

УДК 577.18 615.33

СТРУКТУРА И СТАБИЛЬНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ФТОРХИНОЛОНОВ С ГИДРОКСИПРОПИЛ- β -ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ

И.М. Дейген¹, А.М. Егоров^{1,2}, Е.В. Кудряшова¹

¹кафедра энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова;
²Российская медицинская академия последипломного образования Министерства здравоохранения Российской Федерации (РМАПО) e-mail: Helena_koudriachova@hotmail.com)

Исследованы физико-химические свойства, структура и стабильность комплексов фторхинолонов (левофлоксацина, офлоксацина и моксифлоксацина с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином (ГПЦД)) методом ИК-спектроскопии. Определены оптимальные условия образования комплексов (рН 4, избыток ГПЦД (2:1)). Методом УФ-спектроскопии продемонстрировано, что комплексообразование с ГПЦД позволяет повысить растворимость фторхинолонов в 2–5 раз в зависимости от препарата. Полученные результаты открывают перспективы разработки новых лекарственных форм фторхинолонов.

Ключевые слова: фторхинолоны, циклодекстрин, комплексы «гость–хозяин», ИК-спектроскопия.

Список сокращений: фторхинолоны – ФХ, левофлоксацин – ЛФ, офлоксацин – ОФ, моксифлоксацин – МФ, циклодекстрины – ЦД, 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин – ГПЦД.

Фторхинолоны – высокоэффективные антибактериальные препараты, нашедшие широкое применение в терапии инфекций, в том числе резистентных форм туберкулеза [1–5]. При лечении острых резистентных форм туберкулеза требуется длительная медикаментозная терапия с многократным применением высоких доз. Один из наиболее перспективных методов создания новых лекарственных форм пролонгированного действия – применение сверхкритических флюидных технологий (СКФ) для проведения инкапсуляции лекарственных компонентов с использованием биodeградируемых полимеров, в первую очередь, полимолочной кислоты с применением добавок, необходимых для оптимизации биофармацевтических свойств микрочастиц, получаемых методом СКФ. В качестве таких добавок наиболее перспективными представляются циклодекстрины – природные циклические олигосахариды с варьируемым диаметром пор, а также их производные [6]. ЦД широко применяются в фармацевтике в качестве комплексообразующих агентов, которые повышают растворимость лекарственных субстанций в воде, а также увеличивают их биодоступность и стабильность [7]. Благодаря наличию гидрофобной полости и полярной поверхности ЦД могут образовывать в водных растворах комплексы включения «гость–хозяин» с лекарственными субстанциями, которые представляют

собой амфифильные органические молекулы. В том случае, когда «гость» обладает положительным или отрицательным зарядом, прочность комплекса ЦД–субстрат уменьшается в 2–30 раз по сравнению с нейтральной формой того же лиганда [8–10].

Цель представленной работы – исследование физико-химических свойств комплексов ряда клинически значимых фторхинолонов: ОФ, ЛФ и МФ с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином, который разрешен FDA для использования в фармацевтике [11]. Для решения поставленной задачи нами применен метод ИК-спектроскопии Фурье как удобный и высокоинформативный метод анализа структуры и свойств надмолекулярных ансамблей [12].

Экспериментальная часть

Материалы

В работе использовали 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин («Sigma», США), ЛФ и ОФ («Zhejiang Kangyu Pharm Co Ltd.», Китай), МФ («Sansh Biotech Pvt Ltd.», Индия).

Методы

Получение комплексов ФХ–ГПЦД. Раствор ФХ (2 мг/мл, рН 2–7) смешивали с раствором ГПЦД (рН 2–7). Концентрация ФХ во всех образцах составляла 1 мг/мл. Мольный избыток ГПЦД относительно ФХ варьировали в интерва-

ле 0,25–10,00. Комплексы инкубировали в течение 15 мин при перемешивании при комнатной температуре.

