

УДК 615.214:547.1/0121

©Коллектив авторов

УЛУЧШЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НИФЕДИПИНА ПУТЕМ МЕХАНОХИМИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСИРОВАНИЯ С ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Т.Г. Толстикова¹, М.В. Хвостов^{1}, А.О. Брызгалов¹, А.В. Душкин², Е.С. Метелева²*

¹Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова, СО РАН,
630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 9; тел./факс: (383)3300731;
эл. почта: Mihail.hvostov@gmail.com.

²Институт химии твёрдого тела и механохимии СО РАН, Новосибирск

Методом механохимической активации получена новая водорастворимая форма блокатора медленных кальциевых каналов нифедипина (НФ) с глицирризиновой кислотой (ГК) в виде молекулярного комплекса в молекулярном соотношении компонентов 1:4. Фармакологическое преимущество этого комплекса заключается в снижении эффективной дозы нифедипина в комплексе в 10 раз по сравнению с терапевтической дозой, с сохранением высокой антигипертензивной активности и усилении плеiotропного антиаритмического свойства нифедипина. Новый антигипертензивный и антиаритмический агент (комплекс НФ:ГК = 1:4) химически стабилен и безопасен при парентеральном введении.

Ключевые слова: нифедипин, глицирризиновая кислота, комплексообразование, гликозиды, механохимический синтез.

ВВЕДЕНИЕ. Нифедипин (диметиловый эфир 2,6-диметил-4-(2'-нитрофенил)-1,4-дигидропиридин-3,5-дикарбоновой кислоты) - один из широко применяемых препаратов ряда 1,4-дигидропиридина – является селективным блокатором медленных кальциевых каналов. Его распространённость в качестве энтерального антигипертензивного средства можно объяснить как фармакологическими свойствами, вновь привлекающими к нему внимание практических кардиологов, так и технологической доступностью субстанции фармакона (лекарства). Что касается лекарственных форм для внутривенного введения, необходимых в качестве средства скорой помощи, то на пути их распространения встают некоторые сложности. В частности, рекомендованные для применения инъекционные формы требуют особой предосторожности при введении, что связано с наличием этанола в составе растворителя фармакона.

Поэтому разработка водорастворимых форм нифедипина, пригодных для парентерального введения остаётся актуальной задачей.

Известно, что использование углеводсодержащих метаболитов микробного и растительного происхождения для образования комплексов с фармаконами (лекарствами) является перспективным подходом к разработке новых транспортных форм известных лекарственных препаратов. В этом ряду комплексообразователей на первом месте по степени изученности и практического применения находятся циклодекстрины (CD).

* - адресат для переписки

Комплексообразование с помощью CD обеспечивает повышение водорастворимости и часто связанную с ней биодоступность фармаконов. В составе комплексов с CD продлевается терапевтическая активность и повышается устойчивость фармаконов к нежелательному раннему метаболизму в желудочно-кишечном тракте. Известны комплексы с CD для более 70 фармаконов различного вида активности. В промышленном масштабе производится 20 препаратов на основе комплексов CD, в том числе 7 препаратов в виде инъекционной формы [1-3]. Описаны комплексы нифедипина с гидроксипропилметилцеллюлозой [4, 5] и хитозаном [6], способствующие повышению водорастворимости фармакона. Комплексообразование с помощью гидроксипропилциклодекстрина позволило получить препарат с повышенной водорастворимостью, но пригодной только для перорального применения [3].

Ранее нами было установлено, что терпеноидные гликозиды 18 β H-глицирризиновая кислота (ГК), стевиозид и ребаудиозид образуют комплексы с целым рядом фармаконов [7-9]. Фармакологически перспективными являются комплексы ГК с нестероидными противовоспалительными средствами [10], простагландинами [11], антиаритмиком аллапинином (гидробромид дитерпенового алкалоида лаппаконитина) [12, 13], антидепрессантом прозаком [14], противоопухолевыми препаратами 5-фторурацилом, фторафуром, рубомицином [15], противомикробными препаратами левомецетином, сульфамиридезином, салазодиметоксином, сульгином, резорцином [16].

