

СИНТЕЗ САЛИЦИЛАТОВ ХИТОЗАНА

А. И. Сливкин, В. Л. Лапенко, П. И. Кулинцов, А. А. Болгов, С. С. Чертоляс

Воронежский государственный университет

Представлены результаты экспериментальных исследований, связанных с разработкой методов химической иммобилизации ацетилсалициловой, салициловой и парааминосалициловой кислот в структуру хитозана. Взаимодействием метилолхитозана, полученного обработкой аминогликана формалином и пероксидом водорода, с салициловой и ацетилсалициловой кислотой получены растворимые в воде соответствующие аналоги, формирующие из водных растворов кристаллоидные структуры. Из N-сукцината хитозана и парааминосалициловой кислоты синтезированы водорастворимые аналоги солевого типа. Разработана методика присоединения ацетилсалициловой кислоты в структуру хитозана с образованием солевых связей.

Известен широкий диапазон использования ацетилсалициловой кислоты (АСК) в химиотерапии различных патологий. Помимо традиционного направления применения АСК — как анальгетического, противовоспалительного средства, в последние десятилетия показана ее эффективность при профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Проводятся разработки, связанные с созданием производных АСК, лекарственных форм на ее основе при устранении ее главных недостатков: ограниченной биодоступности (низкой гидрофильности) и вредного побочного действия на желудочно-кишечный тракт. Актуальным является развитие направления по разработке конъюгатов АСК с полимерными и олигомерными компонентами, способными к детоксикации субстанции одновременно с усилением биохимических свойств АСК и приданием ей растворимости в воде [1, 2, 3]. В качестве матриц для иммобилизации АСК могут быть использованы производные биополимеров, в частности — гликанов. Особое внимание должно быть уделено применению для этих целей полисахаридов, несущих в своей структуре функциональные группы повышенной реакционной способности, в частности ионогенные группировки. При разработке условий химического присоединения низкомолекулярных соединений или полимерных структур определенную трудность вызывает химическая нестабильность сложноэфирной группировки в составе молекулы АСК. Химическая иммобилизация лекарства на соответствующих функционалсодержащих объектах возможна: а) путем образования солевых связей в условиях конверсии свободных карбоксилатов в структуре АСК и катионоактивной группировки; б) получением сложного эфира конверсией того же карбоксила при алкили-

ровании низкомолекулярными или полимерными реагентами. Для придания последним алкилирующей способности возможно включение дополнительного структурного элемента в состав полимерной матрицы; в) реализацией амидной связи при конверсии карбоксила и аминогруппы в составе присоединяемого компонента; г) использованием лабильности протонов в составе ароматического цикла в орто- и пароположениях по отношению к фенольному гидроксилу АСК. На ряде конкретных примеров установлено значительное влияние полимерного компонента на биологическую активность модифицированного лекарства (продлонгация действия, детоксикация) для структурных вариантов ковалентных связей лекарство — полимер.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ
АЦЕТИЛСАЛИЦИЛАТЫ ХИТОЗАНА

А. 1.00 г хитозана, полученного деацетилированием в условиях обработки 50%-ным водным раствором NaOH, и 100 мл 0.1 н HCl загрузили в реактор с обратным холодильником, термометром и перемешивали при 50 °С до полной гомогенизации системы. В полученный раствор вводили 0.13 г (0.0042 моль) формальдегида. Перемешивание реакционной массы продолжали при 70 °С в течение 60 мин. до образования слабо окрашенного раствора. Деполимеризацию образовавшегося N-метилоланолага хитозана проводили путем введения водного раствора перекиси водорода (концентрация H₂O₂ в системе — 0.64%). Реакционную массу термостатировали в динамических условиях в течение 40 мин.; визуально было отмечено снижение вязкости образовавшегося раствора.

