

DOI: 10.30906/0023-1134-2022-56-4-18-22
© Коллектив авторов, 2022

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

МЕХАНОСИНТЕЗ МАТРИЧНЫХ ФОРМ СУЛЬФАНИЛАМИДА

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

* e-mail: ktvl2010@mail.ru

Изучена возможность использования механохимической технологии для получения антибактериальных систем пролонгированного действия на основе сульфаниламида и сополимера малеинового ангидрида с винилацетатом или окисленного картофельного крахмала. Показано, что конъюгация лекарственного вещества с полимерами происходит в результате ковалентного связывания. Степень конверсии сульфаниламида зависит от величины действующей силы и времени твердофазной реакции; накопление продукта продолжается после снятия нагрузки. Наиболее перспективным является конъюгат с полисахаридной матрицей, в котором высвобождение фармацевтического препарата при расщеплении азометиновой связи происходит медленнее по сравнению с его выводом из организма при применении исходной лекарственной формы.

Ключевые слова: сульфаниламид; механосинтез; конъюгация; сополимер малеинового ангидрида; крахмал картофельный; высвобождение.

Традиционные антибактериальные лекарственные средства из группы сульфаниламидов в настоящее время редко назначают пациентам для применения по причине частых проявлений резистентности к ним у бактерий [1]. Модификация структуры сульфаниламида (СА) и его производных по ароматической аминогруппе с получением соединений с азометиновой или амидной связью считается перспективным направлением создания новых антимикробных средств (см., например, [2 – 5]).

Клинически доказанная эффективность матричных форм лекарственных веществ (ЛВ) с контролируемым высвобождением терапевтического вещества [6, 7] дает основания для проведения исследований по разработке конъюгатов, в которых сульфаниламид связывается с физиологически активным и/или биосовместимым полимером, содержащим карбонильные, карбоксильные, сложноэфирные и другие группы в боковой цепи. Несмотря на то, что в настоящее время сульфаниламид не назначается для перорального применения, его можно рассматривать как модельное соединение для разработки твердых лекарственных форм пролонгированного действия на основе сульфаниламидных препаратов кратковременного действия (период полувыведения которых составляет менее 8 ч — сульфадимезина, норсульфазола, уросульфана, этазола [8]).

Для осуществления взаимодействия ЛВ с полимером в настоящее время часто применяют нетрадиционные методики, например, обработку реагирующих веществ ультразвуком [9], микроволнами [10], ионизирующим излучением [11], их сплавление [12], совме-

стное диспергирование. Следует отметить, что механохимический подход (так называемая “сухая технология”) широко распространен в фармацевтической промышленности, в том числе для иммобилизации ЛВ на полимерных носителях [13], и является более экологичным [14] и, нередко, более экономичным и эффективным по сравнению с классическими методами синтеза [15].

Целью настоящей работы является получение в условиях механохимической реакции матричных форм сульфаниламида и изучение высвобождения из них лекарственного вещества *in vitro*.

Экспериментальная часть

Для исследования использовали: сульфаниламид — субстанция-порошок (ООО “ЛЮМИ”, Россия), биосовместимые сополимер малеинового ангидрида с винилацетатом (СПЛ МА-ВА) и модифицированный картофельный крахмал (МКр). СА использовали без дополнительной очистки. Сополимер МА-ВА синтезировали и выделяли, как описано в работе [16]; молекулярная масса $101 \pm 0,5$ кДа, соотношение звеньев МА:ВА — 53:47 масс.%. Крахмал (ГОСТ Р 53876-2010, ООО “ПромАгроПак”, Краснодар) модифицировали окислением до диальдегидной формы ($[CHO] \approx 70$ мол. %) — как описано в [17].

