

УДК 544.777

ГЕЛИ НА ОСНОВЕ БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ И НИТРАТА СЕРЕБРА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ

Е.П. Алексеева

Тверской государственной университет
Кафедра физической химии

Впервые обнаружен эффект гелеобразования при взаимодействии растворов некоторых бета-лактамных антибиотиков и нитрата серебра. Гели были исследованы методами просвечивающей электронной микроскопии (Carl Zeiss Leo 912 AB OMEGA), ИК-спектроскопии (Bruker Equinox 55), динамического рассеяния лазерного излучения (Malvern ZetaSizer Nano ZS). Для оксациллин-серебряного геля проверена антимикробная активность. Добавлены в гели различные биологически активные и лекарственные препараты с целью увеличения антигрибковых свойств гелей. Получены гели как на водной основе, так и на смеси воды со спиртом и воды с диметилсульфоксидом (ДМСО).

Ключевые слова: *натриевая соль оксациллина, натриевая соль цефотаксима, нитрат серебра, гель.*

Антибиотики относят к наиболее часто используемым препаратам для лечения инфекционных заболеваний как человека, так и животных. Кроме того, для защиты растений от болезней, вызываемых бактериями и грибами, для обеззараживания скорлупы яиц, для стимуляции роста сельскохозяйственных животных. Многие антибиотики сыграли важную роль в качестве инструментов исследования специфических функций клетки. Генетическая инженерия, например, не достигла бы сегодняшних успехов, если бы антибиотики не использовались при отборе легко выявляемых генетических маркеров [1].

К настоящему времени описано более 6000 антибиотических веществ. Разобраться в такой многообразии антибиотиков возможно только при соответствующей классификации, распределении их в определенном порядке.

На сегодняшний день наиболее часто используемыми препаратами являются пенициллины и цефалоспорины [2].

Для лечения ран и ожогов, в том числе инфицированных, издавна успешно применялись водный раствор нитрата серебра и препараты на основе коллоидного металлического серебра (колларгол и протаргол), в которых стабилизатором высокодисперсных частиц серебра служат белковые полимеры казеин и желатин [3]. Эти препараты из-за наличия в их составе белков непостоянного состава обладают аллергическим действием и не поддаются строгой стандартизации. В настоящее время

в связи с развитием явления антибиотико-резистентности микробов вновь наблюдается усиление интереса к препаратам серебра. Получены и рекомендованы к применению комплексные соединения серебра с различными аминокислотами, содержащие до 50 масс. % серебра [2–8]. Эти соединения проявляют антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* и некоторых других бактерий. Однако они обладают и недостатками. Получение лекарственных веществ в форме гелей – новое и весьма перспективное направление в фармацевтической химии. Гели как лекарственная форма зачастую удобнее привычных мазей и кремов и эффективно используются для лечения заболеваний суставов и кожи.

Проведенные ранее исследования показали, что антибиотики группы пенициллина, успешно применяемые для лечения различных инфекционных заболеваний, в том числе кожных инфекций и инфицированных ран и ожогов [2], могут образовывать устойчивые комплексы с катионами металлов, в которых в ряде случаев проявляют более высокую активность [4]. В ходе исследования взаимодействия пенициллинов и цефалоспоринов с ионами серебра(I) был обнаружен эффект образования гелей при взаимодействии растворов нитрата серебра и натриевых солей оксациллина – одного из наиболее эффективных и химически устойчивых пенициллиновых антибиотиков и цефотаксима.

Для получения оксациллин-серебряных гелей смешивали растворы натриевой соли оксациллина (NaOxa) и нитрата серебра. В первый момент образуется белый коллоидный раствор, который в течение нескольких минут (не более 10) превращается в прозрачный бесцветный гель (рис. 1).

