

УДК 547.458.2: 544.35

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АТОРВАСТАТИНА С ТРИТЕРПЕНОВЫМ ГЛИКОЗИДОМ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ЯМР РЕЛАКСАЦИИ В РАСТВОРАХ

Шлотгауэр А.А.

*Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН,  
Новосибирск, e-mail: schlotgauer\_a@mail.ru*

Глицирризиновая кислота (ГК) – природный тритерпеновый гликозид, добываемый из корня солодки, образует стабильные супрамолекулярные агрегаты с широким рядом малорастворимых лекарственных соединений. В настоящее время такие агрегаты лекарств с водорастворимыми макромолекулами или молекулярными самоассоциатами широко используются в медицинской химии и фармакологии для повышения растворимости и биодоступности липофильных лекарственных соединений. В настоящей работе исследовано взаимодействие аторвастатина (АТС) – одного из лидеров мирового рынка среди антигиперлипидемических препаратов, с глицирризиновой кислотой методом динамического ЯМР. Обнаружено, что кальциевая соль аторвастатина вступает в реакцию обмена с глицирризиновой кислотой с образованием нерастворимой кальциевой соли ГК и кислотной формы аторвастатина. Исследование методом динамического ЯМР показало, что кислотная форма АТС образует ассоциаты с глицирризиновой кислотой.

**Ключевые слова:** аторвастатин, глицирризиновая кислота, динамический ЯМР, ассоциаты

## STUDY OF ATORVASTATIN INTERACTION WITH TRITERPENE GLYCOSIDE GLYCYRRHIZIC ACID BY NMR RELAXATION TECHNIQUE IN SOLUTION

Shlotgauer A.A.

*Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS,  
Novosibirsk, e-mail: schlotgauer\_a@mail.ru*

Glycyrrhizic acid (GA) – a natural triterpene glycoside extracted from licorice root, forms stable supramolecular aggregates with a wide range of low soluble drug compounds. Currently, such aggregates of drugs with water-soluble macromolecules or molecular self-associates are widely used in medicinal chemistry and pharmacology to increase solubility and bioavailability of lipophilic medicinal compounds. In this paper we investigate the interaction of atorvastatin (ATS) – one of the world leaders of antihyperlipidemic drugs with glycyrrhizic acid by dynamic NMR. It has been found that calcium salt of atorvastatin reacts with glycyrrhizic acid to form insoluble calcium salts of GA and acid form of atorvastatin. The dynamic NMR study has shown that the acid form of ATS forms associates with glycyrrhizic acid.

**Keywords:** atorvastatin, glycyrrhizic acid, dynamic NMR spectroscopy, associates

В настоящее время ингибиторы 3-гидрокси-3-метил-глутарил-СоА редуктазы (ГМГ-СоА), так называемые статины, наиболее эффективны в отношении снижения уровня холестерина в крови и смертности от атеросклероза и ишемической болезни сердца [12]. Однако у большинства статинов эффективная терапевтическая суточная доза, равная 20-80 мг, обуславливает возникновение нежелательных побочных эффектов – гепатотоксичности, миалгии, миопатии и рабдомиолиза [10]. Учитывая то, что применение статинов является пожизненным, риск развития нежелательных побочных осложнений существенно возрастает. Поэтому поиск новых статинов с более низкой суточной дозой, более безопасных и эффективных в отношении снижения уровня атерогенного холестерина остается актуальной проблемой медицинской химии и фармакологии.

Одним из современных подходов к созданию новых лекарственных соединений является использование известных фармакологических субстанций в виде комплексов с природными комплексонами, в частности, с глицирризиновой кислотой (ГК).

