

DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-8-50-54
© Коллектив авторов, 2021

Т. В. Крюк*, Т. Г. Тюрина, Т. А. Кудрявцева

КОНЬЮГАТ НАТРИЯ ЦЕФОТАКСИМА С КАРТОФЕЛЬНЫМ КРАХМАЛОМ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО СРЕДСТВА

ГУ "Институт физико-органической химии и углехимии имени Л. М. Литвиненко", 83114, Донецк, ул. Р. Люксембург, 70.

* e-mail: ktvl2010@mail.ru

Получена матричная форма натрия цефотаксима, в которой полимерной основой является продукт периодатного окисления картофельного крахмала (содержание звеньев с группой СНО 68 мол. и %). Образование конъюгата подтверждено данными ИК- и УФ-спектроскопии. С помощью ^1H ЯМР-спектроскопии установлено, что степень конъюгации составляет 30 мол. %. Высвобождение антибиотика из синтезированного конъюгата в результате расщепления азометиновой связи в различных биорелевантных средах происходит медленнее по сравнению с выведением цефотаксима из организма при применении традиционной лекарственной формы.

Ключевые слова: натрия цефотаксим; крахмал картофельный; конъюгация; высвобождение.

Систематическое и/или неконтролируемое использование антибиотиков привело к возникновению ряда проблем, из которых наиболее глобальными являются формирование устойчивой резистентности патогенов к антибактериальным средствам и развитие тяжелых аллергических реакций у пациентов [1, 2]. Одним из путей решения этих проблем является использование при терапии систем доставки лекарств на основе комбинирования антибактериальных средств с биосовместимыми полимерами. Конъюгаты лекарственное вещество (ЛВ) — полимер представляют собой класс биофармацевтических препаратов, обладающих большим потенциалом по сравнению с введением антибиотиков в их традиционной форме. Высокая эффектив-

ность таких систем обусловлена, в первую очередь, тем, что полимерные частицы изменяют фармакокинетику и биораспределение ЛВ за счет их способности преодолевать тканевые и клеточные барьеры и доставлять лекарственные средства в очень плотные ткани и недоступные клетки-мишени. Кроме того, полимерные носители защищают содержащееся в них ЛВ от инактивации и способствуют пролонгации его действия [3].

Полисахариды активно исследуются в качестве потенциальных носителей активных фармацевтических ингредиентов благодаря их природному родству к биологическим тканям и способности регулировать фармакокинетические показатели препарата [4, 5]. Так, пектины, производные хитозана, целлюлозы, крахмала и других полисахаридов успешно используются как платформы для доставки терапевтических белков и нуклеиновых кислот [6], противоопухолевых препаратов [7], лекарств при лечении глазных патологий [8], заболеваний толстой кишки [9] и т.д.

Ковалентное присоединение ЛВ к биосовместимым полисахаридам чаще всего проводят после функционализации макромолекулы полимера-носителя [10], разновидностью которой является периодатное окисление диольных групп глюкозных структур до альдегидных с последующей реакцией полиальдегида с фармацевтическим агентом. Таким способом были получены, в частности, антибактериальные конъюгаты изониазида с карбоксиметилцеллюлозой [11], амфотерицина В с арабиногалактаном [12] и др., пониженная

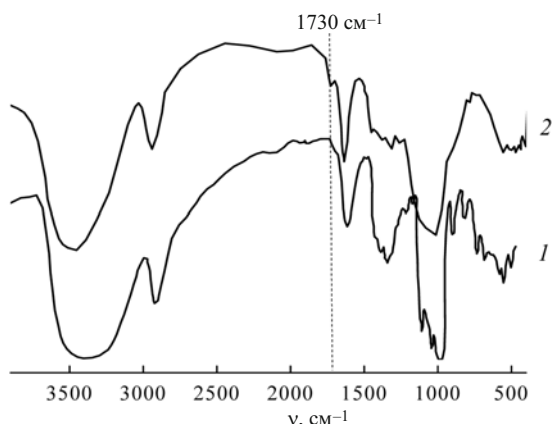


Рис. 1. ИК-спектры картофельного крахмала (1) и продукта его окисления натрием периодатом (2).