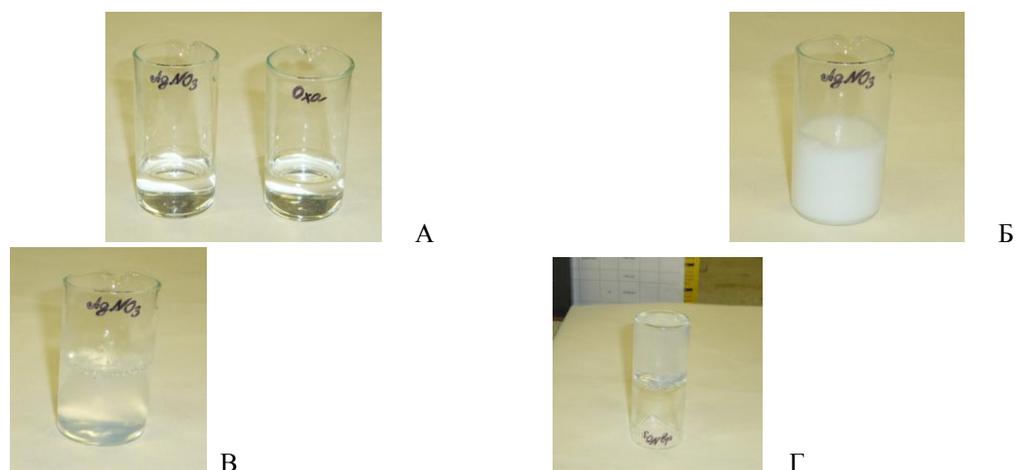


Рис. 1. Фотографии процесса получения оксациллин-серебряного геля: А – исходные растворы, Б – мутный раствор сразу после смешения, В – через 10 минут уже гель, Г – гель не течет при переворачивании стакана

Гелеобразование в системе $\text{NaOxa}-\text{AgNO}_3$ возможно при мольном соотношении компонентов от 1:1 до 9:1 и концентрации NaOxa не менее 0.07 моль/л. При меньшей концентрации антибиотика образуется бесцветный прозрачный раствор. При соотношении 10:1 образуется только бесцветный прозрачный вязкий раствор.

Гель тиксотропен: при интенсивном перемешивании его стеклянной палочкой образуется вязкая жидкость, быстро застудневающая. Термическая устойчивость геля достаточно высока. Он выдерживает нагревание до 80 °С, не теряя формы и прозрачности, происходит лишь изменение его окраски от бесцветной до темно-коричневой. При 90 °С гель разрушается с образованием осадка Ag_2S . Гелеобразование не сопровождается кислотно-основными взаимодействиями. Исходные растворы NaOxa и AgNO_3 и получаемый гидрогель имеют практически нейтральную реакцию (рН около 6).

Исследование оксациллин-серебряного гидрогеля. Известно, что взаимодействие пенициллинов с катионами металлов часто приводит к гидролизу антибиотиков [2]. Поскольку полученные оксациллин-серебряные гели предполагается использовать в медицине как антимикробные средства для наружного применения, весьма важно было узнать, сохраняется ли химическая структура молекул оксациллина в процессе получения гелей. Известно, что одним из лучших методов идентификации химических веществ является инфракрасная спектроскопия. Поэтому были записаны ИК спектры оксациллина, выделенного из раствора его натриевой соли (т.е. того, который применяется для получения гелей) и из оксациллин-серебряного гидрогеля. Твердые образцы растирали в агатовой ступке с порошком спектрально чистого (в ИК области) бромида калия и на гидравлическом прессе получали таблетки. ИК спектры таблеток записывали на Фурье ИК спектрофотометре «Equinox 55» фирмы Bruker (Германия).

Оксациллин в форме кислоты, в отличие от его натриевой соли, малорастворим в воде. Поэтому и из раствора NaOxa и из $\text{Ag}-\text{Oxa}$ геля оксациллин выделяли в виде кристаллического тонкодисперсного белого осадка путем добавления разбавленной азотной кислоты. Важно отметить, что для выделения оксациллина из геля потребовалось длительное время и постоянное интенсивное перемешивание. Однократное смешивание геля с эквивалентным количеством азотной кислоты не вызывает его разрушения. Это говорит, с одной стороны, о прочности образующихся связей между анионами оксациллина и катионами серебра, а с другой – о том, что карбоксилатные группы анионов оксациллина не задействованы в образовании связей с серебром, поскольку их протонирование не влияет на стабильность геля. Полученные ИК спектры образцов оксациллина представлены на рис. 2. Видно, что они практически идентичны, что говорит о

неизменности структуры оксациллина в процессе гелеобразования.

