

УДК 544.723:541.15:577.181.7:620.3

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ АМИКАЦИНА И ЕГО СОРБЦИОННАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ НА ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ НАНОАЛМАЗАХ

А.С. Соломатин^{1,2,*}, Р.Ю. Яковлев^{2,3}, Н.Б. Леонидов², Г.А. Бадун¹,
М.Г. Чернышева¹, И.И. Кулакова¹, А.Н. Ставрианиди¹, О. А. Шляхтин¹,
Г.В. Лисичкин¹

(¹Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова; ²РязГМУ имени
акад. И.П. Павлова; ³Институт геохимии и аналитической химии имени
В.И. Вернадского РАН; *e-mail: solo-msu@yandex.ru)

С помощью меченного тритием амикацина выявлено влияние химической природы поверхности детонационного наноалмаза на адсорбцию антибиотика. Установлено, что на наноалмазах с карбоксилированной поверхностью ($S_{уд.} = 283 \pm 5 \text{ м}^2/\text{г}$) хемосорбируется в два раза больше амикацина, чем на наноалмазах с гидрированной поверхностью ($S_{уд.} = 289 \pm 5 \text{ м}^2/\text{г}$): 48 и 22 мг/г соответственно. Показано, что выдерживание наноалмазов с иммобилизованным амикацином в виде гидрозоля в течение одного месяца приводит к высвобождению соответственно до 9,6 и 6,4 мг/г антибиотика. Полученные результаты показывают возможность создания системы доставки амикацина на основе наноалмазов.

Ключевые слова: наноалмаз, амикацин, меченные тритием соединения, адсорбция, система доставки лекарств.

Одно из наиболее интенсивно развивающихся направлений медицины и фармакологии – создание систем адресной доставки лекарственных веществ (ЛВ) [1]. Такие системы позволяют понизить токсические эффекты ЛВ за счет уменьшения дозировки и повысить эффективность ЛВ за счет направленного транспорта в пораженный орган. В качестве платформ для ЛВ рассматриваются наноконтейнеры, прежде всего липосомы, и наночастицы. На сегодняшний день наибольшее внимание фармакологов привлекают липосомы. Однако их применение сопряжено с трудностями синтеза, недостаточной универсальностью, низкой стабильностью и малым сроком хранения. Поэтому в последнее десятилетие интерес исследователей все больше смещается в сторону наночастиц, на поверхности которых могут быть иммобилизованы ЛВ. Среди различных классов наночастиц (металлы, оксиды, кремнезем, углеродные материалы), предложенных на роль носителей в системах доставки ЛВ [2], особое место занимают углеродные наноструктуры – фуллерены, графен, нанотрубки и наноалмазы детонационного синтеза (ДНА). Методы синтеза этих материалов хорошо разработаны, а их физико-химические свойства изучены [3, 4]. Судя по литературным данным, ДНА обладает существенно меньшей токсичностью, чем фуллерены и углеродные

нанотрубки [5]. К тому же частицы ДНА способны проникать через биобарьеры, в том числе гематоэнцефалический [6–8].

В отличие от других углеродных наноматериалов в настоящее время только ДНА получают в промышленных масштабах (тонны в год) из взрывчатых веществ с отрицательным кислородным балансом при детонации последних в неокислительной среде [9]. Условиями синтеза обусловлено получение первичных частиц ДНА, имеющих сферическую форму и размер 4–10 нм. Они представляют собой химически инертное алмазное ядро, покрытое деформированной углеродной оболочкой, с которой связан слой поверхностных функциональных групп [10, 11].

Высокая концентрация последних позволяет использовать широкий спектр химических реакций для функционализации и химического модифицирования поверхности алмазных наночастиц [12–14]. Функционализацию ДНА применяют для последующей иммобилизации молекул ЛВ на его поверхности путем ковалентного связывания [15], или адсорбции [16, 17]. Адсорбция ЛВ на ДНА позволяет не только сохранять специфическую активность ЛВ (например, в случае противоопухолевого препарата 4-гидрокситамоксифена в эксперименте *in vitro* [18]), но даже повышать эффективность ЛВ (например, доксорубина по отно-

шению к опухолям печени (LT2-Мус) и молочной железы (4Т1) мышей в эксперименте *in vivo* [19]).

К одним из наиболее эффективных антибиотиков, применяемых для лечения инфекционных заболеваний, включая туберкулез [20], относится социально значимый антибиотик широкого спектра действия группы аминогликозидов и противотуберкулезное средство II ряда – амикацин [21] (рис. 1).

Для амикацина, как и для других аминогликозидных антибиотиков, характерны ототоксичность и нефротоксичность [22]. Однако было отмечено, что амикацин менее токсичен, чем многие аминогликозидные антибиотики [24]. Задача получения высокоэффективной системы доставки амикацина на основе ДНА в целях снижения его дозировки и повышения эффективности действия актуальна, в особенности применительно к фтизиатрии и пульмонологии [20]. Нами установлено [8], что максимальное накопление ДНА наблюдается в легочной ткани.