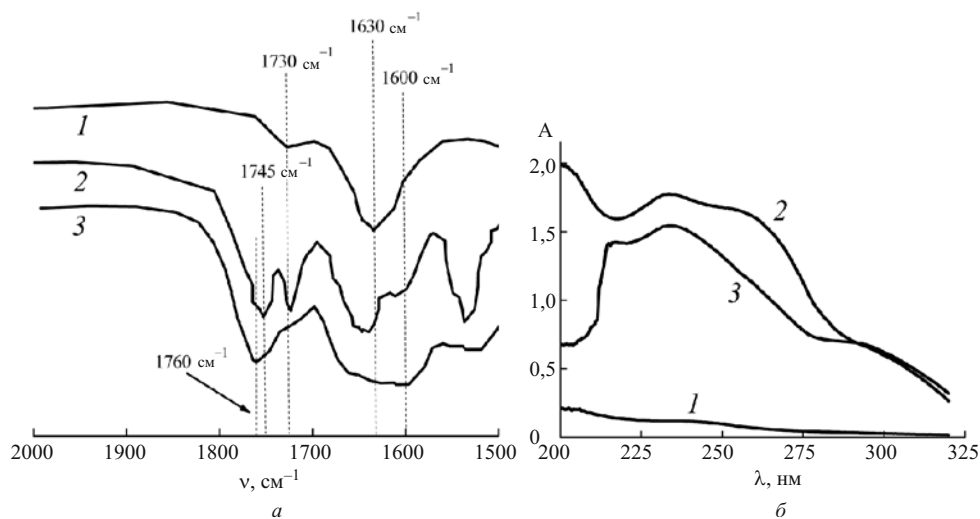


Рис. 2. Фрагменты ИК- (а) и УФ-спектров (б) модифицированного крахмала (1), натрия цефотаксима (2) и продукта их взаимодействия в растворе при 50 °С, 2 ч (3).

токсичность которых по сравнению с низкомолекулярными ЛВ была доказана в исследованиях *in vivo*.

Целью настоящей работы является синтез конъюгата антибиотика натрия цефотаксима с использованием в качестве матрицы биоразлагаемого природного полисахарида (картофельного крахмала), изучение состава и структуры полученного конъюгата, а также

высвобождения лекарственного препарата из матричной формы.

Экспериментальная часть

Для исследования использовали: картофельный крахмал пищевой, ГОСТ Р 53876-2010; натрия цефо-