Помимо сообщений о собственной биологической активности ГК [2, 3, 6] к настоящему времени накоплено большое количество экспериментальных данных о способности ГК усиливать биодоступность других лекарственных препаратов при совместном применении [9, 13]. Наряду с увеличением растворимости многих гидрофобных лекарственных соединений в присутствии ГК наблюдается значительное усиление эффективности, а в некоторых случаях и изменение механизма терапевтического действия [11, 14]. Так, ранее было продемонстрировано усиление лекарственного эффекта бутадииона, индометацина, нифедипина и ряда других лекарств при использовании их в комплексах с ГК [4, 9, 13]. Что касается статинов, к настоящему времени получен и исследован только комплекс ГК с симвастатином [11, 14]. Создано новое комплексное соединение симвастатина с глицирризиновой кислотой – симваглизин, для которого характерно снижение терапевтической дозы в несколько раз, что указывает на большую безопасность симваглизина в сравнении с симвастатином.

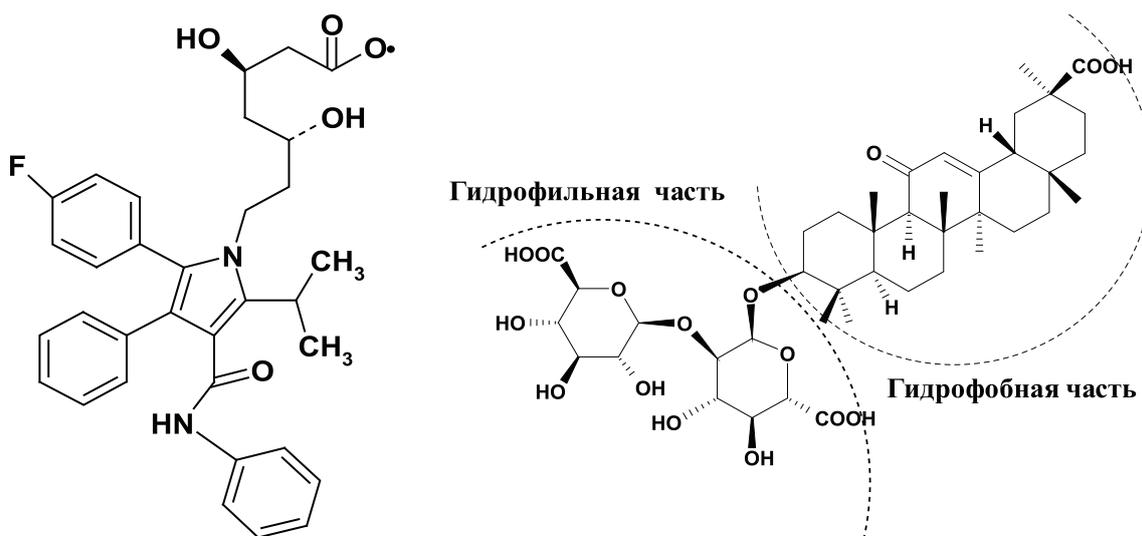


Рис. 1. Структурные формулы аторвастатина и глицирризиновой кислоты

**Целью** настоящей работы является исследование возможностей ассоциации другого холестеринснижающего препарата – аторвастатина (АТС) с глицирризиновой кислотой методом ЯМР-релаксации. Данный метод основан на высокой чувствительности времени спин-решеточной  $T_1$  и спин-спиновой  $T_2$  релаксации к межмолекулярному взаимодействию и к диффузионной подвижности молекул [5]. Образование ассоциатов (комплексов включения, мицелл и т.д.) приводит к существенному сокращению времен релаксации протонов из-за изменения времен вращательной корреляции молекул  $\tau_c$  в ассоциате. В свою очередь,  $\tau_c$  в соответствии с известным соотношением Стокса–Эйнштейна–Дебая:  $\tau_c = 4\pi a^3 \eta / 3kT$ , зависит от радиуса молекулы ( $a$ ) и вязкости среды ( $\eta$ ). Включение молекулы в состав ассоциата (комплекс, мицелла) может привести к изменению обоих параметров. Особенно перспективным применение метода ЯМР-релаксации считается в случае, когда, как в исследуемой системе, различие химических сдвигов ассоциированной и свободной молекул минимально [5].