Амикацин, ковалентно связанный с ДНА, проявил антибактериальную активность по отношению к *Bacillus subtilis* [25]. Тестирование показало, что минимальная подавляющая концентрация конъюгата в пересчете на амикацин была ниже, чем концентрация исходного амикацина. Однако ковалентная иммобилизация амикацина трудоемка и требует многостадийной предварительной функционализации наноалмаза. Поэтому мы сосредоточили внимание на методе адсорбционной иммобилизации амикацина на ДНА.

При выборе метода определения количества амикацина, иммобилизованного на ДНА, мы исходили из того, что он должен быть чувствительным, одинаково пригодным как для рас-

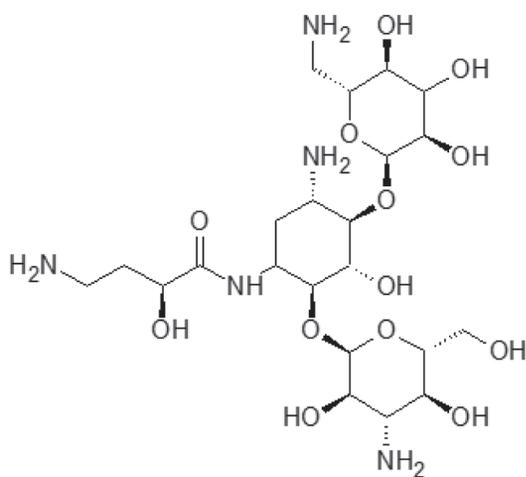


Рис. 1. Структурная формула амикацина

творов, так и для твердых наночастиц с иммобилизованным на них амикацином, не должен основываться на использовании дериватизации амикацина, чтобы структура молекулы не претерпевала изменений. Поэтому в настоящей работе мы остановились на использовании метода радиоактивных индикаторов, введении тритиевой метки в молекулу амикацина с последующей регистрацией ее методом жидкостной сцинтилляционной спектрометрии [26]. Благодаря низкой энергии β -излучения трития ($E_{\text{макс}} = 18,6$ кэВ) и большому периоду полураспада (12,3 года) меченные тритием соединения успешно используются в продолжительных по времени исследованиях, не требующих чрезвычайных мер радиационной защиты, в том числе и в биологических экспериментах [27]. Для получения меченого амикацина использовали метод термической активации трития, который успешно применяется для введения метки в сложные смеси органических соединений природного происхождения [28] и углеродные наноматериалы [29, 30].

Цель работы – выявление влияния химического состояния поверхности ДНА на адсорбционную иммобилизацию амикацина.

Экспериментальная часть

Материалы. Амикацин использован в виде субстанции сульфат амикацина (ОАО «Синтез», Курган, РФ). Наноалмаз детонационного синтеза (торговая марка УДА-ТАН) приобретен в Федеральном государственном унитарном предприятии СКТБ «Технолог» (г. Санкт-Петербург, Россия). В соответствии со спецификацией, в ДНА содержалось 0,7 мас.% негорючих примесей. Для снижения их содержания ДНА был последовательно обработан 0,1 М раствором NaOH и концентрированной HCl, тщательно промыт водой и высушен [31].

В работе использовали газообразный тритий производства ФГУП ПО «Маяк» (Россия). Измерение радиоактивности меченных тритием соединений проводили на приборе «RackBeta 1215» («LKB-Wallac», Финляндия) в жидком сцинтилляторе «Ultima Gold» («PerkinElmer», США). Использованы дигидрофосфат калия («ХЧ» ГОСТ 4198-75, «Химмед», Россия), метанол («HPLC grade», «Merck», Германия), остальные реактивы и растворители были приобретены в фирме «Sigma» (США).

Физико-химические методы исследования ДНА. Структурные характеристики ДНА и раз-

мер первичных частиц изучены на сканирующем микроскопе «LEO 1455 VP» с детектором «Centarius» («Karl Zeiss», Германия) и просвечивающем электронном микроскопе марки «JEM-2100 F» («JEOL», Япония), с разрешением 2 Å в точке и 1 Å в решетке.

Удельную площадь поверхности и пористость образцов ДНА определяли методом БЭТ по низкотемпературной адсорбции азота на установке «Gimini 2390» (V1.02 t) («Micromeritics», США) с точностью ± 5 м²/г. Предварительно ДНА прогревали при $T = 120$ °С в вакууме 10^{-3} мм рт. ст.