Также был записан спектр высушенного оксациллин-серебряного гидрогеля, который представлен на рис. 3 в сравнении со спектром оксациллина. Смещение полос поглощения и изменение их интенсивности свидетельствует о ковалентном связывании оксациллина с ионами серебра в геле.

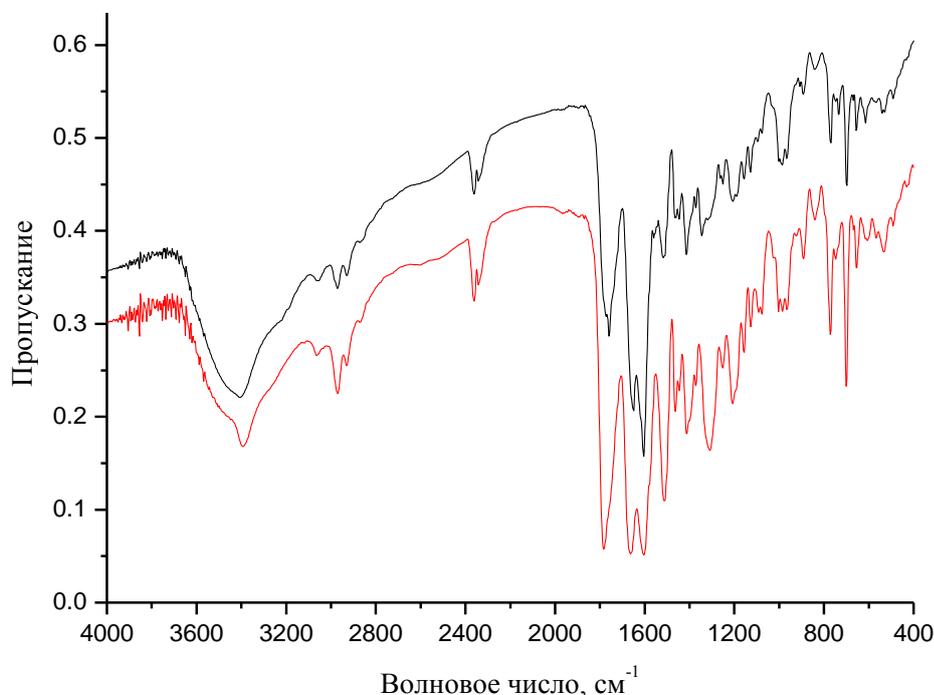


Рис. 2. ИК спектры оксациллина, верхняя – оксациллин, выделенный из натриевой соли оксациллина, нижняя – оксациллин выделенный из геля

Исследование методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показало, что надмолекулярная структура оксациллин-серебряного геля состоит из переплетенных стержнеобразных агрегатов, имеющих практически одинаковый диаметр (около 20 нм). Стержни состоят из кластеров диаметром около 3 нм (рис. 4). Анализ гидрогеля проводили в центре коллективного пользования «Просвечивающая электронная микроскопия» МГУ, используя электронный микроскоп «Leo 912 AB OMEGA» фирмы «Carl Zeiss», Германия. Раствор или гидрогель наносили на стандартную медную сетку с полимерной подложкой из формвара (поливинилформаль) толщиной около 100 нм, сушили и помещали в микроскоп.