Механическую обработку (МО) эквимольных смесей СПЛ — СА, МКр — СА проводили в лабораторной шаровой мельнице MLW KM1 (Германия): масса шара 0,2 кг, $3000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$, прилагаемая нагрузка 20 Н, масса реакционной смеси $\sim 0,6$ г; и в лаборатор-

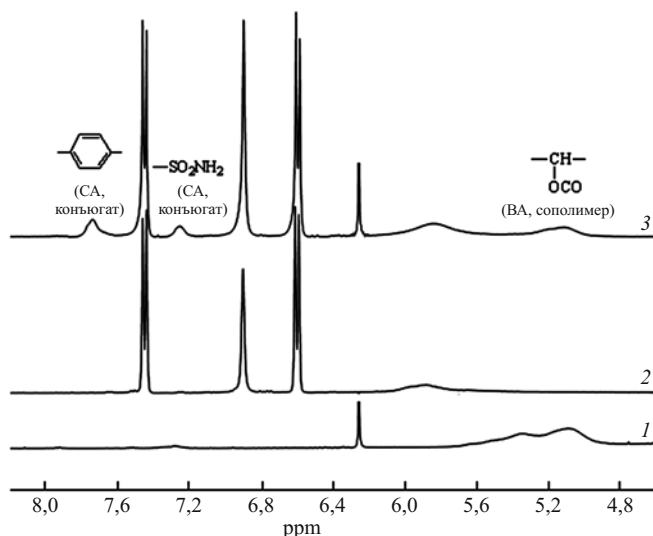


Рис. 1. Фрагменты ^1H ЯМР-спектров сополимера МА-ВА (1), сульфаниламида (2) и смеси СА со СПЛ (1:1 моль/моль) после МО в виброистирателе в течение 3 мин (3) (DMSO-d_6 , 400 МГц, 25 °С).

ном вибрационном истирателе 75Т-ДрМ (Россия): масса рабочего тела 1,13 кг, виброускорение $300 - 490 \text{ м} \cdot \text{с}^{-2}$, виброскорость $0,942 - 1,57 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$, действующая нагрузка $339 - 550 \text{ Н}$, масса навески $\sim 4,5 \text{ г}$. Все исходные реагенты сохраняют свои физико-химические свойства после МО, что подтверждено ^1H ЯМР-спектроскопией; молекулярная масса СПЛ после МО $99 \pm 0,5 \text{ кДа}$.

Степень конверсии СА (масс. %) рассчитывали по формуле:

$$\text{Степень конверсии СА} = \frac{m(\text{CA})_1}{m(\text{CA})_0} \cdot 100\%,$$

где $m(\text{CA})_1$ – масса непрореагировавшего СА; $m(\text{CA})_0$ – масса СА, взятая для механосинтеза. Значения $m(\text{CA})_1$ определяли по результатам потенциометрического титрования с помощью иономера И-160МИ (Россия). Для этого смесь после МО количественно переносили на стеклянный фильтр и тщательно промывали водой; в фильтрате определяли содержание непрореагировавшего СА нитритометрическим методом [18].

ИК-спектры регистрировали на спектрофотометре Spscord-75 IR (Германия) в таблетках КВг, УФ-спектры — на спектрофотометре Helios Gamma (США) в кварцевых кюветках с толщиной поглощающего слоя 1 см, ^1H ЯМР-спектры — на спектрометре Bruker Avance II (Германия) при 400 МГц в среде DMSO-d_6 .

Для исследования высвобождения СА из матричной формы к $\sim 0,005 \text{ г}$ конъюгата добавляли 10 мл биорелевантной среды (Tris-HCl буфера, приготовленного в соответствии с [19], или 0,1 н. HCl), выдерживали в термостате при $(38 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение заданного времени. Количество высвободившегося ЛВ (%) рассчитывали по формуле:

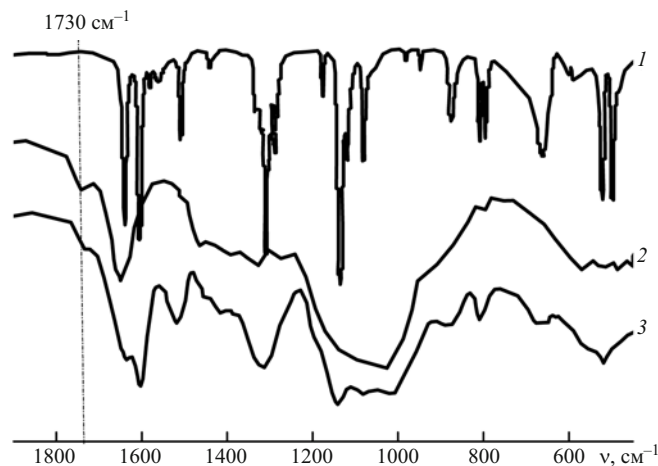


Рис. 2. Фрагменты ИК-спектров СА [20] (1), МКр (2) и продукта их механохимической реакции (3).