Идентификацию функционального покрова ДНА, а также качественные изменения его в процессе функционализации подтверждали методом ИК-спектроскопии с использованием спектрометра с Фурье-преобразованием «Nicolet IR200» («ThermoScientific», США) с разрешением 2 см⁻¹. Чтобы иметь возможность проводить количественные оценки, таблетки ДНА с КВг готовили по одинаковой методике: 0,8 мг наноалмаза смешивали с 140 мг предварительно просушенного в вакууме (при 100 °С, 1 мм рт. ст.) порошка КВг и растирали в агатовой ступке. Отбирали 75 мг смеси и прессовали таблетку. Размер частиц ДНА в гидрозолях определяли методом динамического рассеяния света (ДРС) с помощью «Zetasizer Nano ZS Zen3600» («Malvern Instruments», UK).

Анализ химического состава поверхности ДНА проводили методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) на приборе «LAS-3000» («Riber», Франция). Для возбуждения фотоэлектронов использовали рентгеновское излучение алюминиевого анода ($Al K_{\alpha} = 1486,6$ эВ) при напряжении на трубке 12 кВ и токе эмиссии 20 мА. Вакуум в рабочей камере составлял 5×10^{-10} Торр. Калибровку фотоэлектронных пиков проводили по линии углерода C1s с энергией связи $E_{св}$, равной 285 эВ.

Использовали ультразвуковой диспергатор «МЭФ 93» (250 Вт/см²; «МЭЛФИЗ», Россия).

Функционализация поверхности ДНА. Получение гидрированного ДНА (ДНА-Н) выполняли по методике, предложенной в [32]. Навеску ДНА массой 500 мг выдерживали в токе водорода (2,5 л/ч) в течение 5 ч при 800 °С; использовали газообразный водород чистотой 99,99%.

Жидкофазное окисление ДНА осуществляли согласно методике, указанной в работе [33]. В стеклянной плоскодонной колбе на 150 мл, снабженной обратным холодильником, гото-

вили 75 мл смеси концентрированных HNO₃ и H₂SO₄ в соотношении 1:9 по объему. В смесь вносили 1 г ДНА и нагревали при 120 °С в течение 24 ч при постоянном перемешивании. Карбоксилированный ДНА (ДНА-СООН) отделяли центрифугированием (10000 г, 10 мин). Осадок последовательно обрабатывали 0,1 М раствором NaOH при 90 °С в течение 2 ч, затем 0,1 М раствором HCl при 90 °С в течение 2 ч. Полученный осадок снова отделяли центрифугированием, затем многократно промывали водой и высушивали на роторном испарителе при 60 °С.

Приготовление гидрозолей ДНА. Для изучения адсорбции амикацина на поверхности полученных функционализированных наноалмазов (ДНА-Н и ДНА-СООН) готовили их гидрозоли с одинаковым средним размером частиц, равным 70 ± 10 нм, по методике, описанной в работе [34]. В пластиковую центрифужную пробирку объемом 50 мл вносили 0,6 г ДНА и 40 мл дистиллированной воды. Содержимое пробирки подвергали ультразвуковой обработке в течение 1 мин и центрифугировали (6000 г, 5 мин). Такой цикл повторяли пять раз и в надосадочной жидкости определяли концентрацию ДНА. Для этого на часовое стекло, предварительно доведенное до постоянной массы, с помощью дозатора наносили 0,5 мл гидрозоля ДНА. Стекло помещали на металлическую сетку, расположенную на расстоянии 2–3 см над электрической плиткой, нагретой до 200 °С. Гидрозоль высушивали до постоянной массы. По привесу определяли массу ДНА в 0,5 мл гидрозоля и рассчитывали концентрацию исходного гидрозоля. Для каждого образца гидрозоля проводили не менее трех параллельных определений.

Синтез, очистка и анализ меченого амикацина. Меченный тритием амикацин (³H)амикацин) получали методом термической активации трития [35]. Для этого раствор, содержащий 0,4 мг сульфата амикацина, равномерно наносили на стенки реактора, замораживали и удаляли воду лиофилизацией. Затем реактор подсоединяли к установке для термической активации трития и удаляли из него воздух до остаточного давления 0,01 Па.

Реактор заполняли смесью водорода и трития с содержанием трития 23%. Диссоциацию молекул трития на атомы проводили в течение 10 с на нагреваемой электрическим током до 1700 К вольфрамовой проволоке, расположенной вдоль центральной оси реакционного сосуда. После обработки амикацина остаточный

газ откачивали из реактора. Для предотвращения термодеструкции молекул амикацина реактор охлаждали жидким азотом в течение всего эксперимента. Меченое соединение растворяли в 3 мл воды Milli-Q. Третий из лабильных положений в молекуле меченого амикацина ($-\text{O}^3\text{H}$, $=\text{N}^3\text{H}$ и $-\text{H}^3$) удаляли путем трехкратного растворения последнего в воде с последующим упариванием полученного раствора досуха.

Измерение радиоактивности меченных тритием соединений проводили на приборе «RackBeta 1215» («LKB-Wallac», Финляндия) в жидком сцинтилляторе «Ultima Gold» («PerkinElmer», США).

