

DOI: 10.15825/1995-1191-2016-1-22-31

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ФОРМЫ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

В.И. Севастьянов¹, В.К. Попов², В.Ю. Белов³, С.В. Курсаков³, Е.Н. Антонов²,
С.Э. Богородский²

¹ ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБУН «Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН», Москва, Российская Федерация

³ АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Российская Федерация

Цель. Разработка инкапсулированной в полимерные высокопористые микроносители пролонгированной формы ацетилсалициловой кислоты (АСК) с использованием сверхкритического диоксида углерода и последующим изучением методом ВЭЖХ кинетики высвобождения АСК *in vitro* и *in vivo*. **Материалы и методы.** В качестве полимерных носителей для инкапсуляции АСК были выбраны аморфные D,L-полилактиды (ПЛ) и полилактогликолиды (ПЛГ) марок PURASORB PDL02 и PDLG7502 («PURAC Biochem bv», Нидерланды). Инкапсуляцию АСК проводили с использованием процесса сверхкритического флюидного формирования методом PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions) мелкодисперсных (20–50 мкм) биорезорбируемых порошков алифатических полиэфиров, содержащих 10 масс.% АСК. Кинетику высвобождения АСК из полимерных микрочастиц в физиологический раствор и фармакокинетические исследования *in vivo* (кролики) регистрировали методом ВЭЖХ. **Результаты.** Разработана методика количественного определения АСК и ее основного метаболита салициловой кислоты (СК) в модельном растворе и плазме крови методом ВЭЖХ с УФ-детектированием с улучшенной пробоподготовкой и селективностью. Аналитический диапазон методики без учета разбавления составил 0,05–5,0 мкг/мл для модельного раствора и 0,2–10,0 мкг/мл для плазмы крови; степень извлечения АСК СК из плазмы крови – 95,8 и 98,1% соответственно. Показано, что количество АСК, высвободившегося из ПЛ в течение первых 4 ч, примерно на 25% превышает массу АСК, выделившегося из ПЛГ, что может служить обоснованием выбора ПЛГ в качестве носителя для создания пролонгированной формы АСК. Фармакокинетические исследования (кролики, n = 3) показали постепенное высвобождение АСК из микрочастиц ПЛГ в течение 24 ч после внутримышечной имплантации инкапсулированной формы АСК в дозе 10 мг/кг. **Заключение.** Полученные методом PGSS экспериментальные образцы высокопористых мелкодисперсных порошков ПЛГ, содержащие до 10 масс.% АСК, могут служить исходными прототипами для разработки и создания на их основе пролонгированной формы АСК.

Ключевые слова: высокопористые полимерные микрочастицы, полиэфиры, инкапсуляция, ацетилсалициловая кислота, сверхкритический диоксид, кинетика высвобождения, плазма крови, ВЭЖХ.

Для корреспонденции: Севастьянов Виктор Иванович. Адрес: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (499) 196-88-74. E-mail: viksev@yandex.ru.

For correspondence: Sevastianov Victor Ivanovich. Address: 1, Schukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Tel. (499) 196-88-74. E-mail: viksev@yandex.ru.

CREATING A PROLONGED FORM OF ACETYLSALICYLIC ACID: AN EXPERIMENTAL APPROACH

V.I. Sevastianov¹, V.K. Popov², V.Yu. Belov³, S.V. Kursakov³, E.N. Antonov², S.E. Bogorodsky²

¹ V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

² Institute of Laser and Information Technologies of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

³ Institute of Biomedical Research and Technology (ANO), Moscow, Russian Federation

Aim. The development of a prolonged form of acetylsalicylic acid (ASA) encapsulated into polymeric highly porous microcarriers using supercritical carbon dioxide and the subsequent study of ASA release kinetics *in vitro* and *in vivo* using high-performance liquid chromatographic (HPLC). **Materials and methods.** As polymeric carriers for ASA encapsulation amorphous D,L-poly lactides (PLA) and poly lactoglycolides (PLGA) of PURASORB PDL02 and PDLG7502 series (PURAC Biochem BV, Netherlands) were selected. The ASA encapsulation was performed using the PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions) method of supercritical fluid formation of microfine (20–50 µm) bioresorbable powders of aliphatic polyethers containing 10 wt.% ASA. The release kinetics of ASA from polymeric microparticles into saline solution as well as pharmacokinetic studies *in vivo* (rabbits) were registered by HPLC. **Results.** A method of quantitative determination of ASA and its main metabolite salicylic acid (SA) in model solution and blood plasma by HPLC-UV detection with enhanced sample preparation and selectivity was developed. The method's analytical range without accounting for dilution was 0.05–5.0 µg/ml for model solution and 0.2–10.0 µg/ml for blood plasma; the degree of extraction of ASA SA from blood plasma – 95.8 and 98.1%, respectively. It was demonstrated that the amount of ASA released from PLA during the first 4 h exceeds the mass of ASA released from PLGA by approximately 25% which may serve as a justification for the selection of PLGA as a carrier for the creation of a prolonged form of ASA. Pharmacokinetic studies (rabbits, n = 3) demonstrated a gradual release of ASA from PLGA microparticles during 24 h after intramuscular implantation of encapsulated form of ASA at the dose of 10 mg/kg. **Conclusion.** Test samples of highly porous microfine powders of PLGA obtained by PGSS containing up to 10 wt.% ASA may serve as source prototypes for the development and creation on their basis of a prolonged form of ASA.

