа наблюдения	Количество экстензорных судорог
Контроль (введение 0.7 мл физраствора)	40.0±3.6
АСК, 50 мг/кг	35.2±4.2
АСК, 100 мг/кг	19.5±4.4*
АСП, 50 мг/кг	18.6±3.3*
АСП, 100 мг/кг	8.0±3.2*

\* Различия статически достоверны при  $p < 0.001$  в сравнении с контрольной группой.

АСК в пересчете на АСК в дозе 100 мг/кг массы тела животного при введении в желудок по анальгетической активности на фоне внутрибрюшинного введения 3% уксусной кислоты превосходит АСК в 2 раза.

Исследовано влияние полимерного водорастворимого аналога АСК на свертывающую систему крови и ее морфологический состав на 54 белых беспородных крысах самцах с массой тела 200-250 г. Исследование крови проводилось в динамике по суткам: 1, 10, 30. Кровь бралась из хвостовой вены (при отсечении кончика хвоста). Регистрация параметров осуществлялась коагулограммом. Для сравнения использовали АСК в той же дозе что и содержащаяся в АСП АСК. Водный раствор АСК и АСП вводился с помощью металлического зонда внутрижелудочно ежедневно (30 дней кроме воскресений).

Результаты сравнительной оценки приведены в таблице 2.

Анализ коагулограмм белых крыс, получивших перорально АСК и АСП, позволяет заключить, что

на 10-е и 30-е сутки эксперимента происходило изменение индекса коагуляции (Ик), увеличение времени свертывания крови при введении АСК на 21.8%, а АСП – на 53.1% ( $p < 0.01$ ). АСП по влиянию на процессы свертывания крови превосходит АСК в дозе 75 мг/сутки в пересчете на массу взрослого человека в 1.5-2 раза.

Исследования проводились на 54 белых беспородных крысах самцах с массой тела 200-250 г. В ходе эксперимента первой группе животных ежедневно (30 дней, кроме воскресений) перорально с помощью зонда вводили препараты АСК, второй АСП в эквивалентных дозах по АСК (75 мг/сутки). Животные опытных групп умерщвлялись декапитацией (под эфирным наркозом), затем проводилось патологоанатомическое вскрытие трупов и гистологическое исследование желудков, печени, почек, сердца, легких и селезенки.

При вскрытии трупов крыс видимых патологических изменений не обнаружено. При гистологическом исследовании у крыс, получивших АСК в дозе 75 мг/сутки, выявлены признаки усиления

Таблица 2

Влияние АСК и АСП в дозе 75 мг/сутки на периферическую кровь крыс при внутрижелудочном введении в хроническом эксперименте ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )

Показатели морфологического состава сыворотки крови			Динамика показателей коагулограмм	
Препарат и субстанция	Эритроциты, млн/мкл	Лейкоциты, тыс.	Индекс коагуляции (Ик)	Индекс фибринолиза
Контроль	5.75±0.2	10.5±1.8	0.32±0.06	0.01±0.01
АСК75мг/кг	6.42±18.5	13.4±0.5	0.25±0.05	0.01±0.01
АСП75мг/кг	5.01±6.8	11.8±1.1	0.15±0.04*	0.02±0.02

\* Различия статически достоверны при  $p < 0.01$  в сравнении с контрольной группой.

секреции в фундальных железах слизистой оболочки желудка. В частности, в цитоплазме главных (зимогенных) клеток содержалось больше секреторных гранул, были несколько увеличены в объеме обкладочные (париетальные) и добавочные (слизистые) клетки. В эпителии желудка крыс, получавших АСП в дозе 75 мг/сутки, подобные изменения отсутствуют.

У животных обеих опытных групп (получавших АСК и АСП) отмечено небольшое увеличение объема гепатоцитов на периферии печеночных долек, расширение полости капсул Шумлянско-Боумана в почечных тельцах, более выраженная васкуляризация миокарда и небольшое увеличение количества лимфоидной ткани в селезенке. Все эти изменения носят физиологический характер и могут быть расценены как признаки некоторого усиления функций исследованных органов.

Выявлена легкая степень гидропического поражения эпителия канальцев в почках, проявляющаяся набуханием клеток, сглаживанием границ, смещением ядер; появляются также вакуоли в цитоплазме, в некоторых канальцах видны белковые массы. В селезенках увеличено количество лимфоидной ткани, что указывает на антигенное действие ПВП.

АСП в дозе 75 мг/сутки не вызывает повреждающего действия на слизистую оболочку желудка, тогда как АСК вызывает раздражение слизистой оболочки желудка и усиливает секрецию фундальных желез.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патент №2099059 Россия опубл. 20.12.1997. Бюл. №35.
2. *Полубояров В.А., Коротаяева З.А., Киселевич С.И. и др.*//Журнал Физ. Химии. 1999. Т.73 №7. С.1227-1232.
3. Патент №2054939 Россия опубл. 27.02.1996 Бюл. 6.
4. Патент №2099058 Россия опубл. 20.12.1997 Бюл 35.
5. Патент №2088233 Россия опубл. 27.08.97 Бюл 24.
6. Патент №2095064 Россия опубл. 10.11.1997 Бюл 31.
7. Патент №2201234 Россия опубл. 27.03.2003 Бюл 9.
8. *Гацура В.В.*//Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ, 1974.