Исследование высвобождения компонентов комплекса. Диализ исследуемых комплексов ЛФ–ГПЦД проводили с использованием диализной мембраны (Serva, MW cut-off 3 кДа). Систему инкубировали в течение 3 ч при температуре 37°C, отбирая аликвоты по 30 мкл для регистрации ИК-спектров.

Исследование растворимости комплексов. К 3 мг сухого МФ, ЛФ, ОФ добавляли ГПЦД из расчета 1:1, М/М. Смеси растворяли в 200 мкл соляной кислоты (рН 4). В качестве контроля готовили аналогичные суспензии ФХ без ГПЦД. Образцы инкубировали при перемешивании при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего проводили центрифугирование 10 мин при 8000 г_г. Для регистрации УФ-спектров ФХ-содержащих растворов отбирали по 5 мкл супернатанта и разбавляли соляной кислотой (рН 4).

ИК-спектроскопия. ИК-спектры регистрировали на ИК-спектрометре Фурье «Tensor 27» («Bruker», Германия), оснащенного термостатом «Huber» (США) при 22°C [12].

Обсуждение результатов

ИК-спектры фторхинолонов. В работе изучали спектральные свойства трех лекарственных препаратов – МФ, ОФ и его левовращающего изомера (ЛФ). Молекулы ФХ содержат множество функциональных групп, способных поглощать в ИК-области: карбоксильную группу, карбонильную группу хинолона, ароматическую хинолоновую группировку, пиперазольное кольцо и ряд других групп. ИК-спектры растворов ЛФ и ОФ обладают сходной структурой, что согласуется с их идентичным строением (рис. 1, А).

Анализ ИК-спектров, полученных при разных значениях рН (рис. 1, Б, В), позволил провести соотнесение основных полос поглощения ЛФ с использованием литературных данных

