

Механохимическое получение и фармакологическая активность водорастворимых межмолекулярных комплексов арабиногалактана и лекарственных веществ

А. В. Душкин,^{а*} Е. С. Метелева,^а Т. Г. Толстикова,^б Г. А. Толстиков,^б Н. Э. Поляков,^в
Н. А. Неверова,^г Е. Н. Медведева,^г В. А. Бабкин^г

^аИнститут химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения Российской академии наук,
Российская Федерация, 630128 Новосибирск, ул. Кутателадзе, 18.

E-mail: dushkin@solid.nsc.ru

^бНовосибирский институт органической химии Сибирского отделения Российской академии наук,
Российская Федерация, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 9

^вИнститут химической кинетики и горения Сибирского отделения Российской академии наук,
Российская Федерация, 630090 Новосибирск, ул. Институтская, 3

^гИркутский институт химии им. А. Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук,
Российская Федерация, 664033 Иркутск, ул. Фаворского, 1

Исследованы возможность механохимического получения водорастворимых комплексов растительного полисахарида арабиногалактана и малорастворимых лекарственных веществ (сибазона, мезапама, индометацина и азалептина), их молекулярная динамика методом ЯМР-релаксации в растворах, а также некоторые фармакологические свойства в сравнении с исходными лекарственными веществами.

Ключевые слова: водорастворимые комплексы, механохимия, арабиногалактан, сибазон, мезапам, индометацин, азалептин, фармакологические свойства, ЯМР-релаксация в растворах.

Для повышения растворимости в воде лекарственных веществ (ЛВ) часто используют способы, основанные на образовании их комплексов с водорастворимыми синтетическими или природными полимерами или олигомерами^{1,2}. Механохимический путь получения этих комплексов или твердых дисперсных систем, образующих такие комплексы при растворении в воде, обладает преимуществами по сравнению с традиционными жидкофазными процессами^{3,4}.

Описан синтез комплексов ряда фармацевтических субстанций с β -циклодекстрином, поливинилпирролидоном и полиэтиленгликолем при обработке смесей этих веществ в шаровой мельнице^{5–8}. Однако β -циклодекстрин образует комплексы не со всеми соединениями, а прием больших (≥ 1 г) доз синтетических полимеров нежелателен. Кроме того, в большинстве упомянутых работ не проводилось фармакологических исследований полученных материалов.

В условиях механической обработки смеси хитозана и пироксикама происходит значительная деструкция хитозана, проявляющаяся в снижении его средней молекулярной массы (ММ) с $1.6 \cdot 10^6$ до $5 \cdot 10^3$ Да.⁹ Использование материалов с такой глубокой степенью деструкции в фармации нежелательно.

По нашему мнению, перспективно применение в качестве комплексообразователей природных полисахаридов невысокой ММ (порядка $(1–3) \cdot 10^4$ Да) для уменьшения степени механодеструкции, которые

обладают высокой водорастворимостью в широком диапазоне pH, не склонны к образованию гелей и легко метаболизируются в организме. К такому типу соединений относятся арабиногалактаны (АГ) — водорастворимые полисахариды лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и лиственницы Гмелина (*L. gmelinii* Rupr.). Их содержание составляет до 15% от массы сухой древесины, что делает АГ одними из наиболее доступных среди природных и биосинтетических полисахаридов^{10–13}. Технология производства АГ в России впервые разработана в лаборатории химии древесины Иркутского института химии им. А. Е. Фаворского СО РАН.¹⁴ Арабиногалактан представляет собой высокоразветвленный полисахарид с ММ 9–18 кДа. Эта особенность строения может способствовать образованию прочных межмолекулярных комплексов лекарственных препаратов.

В настоящей работе исследованы возможность механохимического получения водорастворимых комплексов АГ и малорастворимых ЛВ (сибазона, мезапама, азалептина и индометацина), их молекулярная динамика и спектральные характеристики в растворах, а также их некоторые фармакологические характеристики в сравнении с исходными ЛВ. Выбор лекарственных субстанций обусловлен относительной легкостью количественной оценки их фармакологического действия и низкой растворимостью в водных растворах, что снижает эффективность существую-

ших лекарственных средств на их основе. Для изучения состояния твердых фаз применяли методы рентгеноструктурного и термического анализ, а также оптической микроскопии. Молекулярную динамику комплексов в растворах исследовали методом ЯМР ^1H . Параметры специфической фармакологической активности изучали на лабораторных животных (мышях).

Экспериментальная часть

Использовали субстанции сибазона (1-метил-5-фенил-7-хлор-2,3-дигидро-1*H*-1,4-бензодиазепин-2-она, растворимость в воде $0.048 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$), мезапама (1-метил-5-фенил-7-хлор-2,3-дигидро-1*H*-1,4-бензодиазепина, растворимость в воде $0.018 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$), индометацина (2-метил-5-метокси-(1-(4-хлорбензоил)индол-3-ил)уксусной кислоты, растворимость в воде $0.041 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$), азадептина (11-(4-метилпиперазино)-8-хлор-5*H*-дибензо[*b,e*][1,4]-диазепина, растворимость в воде $0.036 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) фармакопейного качества без дополнительной очистки. Применяли АГ с отношением Gal : Aga = 18 (ЯМР ^{13}C), выделенный из лиственницы сибирской по описанному ранее методу^{14,15}. Содержание основного вещества в продукте >99.5%, влажность 0.01%, содержание фенольных примесей (флавоноидов) 0.15%.

Для проведения механохимических реакций использовали планетарную мельницу АГО-2. Режим обработки: ускорение мелющих тел — 60g, масса обрабатываемого материала 3 г, объем барабана 40 мл, мелющие тела — стальные шары (диаметр 6 мм, загрузка 75 г). Продолжительность обработки 3—10 мин. При более длительной обработке происходило частичное разложение образцов, в то время как при более кратковременной уменьшалась глубина взаимодействия.