Б. 0.76 г ацетилсалициловой кислоты (0.0042 моль) вводили в реакционную массу при

перемешивании через боковое горло в виде раствора в 5 мл спирта; соотношение хитозана (степень деацетилирования — 90%) и ацетилсалициловой кислоты (АСК) — 1 : 0.7 моль. Перемешивание проводили при 70—75 °С в течение 120 мин. Образовался практически прозрачный окрашенный в слабо-желтый цвет раствор (pH 4—5). Фильтрат раствора (бумажный фильтр, вакуум) переместили в стеклянный кристаллизатор. Дегидратация раствора проводилась при 40—50 °С в открытой системе в течение 50 часов. Наблюдали образование симметрично расположенных практически бесцветных кристаллоидных ассоциатов, располагавшихся в трехмерном пространстве. Твердую массу измельчили истиранием в ступке и обработали 50 мл этанола в целях экстракции следов АСК, остатков HCl и других примесей. Гетерогенную смесь фильтровали, а остаток на фильтре промывали этанолом и сушили в вакууме. Выделенный конъюгат **N-метиллоланола** хитозана с АСК представляет собой твердый бесцветный продукт, хорошо растворимый в воде, в составе которого визуально отмечаются деструктивные элементы указанных выше кристаллоидных ассоциатов. Выход — 1.29 г. Проведен анализ полученного конъюгата АСК с целью определения содержания в его структуре фиксированного АСК (фармакопея X). Массовое содержание связанного лекарственного компонента (АСК) в полимерной форме — 35%.

В. 1.5 г хитозана, дополнительно обработанного в целях частичной деполимеризации пероксидом водорода в водной среде (степень деацетилирования — 90%; $[\eta]$ — 4 ддл/г), растворили в 100 мл 0.1 н HCl при 40 °С и перемешивании. Смесь поместили в реактор и через боковое горло ввели 0.2 г (0.0064 моль) формальдегида; 1:1.1 моль. Смесь термостатировали при 70—75 °С 60 мин. В реакционную массу при перемешивании ввели 0.76 г (0.0042 моль) АСК в виде раствора в 5 мл спирта. Соотношение хитозана и АСК — 1:0.5 моль. Образовавшуюся систему выдерживали в динамических условиях при 75 °С 120 мин. Частичную деполимеризацию конъюгата проводили путем введения в систему 0.18 г перекиси водорода. Реакционную массу термостатировали 40 мин. при 70—75 °С; визуально отмечено снижение вязкости образовавшегося раствора. Фильтрат помещали в стеклянный кристаллизатор и высушивали при 40—45 °С с доступом воздуха. Наблюдали образование непрозрачной хрупкой пленки слабо-желтого цвета. Полученный материал измельчали в ступке до порошкообразного состояния и обрабатывали

спиртом для экстракции следов аспирина. Выделен бесцветный растворимый в воде порошок — конъюгат хитозана с АСК. Выход — 1.78 г; 72%. Массовое содержание АСК в полимере — 32.5%.

Г. 1.5 г хитозана, полученного путем щелочно-го деацетилирования хитина, частично деполимеризованного в условиях обработки водным раствором перекиси водорода в гетерофазной системе ($[\eta]$ 0.52 ддл/г) и 100 мл 0.1 н HCl , загрузили в реактор. Суспензию перемешивали при комнатной температуре до полного растворения хитозана. Через боковое горло реактора ввели 0.128 г (0.0042 моль) формальдегида. Соотношение реагирующих реагентов — хитозана в расчете на степень деацетилирования (СД) 91.6% и формальдегида — 1:0.5 моль. Наблюдали образование прозрачного раствора без признаков присутствия студнеобразных компонентов. В полученный раствор при тех же условиях ввели 0.76 г (0.0042 моль) АСК в 5 мл этанола. Соотношение хитозана (СД 91.6%) и АСК — 1:0.5 моль. Дегидратация проводилась при 40—45 °С в открытой системе в течение 50 часов. Наблюдали образование симметрично расположенных стержнеобразных кристаллоидов конъюгата хитозана с АСК. Найдено массовое содержание АСК в структуре конъюгата — 35%. Выход из расчета на исходную массу полимерной матрицы хитозана и установленной степени деацетилирования составляет 69%.

Д. 2.35 г хитозана (СД 80%; ММ 20 кДа) в основной форме, 20 мл воды и 3.49 г АСК, растворенной в 30 мл спирта, помещали в химический стакан емкостью 100 мл. Реакционную смесь выдерживали 90 мин. при 3 °С и перемешивании на магнитной мешалке (pH 5). Образовавшийся аналог — полимерную соль АСК — отфильтровывали, промывали спиртом. Фильтрат титровали 0.1 н раствором $NaOH$. **Неконвертированный избыток АСК** — 1.70 г. Остаток на фильтре — практически бесцветный, твердый, набухающий в воде порошок — полимерная форма АСК, содержащая 37.4% (масс.) субстанции, что составляет 81.3% от теоретически возможного присоединения АСК в виде соли по первичноаминным группам хитозана.