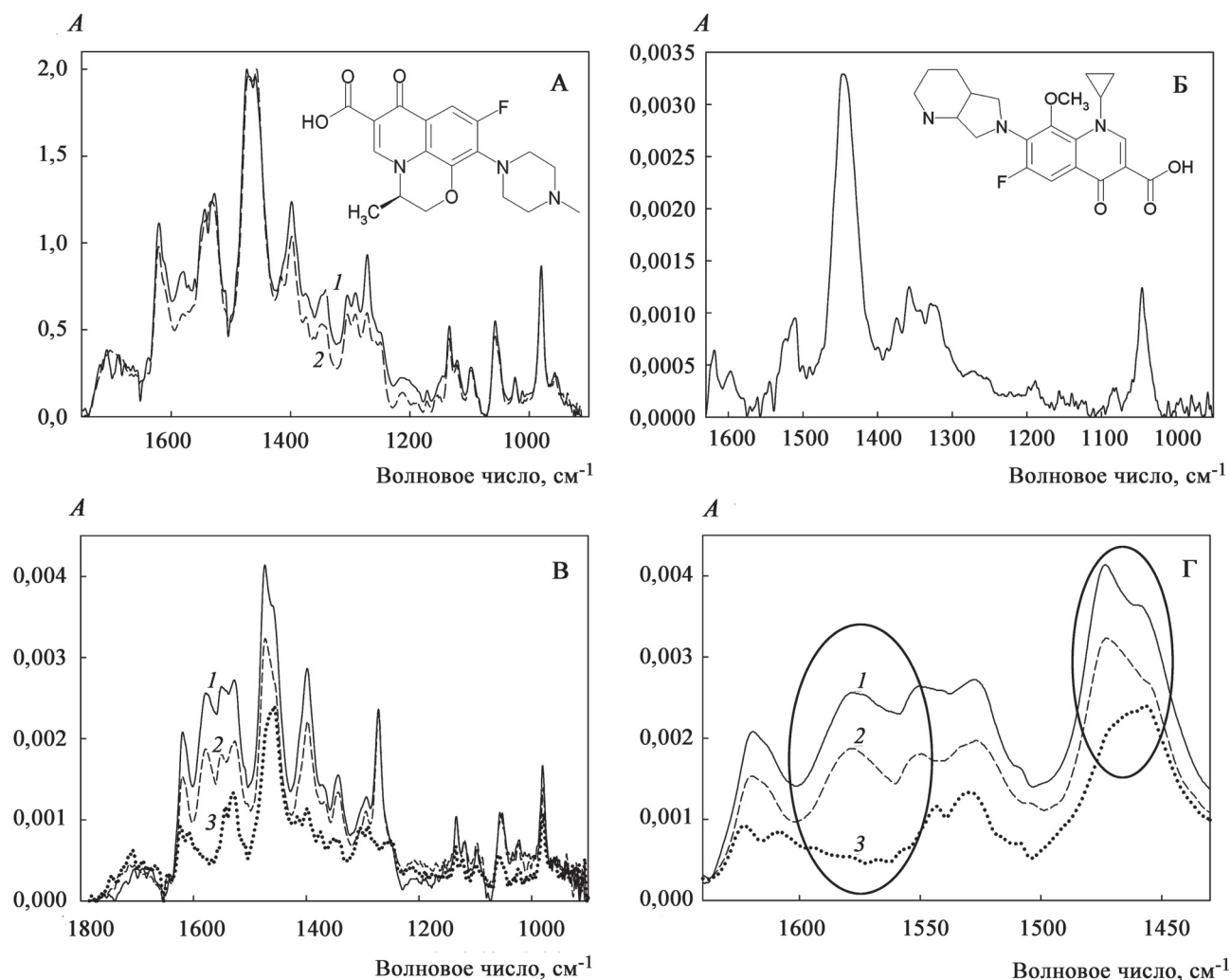


Рис. 1. ИК-спектры: А – ОФ (1) и ЛФ (2) (5 мг/мл, рН 4); Б – МФ (1 мг/мл, рН 4); В, Г – ЛФ при рН 7 (1), рН 4 (2), рН 2 (3), область поглощения 1650–1450 см⁻¹

Основные полосы поглощения в ИК-спектре левофлоксацина

Группа	Положение пика, см ⁻¹	Группа	Положение пика, см ⁻¹
СО в СООН	1730–1720	С–N	1390–1350, 1339, 1208
СО	1630–1620	С–О в СООН	1280–1270
С=C хинолон	1606–1549	СОС	1100
СОО ⁻ (только в рН 4,7)	1580	СF	1050–1040
С–С ароматического остова	1500–1400	CN, CH пиперазол	979

[13–16]. Наиболее интенсивные полосы поглощения в ИК-спектрах ЛФ и ОФ (полосы 1456 и 979 см⁻¹) относятся к ароматической структуре хинолона и пиперазольной группе соответственно, которые являются аналитически значимыми и могут быть использованы для определения содержания ЛФ и ОФ в системе. Полное соотношение полос поглощения в спектрах левофлоксацина и офлоксацина представлено в таблице. В ИК-спектре МФ (рис. 1, Б) присутствуют наиболее интенсивные полосы поглощения: 1445 см⁻¹ (соответствует колебаниям связи С=C в ароматической структуре хинолона) и 1045 см⁻¹ (соответствует колебаниям связи С–F). Следует отметить сходство спектров левофлоксацина и моксифлоксацина, однако в спектре последнего отсутствуют полосы 1100 и 979 см⁻¹ ввиду различий в структуре молекул.