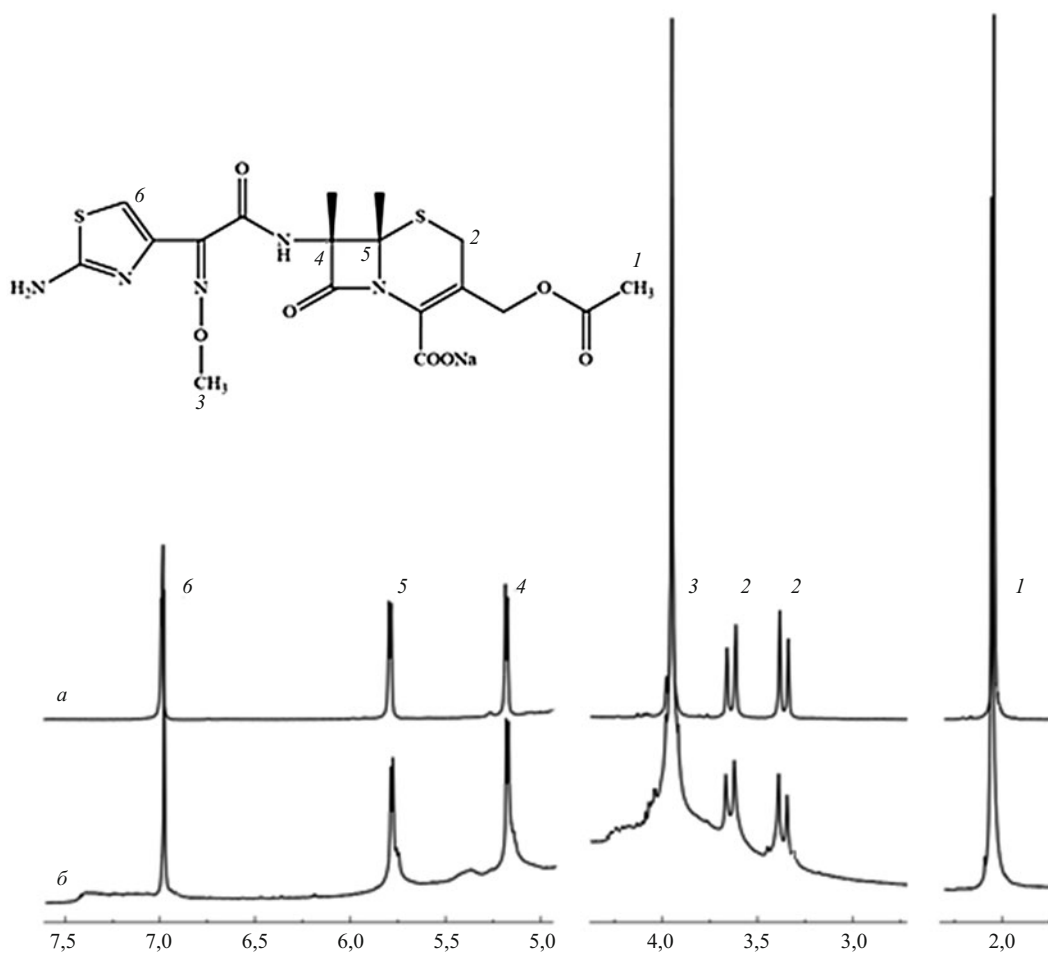


Рис. 3. Фрагменты ¹H ЯМР-спектра NaCFT (а) и его конъюгата с модифицированным крахмалом (б) (D₂O, 400 МГц, 25 °С).