#### Материалы и методы исследования

Глицирризиновая кислота получается экстракцией из корня солодки уральской, как описано в [7]. Комплексы готовились путем смешения метанольных растворов ГК и АТС с водой в объемном соотношении 1:4, а также в буферном растворе (5 мМ HEPES в  $D_2O$ ). Варьирование кислотности раствора производилось добавкой DCl или KOD в буферный раствор. Дейтерированные растворители для записи спектров ЯМР: метанол  $CD_3OD$  (99,7% D, Sigma-Aldrich), вода  $D_2O$  (99,9% D, Aldrich); и аторвастатин – (R(R\*R\*))–2-(4-фторфенил)- $\beta$ -, $\Delta$ -дигидрокси-5-(1-метилэтил)-3-фенил-4-((фениламино)карбонил)-1H-

пиррол-1-гептановой кислоты кальциевая соль (USP) использовались без дополнительной очистки.

$^1H$  ЯМР-спектры в растворах регистрировались на спектрометре фирмы «Брукер» DPX-200 на частоте 200 МГц. Измерение времен фазовой релаксации  $T_2$  проводилось с использованием стандартной последовательности Карра–Парселла–Мейбума–Гилла (КПМГ) вида:  $P1(90^\circ) - (\tau - P2(180^\circ) - \tau)_n$  – регистрация, где  $\tau = 0,6$  ms – фиксированная временная задержка, а  $n$  варьировалась от 0 до 2048.

Временные зависимости скоростей релаксации в системах, где в растворе имеются свободные молекулы, а также включенные в состав ассоциатов, как правило, описываются одной или двумя экспонентами [5].

В случае медленного обмена между молекулами, находящимися внутри ассоциата и вне его, в эксперименте наблюдается биэкспоненциальная кинетика спада сигнала эха,

$$A(t) = P_1 \cdot \exp(-t/T_{21}) + P_2 \cdot \exp(-t/T_{22}),$$

где  $T_{21}$  и  $T_{22}$  соответствуют временам релаксации молекул гостя в связанном и свободном состоянии. Быстрая компонента  $P_1$  соответствует доле молекул, находящихся в ассоциате, а медленная  $P_2$  – доле молекул в растворе. Такая картина обычно наблюдается для комплексов гидрофобных молекул. В ситуации, когда молекулы в ассоциате и в растворе находятся в состоянии быстрого обмена (по сравнению со временем релаксации), изменение сигнала ЯМР при варьировании задержки между импульсами описывается моноэкспоненциальным законом. В этих условиях наблюдаемая величина времени релаксации является суперпозицией величин  $T_{21}$  и  $T_{22}$ .

$$1/T_{obs} = P_1/T_{21} + (1 - P_1)/T_{22}.$$

#### Результаты исследования и их обсуждение

Добавление водно-спиртового раствора глицирризиновой кислоты к спиртовому раствору аторвастатина приводит к выпадению осадка и уменьшению интенсивности линий статина в ЯМР спектре (рис. 2).

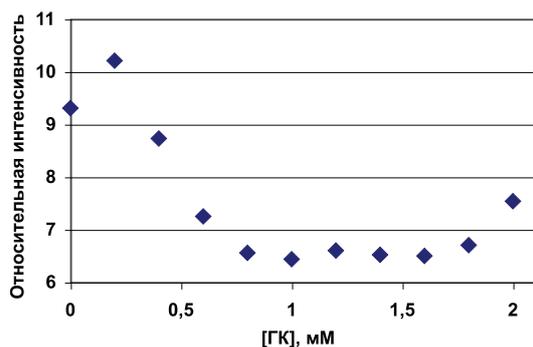


Рис. 2. Изменение растворимости АТС (в относительных единицах) в водном растворе (рН = 4,6), содержащем 20% метанола, в зависимости от концентрации ГК. Относительная концентрация АТС в данном эксперименте определялась по интегральной интенсивности ароматических протонов аторвастатина. Исходная концентрация АТС составляла 0,5 мМ. Погрешность приведенных данных составляет 0,5 в относительных единицах

