

УДК 544.032+544.778.4

ПОЛУЧЕНИЕ КРИОХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО УЛЬТРАДИСПЕРСНОГО ПОРОШКА ДИОКСИДИНА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕГО АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

О.И. Верная*, В.П. Шабатин, А.М. Семенов, Т.И. Шабатина

*(кафедра химической кинетики; *e-mail: olga_vernaya@mail.ru)*

Одним из способов повышения биодоступности и эффективности лекарственных веществ является уменьшение их частиц до наноразмеров и изменение их кристаллической структуры. Методом криохимического синтеза получена стабильная нанорма новой полиморфной модификации антибактериального препарата 2,3-бис-(гидроксиметил)хиноксалин-N,N'-диоксида (диоксидина), которая была охарактеризована методами газовой хроматографии, ЯМР, РФА, термоаналитическими методами (ТГ, ДТГ, ДСК) и ПЭМ. Новая полиморфная модификация диоксидина оказалась более активной к процессам подавления роста грамположительных *M. суапет* 98 и грамотрицательных *E. coli* 52 бактериальных штаммов, чем исходная фармакопейная модификация.

Ключевые слова: наночастицы, диоксидин, криохимическая модификация.

В настоящее время многие из лекарственных препаратов обладают низкими показателями биодоступности [1]. Одним из решений данной проблемы с точки зрения современной фармакологии является перевод этих соединений в нанорму. В данном случае рост поверхностной площади лекарственных средств способствует увеличению скорости их растворения. Биодоступность малорастворимых лекарственных веществ можно улучшить получением эмульсий и суспензий на основе наночастиц этих соединений.

Другим способом повышения биодоступности является получение новых полиморфных модификаций известных лекарственных препаратов. Полиморфизм – способность вещества в твердом состоянии существовать в разных полиморфных модификациях, каждая из которых имеет один и тот же химический состав, но различную кристаллическую структуру. Разные полиморфные модификации лекарственных веществ проявляют различные физико-химические и биофармакологические свойства. От того, в какой кристаллической модификации субстанция содержится в лекарственном препарате, зависят его стабильность, скорость растворения и эффективность. Полиморфизм кристаллических лекарственных препаратов обладает большим инновационным потенциалом, поэтому представляет большой интерес для фармацевтической индустрии [2, 3].

Среди методов получения кристаллических модификаций наиболее распространен метод пере-

кристаллизация из растворов [4, 5] и расплавов [6], в том числе с использованием растворителей в сверхкритических состояниях [7, 8]. Новые полиморфные модификации веществ получают также методом криохимической модификации, включающей испарение вещества в потоке нагретого газа-носителя с последующей конденсацией паров на поверхность, охлаждаемую до температуры кипения жидкого азота [9].

Цель настоящей работы – криохимический синтез ультрадисперсного порошка диоксидина (2,3-бис-(гидроксиметил)хиноксалин-N,N'-диоксида) и определение антибактериальной активности полученного модифицированного лекарственного препарата. Диоксидин – синтетический антибактериальный препарат с выраженным бактерицидным типом действия, в основе которого лежит повреждение биосинтеза ДНК микробной клетки с глубоким повреждением структуры нуклеотида уже при внесении субингибирующих концентраций. Препарат эффективен в отношении широкого спектра штаммов бактерий [10, 11].

Экспериментальная химическая часть

Реагенты и методы исследования. Субстанцию диоксидина, соответствующую фармакопейной статье (ФС) 42-2308-97, использовали без дополнительной очистки. Диоксидин представляет собой желто-зеленое кристаллическое вещество, малорастворимое в воде (до 1 мас.% при 18–20 °С).

Синтез криомодифицированного диоксида. Водный раствор диоксида (1–8 мас.%), нагретый до температуры 20–100 °С, замораживали жидким азотом и подвергали лиофильной сушке в течение 22–27 ч.

Для подтверждения идентичности состава, различий в кристаллической структуре и антибактериальной активности исходного фармакопейного и криомодифицированного диоксида проведен комплекс физико-химических и биологических методов анализа.

Хроматографический анализ спиртовых растворов исходного фармакопейного и криомодифицированного диоксида проводили на газовом хроматографе «КристаллЛюкс-4000» (Россия).

Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) исходного и полученного вещества снимали в насыщенном растворе в дейтерированной воде (D₂O) на ЯМР-спектрометре высокого разрешения «VXR-400» фирмы «VARIAN» (США).

Рентгенофазовый анализ (РФА) образцов проводили на дифрактометре «Rigaku D/MAX-2500» (Япония) на CuKα-излучении ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$).

Термоаналитические исследования проводили на термоанализаторе «STA 449 C Jupiter NETZSCH» (Германия) в токе аргона при повышении температуры 10 град/мин. В качестве держателей образцов использовали алюминиевые кюветы. Навески проб составляли 4,7–7,8 мг.

Микрофотографии криомодифицированного диоксида получали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на электронном микроскопе «JSM 6380 LA» при увеличениях $\times 1000 \dots 20000$.

Определение антибактериальной активности разных модификаций диоксида осуществляли диско-диффузионным методом [12] с применением прессованных таблеток исходного и криомодифицированного диоксида. В качестве тест культур использовали бактерии (беспоровые грамотрицательные и грамположительные), полученные из коллекции культур кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова: *E. coli* 52 и *M. suaneum* 98. Эксперименты проводили в чашках Петри, 20 мл агаризованной питательной среды, подсушенной в течение суток (толщина слоя среды 4 мм). Измерение зон подавления роста (ЗПР) тест-культур роста проводили через 16 и 48 ч инкубации.

Результаты и их обсуждение

Первоначально методами ЯМР ¹H и газовой хроматографии была установлена идентичность

химических формул исходного фармакопейного и криомодифицированного диоксида.

Сходство спектров ЯМР-¹H исходного диоксида (D₂O) δ : 4,93–5,21 (m, 4H, 2CH₂), 7,85–8,05 (m, 2H, H Ar), 8,38–8,52 (m, 2H, H Ar) и криомодифицированного препарата (D₂O) δ : 4,95–5,25 (m, 4H, 2CH₂), 7,86–8,05 (m, 2H, H Ar), 8,35–8,50 (m, 2H, H Ar) подтверждает, что полученное вещество является диоксидом.

Значения хроматографического времени удерживания ($t_{уд.}$) исходной субстанции и полученного из нее вещества одинаковы и составляют 3,96 мин, что подтверждает идентичность их химических составов. В хроматограммах обеих модификаций диоксида присутствуют только пики растворителя и диоксида, что свидетельствует об отсутствии примесей в составе лекарственных веществ.

Для подтверждения того, что полученное вещество является новой кристаллической модификацией диоксида, проведены РФА и термоаналитические исследования.

Сравнение рентгеновских дифрактограмм исходного диоксида и полученного из него вещества (рис. 1) свидетельствует о том, что оно является новой кристаллической модификацией диоксида, так как положение дифракционных максимумов и их интенсивности ($I_{отн.}, \%$) для этого вещества (8,740 (100,0%), 8,026 (94,2%); 3,358 (99,3%); 3,304 (67,6%)) отличается от положения дифракционных максимумов и их интенсивности исходного диоксида (8,638 (100,0%); 7,508 (68,4%); 3,299 (24,8%); 2,242 (16,8%)).

Данные термоаналитических исследований приведены на рис. 2. Кривые ДСК исходной субстанции диоксида (рис. 3, а) и полученной из него новой кристаллической модификации диоксида (рис. 3, б) различаются положением и величиной эндотермических эффектов плавления, а также экзотермических эффектов термического разложения. Для исходной субстанции диоксида плавление происходит при температуре (175,5±0,5)°С с тепловым эффектом $-(99,8 \pm 0,4) \text{ Дж/г}$, а термолит протекает при температуре (199,2±0,5)°С с тепловым эффектом (1135±4) Дж/г. Для новой кристаллической модификации диоксида плавление происходит при температуре (171,7±0,5)°С с тепловым эффектом $-(38,8 \pm 0,4) \text{ Дж/г}$, а термолит протекает при температуре (186,0±0,5)°С с тепловым эффектом (1243±4) Дж/г. Таким образом, проведенные термоаналитические эксперименты показали, что полученная новая кристаллическая модификация диоксида более активна к про-