Key words: highly porous polymeric microparticles, polyethers, encapsulation, acetylsalicylic acid, supercritical dioxide, release kinetics, blood plasma, HPLC.

ВВЕДЕНИЕ

Фармакологические препараты на основе ацетилсалициловой кислоты (АСК) обладают противовоспалительным, жаропонижающим и анальгетическим действием [1]. Способность АСК оказывать антиагрегационное действие, ингибировать спонтанную и индуцированную агрегацию тромбоцитов предопределило ее широкое использование как для профилактики острого коронарного синдрома и ишемического инсульта, так и после операций с использованием аппаратов искусственного и вспомогательного кровообращения [2–4]. Однако пероральное введение АСК вызывает местное раздражение слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и при длительном приеме может привести к развитию язв желудка и двенадцатиперстной кишки [5]. Кроме того, при пероральном приеме ацетилсалициловая кислота быстро подвергается гидролизу с образованием фармакологически активного метаболита – салициловой кислоты (СК). Период полувыведения СК из организма составляет от 3 до 9 часов и удлиняется при увеличении дозы препарата [6]. В ограниченных количествах салици-

ловая кислота связывается с белками крови, но при длительном применении АСК в больших дозах она частично находится в свободном состоянии и может послужить причиной интоксикации организма.

В связи с этим в последнее время большое внимание уделяется совершенствованию уже существующих препаратов на основе АСК, а также созданию ее новых лекарственных форм пролонгированного действия [7–10]. К таким лекарственным средствам можно отнести трансдермальные терапевтические системы [10], а также инъекционные или имплантируемые формы, представляющие собой лекарственные субстанции (ЛС), инкапсулированные или диспергированные в биосовместимые резорбируемые или биостабильные полимерные носители в виде монолитов, губок и микрочастиц [8, 10].

К числу наиболее перспективных способов инкапсуляции ЛС относятся технологии, основанные на применении сверхкритического диоксида углерода (ск-СО₂) в качестве экологически чистого растворителя ЛС, легко пластифицирующего аморфные и частично-кристаллические полимеры [10–12]. Это позволяет избежать необходимости

использования токсичных органических растворителей (ацетон, хлороформ и др.) и высоких (более 100 °C) температур для формирования полимерных микрочастиц различной дисперсности [13]. Кроме того, ск-СО₂ может достаточно эффективно удалять растворимые в нем токсичные примеси (непрореагировавшие мономеры и низкомолекулярные олигомеры, инициаторы полимеризации, пластификаторы и т. д.), что также способствует повышению биологической безопасности получаемых лекарственных форм [14].

При создании новых лекарственных средств необходим надежный мониторинг концентрации ЛС и его метаболитов в модельных и биологических средах. Выбор того или иного метода анализа зачастую является компромиссом между скоростью и простотой пробоподготовки и требуемой селективностью и чувствительностью определения. На данный момент не существует надежного унифицированного метода количественного определения ацетилсалициловой кислоты и ее основного метаболита – салициловой кислоты (СК) в различных объектах.

Основными проблемами при подготовке проб и определении АСК и продуктов его метаболизма является нестабильность АСК, низкая молекулярная масса и высокая полярность определяемых веществ. Для предотвращения гидролиза АСК в образцы добавляют неспецифические ингибиторы холинэстеразы, например, фторид калия [15], снижают pH и температуру проб [16, 17]. Для подготовки проб образцов, содержащих АСК, используют методы осаждения белков [16, 17], жидкостной [18, 19] и твердофазной экстракции [20], а также сочетание этих методов.

Методы количественного определения АСК и СК сводятся в большинстве случаев к ВЭЖХ-детектированию в УФ-области спектра [17, 18]. Однако их отличает низкая степень извлечения определяемых веществ и недостаточная селективность.

Цель настоящей работы состоит в разработке инкапсулированной в полимерные высокопористые микроносители пролонгированной формы АСК с использованием сверхкритического диоксида углерода и последующим изучением методом ВЭЖХ кинетики высвобождения АСК и СК *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

В работе использовали субстанции следующих веществ: ацетилсалициловая кислота («Шандонг Ксинхуа Фармасьютикал Ко. Лтд», Китай); салициловая кислота («Шандонг Ксинхуа Фармасьютикал Ко. Лтд», Китай). Для подготовки и анализа проб

применяли ацетонитрил (для ВЭЖХ), фосфорную кислоту (х. ч.), соляную кислоту (х. ч.), натрия сульфат (х. ч.), натрия хлорид (х. ч.), воду (для хроматографии).

Исходные стандартные растворы АСК и СК готовили растворением навесок субстанций в воде (pH 2,5, регулировали конц. H₃PO₄); рабочие стандартные растворы получали разведением исходных стандартных растворов водой (pH 2,5).

Модельный раствор готовили путем растворения натрия хлорида в воде до получения концентрации 0,9% (масс.). Модельный и стандартные растворы хранили в фармацевтическом холодильнике Pozis XF-400 (Россия) при температуре от 2 до 8 °C.

Образцы плазмы крови кроликов хранили в биомедицинском морозильнике Sanyo MDF-U5412 (Япония) при температуре от –34 до –38 °C. Перед подготовкой образцы размораживали при комнатной температуре.

На основе анализа данных литературы и результатов собственных исследований [13, 21, 22] в качестве наиболее подходящих полимерных кандидатов для инкапсуляции АСК были выбраны аморфные D,L-полилактиды (ПЛИ) и полилактогликолиды (ПЛИГ) (приведенная вязкость 0,2 dl/g) марок PURASORB PDL02 и PDLG7502 («PURAC Biochem bv», Нидерланды). Температуры стеклования этих полимеров лежат в диапазоне 55–60 °C.