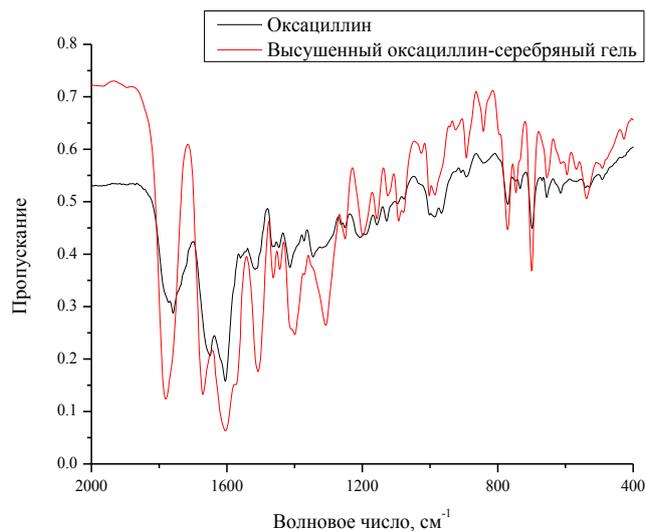


Рис. 3. ИК спектры оксациллина и высушенного оксациллин-серебряного геля

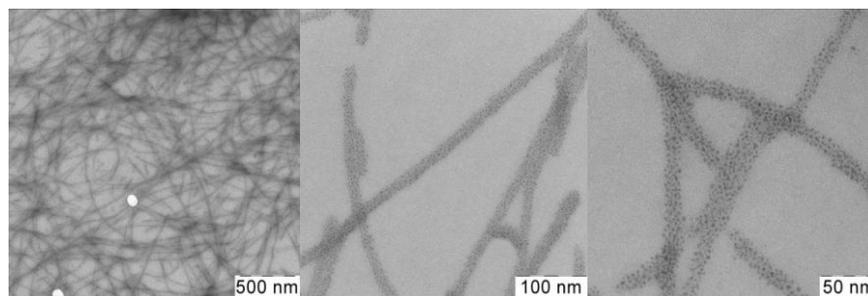


Рис. 4. Структура геля по данным просвечивающей электронной микроскопии

Оксациллин-серебряный гидрогель – устойчивая система, способная сохраняться в течение длительного времени без синерезиса. Можно отметить только происходящее постепенно, в течение нескольких суток, изменение окраски от бесцветной к желтой и далее к темно-красной. При этом гель остается прозрачным. Скорее всего изменение окраски обусловлено восстановлением Ag (I) и образованием наночастиц серебра, которые обнаруживаются методом ПЭМ (рис. 5).

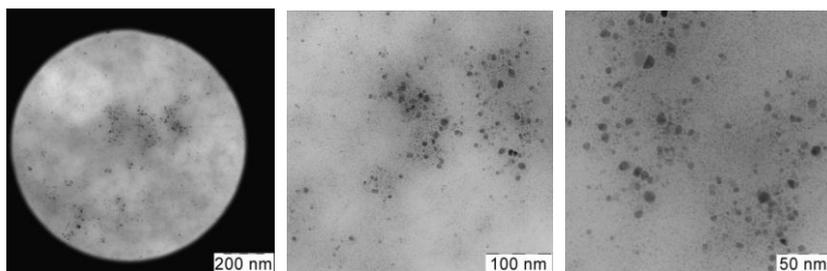


Рис. 5. Наночастицы серебра в геле

Исследование методом динамического рассеяния лазерного излучения на приборе «Malvern Zetasizer Nano ZS» раствора, содержащего NaOx и AgNO₃ в мольном соотношении 10:1 при концентрации оксациллина 0,05 моль/л, в кюветах с толщиной слоя 1 см выявило наличие в нем частиц размером около 300 нм (рис. 6).

Results

	Size (d.nm...)	% Intensity	Width (d.n...
Z-Average (d.nm): 178,3	Peak 1: 300,2	93,1	207,9
Pdl: 0,508	Peak 2: 4754	3,8	753,3
Intercept: 0,962	Peak 3: 15,55	3,1	3,763
Result quality	Refer to quality report		