Комплексообразование ФХ с ГПЦД при рН 4 приводит к увеличению интенсивности основных полос поглощения ЛФ. На рис. 2, А приведены спектры несвязанного ЛФ и ЛФ–ГПЦД (1:10) при рН 4. Происходят изменения в области 1620–1520 см⁻¹, соответствующей поглощению С=О-группы и ароматической структуры хинолона. Интересно отметить, что полоса поглощения 1270 см⁻¹, соответствующая колебанию связи С–О карбоксилат-иона, претерпевает небольшое смещение (1272–1274 см⁻¹), и происходит заметное повышение интенсивности пика. Изменения в спектрах при рН 4 наблюдаются и в области колебаний связей С–О–С и С–F. Наблюдаемые изменения указывают на смену микроокружения вышеуказанных функциональных групп за счет комплексообразования. Изменений в структуре полос пиперазольного кольца, включая связь С–N, которая соединяет пиперазольное кольцо с ароматической структурой хинолона, практически не наблюдает-

ся. Это указывает на отсутствие участия данных групп в комплексообразовании, что подтверждается квантово-химическими расчетами [17].

Комплексообразование МФ с ГПЦД при рН 4 приводит к аналогичным изменениям в спектре (рис. 2, В). В первую очередь следует отметить изменение в области поглощения карбонильной и карбоксильной групп (1720–1600 см⁻¹), а также в области поглощения С=C-связей ароматической структуры МФ (1455 см⁻¹). Полосы поглощения связи С–N (ароматический третичный амин) (1360 см⁻¹) и связи С–F (1050 см⁻¹) также претерпевают изменения. Указанные изменения в ИК-спектрах МФ усиливаются при увеличении содержания ГПЦД в системе.

Таким образом, комплексообразование происходит за счет взаимодействия ароматической части молекулы ФХ с ЦД. Полученные результаты согласуются с литературными данными [18]. Применение комплексов как лекарственных форм требует решения вопроса о их стабильности при смене рН, поскольку переход от кислых растворов к физиологическим щелочным может привести к диссоциации комплекса.

Устойчивость комплекса ЛФ–ГПЦД при переходе от кислых растворов (рН 4) к щелочным средам (рН 7) изучена на примере комплекса ЛФ–ГПЦД. На рис. 2, Б приведен ИК-спектр левофлоксацина в комплексе с ГПЦД при рН 7. При смене рН системы с 4 до 7 в спектре эквимольного комплекса ЛФ–ГПЦД обнаруживается ряд изменений (рис. 2, Г). В первую очередь различия в спектрах проявляются в повышении интенсивности полос поглощения, задействованных в комплексообразовании, в меньшей степени наблюдаются изменения в структуре полос. Это свидетельствует более о влиянии рН на спектр ЛФ, находящегося в комплексе, нежели о диссоциации комплекса.