САЛИЦИЛАТ ХИТОЗАНА

А. 1.00 г хитозана растворили в 100 мл 0.1 н HCl при 40 °С и перемешивании. Смесь поместили в реактор и через боковое горло ввели 0.11 г (0.0036 моль) формальдегида. Соотношение реагентов — хитозана в расчете на СД 90% и формальдегида — 1:0.6 моль. Смесь термостатировали в ди-

намических условиях 60 мин. В реакционную массу при перемешивании ввели 0.6 г салициловой кислоты (СК) в виде раствора в 5 мл спирта. Соотношение хитозана (СД 90%) и СК — 1:0.7 моль. Образовавшуюся систему выдерживали при 75 °С 120 мин.; наблюдали образование практически прозрачного, слегка окрашенного раствора (рН 3.5). Фильтрат реакционной массы поместили в стеклянный кристаллизатор и высушивали при 40—45 °С с доступом воздуха. Наблюдали образование непрозрачной хрупкой пленки. Полученный материал измельчили в ступке до порошкообразного состояния и обработали спиртом для экстракции следов салициловой кислоты. Выделен белый порошок — конъюгат хитозана с СК, растворимый в воде (рН ≤ 7). Выход — 1.3 г; 76%. Массовое содержание химически связанной СК в конъюгате — 33%.

ПАРААМИНОСАЛИЦИЛАТ ХИТОЗАНА

1.00 г хитозана (СД 90.5%; $[\eta]$ 0.4 ддл/г (2% CH_3COOH)) и 0.35 г (0.003 моль) янтарной кислоты смешивали и растирали в агатовой ступке. Соотношение первичноаминных групп в массе хитозана и янтарной кислоты — 1:0.5 моль. К полученной массе добавили 10 мл воды и продолжили перемешивание образовавшейся суспензии до полной гомогенизации реакционной массы.

0.4 г парааминосалициловой кислоты (ПАСК) добавили в реакционную массу (соотношение реагентов — хитозана (СД 90.5%) и ПАСК — 1:0.5 моль). Образовавшуюся систему продолжали перемешивать и растирать в указанных выше условиях. Наблюдали образование окрашенного раствора. Реакционную массу профильтровали и поместили на чашку Петри. Дегидратация осуществлялась в открытой системе при 22—25 °С в течение 48 часов. На стеклянной поверхности образовалась прозрачная окрашенная хрупкая пленка. Проведено потенциометрическое титрование полученного конъюгата. Массовая концентрация ПАСК в структуре полимера — 23%. Выход — 72%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучены возможности химической иммобилизации салицилатов в структуру различных по степени полимеризации гомологов хитозана с высоким показателем степени деацетилирования (более 90%) путем образования связей лекарство — полимер без практического участия карбоксильных групп низкомолекулярного компонента. При этом принималась во внимание высокая реакционная способность протонов ароматического цикла салицилатов и первично-аминных группировок различных соеди-

нений в процессах взаимодействия с формальдегидом при рН ≤ 4. Преимуществом этого варианта методики иммобилизации АСК в структуру полимера является наличие неконвертированных ее функционалов в целевом конъюгате, а также условия проведения процесса (рН ≤ 4), практически гарантирующие стабильность структуры АСК. В серии опытов, проведенных с целью оптимизации процесса химической иммобилизации АСК в структуру хитозана, использовались различные гомологи полимера. Такие полимерные матрицы подготавливали путем предварительной обработки хитозана, полученного деацетилированием хитина, пероксидом водорода в условиях варьирования параметрами деполимеризации или обработкой N-метилоланоаналогов хитозана с применением пероксидного метода. Проводилась также двукратная обработка пероксидом водорода исходного гомолога хитозана и его N-метилоланоаналога. Хитозаны, использованные в процессе без предварительной их деполимеризации, характеризуются показателями $[\eta] = 11.0—17.0$ ддл/г (CH_3COOH 2%) и степенью деацетилирования 90—91%; для хитозанов, подвергнутых предварительной пероксидной обработке, $[\eta] = 0.41—4.0$ ддл/г (CH_3COOH 2%).