С другой стороны, обнаружено также уменьшение интенсивности линий протонов ГК в присутствии АТС. Объяснить уменьшение концентрации обоих реагентов, АТС и ГК, при их смешении можно, если предположить, что между АТС и ГК происходит реакция обмена. Продуктами реакции обмена между кальциевой солью АТС и кислотой (ГК) должны быть свободная кислота АТС и кальциевая соль ГК. При этом известно, что кислота АТС и кальциевая соль ГК имеют худшую растворимость, чем кальциевая соль АТС и свободная глицирризиновая кислота. Кроме того, согласно [8], анионная форма ГК не образует ассоциатов. Судя по уменьшению относительной интенсивности ароматических протонов АТС (рис. 2), его концентрация в растворе уменьшилась как минимум на 30% (0,15 мМ). Таким образом, необходимо принимать во внимание, что из-за реакции обмена анионом кальция с АТС, реальные концентрации ГК также меньше исходных, которые приведены на рисунках, по крайней мере, на 0,15 мМ.

Для того чтобы проверить возможность ассоциации свободной кислоты АТС с ГК, нами были измерены времена спин-спиновой релаксации протонов АТС в водно-спиртовом растворе в отсутствие и в присутствии ГК в различных концентрациях (рис. 3).

На рис. 4 представлена зависимость скорости релаксации ароматических протонов АТС от концентрации ГК.

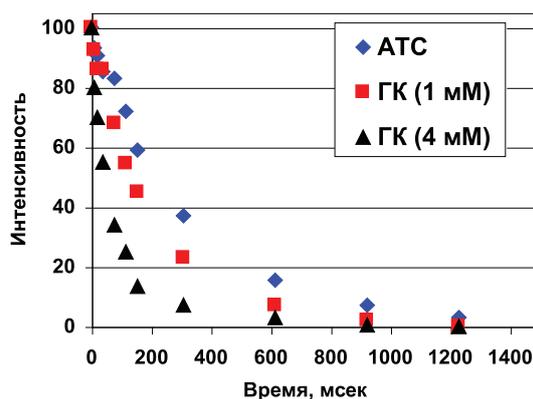


Рис. 3. Кинетика спада сигнала ЯМР в эксперименте КПМГ. Измерение времени релаксации проводилось для ароматических протонов АТС при исходной концентрации АТС 0,5 мМ и нескольких концентрациях ГК в 20% водно-метанольном растворе (рН = 4,6)

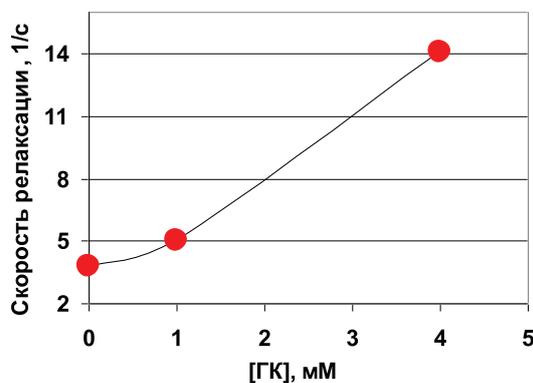


Рис. 4. Зависимость скорости релаксации ароматических протонов АТС от концентрации ГК в водно-метанольном растворе при рН 4,75. Погрешность расчета скорости релаксации составляет 10%

Прогрессивное значительное увеличение скорости релаксации протонов АТС с ростом концентрации ГК в растворе указывает на ассоциацию статина с ГК. При этом временная зависимость сигнала ЯМР чистого АТС ( $T_2 = 325 \pm 27$  мс) и АТС в присутствии 1 мМ ГК, ( $T_2 = 201 \pm 11$  мс) описываются моноэкспонентой, тогда как кривая, записанная для 4 мМ ГК, демонстрирует биэкспоненциальную зависимость с  $T_{21} = 7,4 \pm 5,5$  и  $T_{22} = 84,3 \pm 7,5$  мс. Таким образом, судя по временам релаксации в присутствии 4 мМ ГК наблюдается медленный обмен между двумя типами ассоциатов. Необходимо отметить, что для водно-спиртовых растворов ГК с помощью двух независимых методов: динамического ЯМР и гельпроникающей хроматографии, обнаружено существование мицелл [1, 8]. Поскольку мицеллообразование ГК начинает-