Для определения растворимости ЛВ механически обработанные смеси АГ—ЛВ в количестве 0.4 г (соотношение АГ : ЛВ = 10 : 1) или 0.8 г (соотношение АГ : ЛВ = 20 : 1), а также навески индивидуальных веществ, эквивалентные их содержанию в указанных выше смесях, перемешивали в 5 мл воды на магнитной мешалке ($600 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$) в течение 6 и 24 ч при 24 °С. Во всех случаях ЛВ в растворе находилось в равновесии с осадком нерастворившегося ЛВ, а АГ полностью переходил в раствор. Концентрации ЛВ в растворе определяли методом ВЭЖХ на микроколлонном хроматографе Милихром-2, оборудованном УФ-детектором; использовали «обращенный» сорбент RP-18. В качестве элюента применяли систему MeCN—0.05 *M* AcOH (6 : 4), объем элюента 800 мкл, скорость потока $80 \text{ мкл} \cdot \text{мин}^{-1}$, объем пробы 2 мкл, детектирование в диапазоне от 254 до 280 нм. Концентрации исследуемых ЛВ определяли относительно их специально приготовленных спиртовых растворов.

Рентгенофазовый анализ (РФА) проводили на дифрактометре ДРОН-3 с использованием Cu- $\text{K}\alpha$ -излучения, скорость вращения счетчика $2 \text{ град} \cdot \text{мин}^{-1}$.

Термический анализ осуществляли методом ДСК с помощью прибора DSC-550 («Instrument Specialists Inc.», США) в атмосфере Ar. Диапазон изменения температуры 20—250 °С, скорость нагрева $5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{мин}^{-1}$.

УФ-спектры растворов регистрировали на двухлучевом спектрофотометре «Shimadzu UV-240» в кварцевых кюветках, $l = 1.0 \text{ см}$.

Молекулярно-массовое распределение (ММР) образцов исследовали методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ) на колонке (1.0 см×65 см) с Sephadex G-100, отка-

либрованной по декстранам с ММ 10500, 20000, 41272, 70000 и D-галактозе. В качестве элюента использовали 1 *M* раствор NaCl, скорость элюирования $15\text{--}17 \text{ мл} \cdot \text{ч}^{-1}$, собирали фракции по 1 мл. Содержание АГ во фракциях определяли фенол-серноокислотным методом¹⁶.

Спектры ЯМР ^1H в растворах регистрировали на спектрометре «Bruker DRX-200» на частоте 200 МГц. Измерение времен фазовой релаксации T_2 проводили с использованием стандартной последовательности Кара—Парсела—Мербуа—Гилла (CPMG) вида $P_1(90^\circ) - (\tau - P_2(180^\circ) - \tau)_n$ — регистрация, где $\tau = 4 \text{ мс}$ — фиксированная временная задержка, а величина n варьировалась от 0 до 4028. В качестве растворителей для ЯМР-измерений использовали D_2O или смеси D_2O — CD_3OD (7 : 3). Измерения проводили в диапазоне концентраций от 0.2 до 10 ммоль $\cdot \text{л}^{-1}$ при рН исходной воды (6.0).

Фармакологические (анксиолитические и противовоспалительные) свойства комплексов АГ с различными фармаконами изучали на белых беспородных мышях массой 20—25 г. Ульцерогенность комплексов с индометацином исследовали на крысах линии Вистар массой 180—200 г. Образцы вводили однократно внутривенно в виде водной суспензии за 1 ч до проведения тестов.

Обсуждение полученных результатов

Твердые фазы образцов ЛВ, полученных при механической обработке индивидуальных веществ и смесей с АГ в массовых соотношениях 1 : 10 и 1 : 20, исследовали методами РФА, ДСК, ВЭЖХ и оптической микроскопии.

Анализ с помощью ВЭЖХ спиртовых экстрактов механически обработанных смесей показал, что в используемых условиях не происходит химических взаимодействий с участием исследуемых ЛВ.

Результаты РФА и ДСК приведены на рисунках 1 и 2. Механическая обработка исходных лекарственных субстанций, а также АГ не приводит к значимым изменениям их рентгенограмм и термограмм. В то же время такие изменения наблюдаются при механической обработке смесей ЛВ с АГ. Во всех случаях в необработанных смесях присутствуют характерные для кристаллических фаз ЛВ рефлексы рентгенограмм и фазовый переход плавления, исчезающие после механической обработки. Из этих данных сле-

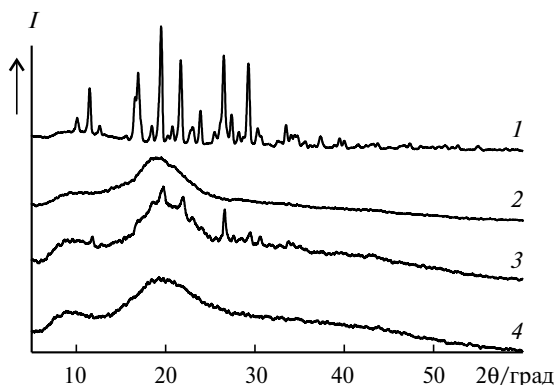


Рис. 1. Рентгенограммы исходных индометацина (1), АГ (2), а также смеси индометацин—АГ (1 : 10) до (3) и после (4) механической обработки в мельнице АГО-2.

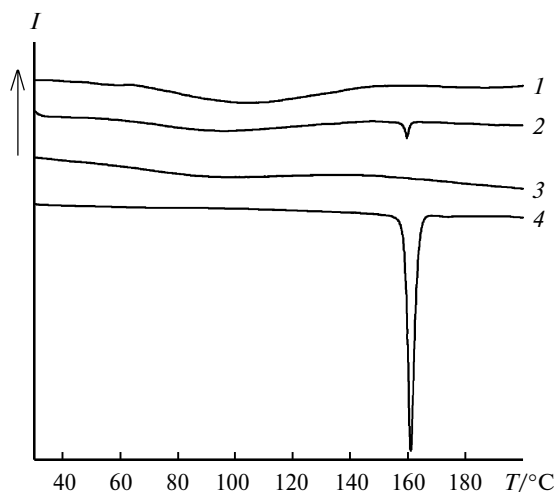


Рис. 2. Термограммы ДСК исходных индометацина (1), АГ (2), а также смеси индометацин—АГ (1 : 10) до (3) и после (4) механической обработки в мельнице АГО-2.