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

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

Статистическую обработку результатов производили с использованием распределения Стьюдента. Погрешность определения ($\Delta = t_{0,95,3} \cdot \sqrt{S}$) степени конверсии составляла 0,5 – 1,5 масс. %, концентрации СА при его высвобождении — 0,5 – 1 масс. % в зависимости от времени механообработки или выдержки конъюгата в выбранной среде соответственно.

Результаты и их обсуждение

Ранее нами было показано, что при совместной механообработке сульфаниламида с сополимером МА-ВА в шаровой мельнице происходит амидирование звеньев малеинового ангидрида, при этом скорость механохимической реакции выше, чем при синтезе в растворе, а состав продуктов зависит от времени МО [16]. В данной работе было рассмотрено влияние на эффективность механосинтеза повышения величины прилагаемой нагрузки от 20 Н (шаровая мельница) до 339 – 550 Н (виброистиратель). Для этого провели сравнительный анализ ^1H ЯМР-спектров смесей СА с СПЛ после механообработки (типичный спектр представлен на рис. 1) в шаровой мельнице и в виброистирателе. Установлено, что соотношение интегральных интенсивностей сигналов, соответствующих резонансу протонов аминогрупп, входящих в боковую цепь сополимера (7,2 – 7,3 м.д. (2H, $-\text{SO}_2\text{NH}_2$)), ароматических протонов (7,6 – 7,8 м.д. (4H, Ar) и сигналов протонов цепи СПЛ (4,9 – 5,7 м.д. (1H, звено ВА)) значительно увеличивается во втором случае. Это подтверждает ожидаемый результат повышения степени конверсии исходных веществ с ростом действующей силы. Так, возрастание нагрузки в ~ 20 раз позволило увеличить степень связывания ЛВ с сополи-

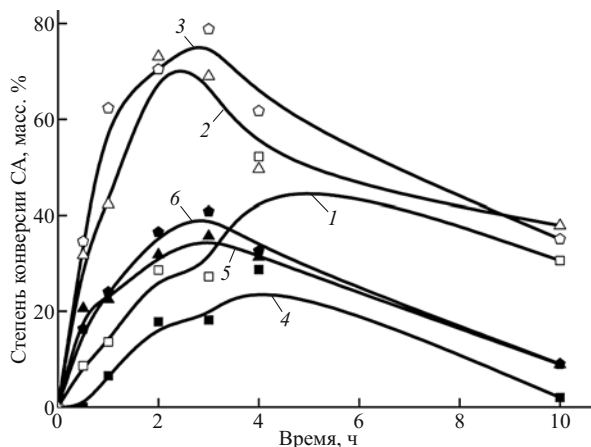


Рис. 3. Зависимость степени конверсии от времени МО в шаровой мельнице смесей СА с СПЛ (1–3), СА с МКр (4–6). Образцы анализировали через 1 ч (1, 4), 10 сут (2, 5), 20 сут (3, 6) после МО.

мером в 2 раза при одновременном уменьшении продолжительности МО в 80 раз (с 4 ч до 3 мин).

На рис. 2 приведены фрагменты ИК-спектров (в области $1900 - 400 \text{ см}^{-1}$) продукта механохимической реакции СА с модифицированным крахмалом и исходных реагентов. По внешнему виду спектра поглощения продукта можно говорить, что он не является суммарным спектром смеси СА и полисахарида: все характеристические полосы колебаний сульфаниламида в конъюгате сохраняются, при этом они уширяются и несколько смещаются, что свидетельствует о вхождении ЛВ в состав полимерной матрицы; интенсивность полосы, относящейся к колебаниям группы СНО (1730 см^{-1}), снижается, и одновременно происходит ее смещение до 1725 см^{-1} .

Установлено, что степень конверсии СА экстремально зависит от времени соизмельчения смеси. Как видно из характера кривой 1 на рис. 3, максимальное

количество ЛВ реагирует с сополимером при механической обработке реагентов в шаровой мельнице в течение 4 ч, затем степень конверсии заметно снижается, т.е. дальнейшая механоактивация (более 4 ч) не является целесообразной.