Особо важным следствием комплексообразования является существенное (5-100 кратное) снижение терапевтической дозы фармакона с сохранением высокой базовой активности. Кроме того, происходит усиление положительных плеiotропных свойств фармакона, и в ряде случаев появляются новые положительные эффекты. Следует подчеркнуть, что ни в одном из описанных случаев комплексообразования фармаконов с CD подобные следствия не отмечались.

В настоящем сообщении впервые описывается получение комплекса ГК с нифедипином (НФ) и его фармакологические свойства.

МЕТОДИКА.

Синтез комплекса нифедипина и глицирризиновой кислоты молекулярного состава НФ:ГК 1:4 проводили твердофазным механохимическим путём [17]. Нифедипин (фирмы Sigma, 98% чистоты, Китай) и 18 β H-глицирризиновая кислота (получена из фармакопейного препарата глицирам по методу [18], содержания основного вещества 97,1 \pm 1,2% (т. пл. 223-224 $^{\circ}$ C; $[\alpha]$ _{20D}+62,50 (C 0,02; EtOH)) помещали в планетарную мельницу АГО-2 [19]. Режим обработки: ускорение мелющих тел – 60 g, масса обрабатываемой смеси 3 г, объём барабана – 40 см³, мелющие тела – стальные шары, диаметр 6 мм, загрузка 75 г. Время обработки составляло 10 минут. При более длительной обработке происходило частичное разложение образцов, в то время как при меньших временах мехактивации уменьшалась глубина взаимодействия.

Для определения растворимости нифедипина, механически обработанные смеси НФ/ГК, в количествах 0,2 г, а также навеску исходного НФ, эквивалентную его содержанию в вышеуказанных смесях, растворяли в 4 мл воды при перемешивании на магнитной мешалке (600 об/мин) в течение 6 и 24 ч при температуре 24 $^{\circ}$ C. Во всех случаях нифедипин в растворе находился в равновесии с осадком нерастворившегося НФ. При этом ГК полностью переходила в раствор. Как показали исследования ДСК выделенных осадков, они являются кристаллическими фазами НФ. Растворимость нифедипина определяли методом ВЭЖХ на микроколоночном хроматографе Милихром-2 (оборудованном УФ детектором и с использованием "обращенного" сорбента RP-18). В качестве элюента использовалась система ацетонитрил : 2-пропанол : 0,1М трифторуксусная кислота в соотношении 2:2:6, объём элюента - 1000 мкл, скорость потока – 80 мкл/мин, объём пробы – 4 мкл, длина волны детектирования - 234 нм. Концентрация НФ определялась относительно его спиртового раствора.

Рентгенофазовый анализ комплекса выполняли на дифрактометре ДРОН-З с использованием $\text{CuK}\alpha$ -излучения, скорость вращения счётчика 2 град/мин, $I=1000$. Термический анализ проводили методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с помощью прибора DSC-550 (Instrument Specialists Inc.) в атмосфере Ar . Температурная программа: $+20^\circ - +250^\circ\text{C}$, скорость нагрева $5^\circ\text{C}/\text{мин}$.

Фармакологические исследования проводили на половозрелых крысах самцах линии Вистар и линии НИСАГ (стресс-индуцированной гипертензии) массой 190-220 г и 250-320 г, соответственно. Животные получены из лаборатории экспериментальных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Все манипуляции проводили в соответствии с правилами и принципами гуманного обращения с животными.

Антигипертензивное действие исследовали при внутривенном способе введения. Антиаритмическую активность определяли на модели хлоридкальциевой (250 мг/кг) аритмии при внутривенном способе введения. Группы животных формировали по 10 особей в каждой. Было проведено несколько серий экспериментов. Регистрацию ЭКГ осуществляли во втором стандартном отведении путем наложения подкожных электродов. Регистрацию артериального давления (АД) в остром эксперименте осуществляли через канюлю в сонной артерии крысы. Запись АД и ЭКГ проводили на приборе Lablinc V фирмы "Coulbourn instruments" (США). АД при пероральном введении измеряли с использованием хвостовой манжеты (LE 5007 Automatic blood pressure computer, Letica, Испания). Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента в программном пакете "Statistica 6.0".