дует, что в механически обработанной смеси исчезают характерные следы кристаллической фазы исследованных ЛВ. По-видимому, происходит либо их аморфизация, либо молекулярное диспергирование в избыток твердой фазы АГ. Порошки механически обработанных смесей состоят преимущественно из стекловидных частиц размером 20–50 мкм. Это указывает на преимущественное образование гомогенной твердой фазы продуктов механической активации, т.е., вероятно, свидетельствует в пользу механизма молекулярного диспергирования молекул ЛВ в матрицу АГ.

Цветность механически обработанных смесей индометацина, сибазона и азалептина с АГ не меняется по сравнению с исходными веществами. В то же время механически обработанные смеси мезапама с АГ приобретают ярко оранжевую окраску.

Данные по изменению растворимости ЛВ из смесей с АГ приведены в таблице 1. Во всех исследованных случаях имеет место значительное повышение растворимости малорастворимых ЛВ, что демонстрирует высокую эффективность АГ в качестве комплексообразователя. Предварительная механическая обработка АГ и его смесей с ЛВ также во всех случаях существенно повышает растворимость ЛВ.

На рисунках 3 и 4 приведены УФ-спектры растворов АГ, исходных ЛВ, их необработанных, а также механически обработанных смесей. Полоса поглощения в диапазоне 250–310 нм с максимумом при 285 нм, присутствующая в спектрах растворов исходного и механически обработанного АГ, а также исследованных смесей, относится к примеси дигидрохверцетина, так как АГ не имеет полос поглощения в этой части спектра¹⁷. Содержание этой примеси невелико, и она не наблюдается в хроматограммах ВЭЖХ в использованных нами условиях. Таким образом, мы полагаем, что ее присутствие не оказывает существенного влияния на полученные результаты и их интерпретацию. В УФ-спектрах растворов смесей сибазона, азалептина и индометацина с АГ регистри-

Таблица 1. Увеличение растворимости лекарственных веществ в воде из композиций с арабиногалактаном

Образец	Массовое соотношение	Способ получения*	Увеличение растворимости ЛВ
Сибазон—АГ	1 : 10	A	1.7
		B	1.8
		C	2.4
	1 : 20	A	2.0
		B	2.2
		C	3.0
Мезапам—АГ	1 : 10	A	6.9
		B	10.2
		C	19.1
	1 : 20	A	10.8
		B	17.5
		C	46.8
Азалептин—АГ	1 : 10	A	12.4
		B	15.5
		C	20.5
	1 : 20	A	14.3
		B	20.2
		C	38.8
Индометацин—АГ	1 : 10	A	1.2
		B	2.1
		C	9.9
	1 : 20	A	1.7
		B	2.4
		C	16.8

* A — без механической обработки, B — механически обработанный АГ, C — механически обработанная смесь.

руются суперпозиции полос поглощения только исходных веществ. При этом их интенсивности пропорциональны концентрациям этих веществ в растворах. Это следует из сравнения спектров необработанных и механически обработанных смесей, в которых достигается значительное увеличение растворимости ЛВ (см. табл. 1, рис. 3). В спектрах растворов смесей мезапама с АГ появляется новая полоса поглощения при 250 нм, при этом интенсивность полосы исход-

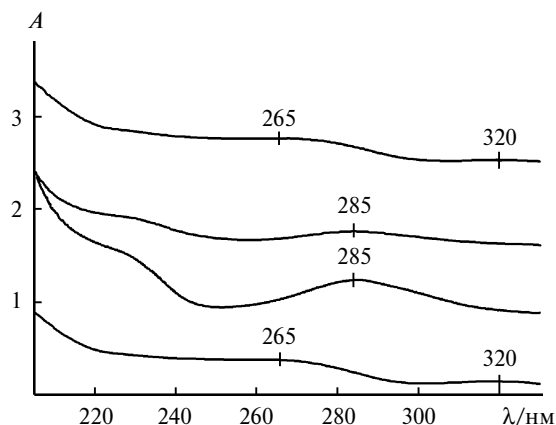


Рис. 3. Спектры поглощения водных растворов смеси индометацин—АГ (1 : 10) до (1) и после (2) механической обработки в мельнице АГО-2, а также исходных АГ (3) и индометацина (4).

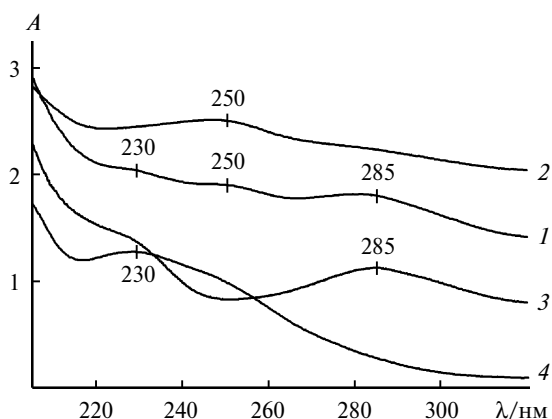


Рис. 4. Спектры поглощения водных растворов смеси мезапам—АГ (1 : 10) до (1) и после (2) механической обработки в мельнице АГО-2, а также исходных АГ (3) и мезапама (4).

ного мезапама при 230 нм падает, а затем практически исчезает в растворах механически обработанных смесей. Интенсивность полосы при 250 нм в спектрах растворов механически обработанных смесей увеличивается при аналогичном повышении растворимости мезапама (см. рис. 4). Аналогичные изменения спектров мезапама наблюдаются в кислых растворах (рН 3.4) в отсутствие АГ, что обусловлено образованием протонированной формы мезапама¹⁸.