Введение в технологический процесс подготовки полимерных матриц дополнительных стадий деполимеризации приводит к улучшению растворимости конъюгата в воде. Предполагается возможность синергического действия низкомолекулярного гомолога хитозана и АСК в организме (тромболитическая, противовоспалительная активность и др.) Стадия процесса формилирования проводилась в условиях, исключающих образование пространственных структур. При этом использовались соотношения взаимодействующих NH_2 групп в составе гликана и формальдегида в пределах 1:0,6—0,7 моль. Показано также, что применение избытка формальдегида (1:1,1 моль) для варианта однократной обработки хитозана пероксидным методом не приводит к развитию пространственного структурирования. Введение в систему формальдегида проводилось путем смешивания растворов гомологов хитозана в 0,1N водном HCl или 2% CH_3COOH (концентрация полимера — 1—1,5%) с соответствующим объемом формалина (32%). N-метилолирование хитозана с оптимальным эффектом осуществлялось при 70—75 °С в течение 60 мин. при рН ≤ 4. Пероксидный компонент вводился в систему в виде 18%-ного водного раствора. Заключительная стадия процесса иммобилизации АСК производилась после добавки в

образовавшуюся систему ее раствора в этиловом спирте. Количество АСК соответствовало соотношению содержания реакционноспособных групп в составе полимерной матрицы 1:0,7 моль. Оптимальный выход целевого водорастворимого конъюгата (60—80%) достигался проведением заключительной стадии в течение 70 мин. при 70—80°C. Пробные минимальные объемы реакционной массы обрабатывались в условиях вакуумирования летучих компонентов (80°C; -0,9 атм.). Во всех случаях имело место образование бесцветной прозрачной пленки, растворимой в воде при нагревании. Ограничение растворимости в воде полученного конъюгата, в сравнении с веществом, выделенным в условиях дегидратации в мягких температурных условиях, объясняется образованием конгломератов взаимоориентированных макромолекул, что характерно для хитозана и его аналогов. При медленном испарении влаги наблюдали образование бесцветных упорядоченных структур ассоциатов кристаллоидов аналогов хитозана. В отдельных опытах образуются трехмерные кристаллоидные формации дендритного типа. В отличие от ранее полученных результатов, в отношении низкомолекулярных гомологов хитозана кристаллоидные формации наблюдали визуально без использования каких-либо оптических систем. Полученные в этих условиях конъюгаты хитозана с АСК растворимы в воде при комнатной температуре ($pH \leq 7$). Аналитическая оценка аналогов хитозана производилась путем титрования водными растворами NaOH в условиях конверсии свободных карбоксильных групп в структуре фиксированной АСК (+8 °C; $pH \leq 7$).

В составе ИК-спектров конъюгата аспирина и хитозана имеется полоса с максимумом 1736 cm^{-1} , что свидетельствует о присутствии в структуре полимераналога присоединенных компонентов АСК (валентные колебания $C=O$ в сложноэфирных группировках). Полоса поглощения в диапазоне 1500—1670 cm^{-1} , с дуплетом пиков 1620 и 1636 cm^{-1} , является результатом совмещения максимумов поглощения за счет присутствия первичных и вторичных аминных групп, а также колебаний $C=C$ в ароматическом цикле АСК (1600 cm^{-1}). Полоса с максимумами 1034 и 1071 cm^{-1} образовалась за счет деформационных колебаний NH групп структуры хитозана. Колебания за счет присутствия в структуре полимера свободных OH групп, принадлежащих присоединенному компоненту, — 1680 cm^{-1} — совмещены с расширенной полосой 1700—1640 cm^{-1} и дуплетом пиков 1636—1726 cm^{-1} . Максимум, харак-

терный для свободной АСК и образующийся за счет валентных колебаний $C=O$ (фенилацетат), совмещен в составе спектров полимераналога с полосой, характерной для структуры хитозана, — 1150—1260 cm^{-1} . О наличии этого максимума можно судить по усилению интенсивности поглощения в указанной полосе спектра.

Проведены опыты по определению условий иммобилизации АСК в структуру аминокликан при образовании соответствующих солевых форм в условиях конверсии первичных аминогрупп полимера и карбоксиллов в структуре АСК. Экспериментальное исследование, в сравнении с аналогичным вариантом при использовании салициловой кислоты, осложнено низкой стабильностью АСК при температурах выше 7—8 °C и $pH > 5—6$. Оптимальные результаты иммобилизации АСК были получены при использовании в качестве матрицы низкомолекулярного хитозана (20 кДа). Процесс взаимодействия АСК и хитозана осуществлялся в двухфазной системе в водно-спиртовой среде (2:3); жидкостной модуль — 1:16. Реакция проводилась при 3 °C в условиях перемешивания в течение 60—90 мин. с постоянным контролированием pH системы. Определение количества АСК, израсходованного на солеобразование с хитозаном, производили по данным ее содержания в жидкой фазе реакции. Массовая концентрация АСК, фиксированной солевыми связями на структуре макромолекул хитозана, — 37.4% при максимально возможном показателе (содержание первичных аминогрупп) 46%. Образовавшийся лекарственный аналог внешне — аморфный порошкообразный продукт.