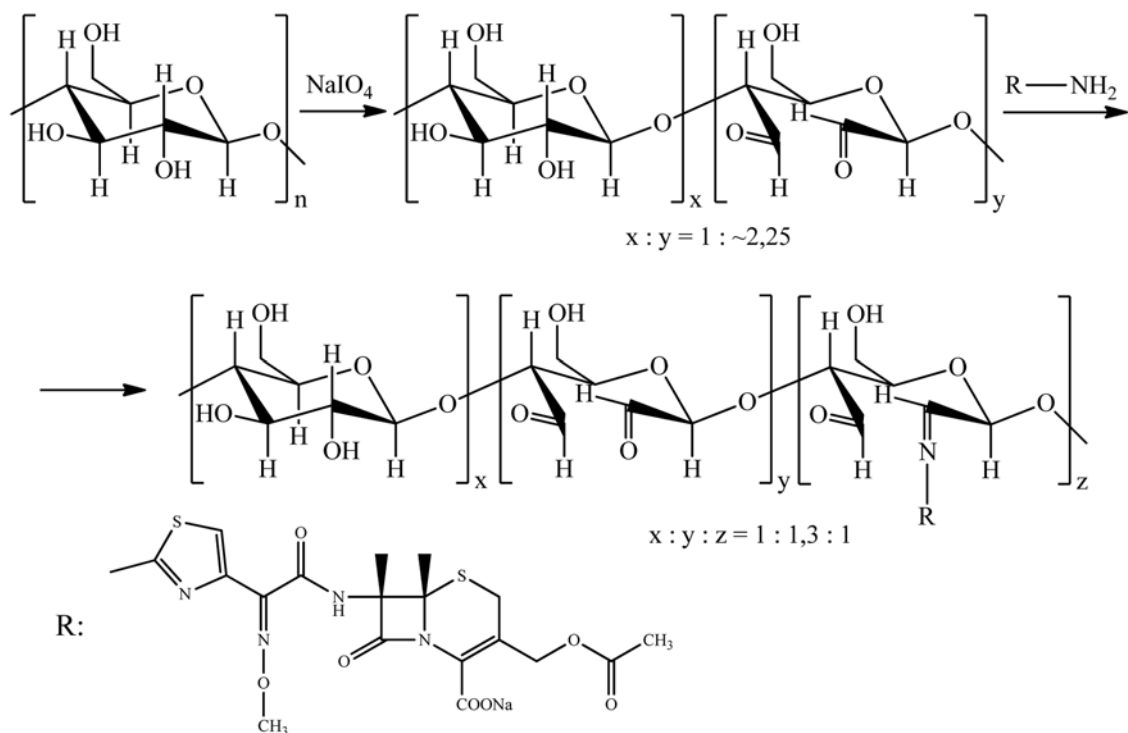


Рис. 4. Схема образования конъюгата натрия цефотаксим — картофельный крахмал.

таксим (NaCFT) — субстанция-порошок (АО “Биохимик”, Россия).

Окисление крахмала проводили в водном растворе (концентрация крахмала 0,152 М, окислителя NaIO_4 — 0,3 М) при pH 4,0 и температуре 25° С в течение 1 ч. Степень окисления в продукте реакции определяли йодометрическим методом [13].

Получение конъюгата. К суспензии 0,161 г (0,0001 моль) модифицированного полисахарида в 1,5 мл бидистиллированной воды приливали раствор 0,4775 г (0,001 моль) NaCFT в 1,5 мл бидистиллированной воды, добавляли 2 мл янтарно-кислотно-боратного буферного раствора (pH 5,2) и выдерживали при температуре 50° С в течение 2 ч. Полученную желеобразную массу осаждали в ацетон и высушивали при 50° С. Продукт (выход 75,6 %) представлял собой мелкокристаллическое вещество желтого цвета, растворимое в воде.

ИК-спектры регистрировали на спектрофотометре Spеcord-75 IR (Германия) в таблетках KBr, УФ-спектры — на спектрофотометре Helios Gamma (США) в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см, ^1H ЯМР-спектры — на спектрометре Bruker Avance II (Германия) при 400 МГц в среде D_2O .

Исследование высвобождения NaCFT из матричной формы проводили следующим образом: к ~0,005 г конъюгата добавляли 10 мл биорелевантной среды (Tris-HCl буфера, приготовленного в соответствии с [14], или физраствора), выдерживали в термостате при (38 ± 1) °С в течение определенного времени. Количество высвободившегося ЛВ (%) рассчитывали по формуле:

$$\omega = \frac{m_t}{m_0} \cdot 100\%,$$

где m_t — масса NaCFT, высвободившегося из полимерной матрицы к моменту времени t ; m_0 — исходная масса NaCFT в полимерной матрице. Значения m_t определяли методом УФ-спектроскопии.

Результаты и их обсуждение

Процесс получения матричной антибактериальной формы состоял из двух этапов:

- 1) окисление биополимера;
- 2) конденсация ЛВ с модифицированным полисахаридом.

В результате окисления крахмала периодатом натрия образуется его диальдегидное производное [15]: на ИК-спектре образца модифицированного крахмала проявляется характеристическая полоса валентных колебаний карбонила альдегидной группы (1730 см^{-1}), которая отсутствует в спектре нативного биополимера (рис. 1). Степень конверсии OH-групп в CHO-группы, рассчитанная по результатам обратного йодометрического титрования выделенного продукта, составила 68 – 70 мол. %.