Молекулярно-массовое распределение АГ до и после его механической обработки исследовано методом ГПХ. Для образцов исходного АГ характерно унимодальное ММР со средней молекулярной массой 13500 Да. Гель-хроматограммы механохимически обработанного АГ характеризуются наличием нескольких максимумов, соответствующих ММ в интервале от ~300000 до 1200 Да со средней ММ ~5000 Да (рис. 5). Изменения ММР механически обработанных смесей АГ и ЛВ качественно близки к приведенным выше данным. Очевидно, во всех случаях в основном происходит частичная деструкция макромолекул полисахарида, однако имеет место и сшивка образующихся фрагментов. При этом степень деструкции (снижения ММ) относительно невелика по сравнению с уменьшением ММ хитозана (в ~10³ раз), подвергнутого механической обработке в аналогичных

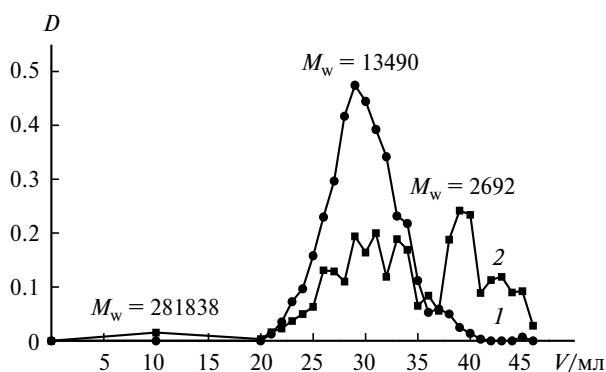


Рис. 5. Гель-хроматограммы образцов исходного АГ до (1) и после (2) механохимической обработки в мельнице АГО-2 в течение 6 мин; V — объем удерживания.

условиях, и, по нашему мнению, не должна препятствовать его возможному применению в фармации. Вероятно, это объясняется невысокой ММ исходного АГ и, вследствие этого, его большей стабильностью в условиях механической обработки¹⁹.

Целью настоящего исследования было подтверждение нашего предположения об образовании межмолекулярных комплексов АГ с ЛВ в растворах, а также сравнение комплексообразования в смесях АГ—ЛВ, приготовленных механохимически и путем простого смешения реагентов в растворе. Для характеристики комплексов применим метод ЯМР-релаксации²⁰. Известно, что времена спин-решеточной (T_1) и спин-спиновой (T_2) релаксации очень чувствительны к межмолекулярному взаимодействию и к диффузионной подвижности молекул²¹. При образовании комплекса времена релаксации протонов существенно уменьшаются из-за замедления диффузионной подвижности. В ситуации, когда молекулы в комплексе и в растворе находятся в состоянии быстрого обмена, изменение сигнала ЯМР при варьировании задержки между импульсами описывается моноэкспоненциальным законом. В случае же медленного обмена (по сравнению с временем релаксации) наблюдается биэкспоненциальная зависимость интенсивности сигнала ЯМР от времени:

$$A(t) = P_1 \exp(-t/T_{21}) + P_2 \exp(-t/T_{22}). \quad (1)$$

Быстрая компонента P_1 соответствует доле молекул, находящихся в комплексе, а медленная P_2 — доле молекул в растворе; T_{21} и T_{22} — времена спин-спиновой релаксации в комплексе и в растворе соответственно. Типичные значения T_2 для молекул в растворе 0.5—1 с, а в комплексе — 0.03—0.09 с. Уменьшение величины T_{21} означает снижение молекулярной подвижности молекул ЛВ в комплексе.

Рассмотрим полученные результаты измерений T_2 для изученных образцов.

Арабиногалактан. Спектры ЯМР ¹H водных растворов АГ представляют собой набор неразрешенных близкорасположенных линий в районе δ 3.5—4.5 м.д. Поэтому измерение времен релаксации осуществлялось по суммарной интегральной интенсивности всех протонов АГ. Очевидно, что полученное таким образом время релаксации носит усредненный характер. Тем не менее спад сигнала ЯМР отвечает четкой биэкспоненциальной зависимости. Ее рассчитанные параметры для АГ, а также для комплексов ЛВ—АГ приведены в таблице 2. Можно предположить, что малые времена релаксации соответствуют «внутренним» протонам, а большие — «периферийным» протонам макромолекул АГ. В результате механической обработки увеличивается молекулярная подвижность внутренних фрагментов макромолекулы, но снижается их доля.

В связи с ограниченной растворимостью лекарственных субстанций в воде для регистрации их спектров ЯМР мы использовали водно-метанольные смеси. Вследствие этого корреляция приведенных ниже данных измерений ЯМР-релаксации (см. табл. 2) и

Таблица 2. Параметры спин-спиновой релаксации протонов АГ и ЛВ в растворах^a

Система	P_1	P_2	T_{21}	T_{22}
(массовое соотношение)	%		мс	
АГ (исходный) ^b	80	17	20	250
АГ ^{b,c}	65	25	35	250
Азалеπτин—АГ (1 : 20) ^d	88	90	12	1000
Азалеπτин—АГ (1 : 20) ^{c,d}	90	40	10	1000
Мезапам—АГ (1 : 20) ^d	55	50	45	250
Мезапам—АГ (1 : 20) ^{c,d}	90	30	10	250
Сибазон—АГ (1 : 20) ^d	Моно	150	—	—
Сибазон—АГ (1 : 20) ^{c,d}	20	60	80	800
Индометацин—АГ (1 : 20) ^d	58	50	42	900
Индометацин—АГ (1 : 20) ^{c,d}	67	40	33	900

^a Измерения T_2 производили для ароматических протонов ЛВ. Точность полученных величин составляет $\pm 10\%$.

^b Растворитель — D₂O. ^c Механически обработанный образец. ^d Растворитель — D₂O—CD₃OD (70 : 30).

изменений растворимостей в водных растворах носит только качественный характер.