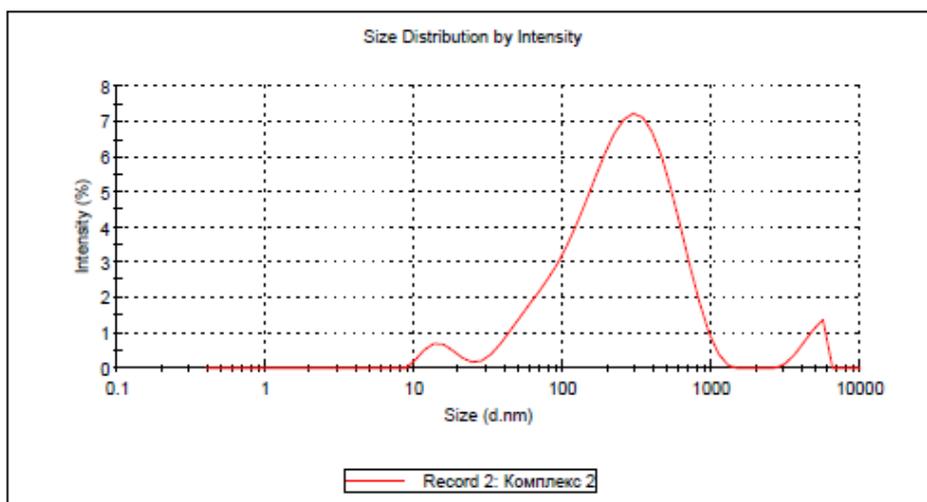
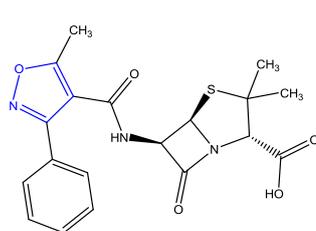


Рис. 6. Динамическое излучение на приборе «Malvern Zetasizer Nano ZS»

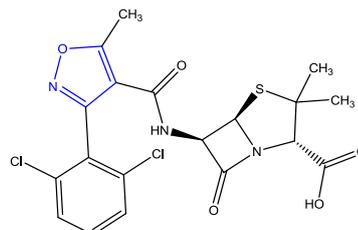
Известно, что гелеобразование в разбавленных растворах низкомолекулярных веществ – явление достаточно редкое и обусловлено образованием полимерных комплексов. Поэтому можно предположить, что в системе NaOx–AgNO₃ такие комплексы образуются.

Попытки получить гидрогели на основе других бета-лактамных

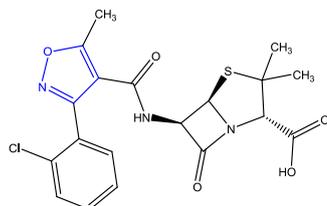
антибиотиков пока не увенчалось успехом. Вероятно, ионы Ag^+ координируют анионы Ox^- через атом азота изоксазольного цикла и тиоэфирный атом серы, и присутствие в структуре антибиотика изоксазольного цикла является принципиально важным для образования полимерных комплексов. Если это предположение верно, то аналогичные по структуре оксациллину антибиотики клоксациллин, диклоксациллин и флоксациллин также должны образовывать гидрогели при взаимодействии с раствором $AgNO_3$. К сожалению, эти препараты не производятся в России и не импортируются, и нам пока не удалось приобрести их для проведения исследований.