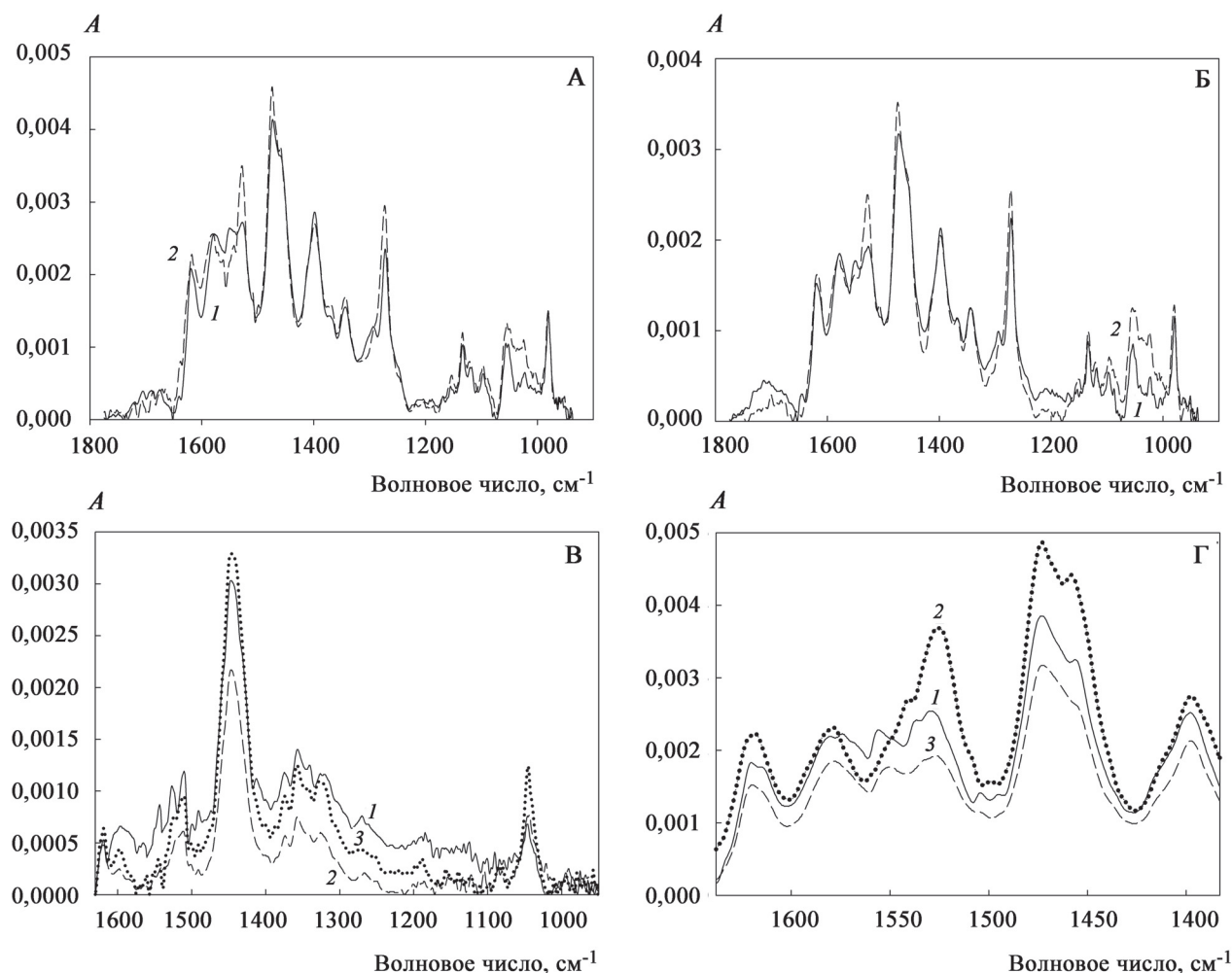


Рис. 2. ИК-спектры: ЛФ (1), комплекс ЛФ–ГПЦД (1:10) (2) при рН 4 (А) и при рН 7 (Б); В: ИК-спектры комплекса МФ–ГПЦД (1:1) (1) и (1:10) (2) в сравнении со спектром несвязанного МФ (3) при рН 4; Г: ИК-спектры комплекса ЛФ–ГПЦД (1:1) в рН 4 (1); после изменения рН от 4 до 7 (2), несвязанного в комплекс ЛФ при рН 7 (3)

Более того, сравнивая спектр комплекса ЛФ–ГПЦД при рН 7 со спектром несвязанного ЛФ при том же рН 7, нельзя не отметить серьезную разницу в спектрах, свидетельствующую о сохранении ЛФ в связанном с ГПЦД состоянии при смене рН системы (рис. 2, Г). Необходимо учесть тот факт, что образование комплекса приводит к повышению интенсивности полос поглощения ЛФ как при рН 4, так и при рН 7 (рис. 2, А, Б). Таким образом, можно заключить, что комплекс, образованный при рН 4, не диссоциирует при изменении рН среды до 7, что делает его перспективным для дальнейших исследований в целях разработки на его основе лекарственного препарата.