Система АГ—азалеπτин. Во всех случаях наблюдается выраженная биэкспоненциальная зависимость интенсивности сигнала от времени, что подтверждает нахождение молекул азалеπτина как в свободном состоянии, так и в комплексе с АГ. При этом доля связанных молекул азалеπτина в механически обработанных образцах увеличивается и их молекулярная подвижность уменьшается. Времена релаксации «свободных» молекул азалеπτина практически не изменяются. В спектрах ЯМР ¹H растворов смесей АГ—азалеπτин положение сигнала группы N—CH₃ смещается в слабое поле относительно сигнала в спектрах растворов чистого азалеπτина, вероятно, из-за протонирования молекул этого ЛВ. Это смещение увеличивается для механически обработанных образцов.

Система мезапам—АГ. Изменения характеристик ЯМР-релаксации аналогичны таковым для ранее описанной системы АГ—азалеπτин. Линии ЯМР ¹H группы N—CH₃ мезапама уширяются и смещаются в слабое поле, что также более выражено в механически обработанных образцах.

Система сибазон—АГ. В растворах этих смесей, не подвергшихся механической обработке, наблюдается моноэкспоненциальный спад сигнала, однако с меньшими временами, чем для свободного сибазона. Очевидно, в данном случае имеет место «быстрый» обмен молекул сибазона между раствором и комплексом. В механически обработанных смесях наблюдается биэкспоненциальный спад сигналов ЯМР, что свидетельствует о замедлении скорости обмена и образовании более прочных комплексов.

Система индометацин—АГ. В обоих случаях наблюдается биэкспоненциальная зависимость интенсивности сигнала ЯМР от времени, а времена релаксации короткой и длинной компонент практически не зависят от способа приготовления смесей. Доля

связанных молекул в механически обработанных образцах несколько увеличивается.

Таким образом, во всех растворах исследованных смесей ЛВ—АГ (за исключением смеси АГ—сибазон, не подвергшейся механической обработке) имеет место биэкспоненциальный спад сигнала ЯМР, типичный для случая так называемого «медленного обмена» молекул ЛВ в комплексе и в растворе. В механически обработанных смесях ЛВ—АГ доля ЛВ, связанных в комплексы с АГ, выше, чем в необработанных смесях. Подвижность молекул ЛВ в составе комплексов с АГ в механически обработанных образцах в большинстве случаев уменьшается. Исходя из условий «медленного обмена», можно предположить, что время жизни молекул ЛВ в комплексе с АГ ≥ 100 мс.

Фармакологические тесты. Первичное исследование фармакологического действия смесей сибазон—АГ, не подвергавшихся механической обработке, в сравнении с исходным сибазоном не выявило изменений специфической активности этого ЛВ. Вследствие этого, а также с учетом результатов по повышению стабильности комплексов ЛВ—АГ, полученных путем механической обработки, дальнейшие эксперименты проводили с механически обработанными образцами смесей ЛВ—АГ. Эффект оценивали по изменению количества различных видов движений и общего эмоционального состояния животных на приборе фирмы «TruScan» (США).

Система сибазон—АГ. Изучено анксиолитическое действие комплекса (образец 3, см. табл. 1) в тесте «открытое поле». Исследовали смеси ЛВ—АГ в дозах 25 и 2.5 мг·кг⁻¹, а также эталон сравнения сибазон в дозе 2.5 мг·кг⁻¹. Дозы сибазона в смесях составляли 2.5 и 0.25 мг·кг⁻¹. Установлено, что комплексообразование сибазона с АГ способствует, во-первых, усилению анксиолитического (транквилизирующего) эффекта сибазона, проявляющемуся в уменьшении количества актов двигательной активности и времени иммобильности; во-вторых, снижению в 10 раз его дозы с сохранением базовой (транквилизирующей) активности сибазона.

Система мезапам—АГ. Изучено анксиолитическое действие комплексов в тесте «открытое поле». Исследовали смеси ЛВ—АГ (образцы 9 и 12, см. табл. 1) в дозе 10 мг·кг⁻¹ и эталон сравнения мезапам в дозах 1 и 10 мг·кг⁻¹. Количество мезапама в смесях 1 : 10 и 1 : 20 составляло 1.0 и 0.5 мг·кг⁻¹. Установлено, что введение механически обработанных смесей мезапам—АГ (в эквивалентных по действующему веществу дозах) способствует снижению степени тревожности животных в 2 раза по сравнению с исходным мезапамом. Высокая противотревожная активность комплексов ЛВ—АГ проявляется при снижении дозы мезапама в 20 раз по сравнению с исходным ЛВ.

Система АГ—азалеπτин. Изучена нейролептическая активность комплексов в тесте «открытое поле». Исследовали смеси (образцы 14 и 18, см. табл. 1) в дозе 250 мг·кг⁻¹ и эталон сравнения азалеπτин в дозе 25 мг·кг⁻¹. Количество введенного азалеπτина в смесях с АГ 1 : 10 и 1 : 20 по массе составляло 25 и

12,5 мг·кг⁻¹ соответственно. Комплексообразование ЛВ—АГ вносит усиление седативной компоненты, что проявляется в снижении двигательной активности, увеличении продолжительности неподвижного момента и уменьшении пройденного животным расстояния и скорости движения по сравнению с эталоном, введенным в той же дозе. Снижение дозы азалептина в комплексе в 2 раза по сравнению с терапевтической существенно влияло на показатели теста «открытое поле» не оказало.

Система индометацин—АГ. Исследование противовоспалительного действия механохимически полученных смесей индометацина и АГ в массовых соотношениях 1 : 10 и 1 : 20 (образцы **20** и **24**, см. табл. 1) проводили на модели каррагенинового воспаления. Чистый индометацин, а также оба исследуемых образца вводили внутрижелудочно через 1 ч после воспроизведения воспаления в общей дозе 75 мг·кг⁻¹. При этом доза индометацина в смесях ЛВ—АГ составляла 7.5 и 3.75 мг·кг⁻¹ соответственно. Показано, что при снижении дозы индометацина в 10 и 20 раз относительно его эталонной дозы противовоспалительная активность сохраняется высокой. Подтверждением высокой эффективности действия индометацина в комплексе с АГ является и то, что АГ на данной модели воспаления активности не проявляет.