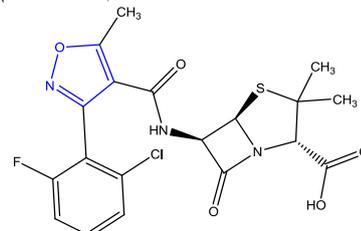
Оксациллин



Диклоксациллин

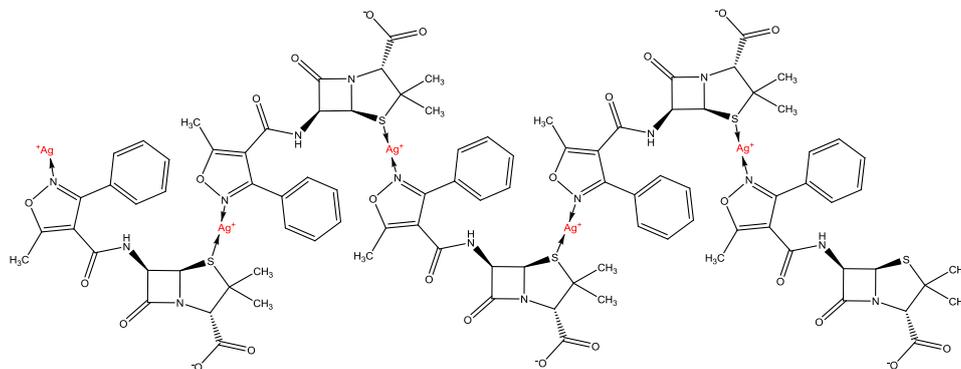


Клоксациллин

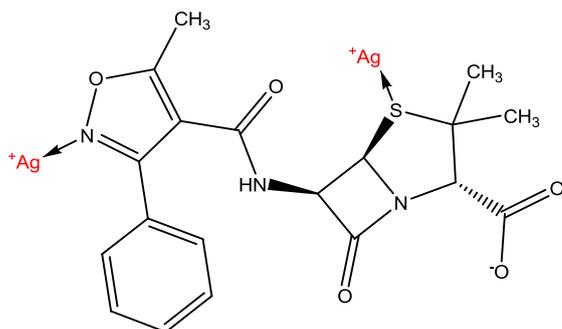


Флоксациллин

Предполагаемая структура полимерных оксациллин-серебряных комплексов:



Такая модель объясняет невозможность образования геля при избытке ионов серебра, так как это способствует образованию биядерных комплексов и препятствует образованию полимеров.



Результаты исследования антимикробной активности оксациллин-серебряного гидрогеля и его компонентов методом диффузии в агар на газоне тест-культур *Bacillus subtilis* 6633, *Staphylococcus aureus* P209 ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Shigella sonnei* III №1908, *Salmonella typhimurium* 5715, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885-653 методом приведены в таблице. Раствор NaOxa проявил активность только в отношении *B. subtilis*, *S. aureus* и *E. coli*. Гель показал высокую антибактериальную активность в отношении всех культур (таблица).

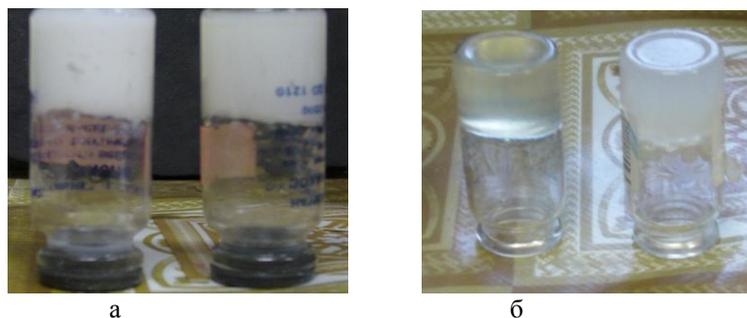
Антагонистическая активность оксациллин-серебряного гидрогеля и его исходных компонентов по отношению к тест-культурам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов

Исследуемые образцы	Зоны подавления роста тест-культур, мм						
	<i>B. subtilis</i> 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Sh. sonnei</i> III №1908	<i>Salmonella typhimurium</i> 5715	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 885-653
Раствор AgNO ₃	14	13	18	12	11	8	12
NaOxa	22	7	18	0	0	0	0
Гель	24	12	17	16	13	16	10

Для получения геля могут быть использованы растворы компонентов как в воде, так и в смеси воды с диметилсульфоксидом (ДМСО) – эффективным растворителем, применяемым также и в медицине для растворения лекарственных веществ с целью улучшения их способности проникать через кожу. Гелеобразование происходит в растворах, содержащих до 50 об. % ДМСО. При большем содержании ДМСО наблюдается лишь образование раствора желтого цвета. В то же время следует отметить, что добавка ДМСО в 10 – 30 об. % ускоряет процесс гелеобразования.

Также гели могут быть получены при использовании водно-

спиртовых растворов. Гелеобразование происходит в растворах, содержащих до 40 об. % этанола.



Р и с . 7. Фотографии гелей на основе воды со спиртом и ДМСО:
а – Оксациллин-серебряный гель, содержащий до 50 об. % ДМСО; б – Оксациллин-серебряный гель, содержащий до 40 об. % спирта

Для улучшения антибактериальных, антимикробных и антигрибковых свойств гелей были введены биологически активные и лекарственные препараты, такие как, клотримазол, хлоргексидин, соли цинка, облепиховое масло и бензипенициллин.