Модифицированный крахмал вводили в реакцию с антибиотиком из класса цефалоспоринов третьего поколения — натрия цефотаксимом. Данный препарат широко применяется в современной фармации при лечении большинства инфекций благодаря высокой терапевтической эффективности и низкой токсичности [16]. Однако клиницисты отмечают [17], что на практике многие больные, которым показан NaCFT, имеют

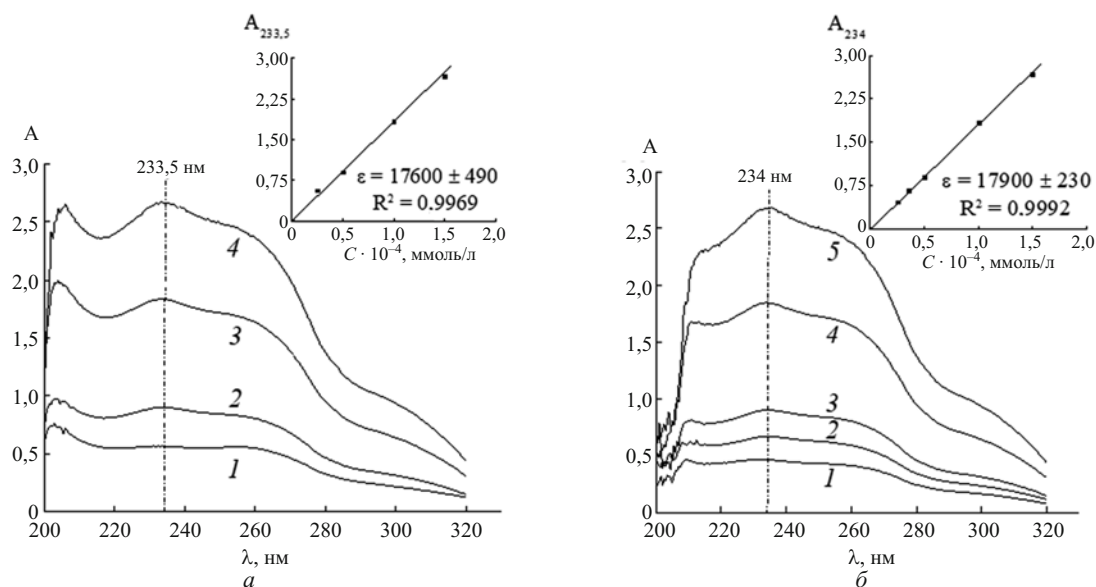


Рис. 5. Электронные спектры поглощения натрия цефотаксима и зависимость величины светопоглощения от концентрации NaCFT в физрастворе (*а*) и в Tris-HCl буфере (*б*). Концентрация ЛВ, моль/л: 1 – $3,5 \cdot 10^{-5}$, 2 – $5,0 \cdot 10^{-5}$, 3 – $1,0 \cdot 10^{-4}$, 4 – $1,5 \cdot 10^{-4}$, 5 – $2,5 \cdot 10^{-4}$.

нарушения функций почек или им необходимо одновременное лечение другими препаратами (аминогликозидами, амфотерицином В, фуросемидом и пр.), что может привести к проявлению нефротоксичности цефалоспорины. Снизить риск нефротоксичности ЛВ позволяет его введение в виде пролонгированной инфузии — не менее 6 ч ($t_{1/2}$ NaCFT 1 ч [18]), так как при этом не возникает пиковых концентраций и используется меньшая доза, чем при обычном режиме [17]. Подобный результат (пролонгация действия препарата) может дать применение конъюгата ЛВ.

Спектральный анализ продукта, выделенного после модификации, свидетельствует о присоединении NaCFT к полимерной матрице. На ИК-спектрах в области $1750 - 600 \text{ см}^{-1}$ наблюдается уширение и смещение полос валентных колебаний карбоксильной группы и группы $\text{C}=\text{O}$ β -лактамного кольца антибиотика (с 1630 до 1600 см^{-1} и с 1745 до 1760 см^{-1} соответственно) по сравнению со спектром исходного ЛВ; интенсивность полосы альдегидной группы полимера (1730 см^{-1}) значительно уменьшается (рис. 2, *а*). В УФ-спектре водного раствора антибиотика (рН 5,6) наблюдаются два максимума поглощения — при 234 и 262 нм; поглощение модифицированного крахмала в рассматриваемой области очень незначительно. Синтезированный продукт характеризуется наличием полос поглощения при 217, 234 нм и четко выраженного плеча в области 280 – 300 нм (рис. 2, *б*).