Анализ полученного меченого амикацина проводили методом ВЭЖХ по методике, основанной на фармакопейном определении амикацина в виде деривата с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой (ТНБС) [36]. В качестве образцов сравнения использовали водные растворы исходного сульфата амикацина с концентрациями 1,0 и 0,1 мг/мл. Образцы сравнения готовили путем растворения 50 мг сульфата амикацина в 50 и 500 мл дистиллированной воды соответственно. Далее к 200 мкл полученных растворов добавляли по 2,0 мл раствора ТНБС (33,8 мМ) и 3,0 мл пиридина. Смеси встряхивали в течение 30 с и нагревали на водяной бане при 75 °С в течение 2 ч. Затем охлаждали в воде и прибавляли 2 мл ледяной уксусной кислоты («Panreac», Испания, 99,5%). Образец исследуемого меченого амикацина готовили аналогичным образом.

Анализ проводили на хроматографе «Ultimate 3000» («Dionex», США), имеющем спектрофотометрический детектор «VWD-3400RS» («Dionex», США) с переменной длиной волны и программным обеспечением (Chromeleon 7.0). Колонка 150×4,6 мм; неподвижная фаза – силикагель C-18 (5 мкм); $T = 30$ °С («Zorbax SB-C18», «AgilentTech», США). Подвижная фаза – смесь 19,8 мМ водного раствора дигидрофосфата калия, доведенного добавлением КОН до pH 5, и метанола в объемном соотношении 3:7; скорость потока 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 20 мкл. Детектирование осуществляли при длине волны 340 нм. Длительность хроматографирования не менее двукратного времени удерживания пика амикацина. Результат рассчитывали не менее чем по 5 независимым измерениям.

Для очистки от радиоактивных примесей использовали препаративную тонкослойную хроматографию на пластинках TLC Plates, Silica Gelon Aluminium 20 X («Aldrich»).

Изучение адсорбции амикацина на ДНА.

Эксперимент по адсорбции амикацина проводили по методике, предложенной в работе [37]. Предварительно готовили раствор сульфата амикацина с концентрацией (в пересчете на амикацин), равной 96 мг/мл. Затем 2,58 мл полученного раствора смешивали с 0,92 мл раствора меченого амикацина с концентрацией антибиотика (в пересчете на амикацин), равной 53,2 мкг/мл и радиоактивностью 275 кБк/мл. Таким образом, была получена смесь меченого амикацина с немеченым с концентрацией (в пересчете на амикацин), равной 71 мг/мл и удельной радиоактивностью 72,7 кБк/мл. Далее в микропробирки, содержащие от 0,02 до 0,3 мл этого раствора, добавляли дистиллированную воду так, чтобы объем конечного раствора составил 0,7 мл. К полученным растворам добавляли по 0,3 мл гидрозоля ДНА-СООН или ДНА-Н (7,3 мг/мл).

Приготовленные смеси интенсивно встряхивали с помощью Мульти-вортекса («Biosan», Латвия) в течение 1 мин. Пробирки со смесями оставляли в ультразвуковой ванне на 24 ч при 20 °С для установления адсорбционного равновесия. Затем содержимое пробирок центрифугировали (10000 г, 30 мин), из каждой пробирки отбирали по 3–5 проб супернатанта объемом по 100 мкл, измеряли их радиоактивность и рассчитывали среднюю радиоактивность равновесного раствора. По убыли радиоактивности рассчитывали количество равновесно сорбированного амикацина.

Для определения количества хемосорбированного амикацина осадок в каждой пробирке ретиспергировали в 15 мл воды. Суспензию перемешивали, встряхивая в течение 1 ч. Далее центрифугированием (30 мин, 11000 г) отделяли осадок от промывной воды и повторяли промывку еще два раза. После промывки осадок ретиспергировали в 2 мл воды. Из каждой пробирки отбирали от 3 до 8 проб суспензии объемом по 100 мкл, определяли радиоактивность каждой пробы и по найденным значениям рассчитывали содержание хемосорбированного амикацина на образцах ДНА.

Определение стабильности системы ДНА – адсорбированный амикацин.

Суспензии, полученные после определения содержания хемосорбированного на ДНА амикацина, центрифугировали (30 мин, 11000 г) и удаляли супернатант. Осадок один раз промывали 15 мл воды и ретиспергировали в 1,5 мл воды. Пластиковые пробирки с полученными суспензиями

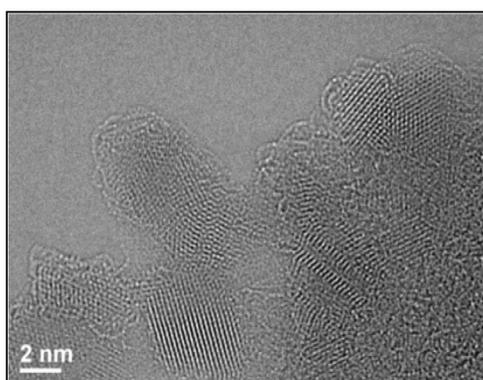


Рис. 2. Микрофотографии образца ДНА-Н по данным ПЭМ-ВР

оставляли на один месяц без доступа света. После этого суспензии центрифугировали (30 мин, 11000 g), измеряли радиоактивность супернатанта и определяли количество перешедшего в раствор амикацина.