Лабораторные животные

В качестве экспериментальных животных использовали кроликов породы «советская шиншилла» массой тела около 2500 г. Животные были получены из питомника ФГУП ОПХ «Манихино». Количество животных было достаточным для формирования репрезентативных экспериментальных групп и последующей статистической обработки полученных результатов. Была также предусмотрена возможность замены и исключения животных из эксперимента в результате форс-мажорных обстоятельств.

Все манипуляции с животными проводили согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986).

Инкапсуляция АСК

Для проведения исследований процессов формирования порошков алифатических полиэфиров, содержащих АСК в различных концентрациях, использовали разработанную в ИПЛИТ РАН установ-

ку [23] для получения полимерных частиц методом PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions). СКФ-инкапсуляцию АСК в полиэфирные микрочастицы методом PGSS, основанного на явлении пластификации (снижения вязкости) полимеров в результате их взаимодействия с sc-CO_2 [11], проводили по следующему алгоритму. Измельченную субстанцию АСК, предварительно перемешанную с измельченным порошком ПЛ или ПЛГ (средний размер частиц 40–80 мкм), загружали в камеру высокого давления объемом 75 см³. Температуру камеры поддерживали в диапазоне 40–50 °С, а температура сопел составляла 70–80 °С. Давление sc-CO_2 варьировалось в диапазоне от 10 до 20 МПа. Содержимое автоклава тщательно перемешивали с помощью магнитного смесителя (150 об/мин). Систему выдерживали в этих условиях в течение 120 минут. За это время происходила полная пластификация полимера и его тщательное перемешивание с АСК. После этого производился импульсно-периодический сброс полученной смеси и диоксида углерода через сопло в приемную камеру атмосферного давления. В экспериментах использовался диоксид углерода (ОСЧ, ГОСТ 8050-85) производства Балашихинского кислородного завода (г. Балашиха, Московская обл.) без какой-либо дополнительной очистки.

После выдержки полученного продукта в атмосферных условиях в течение 3 часов (необходимой для полного удаления CO_2 из частиц полимера и их окончательного затвердевания) проводилось его фракционирование по размерам частиц с помощью калиброванных сит (размер ячеек 200, 160, 100 и 50 мкм) с целью получения полимерных микрочастиц определенной дисперсности, пригодной для создания на их основе компонентов для инъекционных форм АСК пролонгированного действия. Затем частицы помещали в герметичные пластиковые пробирки и хранили при температуре –18 °С до их дальнейшего анализа. Получение контрольных образцов полимерных частиц, не содержащих субстанции АСК, осуществляли в аналогичных условиях.

Морфология поверхности и внутренняя структура мелкодисперсных порошков алифатических полиэфиров и полученных образцов биоактивных полимерных микроносителей исследовалась методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе LEO 1450 (Карл Цейс, Германия).

Исследование кинетики высвобождения АСК и СК из биосовместимых полимерных носителей в модельный раствор и плазму крови проводили на образцах в виде высокопористых мелкодисперсных (характерный размер частиц 20–50 мкм) порошков D,L-полилактида и полилактогликолида, содержащих 10% (масс.) АСК.

Пробоподготовка

Для пробоподготовки применяли мульти-вортекс V32 (Латвия), лабораторную центрифугу MPW-250 (Польша), встряхиватель ЛАБ-ПУ-01 (Россия), лабораторные аналитические весы Vibra-AF-R220CE (Япония), дозаторы переменного объема 0,5–10, 5–50, 20–200 и 100–1000 мкл (Россия).

Плазму крови объемом 500 мкл вносили в микроцентрифужную пробирку вместимостью 2 мл, прибавляли 500 мкл ацетонитрила и 500 мг безводного сульфата натрия. Смесь перемешивали на мульти-вортексе в течение 2 мин и центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 10 мин. 400 мкл надосадочной жидкости переносили в виалу для ВЭЖХ.

Модельный раствор перед хроматографированием фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Хроматографирование

Количественное определение АСК и ее основного метаболита СК проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1200 (США) с УФ-детектором, автосамплером и термостатом колонок.

Хроматографическое разделение проводили в изократическом режиме на колонке Hypersil BDS C18 150×3,0 мм, 5 мкм (США) с предколонкой размером 8×4 мм, заполненной тем же сорбентом. Подвижная фаза – ацетонитрил : вода (рН 2,5, регулировали конц. H_3PO_4) (30 : 70). Подвижную фазу предварительно фильтровали и дегазировали на устройстве для фильтрования под вакуумом. Скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин. Температура термостата колонки – 25 °С. Детектирование проводили при длине волны 230 нм. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Время удерживания АСК – около 4,8 мин, время удерживания СК – около 6,8 мин, продолжительность хроматографирования – 12 мин.

Регистрация и обработка хроматограмм выполнены с помощью программного обеспечения Chem Station (Agilent, США), статистическая обработка результатов – с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2003, $p < 0,5$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Образцы инкапсулированной формы АСК

На рис. 1 приведены результаты СЭМ-анализа полимерных микроструктур, полученных методом PGSS из чистого PDLG7502 при давлении диоксида углерода в камере высокого давления 10 МПа и температуре 50 °С.