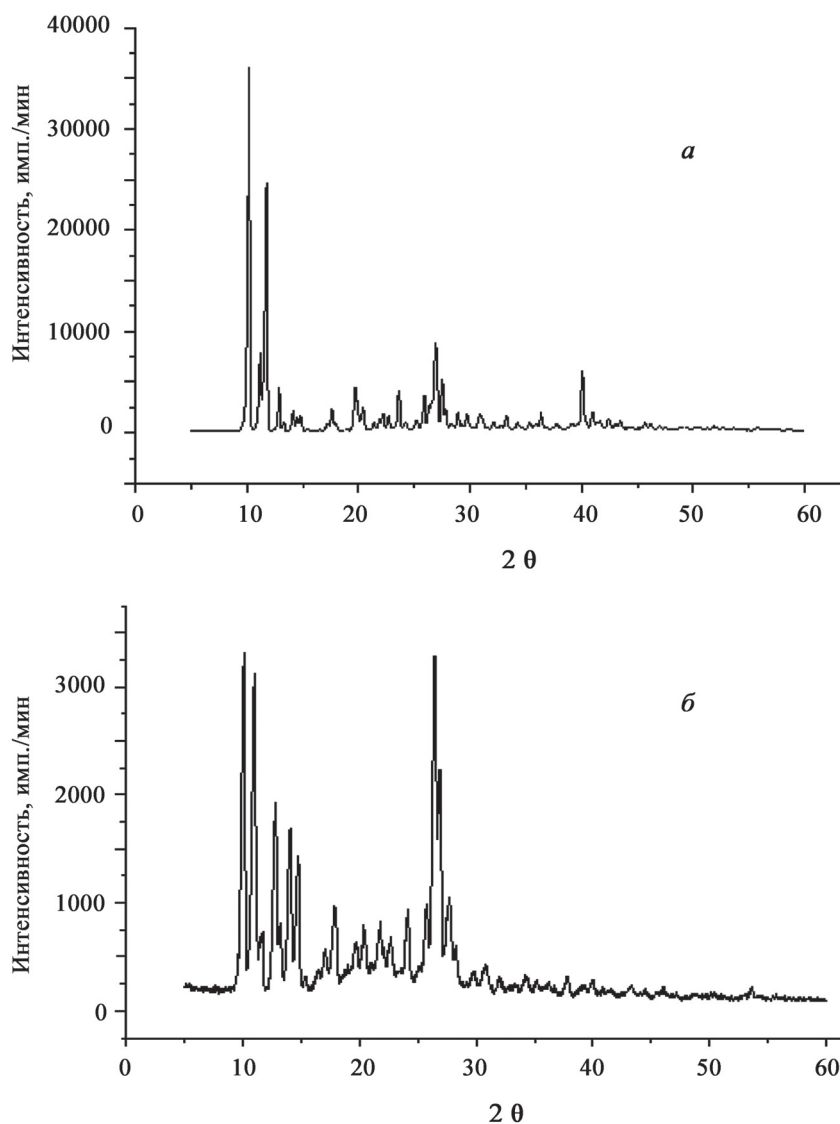


Рис.1. Рентгеновская дифрактограмма исходного (а) и криомодифицированного (б) диоксида