Субхроническую токсичность комплекса НФ:ГК 1:4 изучали при внутрибрюшинном введении самцам и самкам крыс линии Вистар в течение 14 дней. Животные были разбиты на 5 групп (по 6 животных в каждой): группа 1 – контрольная, физиологический раствор; группа 2 - комплекс в дозе 200 мг/кг ; группа 3 - комплекс в дозе $3,5 \text{ мг/кг}$; группа 4 - нифедипин в дозе $3,5 \text{ мг/кг}$; группа 5 - глицирризиновая кислота в дозе $3,2 \text{ мг/кг}$. Растворы вводили из расчета $0,2 \text{ мл}/100 \text{ гр.}$ веса животного. Для растворения субстанции нифедипина в воде добавляли $0,05 \text{ мл}$ Tween-80. Для корректности эксперимента, остальные растворы готовили аналогичным образом.

В конце эксперимента (на 15 день) из сосудов хвоста забирали кровь для определения гематологических показателей периферической крови. Для определения биохимических показателей сыворотки крови, животных забивали путём декапитации и забирали кровь из шейных сосудов.

Гематологические показатели периферической крови определяли на гемоанализаторе "Medonic" СА 530" (Швеция) в те же сроки. Морфологический состав лейкоцитов - с помощью светового микроскопа "Биолам-И" (С.-Петербург). Определение креатинина, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, холестерина, общего белка и глюкозы проводили с использованием стандартных диагностических наборов фирмы "Ольвекс-диагностикум" на фотометре - 5010 "Boehringer Mannheim" (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Как известно [17], метод механохимической активации позволяет проводить реакции в твердой фазе в одну стадию без участия растворителей. В исследованной системе нифедипин-ГК при механической активации по данным ДСК и рентгеноструктурного анализа (рис. 1 и 2) в продукте исчезают следы кристаллической фазы нифедипина, порошок продукта механохимической обработки состоит из стекловидных частиц размером 20-50 мкм. Это свидетельствует об образовании гомогенной твёрдой фазы продукта механохимического воздействия, т.е. происходит молекулярное диспергирование нифедипина в избыток твердой фазы глицирризиновой кислоты.

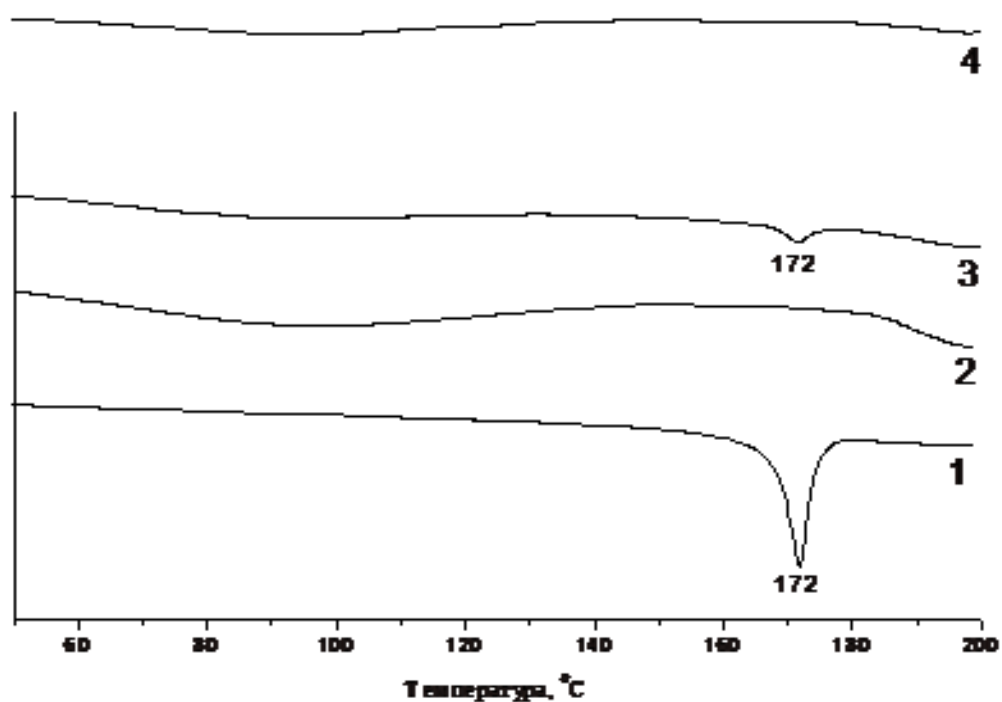


Рисунок 1.