Результаты и их обсуждение

Функционализированные ДНА представляли собой серые порошки с развитой поверхностью и пористостью. Установлено, что функционализация приводит к некоторому увеличению значения $S_{уд.}$ с 251 ± 5 до 283 ± 5 и 289 ± 5 м²/г для ДНА-Н и ДНА-СООН соответственно, что согласуется с литературными данными [11]. Для структуры порошков характерны микропоры (диаметром менее 1,7 нм) и нанопоры (в широком диапазоне до 300 нм). Средний диаметр пор

равен 11–12 нм и соответствует иерархической структуре агрегатов ДНА [11]. Следует отметить, что вклад площади поверхности стенок микропор в величину $S_{уд.}$ образцов ДНА не превышает 3%. Поверхность стенок нанопор практически равна величине $S_{уд.}$ образцов ДНА.

По данным ПЭМ-ВР, агрегаты ДНА состоят из первичных частиц сферической формы (рис. 2). На представленной микрофотографии образца ДНА-Н четко видна структура алмазного ядра частиц. Размер первичных частиц составляет 4–8 нм, что соответствует литературным данным [12]. Аналогичная картина характерна и для ДНА-СООН.

ИК-спектры исходного и функционализированных образцов ДНА приведены на рис. 3. Во всех спектрах наблюдаются характерные полосы поглощения. Отнесение полос поглощения в спектрах проводили на основании работ [38, 39]. Широкая интенсивная полоса с максимумом при 3435 см⁻¹ обусловлена наличием на поверхности ДНА связанных водородными связями гидроксильных групп молекул адсорбированной воды. В области валентных колебаний связей С–Н наблюдаются полосы поглощения при 2928 и 2856 см⁻¹. Полоса поглощения с максимумом при 1726 см⁻¹ обусловлена присутствием карбонильных групп на алмазной поверхности. Поглощение при 1631 см⁻¹ связано с деформационными колебаниями сорбированных молекул воды. Область 1400 – 1000 см⁻¹ принято относить к собственному поглощению

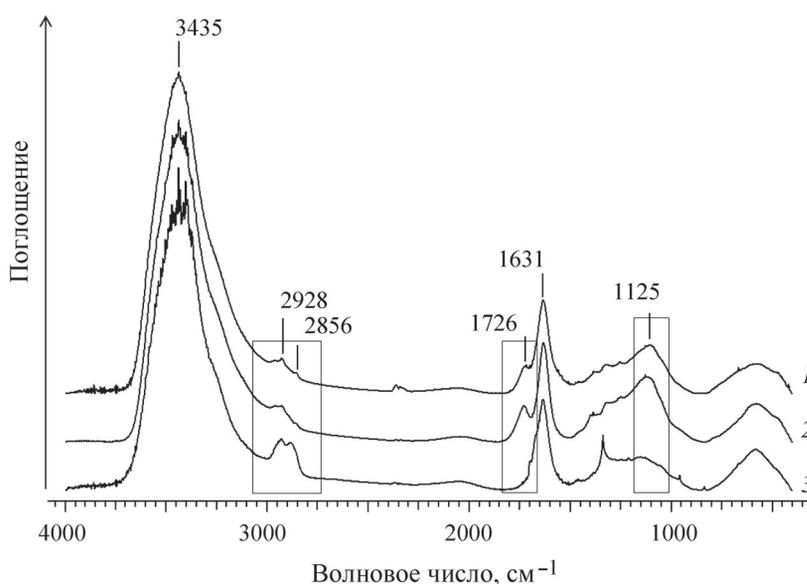


Рис. 3. ИК-спектры поглощения исследованных наноалмазов: 1 – ДНА_{исх.}, 2 – ДНА-СООН и 3 – ДНА-Н (выделены области, в которых наблюдаются наиболее значимые изменения)

Таблица 1

**Содержание основных элементов в поверхностном слое частиц ДНА
(по данным РФЭС)**

Образец	Содержание элементов, ат. %* (нормировано на С, О и N)		
	С	N	О
ДНА	93,0	1,5	5,5
ДНА-Н	95,9	1,5	2,6
ДНА-СООН	88,4	1,7	9,9

* Погрешность определения составляет $\pm 0,3$ ат. %

алмазной решетки [12]. Полоса поглощения при 1125 см^{-1} обусловлена не только поглощением решетки ДНА, но и поглощением эфирных групп С–О–С.