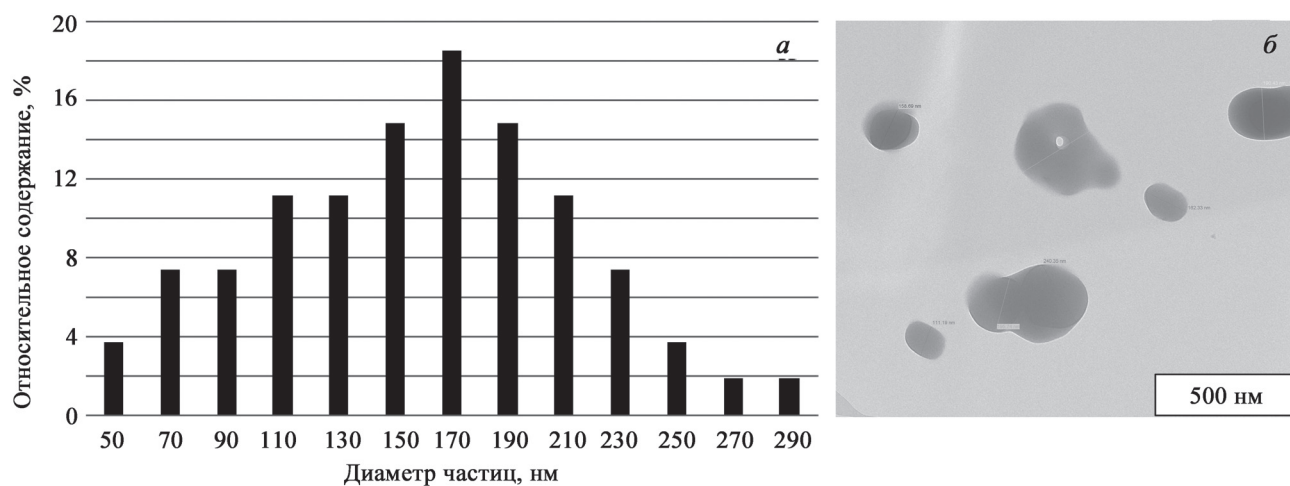


Рис. 2. Распределение частиц криомодифицированного диоксида по размерам, построенное на основании данных ПЭМ (а) и микрофотография отдельных агрегатов криомодифицированного образца (б)