ся уже с концентрации 0,5 мМ [8], резонно предположить, что наблюдаемые при 4 мМ ассоциаты АТС с ГК – это два типа мицелл. При этом время  $T_{21} = 7,4 \pm 5,5$  близко ко времени релаксации самой ГК, находящейся в составе мицеллы ( $T_2(\text{ГК}) = 9,7 \pm 4$  мс [8]). Такая близость времён релаксации характерна для ассоциатов, в которых гость и хозяин вращаются как одно целое. Что касается укорочения времени релаксации АТС примерно на 40%, происходящего в присутствии 1 мМ ГК, то это, скорее всего, результат включения АТС в состав более мелких самоассоциатов ГК (димеры, тетрамеры), описанных в литературе [9].

### Заключение

Таким образом, в настоящей работе исследована ассоциация аторвастатина – одного из лидеров мирового рынка среди антигиперлипидемических препаратов – с глицирризиновой кислотой. Обнаружено, что кальциевая соль аторвастатина вступает в реакцию обмена с глицирризиновой кислотой с образованием нерастворимой кальциевой соли ГК и кислотной формы аторвастатина. Кислотная форма АТС образует ассоциаты с ГК.

### Список литературы

1. Комплексирование фармаконов с глицирризиновой кислотой – путь создания лекарственных препаратов повышенной эффективности / А.В. Душкин, Е.С. Метелева, Т.Г. Толстикова, М.В. Хвостов, М.П. Долгих, Г.А. Толстикова // *Химия в интересах устойчивого развития*. – 2010. – Т.18. – № 4. – С. 517–525.
2. Солодка: биоразнообразие, химия и применение в медицине / Г.А. Толстикова, Л.А. Балтина, Р.М. Кондратенко и др. – Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2007.
3. Толстикова Г.А., Балтина Л.А., Шульц Э.Э., Покровский А.Г. // *Биоорганическая химия*. – 1997. – № 23. – С. 691–703.
4. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Брызгалов А.О., Долгих М.П., Лифшиц Г.И., Хвостов М.В. // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. – 2006. – № 1. – С. 55–58.
5. Fielding L. Determination of association constants from solution NMR data // *Tetrahedron*. – 2000. – № 56. – С. 6151–6170.
6. Hibasami H., Iwase H., Yoshioka K., Takahashi H. // *Int. J. Mol. Med.* – 2006. – Vol. 17. – P. 215–219.
7. Kondratenko R.M., Baltina L.A., Mustafina S.R., Makarova N.V., Nasyrov Kh.M., Tolstikov G.A. Crystalline glycyrrhizic acid synthesized from commercial glycyrram. Immunomodulant properties of high-purity glycyrrhizic acid // *Pharm. Chem. J.* – 2001. – № 35. – P. 101–104.
8. Kornievskaya V.S., Kruppa A.I., Polyakov N.E., Leshina T.V. Effect of glycyrrhizic acid on lappaconitine phototransformation // *J. Phys. Chem. B.* – 2007. – № 111. – P. 11447–11452.
9. Polyakov N.E. and Leshina T.V. Glycyrrhizic Acid as a Novel Drug Delivery Vector. Synergy of Drug Transport and Efficacy // *The Open Conf. Proc. J.* – 2011. – № 2. – P. 64–72.
10. Puddu P., Puddu G.M., Muscari A. // *Acta Cardiol.* – 2001. – № 56. – P. 225–231.
11. Ragino Yu.I., Vavilin V.A., Salakhutdinov N.F., Makarova S.I., Stakhneva E.M., Safronova O.G., Nikitin Yu.P., Tolstikov G.A. Antioxidant and endothelium-stabilizing effects of simvastatin on rabbits with experimental hypercholesterolemia // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2008. – № 145. – P. 285–287.
12. Sheffield M. C. Multiple Effects of Statins in Nonlipid Disease States // *U.S. Pharm.* – 2004. – № 6. – P. 38–54.
13. Tolstikova T.G., Khvostov M.V. and Bryzgalov A.O. // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. – 2009. – Vol. 9. – P. 1317–1328.
14. Vavilin V.A., Salakhutdinov N.F., Ragino Yu.I., Polyakov N.E., Taraban M.B., Leshina T.V., Stakhneva E.M., Lyakhovich V.V., Nikitin Yu.P., Tolstikov G.A. Hypocholesteremic properties of complex compound of simvastatin with glycyrrhizic acid (simvastatin) in experimental models. // *Biomed. Chem.* – 2008. – № 54. – P. 301–313.