Хорошо видно, что каждая отдельно взятая частица полученных мелкодисперсных порошков с характерным размером 20–100 мкм имеет сложную

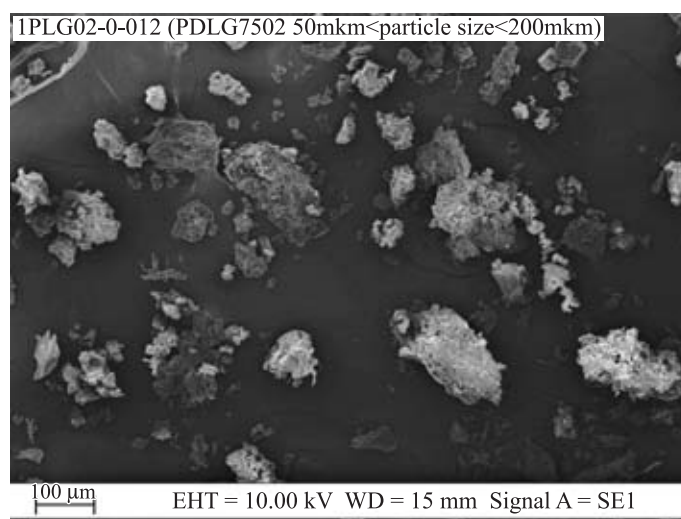


Рис. 1. СЭМ-изображения микрочастиц PDLG7502, полученных методом PGSS

Fig. 1. SEM images of PDLG7502 microparticles obtained by PGSS method

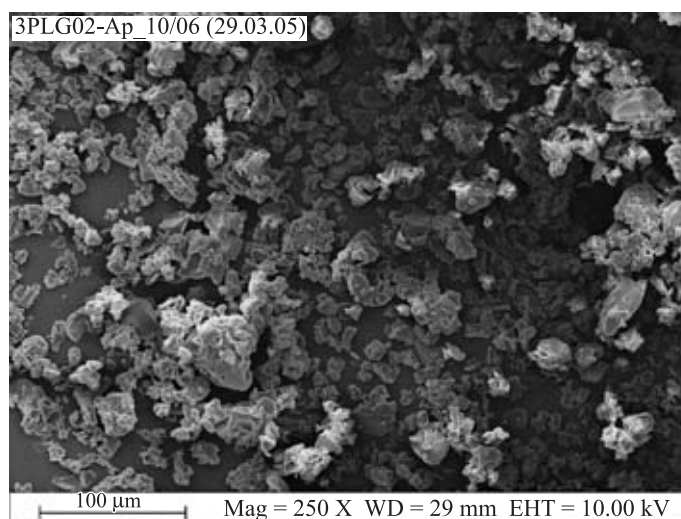


Рис. 2. СЭМ-изображения полученных методом PGSS микрочастиц PDLG7502, содержащих 10 масс.% АСК

Fig. 2. SEM images of PDLG7502 microparticles obtained by PGSS method, containing 10 wt.% ASA

составную структуру микронного масштаба. Это является свидетельством того, что в результате процессов СКФ-пластификации алифатического полиэфира и последующего «вспенивания» при резком сбросе давления CO_2 происходит эффективная микронизация полимера с образованием высокопористых микрочастиц. Важно отметить, что при этом происходит удаление растворимых в ск- CO_2 технологических примесей, а также низкомолекулярных олигомеров лактидов и/или гликолидов.

На рис. 2 показаны характерные СЭМ-изображения двух образцов, содержащих 10 масс.% АСК полимерных микрочастиц, полученных при давлении диоксида углерода в камере высокого давления 10 МПа и температуре 50 °С.

Видно, что в этом случае композитные микрочастицы имеют более плотную структуру. По всей

видимости, АСК оказывает стабилизирующее влияние на процесс СКФ-микронизации полимерной смеси. Подобное влияние ацетилсалициловой кислоты на процесс формирования полиэфирных микрочастиц методом PGSS требует отдельного детального исследования и выходит за рамки настоящей статьи.

В целом схожая картина наблюдалась и при использовании низкомолекулярного полилактида марки PURASORB PDL02 с молекулярной массой ~ 12 кДа.

Пробоподготовка

Для определения оптимального способа подготовки образцов плазмы крови, содержащих АСК и СК, были изучены различные техники пробоподго-

товки (осаждение белков, вымораживание, высаливание, жидкость-жидкостная экстракция и твердо-фазная экстракция).

По совокупности полученных данных был сделан выбор в пользу метода высаливания, показавшего наиболее оптимальные результаты в селективности, простоте, скорости и стоимости подготовки образцов плазмы. Степень извлечения ацетилсалициловой и салициловой кислот из плазмы крови составила 95,8 и 98,1% соответственно.

Хроматографический анализ

Были изучены обращенно-фазовый, ион-парный и нормально-фазовый режимы хроматографирования проб, содержащих АСК и СК. Проведенные эксперименты позволили установить, что наиболее подходящим режимом хроматографирования АСК и СК является обращенно-фазовый режим на колонке Hypersil BDS C18, условия которого были приведены выше. На рис. 3 представлены хроматограммы чистой плазмы и плазмы с добавлением стандартных растворов АСК и СК.