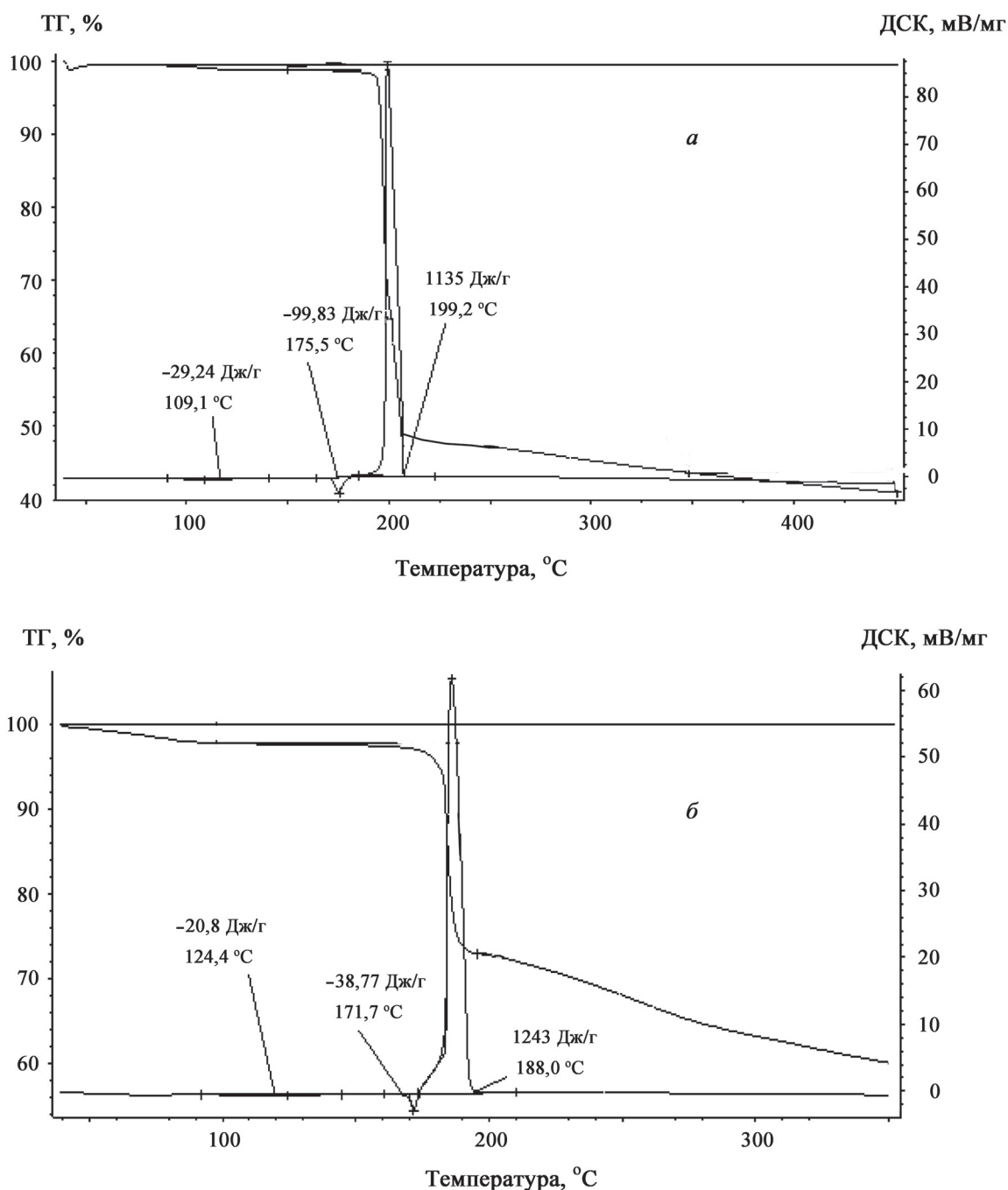


Рис. 3. Термоаналитические исследования исходного (а) и криомодифицированного (б) диоксида

цессам плавления и термического разложения. Кроме того, термоаналитические исследования позволяют различать субстанцию исходной модификации диоксида и полученную из нее новую кристаллическую модификацию.

Для криомодифицированного диоксида методом ПЭМ получены микрофотографии, которые показали, что размер его частиц меняется в диапазоне 50–400 нм. На основании полученных микрофотографий был оценен средний размер частиц криомодифицированного диоксида, который составил 170 нм (рис. 2, а).

Микрофотография отдельных агрегатов криомодифицированного образца представлена на рис. 2, б.

Данные по активности разных модификаций диоксида по отношению к *E. coli* 52 и *M. suaveum* 98, полученные диско-диффузионным методом с использованием прессованных таблеток, приведены на рис. 4.

Для штаммов бактерии *E. coli* 52 и *M. suaveum* 98 диаметр ЗПР (рис. 4) вокруг таблеток криомодифицированного диоксида оказался больше, чем диаметр ЗПР вокруг таблеток исходной

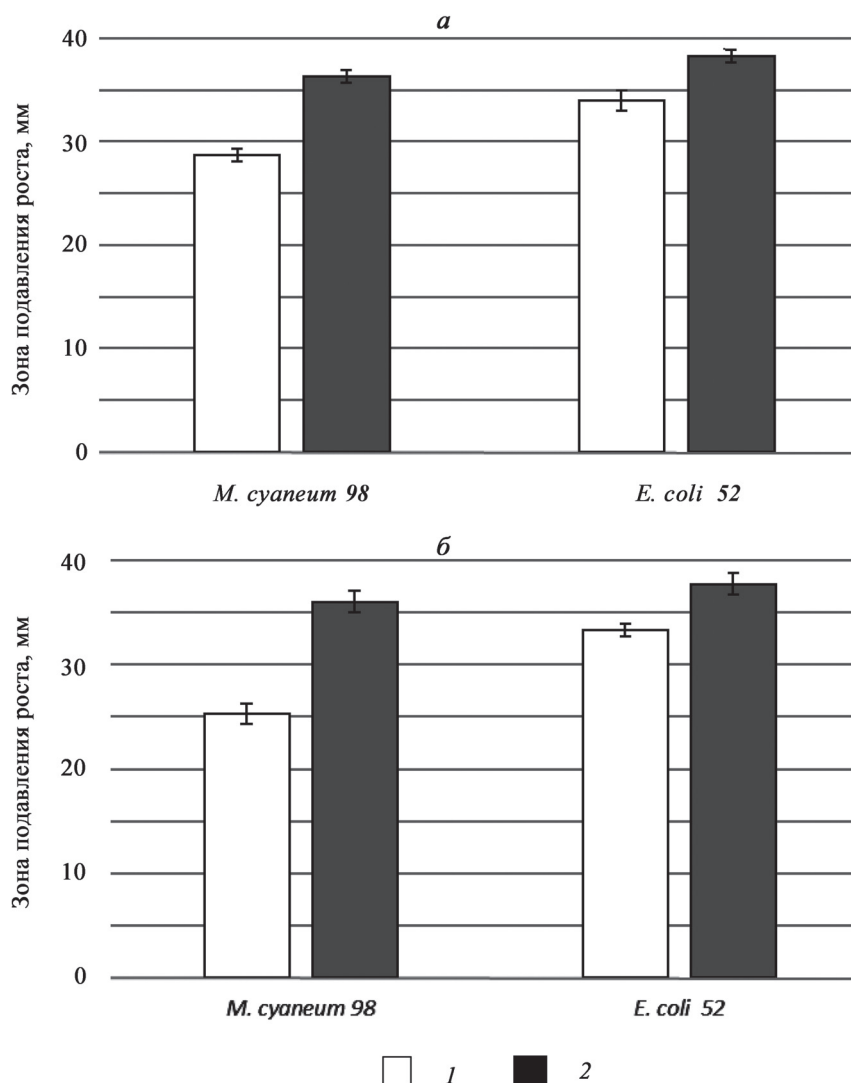


Рис. 4. Зона подавления роста *M. cyaneum 98* и *E. coli 52* вокруг таблеток исходного и криомодифицированного диоксида через 16 (а) и 24 (б) часа инкубации