Для выявления побочных эффектов нестероидных противовоспалительных средств — степени деструктивных поражений слизистой желудка (ульцерогенности) — сравниваемые препараты вводили крысам однократно натошак внутрижелудочно и через 18 ч подсчитывали количество деструктивных поражений слизистой желудка. Было показано, что снижение дозы индометацина в исследуемых смесях позволило уменьшить, по сравнению с эталоном, количество деструктивных поражений слизистой желудка в 2 раза, но сохранить высокую базовую противовоспалительную активность.

Таким образом, в наших экспериментах при определении растворимости ЛВ в присутствии АГ имеет место равновесие растворенного ЛВ с его твердой кристаллической фазой (см. Экспериментальную часть). Согласно количественным оценкам в изученных растворах смесей АГ и ЛВ, как правило, общее количество молекул комплексообразователя значительно превышает количество растворенных молекул ЛВ. В этом случае представляется разумным предположить, что в образующихся межмолекулярных комплексах на одну молекулу АГ приходится не более одной молекулы ЛВ, т.е. принять молярную стехиометрию образующихся комплексов ЛВ : К = 1 : 1 (К — комплексообразователь). Тогда процессы растворения и комплексообразования малорастворимых ЛВ могут быть наглядно описаны уравнениями



Равновесие (3) описывается уравнением

$$K_{\text{к}} = [(\text{ЛВ} \cdot \text{К})_{\text{р}}] / [\text{ЛВ}_{\text{р}}][\text{К}_{\text{р}}]. \quad (4)$$

Здесь ЛВ_{тв} — твердая кристаллическая фаза ЛВ, находящаяся в равновесии с раствором; ЛВ_р — ЛВ, находящееся в растворе в свободном виде; К_р — комплексообразователь в растворе в свободном виде; (ЛВ·К)_р — комплекс комплексообразователя и ЛВ в растворе; K_к — константа образования межмолекулярного комплекса.

Величина [ЛВ_р] соответствует равновесному (термодинамическому) значению растворимости в отсутствие комплексообразователя. При комплексообразовании общая концентрация ЛВ в растворе C_{ЛВ} равна сумме концентраций свободного ЛВ и ЛВ, находящегося в составе комплексов:

$$C_{\text{ЛВ}} = [\text{ЛВ}_{\text{р}}] + [(\text{ЛВ} \cdot \text{К})_{\text{р}}]. \quad (5)$$

Таким образом, увеличение растворимости ЛВ в растворе (X) в присутствии комплексообразователя будет иметь следующее значение:

$$X = C_{\text{ЛВ}} / [\text{ЛВ}_{\text{р}}] = 1 + K_{\text{к}}[\text{К}_{\text{р}}]. \quad (6)$$

При этом ЛВ в растворе и в составе комплексов находятся в динамическом равновесии (3).

В исследованных нами системах достигаемая суммарная концентрация ЛВ в водном растворе в присутствии комплексообразователя значительно превышает равновесную (с его кристаллической фазой) растворимость ЛВ (см. табл. 1). При этом не происходит заметных, в пределах точности анализов ВЭЖХ, химических превращений ЛВ. В использованных нами условиях определения растворимости величина [К_р] (при фиксированном соотношении ЛВ : К в исследуемом образце) практически постоянна; таким образом, увеличение растворимости пропорционально K_к при X >> 1.

В рамках использованных приближений можно сделать вывод, что прочность межмолекулярных комплексов ЛВ с АГ возрастает в ряду сибазон < индометацин < мезапам < азалептин. Использование предварительно механически обработанного АГ также увеличивает K_к. При механической обработке смесей ЛВ и АГ происходит дальнейшее увеличение прочности комплексов.

В свете различий в прочности межмолекулярных комплексов различных ЛВ с АГ представляет интерес обсуждение возможных механизмов межмолекулярных взаимодействий. В рассматриваемых условиях наиболее вероятными представляются водородная связь и кулоновское взаимодействие при ионизации молекул. В самом деле, молекулы АГ и ЛВ имеют довольно много полярных групп — гидроксильных, амидных и карбонильных групп, между которыми вероятно образование водородных связей. В то же время исследуемые ЛВ и АГ обладают определенными кислотно-основными свойствами. Так, азалептин и мезапам являются основаниями (pK_a = 7.5 и 6.2 соответственно). Индометацин представляет собой слабую кислоту (pK_a = 4.5). Сибазон не имеет выраженных кислотно-основных свойств. Растворы АГ, используемые нами, проявляют слабые кислотные свойства, вероятно, за счет присутствия остатков уроно-

вых кислот в боковых цепях¹². Водородный показатель 10%-ного раствора АГ в дистиллированной воде составляет 3.5 и практически не меняется после его механической обработки. Таким образом, если молекулы всех исследованных ЛВ могут образовывать водородные связи с АГ, то кислотно-основные взаимодействия наиболее вероятны с азалаптином и мезапамом, как выраженными органическими основаниями. Этот вывод подтверждается исследованием спектров ЯМР ¹H растворов этих ЛВ в присутствии АГ — имеют место химические сдвиги, характерные для «протонированных» молекул. Эффект протонирования также наблюдается в УФ-спектрах растворов мезапама, АГ и их смесей, подвергшихся механической обработке. В случае сибазона и индометацина аналогичных явлений в УФ-спектрах и спектрах ЯМР не наблюдается. Очевидно, кислотно-основные взаимодействия способствуют образованию более прочных комплексов ЛВ—АГ, что согласуется с данными по увеличению растворимости (см. табл. 1). Следует отметить, что растворимость этих ЛВ также зависит от pH раствора и повышается даже в отсутствие АГ при изменении pH от 5.9 до 3.5 в 7.5 и 7.3 раза для азалаптина и мезапама соответственно. Однако увеличение их растворимости за счет комплексообразования с АГ в несколько раз превышает эти величины. Для индометацина и сибазона в исследованном диапазоне pH растворимость не меняется. Следовательно, увеличение их растворимости в смесях с АГ происходит только за счет образования межмолекулярных комплексов.