Основные параметры хроматографического анализа на колонке Hypersil BDS C18, характеризующие эффективность и селективность разделения в выбранных условиях, были рассчитаны из хрома-

Таблица

Основные параметры хроматографического анализа плазмы с добавлением стандартных растворов АСК и СК
($C = 20$ мкг/мл, $n = 6$, $p = 0,95$)

Basic parameters of plasma chromatographic analysis with the addition of ASA and SA standard solutions ($C = 20$ μ g/ml, $n = 6$, $p = 0,95$)

Параметр	Найденные значения	
	АСК	СК
Время удерживания, мин	4,83	6,78
Коэффициент емкости	2,0	3,2
Ширина пика на половине высоты, мин	0,29	0,36
Число теоретических тарелок, рассчитанное по ширине половины пика	1539	1966
Высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ), мкм	97,5	76,3
Коэффициент асимметрии пика	1,7	1,6
Коэффициент разделения (селективность)	1,6	
Разрешение	2,3	

тограмм плазмы с добавлением стандартных растворов АСК и СК и представлены в таблице.

Величина разрешения и полученные хроматограммы подтверждают полное разделение пиков АСК и СК до базовой линии, что говорит о высокой

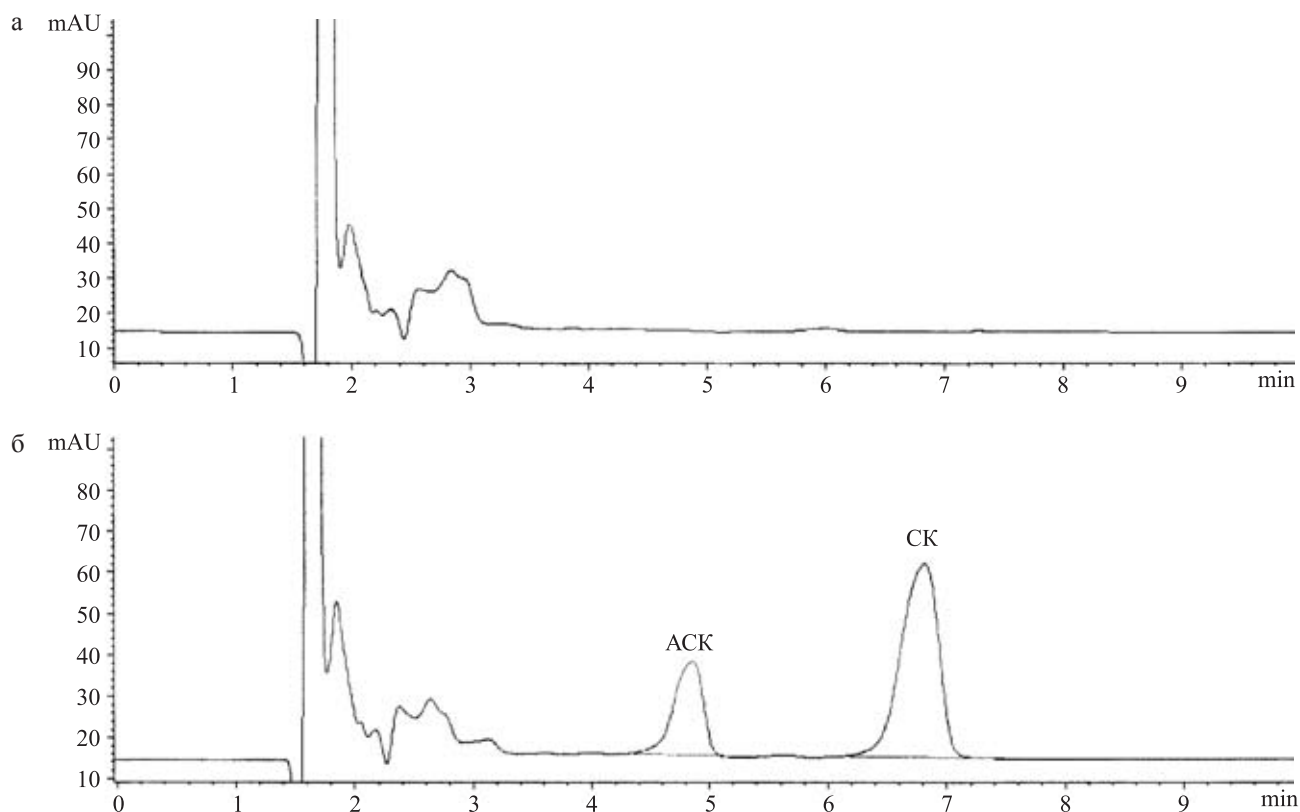


Рис. 3. Хроматограммы чистой плазмы (а) и плазмы с добавлением стандартных растворов АСК и СК (20 мкг/мл) (б)

Fig. 3. Chromatograms of contaminant-free plasma (a) and plasma with the addition of ASA and SA standard solutions (20 μ g/ml) (б)

селективности разработанной хроматографической системы.

Разработанная методика ВЭЖХ была применена для изучения кинетики высвобождения АСК и СК из биосовместимых полимерных носителей в модельный раствор и плазму крови. Количественное определение АСК и СК в модельном растворе и плазме крови проводили методом абсолютной градуировки по графикам, устанавливающим зависимость между концентрацией и площадью пиков определяемых веществ.

Градуировочные зависимости АСК и СК строили в области концентраций 0,05–5,0 мкг/мл для модельного раствора и 0,2–10,0 мкг/мл для плазмы крови. Полученные в этих диапазонах концентраций зависимости имеют линейный характер.

Пределколичественного определения (ПКО) АСК и СК определяли на основании данных линейности градуировочной зависимости как минимальную концентрацию, для которой величина относительного стандартного отклонения не превышает 20% [21, 22]. ПКО ацетилсалициловой и салициловой кислот в модельном растворе составил 0,05 мкг/мл, в плазме крови – 0,2 мкг/мл.