Состав конъюгата устанавливали с помощью ^1H ЯМР-спектроскопии. Резонансу протонов исходного полисахарида в спектре соответствуют уширенные сигналы в области 3,2 – 6,0 и 7,0 – 7,4 м.д. (СН и ОН глюкопиранозы соответственно [19]). Интенсивные пики 1 – 6 принадлежат протонам натрия цефотаксима, о чем говорит сравнение спектров ЛВ (рис. 3, *а*) и полученного продукта (рис. 3, *б*). При этом данные

сигналы в спектре матричной формы имеют более широкую форму, что подтверждает вхождение NaCFT в состав полимера. Согласно данным интегральной интенсивности сигналов протона полимера и антибиотика отношение “звенья крахмала : связанный NaCFT” составляет $\sim 2,6:1$ моль/моль. С учетом того, что $\sim 30\%$ звеньев в полисахарида после окисления сохранили свою структуру, количество звеньев исходного крахмала, диальдегида крахмала и звеньев с азотиновой связью (с присоединенным ЛВ) соотносится как 1:1,3:1 (30:40:30 мол. %).

На основании результатов йодометрии и спектральных методов анализа схему химического связывания NaCFT с модифицированным крахмалом можно представить следующим образом (см. рис. 4).

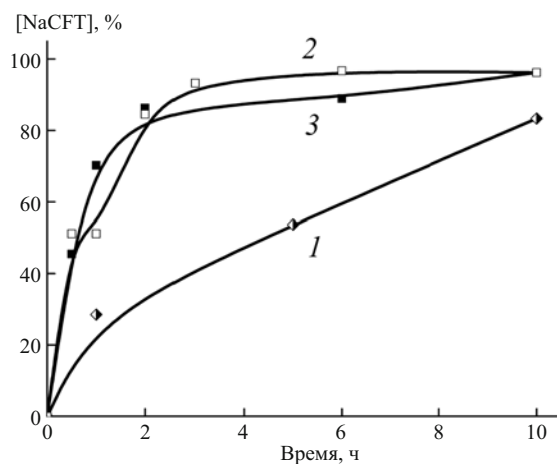


Рис. 6. Профиль высвобождения натрия цефотаксима из конъюгата в физрастворе (1), Tris-HCl буфере в присутствии химотрипсина (2) и без фермента (3). Концентрация, моль/л: химотрипсина — $1 \cdot 10^{-7}$, конъюгата — $5 \cdot 10^{-4}$. Температура $(38 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$.

Как известно [20], профиль высвобождения лекарственного препарата определяется характеристиками носителя и низкомолекулярного вещества, а также природой их взаимодействия. При ковалентном связывании полимера с водорастворимыми ЛВ их отщепление от матрицы происходит в результате разрушения ковалентной, в данном случае — азометиновой связи; это может происходить под действием ферментов, микроорганизмов, в результате гидролиза и др.

Высвобождение антибактериального средства из синтезированного конъюгата оценивали по расщеплению азометиновой связи между ЛВ и полимером-носителем *in vitro* в физрастворе (рН 7,14), а также в Tris-HCl буфере (рН 8,0) в присутствии химотрипсина и без фермента. Для определения количества антибиотика были записаны его электронные спектры поглощения в указанных растворах и получены соответствующие калибровочные графики (рис. 5).

Установлено, что в физрастворе NaCFT высвобождается достаточно медленно, достигая предельного значения ~83 % через 10 ч. В среде буфера Tris-HCl как в присутствии, так и в отсутствие химотрипсина уже через 0,5 ч высвобождается ~50 % ЛВ, более 90 % — через 6 – 10 ч (рис. 6). В целом можно говорить, что полученный конъюгат обеспечивает пролонгированное действие NaCFT, а наблюдаемая кинетика высвобождения позволяет поддерживать концентрацию фармацевтического вещества в диапазоне между токсическим и неэффективным терапевтическим уровнями [21].

Таким образом, получена матричная форма натрия цефатоксима, в которой полимером-носителем является биоразлагаемый природный полисахарид; синтезированный конъюгат может рассматриваться как потенциальная система доставки антимикробного средства с пролонгированным высвобождением.