Накопление продукта происходит во времени после снятия нагрузки. Так, через 10 сут после механосинтеза для образцов, измельченных в течение 3 ч, наблюдается дальнейшее увеличение степени конверсии СА — в 2,5 раза, через 20 суток — еще на 11,5 % (рис. 3, кривые 2, 3). В образцах, анализ которых проводили через 30 сут после МО, изменение количества амина сравнительно с 20-суточным периодом не выявлено. Можно говорить, что в выбранных условиях соизмельчения смесей СА и сополимера образование матричной формы ЛВ продолжается в течение 20 сут после механоактивации, оптимальное время которой составляет 2–3 ч.

Механореакция сульфаниламида с МКр подчиняется таким же закономерностям, как и образование конъюгата СА-СПЛ. Увеличение продолжительности выдержки реагентов в механохимическом реакторе сначала приводит к постепенному повышению степени конверсии, которая далее заметно снижается при увеличении продолжительности МО до 10 ч (рис. 3, кривая 4). После прекращения внешнего воздействия образование химических связей между исходными веществами продолжается в течение 20 сут после механосинтеза, оптимальное время МО составляет 3 ч (рис. 3, кривые 5, 6). При этом образование амидной связи (в конъюгате СА-СПЛ) протекает значительно легче, чем азотиновой (в конъюгате СА-МКр): в одинаковых условиях проведения механосинтеза степень конверсии амина в реакции с сополимером в среднем в 2 раза выше, чем в реакции с полисахаридом. Например, при соизмельчении соответствующих смесей в течение 3 ч с последующей их 10-дневной выдержкой после снятия нагрузки с СПЛ ковалентно

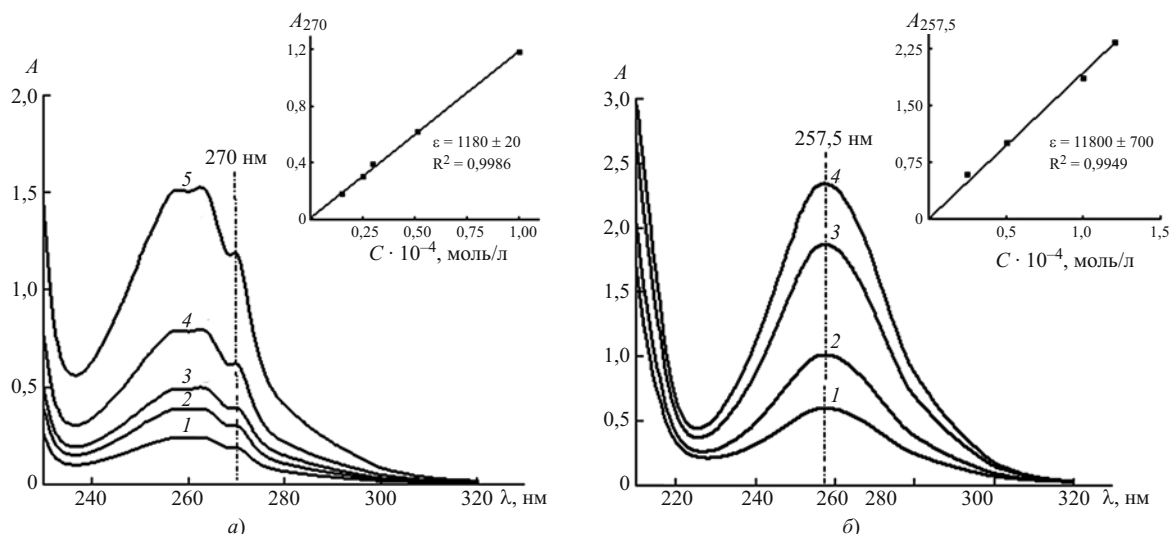


Рис. 4. Электронные спектры поглощения СА и зависимость величины светопоглощения от концентрации СА в 0,1 н. НСl (а) и в Tris-НСl буфере (б). Концентрация СА, моль/л: 1– $1,5 \cdot 10^{-4}$, 2– $2,5 \cdot 10^{-4}$, 3– $3,0 \cdot 10^{-4}$, 4– $5,0 \cdot 10^{-4}$, 5– $1,0 \cdot 10^{-3}$ (а); 1– $2,5 \cdot 10^{-5}$, 2– $5,0 \cdot 10^{-5}$, 3– $1,0 \cdot 10^{-4}$, 4– $1,2 \cdot 10^{-4}$ (б).