Термограммы ДСК исходных нифедипина (1), ГК (2), а также смеси нифедипина и ГК 1:4 до (3) и после (4) механической обработки в мельнице АГО-2 в течение 10 минут.

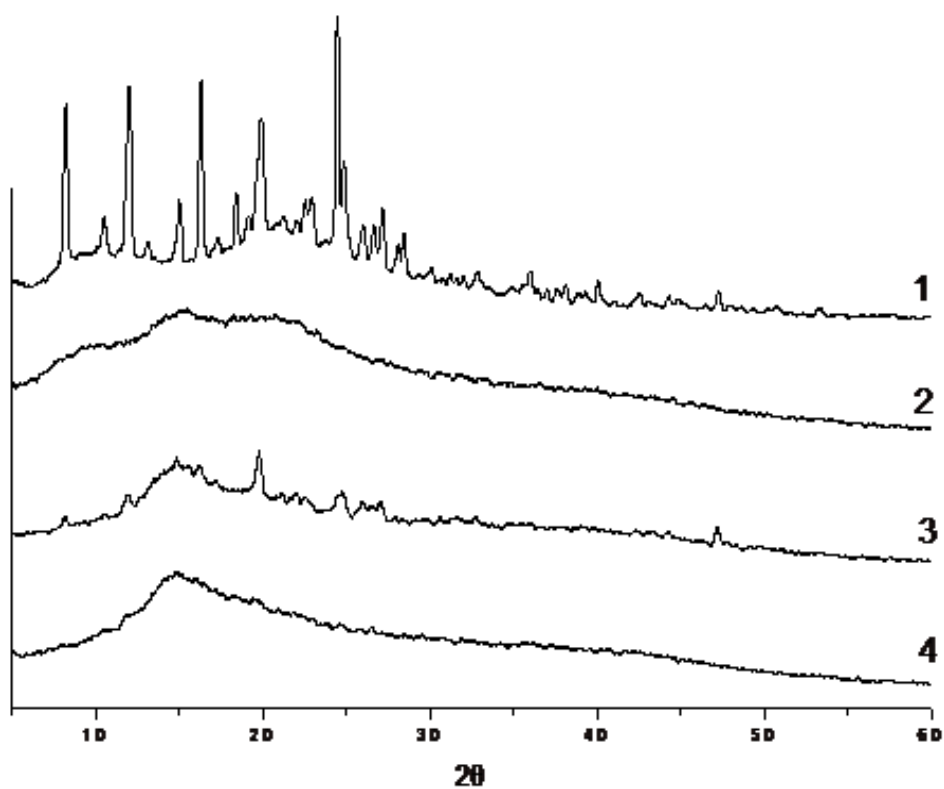


Рисунок 2.

Рентгенограммы исходных нифедипина (1), ГК (2), а также смеси нифедипина и ГК 1:4 до (3) и после (4) механической обработки в мельнице АГО-2 в течение 10 минут.

При растворении в воде полученного продукта наблюдается повышение растворимости нифедипина в 8,5 раз (табл. 1) по сравнению с насыщенным раствором чистого нифедипина. Это указывает на образование водорастворимых межмолекулярных комплексов нифедипин-ГК. Существование таких комплексов в растворах доказано методами спектроскопии ЯМР в работе [20]. Физико-химический механизм повышения растворимости рассмотрен нами в [21, 22]. Таким образом, по нашему мнению, при механической активации смеси твердых образцов ГК и НФ происходит их комплексообразование. Известно, что ГК в воде, этаноле и диметилформамиде существует в виде ассоциатов, состоящих из двух и более молекул, которые стабилизируются межмолекулярными водородными связями между карбоксильными группами агликона и углеводной цепи [7, 23-26]. Можно предположить, что при твердофазной реакции ГК и НФ даёт комплекс типа “host-guest”, в котором связывание компонентов осуществляется как путём кислотно-основного взаимодействия карбоксильной цепи с NH-группой нифедипина, так и за счёт водородных связей между гидроксилами углеводной цепи с нитро- и карбометоксигруппами нифедипина.