Исследование кинетики высвобождения АСК из биосовместимых полимерных носителей в модельный раствор

На модельном растворе была изучена кинетика высвобождения АСК из биосовместимых полимерных частиц с целью выбора оптимального носителя.

Для устранения мешающего влияния АСК, адсорбированной на поверхности частиц носителя, 100 мг полимера, содержащего 10% (масс.) инкапсулированной АСК, помещали в 100 мл модельного раствора и встряхивали в течение 5 минут. Затем раствор отстаивали 10 мин, повторно встряхивали в течение 5 минут и фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Промытые частицы препарата вместе с фильтром помещали в емкость с 400 мл модельного раствора, термостатированную при 37 °С. Через 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 12; 24 ч отбирали пробы объемом 0,5 мл, которые фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм и хроматографировали.

Результаты изучения кинетики высвобождения АСК из D,L-полилактида PURASORB PDL02 и полилактогликолида PURASORB PDLG02 представлены на рис. 4.

Высвобождение АСК из частиц полилактида и полилактогликолида протекает по одному механизму. В течение 4 ч после начала экстракции происходит активное выделение АСК из полимерных микрочастиц, причем наибольшее увеличение кон-

центрации АСК происходит в первые 30 мин. Через 4 ч после начала экстракции начинается постепенное снижение концентрации АСК в модельном растворе, что объясняется гидролизом АСК с образованием салициловой кислоты (рис. 4, б).

Количество АСК, высвободившейся из D,L-полилактида PURASORB PDL02 в течение первых 4 ч, примерно на 25% превышает массу АСК, выделившейся из полилактогликолида PURASORB PDLG02, что может служить обоснованием полилактогликолида PDLG7502 в качестве носителя для создания пролонгированной формы АСК. В связи с этим фармакокинетические исследования были проведены только для АСК, инкапсулированной в микрочастицы из полилактогликолида.

Изучение фармакокинетики АСК, инкапсулированной в биосовместимый полимерный носитель

Анализ кинетики высвобождения АСК из порошка полилактогликолида PURASORB PDLG02 в кровь проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии по следующему алгоритму.

Для проведения исследования случайным образом была сформирована группа экспериментальных животных в количестве 3 шт. В группу отбирали кроликов без признаков отклонений внешнего вида, так чтобы индивидуальное значение массы тела каждого животного не отличалось от среднего более чем на 10%.

Аморфный полилактогликоolid PURASORB PDLG02, содержащий 10% (масс.) АСК, имплантировали в бедренную мышцу кроликов в дозе 10 мг АСК/кг. Образцы крови отбирали до имплантации препарата, а также через 0,5; 1; 6; 12; 24; 30; 48 ч после имплантации. Объем отбираемых образцов крови был достаточен для получения 0,5 мл плазмы. В полученных образцах плазмы определяли содержание АСК и СК.

Результаты изучения фармакокинетики АСК представлены на рис. 5.

Концентрация АСК в плазме крови возрастает в течение первых 6 часов, держится на одном уровне до 24 часов и плавно снижается до незначительных значений. Содержание СК в плазме достигает максимума через 1 ч после введения АСК в мышцу, после чего уменьшается в течение 24 ч до следовых количеств.

Полученные результаты свидетельствуют о постепенном высвобождении АСК в течение 24 ч после внутримышечной имплантации АСК, инкапсулированной в высокопористый полимерный носитель.