В спектре образца ДНА-Н наблюдается исчезновение полосы поглощения карбонильных групп (1726 см^{-1}), характерной для исходного ДНА. Также заметно снижается относительная интенсивность полосы при 1125 см^{-1} , что может быть следствием деструкции эфирных групп в процессе гидрирования. Одновременно происходит увеличение интенсивности полосы при 2928 см^{-1} и смещение полосы 2856 до 2885 см^{-1} , что также подтверждает изменение химического окружения С–Н связей. Спектры образцов ДНА (исх.) и ДНА-СООН близки, что является свидетельством схожести набора функциональных групп на их поверхности.

Изучение элементного состава поверхности исходного и функционализированных ДНА методом РФЭС показало (табл. 1), что в процессе функционализации ДНА наибольшие изменения

происходят, как и следовало ожидать, в содержании кислорода. Так, при окислении исходного ДНА содержание кислорода возросло почти в два раза и достигло ~ 10 ат. % в ДНА-СООН; при гидрировании содержание кислорода, напротив, снизилось в два раза и составило 2,6 ат. % в ДНА-Н. Количество азота при функционализации ДНА практически не изменилось, что соответствует литературным данным [11] о нахождении его преимущественно внутри алмазной решетки, которую функционализация ДНА не затрагивает. Некоторое увеличение содержания азота в карбоксилированном ДНА, возможно, связано с нитрующим действием азотной кислоты. На основании полученных результатов можно сделать вывод о повышении количества поверхностных карбонильных групп $>C=O$ (прежде всего в составе карбоксильных) в процессе окисления исходного ДНА и о полном их восстановлении в процессе гидрирования.

Таким образом, полученные образцы функционализированных ДНА имеют различный на-

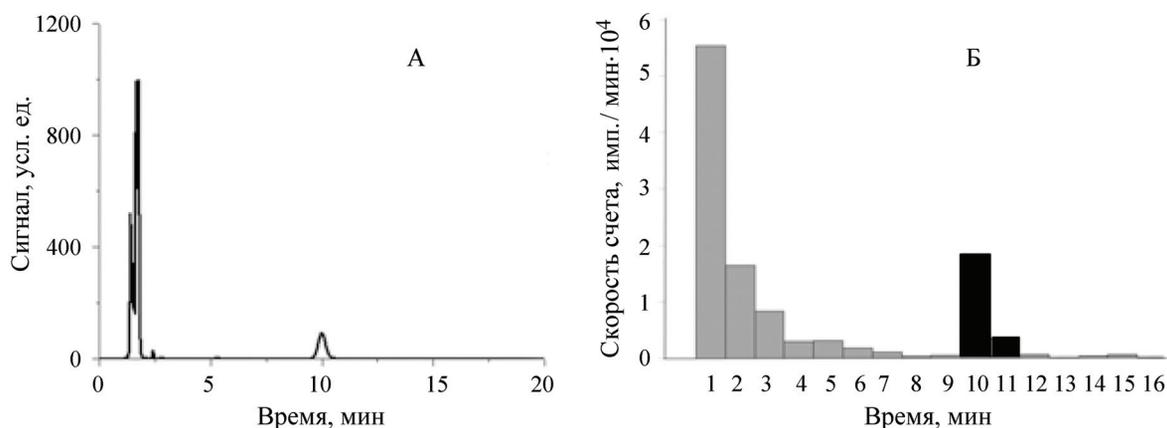


Рис. 4. А. Хроматограмма деривата амикацина (условия дериватизации и анализа приведены в [36]); Б. Скорость счета фракций, полученных после хроматографического анализа деривата [^3H]амикацина (темным цветом отмечены фракции, содержащие амикацин)

Т а б л и ц а 2

Влияние природы подвижной фазы на фактор удерживания R_f [^3H]амикацина

Состав подвижной фазы		R_f
компоненты	соотношение компонентов	
Хлороформ – метанол – аммиак – вода (ХМАВ)	1:4:2:1 [40]	0,12
	1:6:2:1	0,03
Диоксан – аммиак – вода (ДАВ)	6:3:1	0,06
	1:1:1	0,19
	1:1:3	0,30

бор и соотношение функциональных групп на поверхности их частиц. На рис. 4, А приведена типичная хроматограмма исходного раствора сульфата амикацина после дериватизации с ТНБС. Время удерживания (t_R) деривата амикацина составило 10 мин, что согласуется со значением t_R , указанным в европейской фармакопее [36].

Проведенный анализ образцов сравнения показал, что снижение концентрации амикацина с 1,0 до 0,1 мг/мл приводит к пропорциональному уменьшению площади пика деривата с $36,51 \pm 0,44$ до $3,81 \pm 0,14$ отн. ед. (для $p < 0,05$). При анализе меченного тритием препарата по площади пика, равного $2,69 \pm 0,22$ отн. ед. ($p = 0,05$), рассчитали концентрацию амикацина в образце 71 ± 6 мкг/мл, что соответствует химическому выходу [^3H]амикацина, равному 70% от взятого для эксперимента. Обнаруженное уменьшение количества амикацина, вероятно, связано с неполным его извлечением из реакционного сосуда. Отсутствие других пиков, близких к пику основного компонента, позволяет говорить о полном количественном связывании амикацина с ТНБС и отсутствием в меченом препарате продуктов, сходных по структуре с амикацином.