Исследование кинетики высвобождения ФХ из комплексов с ГПЦД. Кинетику высвобождения ЛФ из комплекса с ГПЦД, а также стехиометрический состав комплекса исследовали методом равновесного диализа при рН 4. Предполагается, что на первой стадии будет высвобождаться ЛФ, не включенный в комплекс с ГПЦД, а ЛФ,

связанный с ГПЦД, будет высвобождаться более медленно. Сравнение с кинетической кривой высвобождения свободного ЛФ позволит определить количество ФХ, связанного в комплекс с ГПЦД. Для слежения за накоплением препарата во внешнем растворе была использована полоса 1270 см^{-1} в ИК-спектре ЛФ, которая соответствует колебаниям связи С–О в карбоксильной группе. Данная полоса удалена от основной полосы циклодекстрина (1035 см^{-1}) и малочувствительна к комплексообразованию. На рис. 3 представлены кинетические кривые высвобождения ЛФ из эквимольного комплекса ЛФ–ГПЦД по сравнению с системой в отсутствие ГПЦД при рН 4. Из рис. 3, А следует, что комплексообразование с ГПЦД приводит к существенному изменению профиля высвобождения ЛФ. Первые 20 мин происходит высвобождение не связанного в комплекс ЛФ: кривые накопления препарата во внешнем растворе идут параллельно. Далее наблюдается существенное расхождение в профиле высвобождения ЛФ в при-