Не менее важным фактором, влияющим на прочность межмолекулярных комплексов ЛВ—АГ, является механическая обработка их порошкообразных смесей, а также исходного АГ. В этих случаях эффект повышения растворимости по сравнению с веществами, не подвергавшимися механической обработке, может достигать величины ~10. Полученные результаты, с нашей точки зрения, можно объяснить на основе представлений о конформационных и конфигурационных изменениях в полимерах, а также уменьшения ММ в условиях интенсивных механических воздействий¹⁹.

Так, в результате механической обработки в планетарной мельнице происходит частичная деструкция АГ, сопровождающаяся снижением его средней ММ (см. рис. 5). Поскольку из одной макромолекулы образуются несколько «осколков», то возрастает $[K_p]$ — концентрация комплексообразователя в растворе в свободном виде, и равновесие по уравнению (3) смещается вправо, способствуя увеличению растворимости ЛВ. Вероятно, это явление объясняет повышение растворимости ЛВ при механической обработке чистого АГ.

Однако механическая обработка смеси ЛВ с АГ приводит к еще большему увеличению растворимости ЛВ (см. табл. 1). Для объяснения этого явления надо иметь в виду, что кроме частичной деструкции при механической обработке твердых полимеров отдельные участки цепи принимают но-

вые конформации, которые могут сохраняться при переводе макромолекулы в раствор. Вероятно, подобное явление мы наблюдаем при механической обработке АГ. Считается^{22,23}, что макромолекулы АГ существуют в очень компактной, вероятно, сферической форме. Молекулы ЛВ предпочтительно образуют межмолекулярные комплексы только с отдельными участками макромолекулы, которые, например, могут быть «полостями», состоящими из основной и боковых цепей. Очевидно, что доступность таких «сайтов» для комплексообразования зависит от разрыхленности структуры макромолекулы. Как показали исследования ГПХ, при механической обработке твердого АГ его ММ уменьшается, а полидисперсность увеличивается, что является результатом разрыва полисахаридных цепей АГ. Измерения ЯМР-релаксации не противоречат данным ГПХ. Однако при таких превращениях макромолекул неизбежны их конформационные и конфигурационные изменения.

Макромолекулы АГ содержат большое количество гидроксильных групп и характеризуются сильным внутримолекулярным взаимодействием между цепями, что стабилизирует их конфигурацию. Возникшие в результате механической обработки новые конфигурации АГ могут сохраняться и при растворении. В рамках этого предположения с учетом данных по повышению растворимости ЛВ (см. табл. 1), а также данных ЯМР-релаксации смесей ЛВ—АГ можно сделать вывод, что конфигурации макромолекул АГ, возникшие при его механической обработке, более благоприятны для комплексообразования с молекулами ЛВ. Кроме того, при механической обработке смесей ЛВ с АГ макромолекулы полимера и ЛВ вступают в межмолекулярные взаимодействия, по-видимому, с образованием комплексов уже в твердой фазе. Так, в механически обработанных смесях мезапам—АГ является характерное для протонированной формы окрашивание, что может служить подтверждением нашего предположения. В этих случаях, вероятно, происходит «подстраивание» структуры макромолекулы АГ, благоприятное для комплексообразования с молекулами ЛВ. При растворении созданная конфигурация имеет тенденцию к сохранению, что также проявляется в повышенной прочности межмолекулярных комплексов АГ—ЛВ, подтверждаемой повышением растворимости и совокупностью данных ЯМР-релаксации.

Весьма примечателен факт уменьшения молекулярной подвижности молекул ЛВ в механохимически полученных комплексах по сравнению с комплексами, образовавшимися при совместном растворении исходных веществ. По нашему мнению, в последнем случае комплексообразование молекул ЛВ происходит с периферийными, более подвижными частями молекул АГ, в то время как после механической обработки молекулы ЛВ глубже проникают в структуру АГ. Это согласуется с нашими предположениями о «разрыхлении» структуры макромолекул АГ при механической обработке.

Оценку времени существования молекул ЛВ в комплексе с АГ можно провести на основе данных ЯМР-релаксации и ширины пика ВЭЖХ исследуемых растворов. В первом случае его величина определяется условиями «медленного обмена» и составляет ≥ 0.1 с. На хроматограммах ВЭЖХ наблюдаются симметричные пики соответствующих ЛВ. Времена удерживания не зависят от присутствия АГ в исследованных растворах и совпадают с таковыми для чистых ЛВ, что указывает на «быстрый», в рамках применения этого метода, обмен молекул ЛВ в свободном и связанном состоянии. Для этого время жизни каждого состояния, вероятно, должно быть по крайней мере на порядок меньше ширины пика ВЭЖХ, выраженного в единицах времени его выхода и составляющего в используемых нами условиях 123.6 с. Применение указанных критериев дает интервал 0.1–13 с. К сожалению, проведенная оценка не позволяет установить разницу между механически обработанными и необработанными смесями.

Следует отметить, что полученные результаты позволяют обосновать преимущества получения межмолекулярных комплексов ЛВ–АГ путем твердофазного механохимического синтеза. При этом удается добиться повышения растворимости ЛВ в ≥ 1.5 –10 раз. Предложенная нами качественная модель сохранения конфигураций макромолекул при растворении в наибольшей степени применима к жестким цепным полисахаридам, отдельные участки цепей которых связаны водородными связями, фиксирующими структуру. Аналогичное явление повышения растворимости комплексов ЛВ с синтетическими полимерами наблюдалось и ранее^{7,8}, однако в существенно меньших масштабах. Вследствие этого оно не служило предметом обсуждения.