Отдельные фракции элюата отбирали по времени выхода из хроматографической системы и проводили измерение радиоактивности. Максимум измеренной радиоактивности приходился на фракции, соответствующие времени выхода деривата меченого сульфата амикацина, а также побочные продукты, не удерживающиеся на колонке (рис. 4, Б). Хроматографический анализ на чистоту амикацина методом ТСХ по методике, приведенной в работе [40], оказался неприменим для меченного тритием амикацина, так как мы наблюдали низкое значение R_f (0,12), и в этих условиях [^3H]амикацин плохо отделялся от радиоактивных примесей. Поэтому были выбраны

более оптимальные условия хроматографирования этого соединения (табл. 2).

Оказалось, что наилучшие условия для отделения меченого амикацина от радиоактивных примесей достигаются при использовании смеси диоксан – конц. аммиак – вода (ДАВ) состава 1:1:3, в данном случае $R_f = 0,3$ (табл. 2). При этом было обнаружено, что на хроматографических пластинках «Silufol», несмотря на большее значение фактора удерживания (0,3), наблюдается сильное размывание пятна амикацина по пластине, что может затруднить его дальнейшую препаративную очистку. Поэтому для очистки и выделения [^3H]амикацина использовали пластины фирмы «Aldrich». Анализ и выделение меченого соединения проводили в системе ДАВ, объемное соотношение компонентов 1:1:3, R_f (амикацин) 0,30. Положение амикацина на пластинке определяли с помощью нингдринового реагента при анализе немеченых стандартов. Распределение радиоактивности по пластинке при анализе в

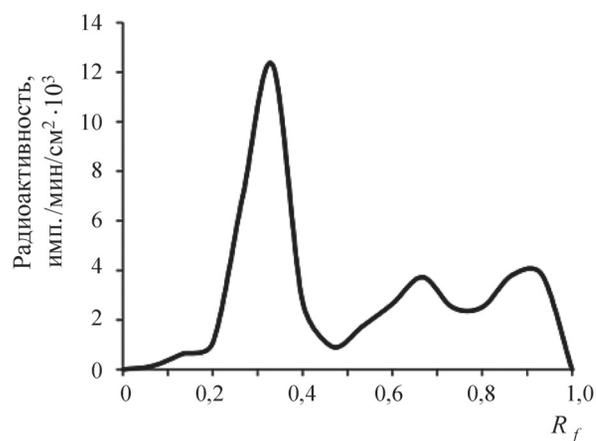


Рис. 5. Распределение радиоактивности продуктов тритирования на хроматографической пластинке. Подвижная фаза: диоксан – концентрированный аммиак – вода (1:1:3)

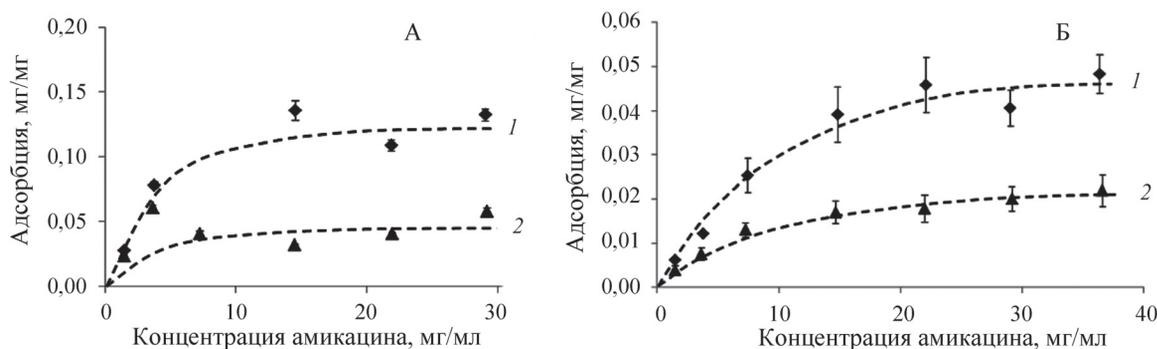


Рис. 6. А. Изотермы адсорбции амикацина на поверхности функционализированных ДНА: 1 – ДНА-СООН; 2 – ДНА-Н. Пунктирными линиями обозначены аппроксимирующие кривые; Б. Зависимость количества хемосорбированного амикацина на поверхности функционализированных ДНА от равновесной концентрации антибиотика: 1 – на ДНА-СООН; 2 – на ДНА-Н. Пунктирными линиями обозначены соответствующие аппроксимирующие кривые

системе ДАВ показано на рис. 5. Радиоактивные примеси при таком способе очистки хорошо отделялись от $[^3\text{H}]$ амикацина, чего не происходило, когда использовали систему хлороформ – метанол – концентрированный аммиак – вода (объемное соотношение компонентов 1:4:2:1, R_f (амикацин) = 0,12), рекомендованную Европейской фармакопеей [36]. Меченое соединение с сорбента элюировали сначала водой, затем 0,6 М раствором HCl . Полученные растворы объединили и упарили досуха на роторном испарителе для удаления избытка HCl . После хроматографической очистки был получен $[^3\text{H}]$ амикацин с радиохимической чистотой 96% и молярной радиоактивностью 2,8 ТБк/моль. Предел обнаружения меченого амикацина в предложенном варианте ТСХ оказался на уровне 1 пмоль.