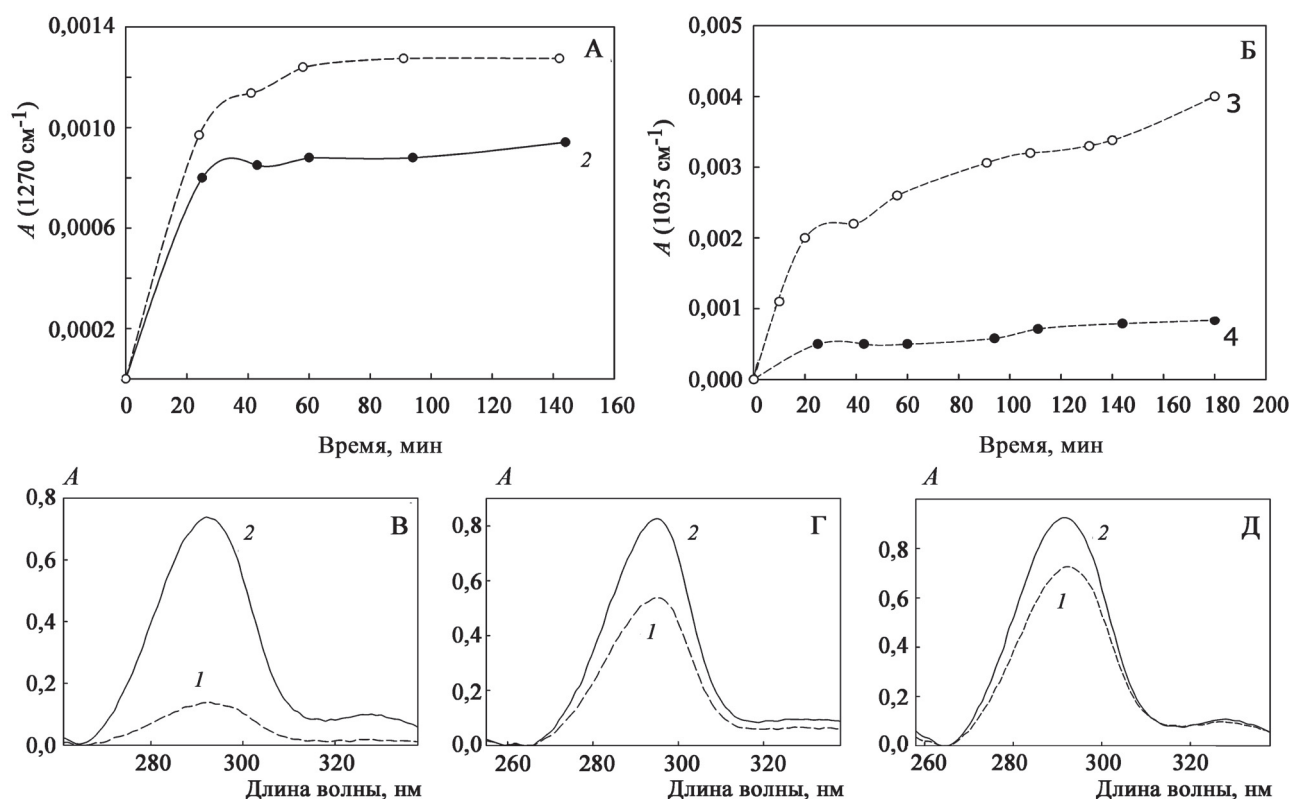


Рис. 3. Кинетические кривые высвобождения ЛФ (А) и ГПЦД (Б) из комплекса ГПЦД–ЛФ(1:1) (2 и 4) в сравнении со свободным ЛФ (А) (1) и ГПЦД (Б) (3) при pH 4, 37°C; УФ-спектры супернатантов свободных фторхинолонов (1) и в комплексе с ГПЦД (2) при pH 4; В – ЛФ; Г – МФ; Д – ОФ

сутствии ГПЦД: высвобождение оставшейся части препарата ЛФ замедлено по сравнению с контрольной системой, что связано, очевидно, с включением определенного количества ЛФ в состав комплекса с ГПЦД. Количество ЛФ, включенного в комплекс, составляет 35% от общего количества ЛФ.

Комплексообразование замедляет также и высвобождение ГПЦД, как следует из сравнения кинетических кривых высвобождения ГПЦД в отсутствие и в присутствии ЛФ (рис. 3, Б). Данный факт подтверждает существование прочного комплекса ЛФ–ГПЦД при данных условиях. По-видимому, диализ позволяет отделить компоненты комплекса, не связавшиеся на начальном этапе процесса, а далее происходит медленное высвобождение ЛФ за счет диссоциации комплекса. Состав системы ЛФ:ГПЦД = 1:2, установленный в результате анализа различия кинетических кривых высвобождения ЛФ и ГПЦД, указывает на то, что помимо стехиометрического комплекса ЛФ:ГПЦД = 1:1 в системе удерживается избыток ГПЦД, возможно, за счет образования водородных связей с ЛФ.

Влияние комплексообразования с ГПЦД на растворимость ЛФ, ОФ и МФ. При разработке лекарственных форм фторхинолонов с использованием ГПЦД в качестве носителя важным аспек-

том является влияние комплексообразования с ГПЦД на растворимость ФХ. На рис. 3, В–Д приведены УФ-спектры супернатантов, полученных в результате центрифугирования суспензии фторхинолонов при pH 4 в отсутствие и в присутствии ГПЦД. Наблюдаемое увеличение интенсивности УФ-спектров в присутствии ГПЦД соответствует большему количеству растворенного ФХ. В результате установлено, что комплексообразование с ГПЦД приводит к значительному увеличению растворимости всех изученных препаратов ФХ. Анализ представленных спектров показал, что растворимость ЛФ, МФ и ОФ увеличивается примерно в 5; 2 и 1,5 раза соответственно.

Таким образом, исследованы физико-химические свойства, структура и стабильность комплексов ЛФ, ОФ и МФ с ГПЦД. С применением метода ИК-спектроскопии получена информация об изменении микроокружения функциональных групп компонентов комплекса ФХ с ГПЦД. На этой основе определены сайты взаимодействия молекул в исследуемых надмолекулярных структурах. Обнаружено, что комплексы ФХ с ГПЦД эффективно образуются в кислых средах. Методом УФ-спектроскопии продемонстрировано, что комплексообразование с ГПЦД позволяет повы-

сить растворимость ФХ в 2–5 раз в зависимости от препарата. Полученные результаты открывают