Таблица 1. Растворимость комплекса НФ:ГК 1:4.

Насыщенный раствор в воде	Растворимость нифедипина в воде
Нифедипин	0,18 г/л
Комплекс: После обработки в АГО-2 в течение 10 мин	1,53 г/л (растворимость нифедипина в воде увеличилась в 8,5 раз)

Анализ водных растворов комплекса методом ВЭЖХ показывает полную сохранность нифедипина. Это обстоятельство демонстрирует ценность ГК как комплексообразователя, который не вызывает никаких изменений молекулы фармакона, известного своей способностью к необратимым превращениям [22, 26].

Изучение антигипертензивного действия показало, что при внутривенном введении водного раствора комплекса крысам самцам линий Wistar и НИСАГ необходимый эффект достигается при дозе, в которой содержание НФ снижено в 10 раз относительно терапевтической дозы (табл. 2, 3) [27].

Таблица 2. Влияние внутривенного введения комплекса НФ:ГК 1:4 на артериальное давление крыс линии Вистар.

Агент	Доза (мг/кг)	Эффект (снижение артериального давления в % от исходного давления)	Исходное систолическое давление (мм рт.ст)	Изменение систолического давления при введении агентов (мм рт.ст)
Нифедипин	3,5	30	121,0±6,6	85,0±4,3 (p<0,05)
Комплекс (0,35 нифедипина)	3,5	26	141,0±5,0	104,0±4,3 (p<0,05)
Нифедипин	0,35	9	142,3±4,4	115,0±2,2 (p<0,05)
Глицерилфосфатная кислота	3,2	нет эффекта	126,5±1,3	129,6±2,0

УЛУЧШЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НИФЕДИПИНА

Таблица 3. Влияние внутривенного введения комплекса НФ:ГК 1:4 на артериальное давление крыс линии НИСАГ.

Агент	Доза (мг/кг)	Изменение систолического давления при введении агентов (мм.рт.ст)	Исходное систолическое давление (мм.рт.ст)	Эффект (снижение артериального давления в % от исходного давления)
Нифедипин	3,5	127,0±6,0 (p<0,05)	192,0±4,0	34
Комплекс (0,35 мг нифедипина)	3,5	129,7±5,1 (p<0,05)	180,5±4,7	28

Как видно, ранее отмеченный нами эффект комплексообразования с ГК, состоящий в снижении дозы фармакона ярко проявляется также в обсуждаемом случае. Важным следствием комплексообразования может стать усиление плейотропных свойств фармакона. Таким свойством для НФ является антиаритмическое действие. Однако, использование НФ в качестве антиаритмического средства невозможно из-за того, что желательное положительное воздействие на ритм сердечных сокращений может быть получено при использовании дозы, вызывающей близкое к критическому снижению АД. При образовании комплекса НФ с ГК нам удалось усилить антиаритмическое действие без снижения АД.

В наших экспериментах были использованы две схемы введения комплекса на модели хлоридкальциевой аритмии. Как видно из таблицы 4, в дозе 0,12 мг/кг (содержание НФ 0,012 мг/кг) комплекс предотвращает гибель животных в среднем на 85%. Это означает, что защитный антиаритмический эффект НФ может быть достигнут в дозе, сниженной в 29 раз по сравнению с дозой, обеспечивающей антигипертензивное действие.

Таблица 4. Антиаритмическое действие комплекса НФ:ГК 1:4.