### References

1. Dushkin A.V., Meteleva E.S., Tolstikova T.G., Khvostov M.V., Dolgikh M.P., Tolstikov G.A. Integration of Farmakon with glycyrrhizic acid a way of creating drugs increased efficiency // *Chemistry for Sustainable Development*. 2010. T.18. no. 4. pp. 517–525.
2. Tolstikov G.A., Baltina L.A., Kondratenko P.M., e.a. Licorice: biodiversity, chemistry and application in medicine // *Novosibirsk: Academic Publishing House «Geo»*. 2007.
3. Tolstikov G.A., Baltina L.A., Schulz E.E., Pokrovsky A.G. // *Bioorganic Chemistry*. -1997. 23. pp. 691–703.
4. Tolstikova T.G., Sorokina I.V., Bryzgalov A.O., Dolgikh M.P., Lifshitz G.I., Khvostov M.V. // *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2006. 1. pp. 55–58.
5. Fielding L. Determination of association constants from solution NMR data // *Tetrahedron*. 2000. 56. pp. 6151–6170.
6. Hibasami, H., Iwase, H., Yoshioka, K., Takahashi, H. // *Int. J. Mol. Med.* 2006. Vol. 17. pp. 215–219.
7. Kondratenko R.M., Baltina L.A., Mustafina S.R., Makarova N.V., Nasyrov Kh.M., Tolstikov G.A.. Crystalline glycyrrhizic acid synthesized from commercial glycyrram. Immunomodulant properties of high-purity glycyrrhizic acid // *Pharm. Chem. J.* 2001. 35. pp. 101–104.
8. Kornievskaya V.S., Kruppa A.I., Polyakov N.E., Leshina T.V. Effect of glycyrrhizic acid on lappaconitine phototransformation // *J. Phys. Chem. B.* 2007. 111. pp. 11447–11452.
9. Polyakov N. E. and Leshina T. V. Glycyrrhizic Acid as a Novel Drug Delivery Vector. Synergy of Drug Transport and Efficacy // *The Open Conf. Proc. J.* 2011. 2. pp. 64–72.
10. Puddu P., Puddu G.M., Muscari A. // *Acta Cardiol.* 2001. 56. pp. 225–231.
11. Ragino Yu.I., Vavilin V.A., Salakhutdinov N.F., Makarova S.I., Stakhneva E.M., Safronova O.G., Nikitin Yu.P., Tolstikov G.A. Antioxidant and endothelium-stabilizing effects of simvastatin on rabbits with experimental hypercholesterolemia // *Bull. Exp. Biol. Med.* -2008. 145. pp. 285–287.
12. Sheffield M. C. Multiple Effects of Statins in Nonlipid Disease States. // *U.S. Pharm.* 2004. 6. pp. 38–54.
13. Tolstikova T.G., Khvostov M.V. and Bryzgalov A.O. // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2009. Vol. 9. P. 1317–1328.
14. Vavilin V.A., Salakhutdinov N.F., Ragino Yu.I., Polyakov N.E., Taraban M.B., Leshina T.V., Stakhneva E.M., Lyakhovich V.V., Nikitin Yu.P., Tolstikov G.A. Hypocholesteremic properties of complex compound of simvastatin with glycyrrhizic acid (simvastatin) in experimental models. // *Biomed. Chem.* 2008. 54. pp. 301–313.

### Рецензенты:

Душкин А.В., д.х.н., руководитель группы механохимии органических соединений Института химии твердого тела и механохимии СО РАН, г. Новосибирск;

Верещагин Е.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии Новосибирского государственного медицинского университета, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 15.08.2013.