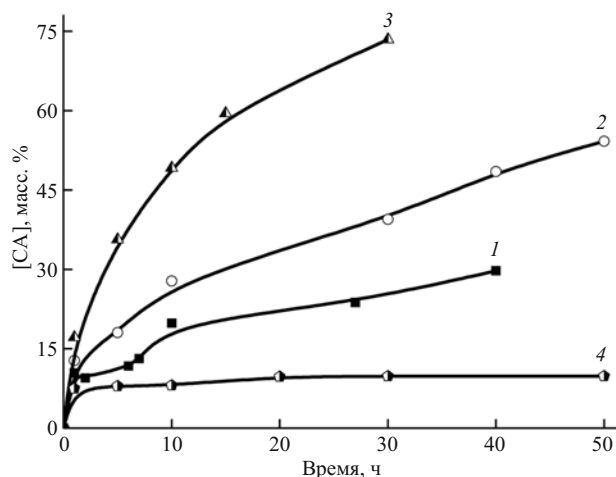


Рис. 5. Профиль высвобождения сульфаниламида из конъюгата с МКр (1 – 3) и с СПЛ (4) в Tris-HCl буфере в присутствии химотрипсина (1), в Tris-HCl буфере (2), в 0,1 н. HCl (3, 4). Концентрация, моль/л: химотрипсина — $1 \cdot 10^{-7}$, конъюгата — $5 \cdot 10^{-4}$. Температура (38 ± 1) °C.

связывалось ~79 масс. %, с МКр — ~36 масс. % ЛВ (рис. 3).

В целом, полученные результаты согласуются с известными представлениями о механохимических реакциях, в частности, о снижении эффективности амидирования при увеличении продолжительности механоактивации сверх оптимального значения [16] и о разделенности во времени механического воздействия и формирования химических связей между реагентами [14].

Исследования по высвобождению СА из его матричных форм проводили *in vitro* при (38 ± 1) °C при pH 1,36 (0,1 н. HCl), а также в Tris-HCl буфере (pH 8,0) в присутствии и отсутствии химотрипсина. Количество выделившегося сульфаниламида определяли методом УФ-спектроскопии по полученным в указанных средах калибровочным графикам (рис. 4). Для изучения кинетики высвобождения были использованы образцы с содержанием ЛВ 53 масс. % (конъюгат СА-СПЛ) и 56 масс. % (конъюгат СА-МКр).

Установлено, что высвобождение сульфаниламида из его конъюгата с модифицированным крахмалом происходит во всех выбранных биорелевантных средах (рис. 5, кривые 1 – 3), при этом скорость гидролиза азометиновой связи, как и следовало ожидать, сильно зависит от величины pH: в кислой среде 50 масс. % ЛВ высвобождается за ~10 ч, в щелочной — за ~45 ч. Присутствие химотрипсина несколько замедляет выделение ЛВ, что может быть связано с изменением механизма расщепления связи $-N=C-$. В целом, можно говорить, что полученная матричная форма отвечает всем признакам системы пролонгированного действия с непрерывным высвобождением: в начальный период (1 ч) выделяется (в зависимости от pH) от 10 до 17 масс. % СА (от общего его содержания в конъюгате), а остальное количество ЛВ высвобождается непрерывно и без значительных концентрационных колебаний на протяжении длительного времени.

Гидролиз амидной связи наблюдали только в кислой среде (рис. 5, кривая 4), при этом кинетика высвобождения сульфаниламида из конъюгата СА-СПЛ принципиально отличается от описанной выше для конъюгата СА-МКр. За короткий промежуток времени (1 ч) выделяется 7,5 масс. % ЛВ, в течение последующих 20 ч наблюдается небольшой монотонный рост количества СА до 10 масс. %, после чего оно остается постоянным на протяжении еще 60 ч (далее эксперимент не проводили). Таким образом, уже через 1 ч в растворе регистрируется 75 % СА от всего количества, которое высвобождается из полимерной матрицы, т.е. выделение ЛВ на этом этапе практически заканчивается.

Полученные результаты позволяют говорить, что при действии внешних механических нагрузок на смеси сульфаниламида с полимерами, содержащими звенья с карбоксильными и альдегидными группами, происходит их ковалентное связывание. Твердофазное взаимодействие подчиняется известным закономерностям механоактивированных процессов: зависит от приложенной нагрузки и длительности измельчения, протекает во времени после завершения механообработки. Синтезированные конъюгаты могут рассматриваться как потенциальные системы доставки антимикробного препарата с пролонгированным высвобождением. При этом более перспективными являются конъюгаты сульфаниламида, представляющие собой основания Шиффа, которые позволяют поддерживать достаточный уровень лекарственного препарата при его выделении из биоразлагаемой матричной формы.