модификации диоксида как через 16, так и через 48 ч инкубации.

Таким образом, методом криохимического синтеза получена наноформа новой полиморфной модификации диоксида. Диско-диффузионным

методом показано, что криомодифицированный препарат оказался более активным к процессам подавления роста бактерий *E. coli 52* и *M. cyaneum 98* по сравнению с исходной фармакопейной модификацией.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда научных исследований (проект № 16-13-10365)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Костюченко А.Л. Эфферентная терапия. СПб., 2000. 432 с.
2. Raw A.S., Furness M.S., Gill D.S., Adams R.C., Holcombe F.O., Lawrence Jr., Yu L.X. // Adv. Drug Deliver. Rev. 2004. Vol. 56. N 3. P. 397.
3. Blagden N., de Matas M., Gavan P.T., York P. // Adv. Drug Deliver. Rev. 2007. Vol. 59. N 7. P. 617.
4. Henwood S.Q., Liebenberg W., Tiedt L.R. // Drug Develop. Ind. Pharm. 2001. Vol. 27. N 10. P. 1017.
5. Braun D.E., Gelbrich T., Kahlenberg V., Tessadri R., Wieser J., Griesser U.J. // J. Pharm. Sciences. 2009. Vol. 98. N 6. P. 2010.
6. Schmidt A.C., Senfter N., Griesser U.J. // J. Therm. Anal. Cal. 2003. Vol. 73. P. 397.

7. *Velaga S.P., Berger R., Carlfors J.*// Pharm. Res. 2002. Vol. 19. N 10. P. 1564.
8. *Pasquali I., Bettini R., Giordano F.*// Adv. Drug Deliv. Rev. 2008. Vol. 60. N 3. P. 399.
9. *Сергеев Б.М., Михалев С.П., Морозов Ю.Н.*// Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2010. Т. 51. № 6. P. 440.
10. *Падейская Е.Н.*// Инфекции и антимикробная терапия. 2001. № 5. P. 150.
11. *Глушков Р.Г., Дронова Л.Н., Елина А.С.* // Хим.-фарм. журн. 1990. Т. 24. № 1. P. 33.
12. *Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания.* Под. ред. Г.Г. Онищенко. М., 2004.

Поступила в редакцию 15.07.16

CRYOCHEMICAL MODIFICATION OF DIOXIDINE ULTRAFINE POWDER AND ITS ANTIBACTERIAL ACTIVITY DETERMINATION

O.I. Vernaya*, V.P. Shabatin, A.M. Semenov, T.I. Shabatina

(Division of Chemical Kinetics; *e-mail: olga_vernaya@mail.ru)

The bioavailability and effectiveness of medicines highly depend on their crystal structure and size. Previously unknown nanosized modification of 2,3-bis(hydroxymethyl) chynoxaline-N,N'-dioxide (dioxidine) was obtained by means of cryochemical modification and carefully studied by different methods of chemical analysis: gas chromatography, NMR, x-ray diffraction, thermoanalytical methods (TG, DTG, DSC), TAM and the method of low-temperature adsorption of argon. This new modification showed higher activity against gram-positive *M. cyaneum* 98 and gram-negative *E. coli* 52 bacterial strains.

Key words: nanoparticles, dioxidine, cryochemical modification.

Сведения об авторах: *Верная Ольга Ивановна* – науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (olga_vernaya@mail.ru); *Шабатин Владимир Петрович* – ст. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (vovapsh@rambler.ru); *Семенов Александр Михайлович* – вед. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. биол. наук (amsemenov@list.ru); *Шабатина Татьяна Игоревна* – зав. лабораторией химии низких температур, вед. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, доцент, докт. хим. наук (tatyana-shabatina@yandex.ru).