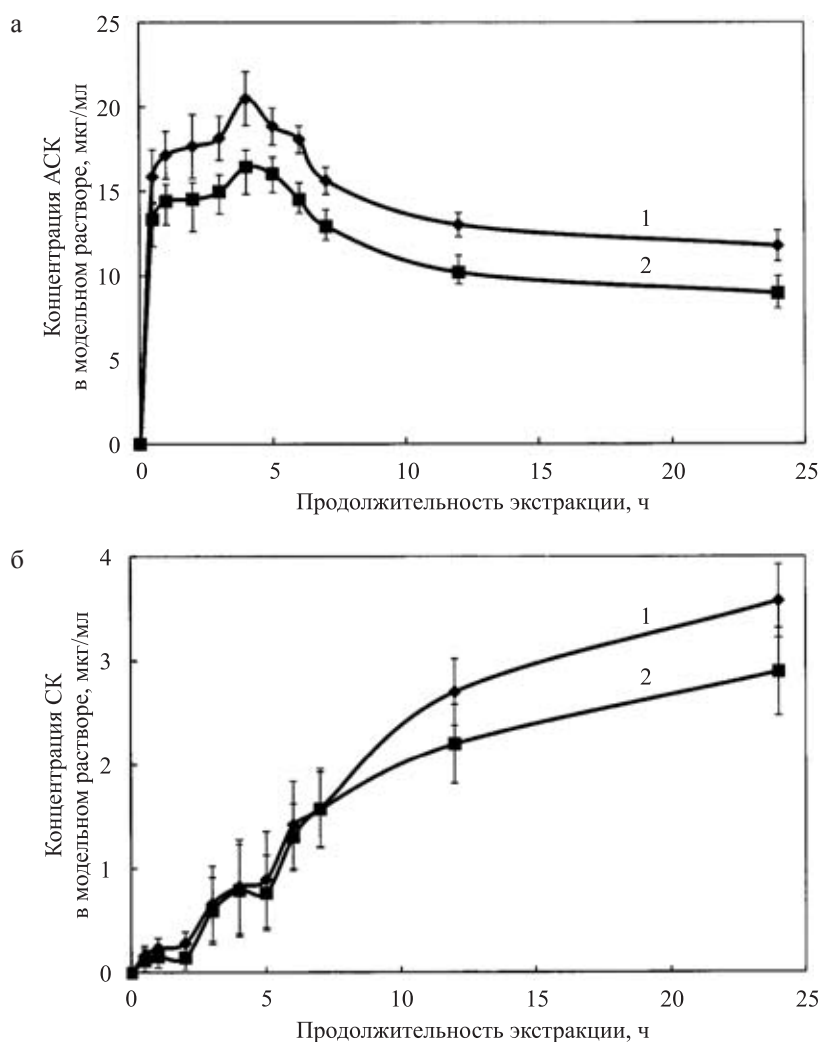


Рис. 4. Кинетика высвобождения АСК (а) и образования СК (б) из аморфного D,L-полилактида PURASORB PDL02 (1) и аморфного полилактогликолида PURASORB PDLG02 (2), содержащих 10% (масс.) АСК (n = 3)

Fig. 4. ASA release kinetics (a) and SA formation (b) from amorphous D,L-poly(lactide) PURASORB PDL02 (1) and amorphous poly(lactoglycolide) PURASORB PDLG02 (2) containing 10 wt.% ASA (n = 3)

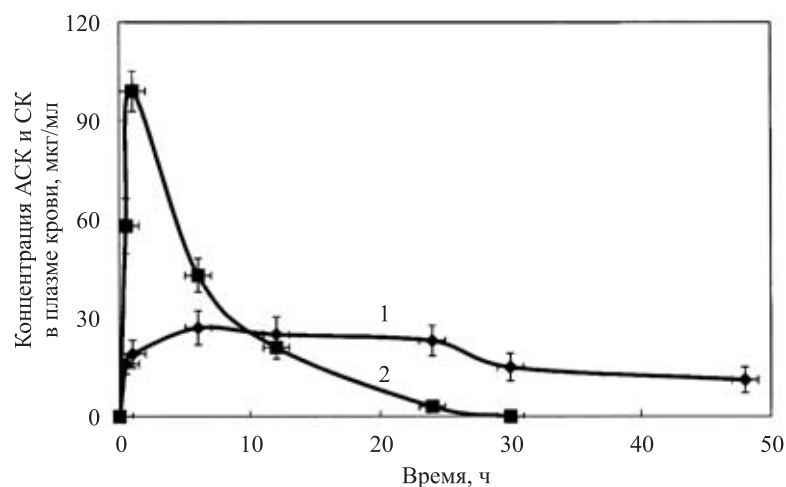


Рис. 5. Усредненные фармакокинетические кривые АСК (1) и СК (2) после однократной внутримышечной имплантации кроликам АСК в аморфном полилактогликолиде PURASORB PDLG02 в дозе 10 мг/кг (n = 3)

Fig. 5. Averaged pharmacokinetic curves for ASA (1) and SA (2) after single intramuscular implantation of ASA to rabbits in amorphous poly(lactoglycolide) PURASORB PDLG02 at the dose of 10 mg/kg (n = 3)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработана методика количественного определения ацетилсалициловой и салициловой кислот в модельном растворе и плазме крови методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Аналитический диапазон методики без учета разбавления составил 0,05–5,0 мкг/мл для модельного раствора и 0,2–10,0 мкг/мл для плазмы крови; степень извлечения ацетилсалициловой и салициловой кислот из плазмы крови – 95,8 и 98,1% соответственно.

Наиболее оптимальным с точки зрения морфологических и физико-химических характеристик микрочастиц алифатических полиэфиров, содержащих терапевтически значимые концентрации АСК, получаемых методом PGSS, является полилактогликолид марки PURASORB PDLG7502, а полученные на его основе экспериментальные образцы мелкодисперсных порошков, содержащие 10 масс.% АСК, могут служить прототипами для разработки и создания на их основе пролонгированной формы ацетилсалициловой кислоты.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-02-12215).