Получение цефотаксим - серебряных гелей. Для получения цефотаксим- серебряных гелей смешивали растворы натриевой соли цефотаксима (NaCtm) и нитрата серебра. В первый момент образуется белый коллоидный раствор, который в течение некоторого времени превращается в гель. В отличие от оксациллин - серебряного геля время образования цефотаксим - серебряного геля составляет не минуты, а несколько часов.

Цефотаксим-серебряные гели могут быть получены как на водной основе, так и на смеси воды со спиртом и воды с ДМСО.

В результате получения и исследования гелей на основе бета-лактамных антибиотиков и нитрата серебра:

1. Впервые открыт эффект образования тиксотропного геля при взаимодействии растворов нитрата серебра и натриевой соли оксациллина.

2. Показано, что гелеобразование может происходить как в случае водных растворов компонентов, так и в случае водно-спиртовых и водно-диметилсульфоксидных растворов.

3. Обнаружена повышенная антимикробная активность геля по сравнению с компонентами.

4. Показана возможность введения в гель дополнительно биологически активных и лекарственных препаратов.

5. Проведено исследование структура сетки геля современными физико-химическими методами.

Оксациллин-серебряные и цефотаксим-серебряные гели перспективны для применения в медицине как весьма удобная комбинированная лекарственная форма антибиотика и серебра, обладающая антимикробным, ранозаживляющим и микоцидным (при введении клотримазола) действием.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта У.М.Н.И.К. Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере. Гос. контракт № 14008. 2010-2011.

Список литературы

1. Ланчини Д., Паренти Ф. Антибиотики. М.: Мир, 1985. 272с.
2. Алексеев В.Г. Бионеорганическая химия пенициллинов и цефалоспоринов: монография. Тверь: Твер. гос. ун-т, 2009. 103с.
3. Страчунский Л.С., Козлов С.Н. Современная антимикробная химиотерапия. М.: Боргес, 2002. 432 с.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2-х т.– М.: Новая волна, 2005. Т. 2. 685 с.
5. Казаченко А.С., Леглер Е.В., Перьянова О.В. Синтез и антимикробная активность комплексных соединений серебра с гистидином и триптофаном // Хим.-фарм. журн. 2000. Т. 34, № 5. С. 34–35.
6. Леглер Е.В., Казаченко А.С., Казбанов В.И. Синтез и антимикробная активность комплексных соединений серебра с аргинином и глутаминовой кислотой // Хим.-фарм. журн. 2001. Т. 35, № 9. С.35–36.
7. Воронков М.Г., Коган А.С., Антоник Л.М., Лопырев В.А., Фадеева Т.В., Марченко В.И., Абзаева К.А. Антимикробное действие серебряных производных полиакриловой кислоты // Хим.-фарм. журн. 2001. Т.35, №5. С. 19.
8. Воронков М.Г., Антоник Л.М., Коган А.С., Лопырев В.А., Фадеева Т.В., Марченко В.И., Абзаева К.А. Антибактериальные и гемостатические свойства серебряных солей полиакриловой кислоты // Хим.-фарм. журн. 2002. Т.36, № 2. С. 27–29.

**GELS BASED ON BETA-LACTAM ANTIBIOTICS
AND SILVER NITRATE FOR USE IN MEDICINE**

E.P.Alekseeva

Tver State University
Department of Physical Chemistry

For the first time observed the effect of gelation in the interaction of solutions of certain beta-lactam antibiotics and silver nitrate. The gels were examined by transmission electron microscopy (Carl Zeiss Leo 912 AB OMEGA), Infrared spektroskopii (Bruker Equinox 55) and dynamic laser light scattering (Malvern ZetaSizer Nano ZS). For okatsillin-silver gel tested antimicrobial activity. Added to the gels, and various biologically active drugs to increase the antifungal properties of the gels. Gels were obtained as a water-based, and in mixtures of water with alcohol and water with dimethyl sulfoxide (DMSO).
Keywords: *sodium oxacillin, cefotaxime sodium salt, silver nitrate, the gel.*

Сведения об авторе:

АЛЕКСЕЕВА Елизавета Павловна – студентка I курса магистратуры кафедры физической химии.