В отличие от АСК проведение процесса взаимодействия салициловой кислоты (СК) с метилоланологом хитозана исключает вероятность деструктивных изменений. Ранее были описаны способы химической иммобилизации СК в структуру хитозана путем проведения реакции солеобразования с катионоактивным полимером в спиртовой среде. Отмечены высокая реакционная способность компонентов в этих условиях и образование солевых аналогов с значительной растворимостью в воде; отмечена специфическая биологическая активность таких полимерных салицилатов [4]. Салицилоирование хитозана, с использованием в качестве спейсерообразующего заместителя $-CH_2-$ группы, обеспечивает более стабильную структуру полимерной лекарственной формы. В качестве матрицы применялся хитозан, выделенный после деацетилирования хитина; деполимеризация, как промежуточная стадия процесса, не производилась.

После проведения серии опытов найдено целесообразным использование метода введения ПАСК в структуру хитозана путем образования солевых связей лекарство — полимер через структурный элемент — остаток янтарной кислоты. Обоснованиями этого приема являются известная совместимость янтарной кислоты с биологическими системами, бифункциональный характер ее реакционной способности и высокая гидрофильность. Процесс иммобилизации ПАСК в структуру хитозана состоит из двух стадий. Химическая активация хитозана заключается в обработке полимера водным раствором янтарной кислоты из расчета соотношения солеобразующих функционалов макромолекул и низкомолекулярного реагента 1.6:1.0 моль. В условиях этого процесса аминогликан в водной среде переходит в жидкую фазу. В проводившихся опытах использовался хитозан, полученный путем последовательно проводившихся деацетилирования в щелочной среде (степень деацетилирования — 90%) и деполимеризации пероксидным методом с образованием низкомолекулярных полимергомологов ($[\eta]$ — 0.4 ддл/г). При обработке на первой стадии расчетное превращение аминогрупп в структуре полимера составляло 60%, что определялось мольной долей янтарной кислоты, вводившейся в реакционную систему. Ограничение степени превращения на этой стадии введено в целях предотвращения пространственного структурирования полимера. Однофазная реакционная масса при этом образуется в течение 10—20 мин. при концентрации полимера (водная среда) 10% и содержании янтарной кислоты 3.5%. На этой стадии использовался механический фактор при взаимодействии указанных компонентов (взаимное растирание). Количество вводившейся в систему ПАСК (конденсированная фаза) эквимолярное в отношении содержания свободных карбоксильных

групп в структуре химически активированного хитозана. Солеобразование при конверсии аминогрупп ПАСК завершалось в течение 20—30 мин. (20—22 °С). При этом кристаллы ПАСК переходили в жидкую фазу. В целях предотвращения ассоциации макромолекул на основе хитозана сушка пленки проводилась в мягких температурных условиях в открытой системе. Получаемая полимерная лекарственная форма является пленкообразующим материалом, не проявляющим адгезивных свойств к стеклу. Полученный лекарственный полимераналог хитозана — вещество, хорошо растворимое в воде. Методом потенциометрического титрования раствором NaOH уточняли фактическое содержание ионогенных центров в составе сополимера. С теоретической точки зрения фиксирование молекулы ПАСК в структуру хитозана через сукциноил-спейсер сопровождается образованием двух солевых группировок. По данным определения фактической концентрации в условиях титрования (седиментация обессоленных макромолекул хитозана), это соответствует количеству присоединенной в структуру лекарственной субстанции. Перспективы развития исследований — определение биологической активности полимерной формы ПАСК *in vitro* на штаммах микобактерий туберкулеза H37RV и мутантных форм МБТ, определение эффекта пролонгации действия лекарственной субстанции в составе полимера, токсикологическая характеристика новой лекарственной формы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патент РФ №2201234, опубл. 27.03.03.
2. Патент США №6663896, опубл. 16.12.03.
3. Патент РФ 2088233, опубл. 27.08.98. Бюл. 24.
4. 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. 2001 г. — М. : ВНИРО, 2001. — С.235—236.