ЛИТЕРАТУРА

1. O. Sköld, *Drug Resist. Updat.*, **3**(3), 155 – 160 (2000).
2. С. Г. Стёпин, Н. В. Железняк, О. Г. Мырадов, Е. А. Диксар, *Вестник фармации*, **85**(3), 88 – 93 (2019).
3. V. Gomathi and R. Selvameena, *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, **6**(1), 487 – 491 (2014).
4. N. Elangovan, T. Kolochi, and S. Sowrirajan, *Int. J. Curr. Res. Chem. Pharm. Sci.*, **3**(9), 60 – 65 (2016).
5. S. I. Kang and Y. H. Bae, *J. Control. Release*, **80**(1 – 3), 145 – 155 (2002).
6. I. Ekladios, Y. L. Colson, and M. W. Grinstaff, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **18**, 273 – 294 (2019).
7. A. Kakkar, G. Traverso, O. C. Farokhzad, et al., *Nat. Rev. Chem.*, **1**, 0063 (2017).
8. С. Д. Тржецинский, Е. В. Гречаная, Г. В. Мазулин и др., *Фармакология противомикробных, противопаразитарных, противовирусных лекарственных средств*, ЗГМУ, Запорожье (2016), с. 31.
9. H. Jiang, Z. Xing, Y. Wang, et al., *Ultrason. Sonochem.*, **63**, 104981 (2020).
10. К. Мартина, Л. Серпе, Р. Кавалли, Д. Кравотто, *Вестник РГМУ*, № 6, 145 – 156 (2018).
11. Д. Н. Киншт, П. Г. Мадонов, А. Г. Ластовецкий и др., *Вестн. новых мед. технол.*, № 3, 211 – 225 (2017).
12. К. В. Алексеев, Н. В. Тихонова, Е. В. Блынская и др., *Вестн. новых мед. технол.*, **19**(4), 43 – 47 (2012).
13. I. Colombo, G. Grassi, and M. Grassi, *J. Pharm. Sci.*, **98**(11), 3961 – 3986 (2009).
14. О. И. Ломовский, В. В. Болдырев, *Механохимия в решении экологических задач*, ГПНТБ СО РАН, Новосибирск (2006), с. 14; с. 97.
15. T.-X. Métro, X. J. Salom-Roig, M. Reverte, et al., *Green Chem.*, **17**(1), 204 – 208 (2015).

16. Т. Г. Тюрина, Т. В. Крюк, *Журн. прикл. хим.*, **92**(3), 306 – 314 (2019).
17. Т. В. Крюк, Т. Г. Тюрина, Т. А. Кудрявцева, *Хим.-фарм. журн.*, **55**(8), 50 – 54 (2021); *Pharm. Chem. J.*, **55**(8), 803 – 807 (2021).
18. *Государственная фармакопея Российской Федерации*, Минздрав России, Москва (2018), с. 4839.
19. Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс, *Справочник биохимика*, Мир, Москва (1991), с. 363.
20. [https://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct frame top.cgi](https://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct%20frame%20top.cgi).

Поступила 19.11.21

MECHANOSYNTHESIS OF SULPHANILAMIDE MATRIX FORMS

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

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

* e-mail: ktv12010@mail.ru

We have studied the possibility of obtaining polymer–drug conjugates as antibacterial systems of prolonged action by method of mechanochemical synthesis using copolymer of maleic anhydride with vinyl acetate or oxidized potato starch as polymer matrices and sulfanilamide as the antimicrobial drug. It is established that (i) drug conjugation with polymer is the result of covalent binding, (ii) the degree of sulfanilamide conversion depends on the magnitude of active force and the time of solid-phase reaction, and (iii) the accumulation of the product continues after removal of the load. The most promising conjugate is based on a polysaccharide matrix, in which the release of drug due to cleavage of the azomethine bond is slower than its removal from the body in case of a traditional dosage form.

Keywords: sulfonamide; mechanochemical synthesis; conjugation; copolymer of maleic anhydride; potato starch; drug release.