	Доза препарата мг/кг	Количество выживших крыс в %	
		Агент+CaCl ₂	CaCl ₂ +Агент
Комплекс (доза нифедипина 0,012 мг/кг)	0,12	80	90
Нифедипин	0,012	0	0

Следующим этапом исследования комплекса стало изучение его безвредности в субхроническом эксперименте на крысах при парентеральном введении в терапевтической (3,5 мг/кг) и максимальной (200 мг/кг) дозах. Содержание нифедипина в максимальной дозе комплекса соответствует его LD₅₀ (15,5 мг/кг для крысы).

Установлено, что парентеральное введение комплекса в течение 14 дней в указанных дозах не вызывает интоксикации животных, не оказывает патологического влияния на температуру и массу тела. Не обнаружено влияния комплекса на центральную нервную систему, не выявлено изменений в картине периферической крови.

Комплекс не вызывает нарушения функций печени, не изменяет уровня общего белка и мочевины в крови. Только в группе, которой вводили комплекс в дозе 200 мг/кг, а также в группе, получавшей ГК, наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) снижение количества холестерина на 27% и 47% соответственно. При введении комплекса ГК /НФ в дозе 3,5 мг/кг отмечено снижение триглицеридов на 27% ($p < 0,05$). Комплекс не влияет на величину суточного диуреза, pH мочи и экскрецию метаболитов. Значительных изменений в метаболизме и функционировании органов и систем крыс не обнаружено. Все эти результаты позволяют судить о нетоксичности растворимого в воде комплекса. Согласно [28], по результатам субхронического эксперимента можно судить о безопасности изучаемого комплекса при его внутривенном использовании.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Комплекс нифедипина с глицирризиновой кислотой НФ:ГК = 1:4, полученный методом механохимической активации, стабилен и безопасен при парентеральном введении. Описанную форму нифедипина можно предлагать для дальнейшего фармакологического и доклинического исследования в качестве средства-кандидата антигипертензивного и антиаритмического действия.

Работа поддержана Междисциплинарным проектом СО РАН и СО РАМН №53, Интеграционным проектом СО РАН №54 и Комплексной Программой Президиума РАН "Фундаментальные науки - медицине" 2007 г.

ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lofsson Th., Brewster M.E., Mason M.* (2004) *Amer. J. Drug Deliv.*, **2**(4), 266-275.
2. *Challa R., Ahuja A., Ali J., Khar R.K.* (2005) *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **6**(2), article 43.
3. *Lofsson Th., Duchene D.* (2007) *Int. J. Pharm.*, **329**, 1-11.
4. *Cilurzo F., Minghetti P., Casiraghi A., Montanari L.* (2002) *Int. J. Pharm.*, **242**, 313-317.
5. *Vippagunta S.R., Maul K.A., Tallavajhala S., Grant D.J.W.* (2002) *Int. J. Pharm.*, **236**, 111-123.
6. *Portero A., Remumran-Ltorez C., Vila-Jato J.L.* (1998) *Int. J. Pharm.*, **175**, 75-84.
7. Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Гранкина В.П., Кондратенко Р.М., Толстикова Т.Г. (2007) Солодка: биоразнообразие, химия, применение в медицине, Академическое издательство "Гео", Новосибирск.
8. Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Шульц Э.Э., Покровский А.Г. (1997) *Биоорган. химия*, **23**(9), 691-709.
9. Толстикова Т.Г., Толстиков А.Г., Толстиков Г.А. (2007) *Вестник РАН*, **77**, 867-874.
10. Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Муринов Ю.И., Давыдова В.А., Толстикова Т.Г., Бондарев А.И., Зарудий Ф.С., Лазарева Д.Н. (1991) *Хим.-фарм. ж.*, **26**, 29-32.
11. Толстиков Г.А., Муринов Ю.И., Балтина Л.А., Саитова М.Ю., Зарудий Ф.С., Давыдова В.А., Лазарева Д.Н. (1991) *Хим. фарм. ж.*, **26**, 42-44.
12. *Polyakov N.E., Khan V.K., Taraban M.B., Leshina T.V., Luzina O.A., Salakhutdinov N.F., Tolstikov G.A.* (2005) *Org. Biomol. Chem.*, **3**, 881-885.
13. Брызгалов А.О., Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Жукова Н.А., Волкова Е.Б., Долгих М.П. (2005) *Ж. exper. клин. фармакол.*, **68**, 24-28.
14. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Коваленко И.Л., Толстиков А.Г. (2004) *Доклады АН*, **394**, 2, 707-709.
15. Балтина Л.А., Муринов Ю.И., Исмаилова А.Ф., Давыдова В.А., Зарудий Ф.С., Толстиков Г.А. (2001) *Хим. фарм. ж.*, **35**, 11, 3-4.

УЛУЧШЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НИФЕДИПИНА

16. Кондратенко Р.М., Балтина Л.А., Мустафина С.Р., Исмагилова А.Ф., Зарудий Ф.С., Давыдова В.А., Базекин Г.В., Сулейманова Г.Ф., Толстиков Г.А. (2003) Хим. фарм. ж., **37**, 32-35.
17. Shakhshneider T.P., Boldyrev V.V. (1999) Reactivity of Molecular Solids, John Wiley and Sons, LTD, England.
18. Балтина Л.А., Кондратенко Р.М., Мустафина С.Р., Толстиков Г.А. (2001) Хим. фарм. ж., **35**, 38-41.
19. <http://www.novic-mill.ru/ago2.php>
20. Polyakov N.E., Khan V.K., Taraban M.B., Leshina T.V. (2008) J. Phys. Chem. B., **112**(14), 4435-4440.
21. Толстикова Т.Г., Толстиков Г.А., Душкин А.В., Метелева Е.С. Патент РФ № 2006143081, МПК А61К31/00. Водорастворимая лекарственная композиция и способ её получения. Заявл. 05.12.2006; опубл. 20.06.2006.
22. Душкин А.В., Метелева Е.С., Толстикова Т.Г., Толстиков Г.А., Поляков Н.Э., Медведева Е.Н., Неверова Н.А., Бабкин В.А. (2008) Известия РАН, сер. Химическая, **6**, 1274-1282.
23. Polyakov N.E., Taraban M.B., Leshina T.V. (2004) Photochem. Photobiol., **80**, 565-571.
24. Романенко Т.В., Муринов Ю.И. (2001) Ж. физ. хим., **75**(9), 1601-1604.
25. Колядина О.А., Муринов Ю.И. (1997) Ж. физ. хим., **71**(3), 460-463.
26. Polyakov N.E., Leshina T.V., Salakhutdinov N.F., Lowell D.K. (2006) J. Physic. Chem. B., **110**(13), 6991-6998.
27. Толстикова Т.Г., Лифшиц Г.И., Хвостов М.В., Брызгалов А.О., Сорокина И.В. (2006) Рациональная фармакотерапия в кардиологии, **1**, 55-58.
28. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под общей редакции Р.У. Хабриева (2005), М. Медицина.

Поступила: 04. 09. 2008.

IMPROVEMENT OF PHARMACOLOGICAL VALUES OF THE NIFEDIPINE BY MEANS OF MECHANOCHEMICAL COMPLEXATION WITH GLYCYRRHIZIC ACID

T.G. Tolstikova¹, M.V. Khvostov¹, A.O. Bryzgalov¹, A.V. Dushkin², E.S. Meteleva²

¹Novosibirsk Institute of Organic Chemistry Siberian Branch of RAS, Acad. Lavrentjev Ave. 9, Novosibirsk, 630090, Russia; tel./fax: (383)3300731; e-mail: Mihail.hvostov@gmail.com

²Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry, Siberian Branch of RAS, Novosibirsk, Russia

A new water-soluble form of the calcium blocker nifedipine (NF) with glycyrrhizic acid (GA) (with molecular ratio 1:4) has been obtained by mechanochemical synthesis. Its pharmacological advantages in comparison with nifedipine were determined. An effective dose of nifedipine in complex reduced to 10 times as compared to its therapeutic dose while high antihypertensive activity preservation and pleiotropic antiarrhythmic activity enhancement. This new antihypertensive and antiarrhythmic agent (complex of NF:GA = 1:4) is chemically stable and safe for parenteral administration.

Key words: nifedipine, glycyrrhizic acid, complexation, glycosides.