перспективы разработки новых высокоэффективных лекарственных форм ЛФ, ОФ и МФ.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 15-13-00063; в работе использовалось оборудование закупленное по программе развития МГУ в 2011г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wolfson J.S., Hooper D.C.* // *Clinical Microbiology Reviews*. 1989. Vol. 2. P. 378
2. *Willmott C.J. R., Maxwell A.* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993. Vol. 37. P. 126.
3. *Курчечек Л.Т.* // *Клиническая фармакология*. 2003. Т. 3. С. 116.
4. *Падейская Е.Н., Яковлев В.П.* *Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике*. М., 1998.
5. *Деревянко И.И.* // *Фарматека*. 2003. Т. 1. С. 20.
6. *Challa R. et al.* // *AAPS PharmSciTech*. 2005. Vol. 6. P. 329.
7. *Valentino J.S., He Q.* // *Toxicologic Pathology*. 2008. Vol. 36. P. 30.
8. *Boogaard M.* *Cyclodextrin-containing supramolecular structures*. Ph.D.: Thesis. Groningen, 2003.
9. *Saenger W.* // *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1980. Vol. 19. P. 344.
10. *Szejtli J.* *Cyclodextrins and their inclusion compounds*. Budapest, 1982.
11. *Eifler A.C., Shad Thaxton C.S.* // *Biomedical Nanotechnology*. 2011. Vol. 726. P. 325.
12. *Deygen I.M., Kudryashova E.V.* // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2014. Vol. 40. P. 547.
13. *Gunasekaran S., Rajalakshmi K., Kumaresan S.* // *Spectrochim. Acta. Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2013. Vol. 112. P. 351.
14. *Goyne K.W., Chorover J., Kubicki J.D., Zimmerman A.R., Brantley S.L.* // *J. Colloid Interface Sci.* 2005. Vol. 283. P. 160.
15. *Pandey S., Pandey P., Tiwari G., Tiwari R., Rai A.K.* // *Indian J. Pharm. Sci.* 2009. Vol. 71. P. 359.
16. *Sahoo S., Chakraborti C.K., Mishra S.C., Naik S., Nanda U.N.* // *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2011. Vol. 2. P. 268.
17. *Yu L., Han B., Chen Y.* // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2002. Vol. 106. P. 4678.
18. *Misiuk W., Jozefowicz M.* // *Journal of Molecular Liquids*. 2015. Vol. 202. P. 101.

Поступила в редакцию 01.08.15

STRUCTURE AND STABILITY OF FLUOROQUINOLONS – 2-HYDROXYPROPYL-CYCLODEXTRIN, PERSPECTIVE ANTI-TUBERCULOSIS FORMULATIONS

I.M. Deygen¹, A.M. Egorov^{1,2}, E.V. Kudryashova¹

¹*Division of chemical enzymology, Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University;* ²*Russian Academy of postgraduate education, Russian Ministry of health care*

The host–guest complex formation of fluoroquinolons (FQ), levofloxacin, ofloxacin and moxifloxacin with HP- β -CD was studied by spectroscopy methods. Stoichiometry and dissociation constant of the inclusion complexes were determined. The complex formation of FQ with HP- β -CD was confirmed by solubility studies, UV, FT-IR spectra and equilibrium dialysis. By complex formation with HP- β -CD, the prolonged release of levofloxacin was observed in dialysis experiments. The solubility of fluoroquinolons was enhanced by two-five -fold after inclusion complex formation. The research may provide basis for the development of new drug formulations of FQ based on HP- β -CD as a nanocarrier system.

Key words: fluoroquinolons, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, guest-host complex, FTIR.

Сведения об авторах: Дейген Ирина Михайловна – аспирант химического факультета МГУ (i.m.deygen@enzyme.chem.msu.ru); Егоров Алексей Михайлович – академик РАН, глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, зав. кафедрой микробиологии Российской медицинской академии последипломного образования Министерства здравоохранения Российской Федерации (РМАПО) (alex.m.egorov@gmail.com); Кудряшова Елена Вадимовна – доцент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (helena_koudriachova@hotmail.com).