Фармакологические свойства систем ЛВ–АГ. Количественная корреляция между данными по увеличению растворимости ЛВ (см. табл. 1) и изменению фармакологических показателей весьма затруднена. Для этого необходимы фармакокинетические исследования, выходящие за рамки настоящей работы. Однако во всех случаях фармакологические испытания полученных комплексов на лабораторных животных показали, что для получения одинакового по сравнению с исходным ЛВ специфического фармакологического действия (седативный, противовоспалительный эффект и т.д.) требовалась в несколько раз меньшая доза ЛВ. По нашему мнению, это связано с повышением биодоступности ЛВ в композициях с АГ. Применительно к пероральному пути введения комплексообразование обеспечивает более эффективное высвобождение малорастворимых ЛВ из твердых лекарственных форм. Кроме того, возможна абсорбция в кровотоки непосредственно комплексов ЛВ с АГ. В последнем случае можно предположить, что при метаболизме ЛВ или связывании его специфическими рецепторами концентрация его несвязанных молекул будет восполняться путем диссоциации комплексов. Фактически, в растворе (крови) будет суще-

ствовать «депо» ЛВ, обеспечивающее повышенный фармакологический эффект.

Таким образом, механохимическое получение твердофазных комплексов лекарственных веществ с растительными полисахаридами представляется перспективным путем модификации лекарственных средств, позволяющим повысить растворимость, а следовательно, биодоступность ЛВ; снизить действующую дозу ЛВ с сохранением высокой базовой активности; уменьшить степень выраженности побочных эффектов, характерных для ЛВ.

В настоящей работе получены и исследованы водорастворимые межмолекулярные комплексы природного растительного полисахарида АГ и малорастворимых ЛВ — сибазона, мезапама, индометацина и азалептина. Спектральными, структурными и аналитическими методами проведено сравнение различных способов получения растворов таких комплексов — жидкофазным и механохимическим твердофазным путем, а также с использованием предварительно механохимически обработанного АГ. Показано, что механохимический твердофазный путь их синтеза позволяет получить более устойчивые межмолекулярные комплексы, а также имеет существенные технологические преимущества. Использование изученных ЛВ в виде водорастворимых комплексов существенно улучшает их фармакологические характеристики — достигается снижение действующей дозы, а также нежелательных побочных эффектов, например, ulcerогенность у нестероидных противовоспалительных препаратов.

Полученные результаты открывают перспективы создания лекарственных средств повышенной эффективности и безопасности.

Список литературы

1. A. Nokhodchi, *J. Pharm. Sci.*, 2005, **8**, 18.
2. М. И. Штильман, *Сорос. образов. журн.*, 1998, **5**, 48.
3. А. М. Дубинская, *Тез. докл. Всесоюз. научн.-техн. конф. «Механохимический синтез» (Владивосток, 1990 г.)*, Изд-во Дальневост. ун-та, Владивосток, 1990, 157.
4. Т. P. Shakhshneider, V. V. Boldyrev, *Reactivity of Molecular Solids*, John Wiley and Sons, LTD, New York, 1999, 271.
5. J. Szejtli, in *Inclusion Compounds*, Eds J. L. Atwood, J. E. Davies, D. D. Mcnicob, Academic Press, New York, 1984, **3**, 331.
6. US Pat. 4727064; *Chem. Abstrs*, 1989, **110**, 179558.
7. Т. P. Shakhshneider, М. А. Vasilchenko, А. А. Politov, V. V. Boldyrev, *Int. J. Pharm.*, 1996, **130**, 25.
8. V. V. Boldyrev, L. P. Burleva, Т. P. Shakhshneider, *Abstr. Ist Intern. Conf. on Mechanochemistry (Kosice, Slovakia, March 23–26, 1993)*, Kosice, Slovakia, 1993, **D 21**.
9. G. L. Ivashenko, Т. P. Shakhshneider, V. V. Boldyrev, N. G. Bazarnova, A. S. Medvedeva, L. P. Safronova, *Mendeleev Commun.*, 2003, **1**.
10. С. А. Кузнецова, А. Г. Михайлов, Г. П. Скворцова, Н. Б. Александрова, А. Б. Лебедева, *Вестн. Красноярск. гос. ун-та, Естественные науки (Электронный ресурс)*, 2005, **2**, 121.

11. С. А. Медведева, Г. П. Александрова, В. И. Дубровина, Т. Д. Четверикова, Л. А. Грищенко, И. М. Красникова, Л. П. Феокистова, Н. А. Тюкавкина, *Butlerov Comm.*, 2002, 7, 45.
12. Е. Н. Медведева, В. А. Бабкин, Л. А. Остроухова, *Химия растительного сырья*, 2003, 1, 27.
13. Пат. РФ 2143437; *Бюл. изобрет.*, 1999, 36.
14. Пат. РФ 2256668; *Бюл. изобрет.*, 2005, 20.
15. Е. Н. Медведева, В. А. Бабкин, О. А. Макаренко, С. М. Николаев, В. Б. Хобракова, А. М. Шулунова, Т. Е. Федорова, Л. А. Еськова, *Химия растительного сырья*, 2004, 4, 17.
16. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, *J. Anal. Chem.*, 1956, 28, 350.
17. Г. Ф. Антонова, Н. А. Тюкавкина, *Химия древесины*, 1976, 4, 60.
18. P. Chananont, T. A. Namor, I. L. Martin, *Acta Crystallogr., Sect. B*, 1980, 36, 898.
19. Н. К. Барамбойм, *Механохимия высокомолекулярных соединений*, Химия, Москва, 1978, 384 с.
20. L. Fielding, *Tetrahedron*, 2000, 56, 6151.
21. Д. Эмсли, Д. Финей, Л. Сатклиф, *Спектроскопия ЯМР высокого разрешения*, Мир, Москва, 1969.
22. H. A. Swenson, H. V. Kaustinen, O. A. Kaustinen, N. S. Tomson, *J. Polymer Sci., A-2*, 1968, 6, 1593.
23. E. V. Groman, P. M. Enriquez, Jung Chu, L. Josephson, *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5, 547.

Поступила в редакцию 3 октября 2007;
после доработки — 6 июня 2008

Краткое англ. низв.

????????????????????