ЛИТЕРАТУРА

1. S. B. Zaman, M. A. Hussain, R. Nye, et al., *Cureus*, **9**(6), e1403 (2017).
2. K. G. Blumenthal, J. G. Peter, J. A. Trubiano, and E. J. Phillips, *Lancet*, **393**(10167), 183 cm⁻¹98 (2019).
3. X. Meng-Hua, B. Yan, Y. Xian-Zhu, et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **78**, 63 – 76 (2014).
4. Н. А. Платэ, А. Е. Васильев, *Физиологически активные полимеры*, Химия, Москва (1986), с. 48.
5. J. Pushpamalar, A. K. Veeramachineni, C. Owh, and X. J. Loh, *ChemPlusChem*, **81**(6), 504 – 514 (2016).
6. H. Song, Y. Fan, Y. Hu, et al., *Adv. Funct. Mater.*, **31**(6), 2005978 (2020).
7. N. Goodarzi, R. Varshochian, G. Kamalinia, et al., *Carbohydr. Polym.*, **92**(2), 1280 cm⁻¹293 (2013).
8. N. Dubashynskaya, D. Poshina, S. Raik, et al., *Pharmaceutics*, **12**(1), 22 – 50 (2020).
9. A. Rubinstein, *Drug Dev. Res.*, **50**(3 – 4), 435 – 439(2000).
10. A. Basu, K. R. Kunduru, E. Abteu, and A. J. Domb, *Bioconjugate Chem.*, **26**(8), 1396 – 1412 (2015).
11. Ш. А. Шомуратов, Э. А. Муродов, А. С. Тураев, *Химия растит. сырья*, № 2, 25 – 28 (2006).
12. T. Ehrenfreund-Kleinman, T. Azzam, R. Falk, et al., *Biomaterials*, **23**(5), 1327 – 1335 (2002).
13. S. Veelaert, M. Polling, and D. De Wit, *Starch – Stärke*, **47**(7), 263 – 268 (1995).
14. Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс, *Справочник биохимика*, Мир, Москва (1991), с. 363.
15. Н. К. Кочетков, А. Ф. Бочков, Б. А. Дмитриев и др., *Химия углеводов*, Химия, Москва (1967), с. 499.
16. D. Mehtaand, A. K. Sharma, *Mol. Pharm.*, No. 1, 1 – 6 (2016).
17. В. Г. Кукес, Д. А. Сычов, Д. А. Архипов и др., *Клиническая фармакология*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2017), с. 765.
18. С. С. Постников, *Атмосфера. Пульмонология и аллергология*, № 2, 43 – 47 (2006).
19. Y. Li, C. Liu, Y. Tan, et al., *Carbohydr. Polym.*, **110**, 87 – 94 (2014).
20. V. Narasimhan, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **48**(1 – 2), 195 – 210 (2001).
21. N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, and O. C. Farokhzad, *Chem. Rev.*, **116**(4), 2602 – 2663 (2016).

Поступила 22.06.21

SODIUM CEFOTAXIM – POTATO STARCH CONJUGATE AS POTENTIAL SYSTEM OF ANTIBACTERIAL DRUG DELIVERY

T. V. Kryuk^{1,*}, T. G. Tyurina¹, and T. A. Kudryavtseva¹

¹ L. M. Litvinenko Institute of Physical-Organic and Carbochemistry, 83114 Donetsk

* e-mail: ktvl2010@mail.ru

We have synthesized a matrix form of sodium cefotaxime based on the product of potato starch periodate oxidation (content of units with CHO group, 68 mol. %). The drug – polymer conjugate formation was confirmed by the IR and UV spectroscopy. By means of ¹H NMR spectrometry it was found that the conjugation degree was 30 mol. %. The release of the antibiotic from the synthesized conjugate due to cleavage of the azomethine bond in various biorelevant media proceeded more slowly compared to the removal of cefotaxime from the body in case of using the traditional dosage form.

Keywords: sodium cefotaxime; potato starch; conjugation; drug release.