Авторы выражают благодарность Л.И. Кротовой за проведение СЭМ-анализа образцов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Машковский МД. Лекарственные средства. М.: Медицина, 2012. *Mashkovskiy MD. Lekarstvennye sredstva. M.: Medizina, 2012.*
2. Скворцова ВИ, Чазова ИЕ, Стаховская ЛВ. Вторичная профилактика инсульта. М.: Медицина, 2006; 120. *Skvortsova VI, Chasova IE, Stakhovskaya LV. Vtorichnaya profilaktika insulta. M.: Medizina, 2006; 120.*
3. Бокарев ИН, Щепотин ВМ, Ена ЯМ. Внутрисосудистое свертывание крови. Киев: Здоровье, 1989; 240. *Bokarev IN, Schepotin VM, Ena YaM. Vnutrisosudistoye svertyvaniye krovi. Kiev: Zdorovie, 1989; 240.*
4. Панченко ЕП. Роль антитромботической терапии в профилактике ишемического инсульта. *Русский медицинский журнал*. 2002; 10: 33–37. *Panchevko EP. Rol' antitromboticheskoy terapii v prophylaktike ishemi-cheskogo insulta. Russkij meditsinskij zhurnal. 2002; 10: 33–37.*
5. Алехин ЕК. Аспирин: новая жизнь старого лекарства. *Соровский образовательный журнал*. 1999; 10: 3–5. *Alekhin EK. Aspirin: novaya zhizn starogo lekarstva. Sorovskiy obrazovatelnyy zhurnal. 1999; 10: 3–5.*
6. Метелица ВИ. Справочник по клинической фармакологии сердечно-сосудистых лекарственных средств. СПб.: Бином, 2002; 926. *Metelitsa VI. Spravochnik po klinicheskoy farmakologii lekarstvennykh sredstv. St-P.: Binom, 2002; 926.*
7. Li X, Justi BR. Design of Controlled Release Drug Delivery Systems. New York: McGraw-Hill, 2006; 437.
8. Тихобаева АА, Саломатина ЛА, Севастьянов ВИ. Имплантируемая система доставки аспирина на основе бактериального биodeградируемого полимера поли-β-оксибутирата. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2001; III (1): 42–44. *Tichobaeva AA, Salomatina LA, Sevastianov VI. et. al. Implantable system of aspirin delivery on the base of bacterial biodegradable polymer of poly-β-hydroxybutyrate. Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov = Russian journal of transplantology and artificial organs. 2001; 1: 42–44. [English abstract].*
9. Полухина ОС, Басок ЮБ, Саломатина ЛА, Севастьянов ВИ. Экспериментальное исследование фармакокинетики ацетилсалициловой кислоты при трансдермальном способе введения. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009; 3: 29–32. *Polukhina OS, Basok YuB, Salomatina LA, Sevast'yanov VI. Experimental study of the pharmacokinetics of acetylsalicylic acid upon transdermal administration. Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya. 2009; 3: 29–32.*
10. Биосовместимые материалы. Под ред. Севастьянова ВИ. и Кирпичникова МП. М.: МИА, 2011; 544. *Bio-compatible materials (textbook). Ed. by: Sevastianov VI, Kirpichnikov MP. Moscow: MIA, 2011; 544.*
11. Pasquali I, Bettini R. Are pharmaceuticals really going supercritical? *Int. J. Pharm.* 2008; 364: 176–187.
12. Гумеров ФМ, Сабирзянов АН, Гумерова ГИ. Суб- и сверхкритические флюиды в процессах переработки полимеров. Казань: Фэн, 2000; 320. *Gumerov FM, Sabirzyanov AN, Gumerova GI. Sub- i sverkhkriticheskie flyudy v protsesakh pererabotki polimerov. Kazan': Fen, 2000; 320.*
13. Tai H, Popov VK, Shakesheff KM, Howdle SM. Putting the fizz into chemistry: applications of supercritical carbon dioxide in tissue engineering, drug delivery and synthesis of novel block copolymers. *Biochemical Society Transactions*. 2007; 35: 516–521.
14. Воложин АИ, Караков АГ, Суханов ЮП, Шехтер АБ, Попов ВК, Антонов ЕН, Карротт М. Тканевая реакция на акриловые пластмассы, модифицированные сверхкритической экстракцией двуокисью углерода. *Стоматология*. 1998; 77 (4): 4–8. *Volozhin AI, Karakov AG, Sykhanov YuP, Shekhter AB, Popov VK, Antonov EN, Karrot M. Tkanevaya reaktsiya na akrilovye plastmassy, modifitsirovannyye sverkhkriticheskoy ekstraktsiej dvuokisi ugleroda. Stomatologiya. 1998; 77 (4): 4–8.*
15. Xu X, Koetzner L, Boulet J. et al. Rapid and sensitive determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 2009; 23 (9): 973–979.
16. Liu JH, Smith PC. Direct analysis of salicylic acid, salicyl acyl glucuronide, salicyluric acid and gentisic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 1996; 675 (1): 61–70.

17. Kees F, Jehnich D, Grobecker H. Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 1996; 677 (1): 172–177.
18. Gaspari F, Locatelli M. Determination of aspirin and salicylic acid in uremic patients' plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Ther. Drug. Monit.* 1987; 9 (2): 243–247.
19. Mays DC, Sharp DE, Beach CA et al. Improved method for the determination of aspirin and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography: applications to human and animal studies. *J. Chromatogr.* 1984; 311 (2): 301–309.
20. McMahon GP, Kelly MT. Determination of aspirin and salicylic acid in human plasma by column-switching liquid chromatography using on-line solid-phase extraction. *Anal. Chem.* 1998; 70 (2): 409–414.
21. Kolotova ES, Egorova SG, Ramonova AA, Bogorodskij SE, Popov VK, Agapov II, Kirpichnikov MP. Cytotoxic and immunochemical properties of viscumin encapsulated in polylactide microparticles. *Acta Naturae.* 2012; 4 (1): 105–110.
22. Bogorodskij SE, Krotova LI, Kursakov SV, Minaeva SA, Popov VK, Sevast'yanov VI. Supercritical fluid encapsulation of acizol into aliphatic polyether microparticles. *Russian Journal of Physical Chemistry B.* 2015; 9 (7): 1011–1017.
23. Антонов ЕН, Богородский СЭ, Фельдман БМ, Марквичева ЕА, Румш ЛД, Попов ВК. Получение биodeградируемых микрочастиц с биоактивными компонентами с помощью сверхкритического диоксида углерода. *Сверхкритические флюиды: теория и практика.* 2008; 3: 34–42. Antonov EN, Bogorodskij SE, Feldman BM, Markvicheva EA, Rumsh LD, Popov VK. Obtaining biodegradable microparticles with bioactive components by using supercritical carbon dioxide. *Sverkhkriticheskie flyuidy: teoriya i praktika.* 2008; 3: 34–42.

Статья поступила в редакцию 14.01.2016 г.
The article was submitted to the journal on 14.01.2016