Для изучения адсорбции амикацина на образцах ДНА-СООН и ДНА-Н были приготовлены их гидрозоли с концентрацией 7,3 мг/мл и размером частиц 70 ± 10 нм. Известно, что разрушение крупных агрегатов порошка ДНА идет по нанопорам и не должно приводить к увеличению поверхности. Поэтому величина $S_{\text{уд}}$ ДНА при переводе его в гидрозоль не должна возрастать.

В предварительных экспериментах показано, что количество амикацина, связавшегося с ДНА, не меняется при увеличении продолжительности эксперимента с 24 до 48 ч. Поэтому во всех экспериментах смесь раствора амикацина с гидрозодем ДНА выдерживали в течение суток.

На рис. 6, А представлены зависимости адсорбции амикацина на двух типах функционализированных ДНА от его равновесной концентрации в растворе. Зависимости имеют вид, сходный с изотермой Лэнгмюра. Область концентраций «насыщения» ДНА амикацином и

величина равновесной адсорбции зависят от химического состава поверхности ДНА. При равновесной концентрации амикацина в растворе выше 10 мг/мл адсорбция амикацина достигала 0,13 мг/мг на ДНА-СООН и только 0,06 мг/мг на ДНА-Н. Значительная часть физически адсорбированного амикацина удалялась при промывании препаратов водой. Количество хемосорбированного антибиотика составило 0,048 и 0,022 мг/мг для ДНА-СООН и ДНА-Н, соответственно (рис. 6, Б).

Выдерживание ДНА с адсорбированным на нем амикацином в виде водной суспензии в течение одного месяца приводит к частичной десорбции антибиотика. Количество амикацина, десорбированного с поверхности ДНА-Н, достигало 0,0064 мг/мг (30%), а с поверхности ДНА-СООН не превышало 0,0096 мг/мг (20%), что свидетельствует о более прочной адсорбции амикацина на окисленной поверхности. На основании полученных результатов можно сделать вывод о четко выраженной специфической сорбции аминокликозидного антибиотика на модифицированной поверхности ДНА.

Таким образом, данные о том, что ДНА именно с карбоксилированной поверхностью проявляют большее сродство к амикацину и имеют повышенную степень загрузки, делают перспективным применение ДНА в качестве носителя в системах доставки амикацина. Это обусловлено более высокой биосовместимостью ДНА-СООН. Так, в работе [40], где было изучено влияние функционализированных ДНА на изолированные митохондрии печени крыс, показано, что карбоксилированный ДНА практически не снижает мембранный потенциал митохондрий даже при концентрации 2,5 мг/мл.

Полученные результаты позволяют рассматривать ДНА как перспективную основу для создания системы доставки амикацина, а изменение химического состава его поверхности – как эф-

фективный инструмент варьирования его сорбционных свойств, от которых в значительной степени могут зависеть фармакологические свойства полученной системы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 16-08-01156 и № 17-03-00985), гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-4306.2018.3) и с использованием оборудования, приобретенного из средств Программы развития МГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Freitas R.A Jr.* Nanomedicine, Volume I: Basic Capabilities. Georgetown. 1999.
2. Nanotherapeutics: Drug Delivery Concepts in Nanoscience. / Ed. A. Lamprecht. Singapore. 2009.
3. *Cheng L.C., Jiang X., Wang J., Chen C., Liu R.S.* // Nanoscale. 2013. Vol. 5. N 9. P. 3547.
4. *Say J.M., Vreden C., Reilly D.J., Brown L.J., Rabeau J.R., King N.J.C.* // Biophys. Rev. 2011. Vol. 3. P. 171.
5. *Zhang X., Hu W., Li J., Tao L., Wei Y.* // Toxicol. Res. 2012. Vol. 1. P. 62.
6. *Kaur R., Badea I.* // Intern. J. Nanomedicine. 2013. Vol. 8. P. 203.
7. *Perevedentseva E., Lin Y.C., Jani M., Cheng C.L.* // Nanomedicine. 2013. Vol. 8. N. 12. P. 2041.
8. *Yakovlev R.Y., Solomatin A.S., Leonidov N.B., Kulakova I.I., Lisichkin G.V.* // Ross. J. Gen. Chem. 2014. Vol. 84. N. 2. P. 379. (*Яковлев Р.Ю., Соломатин А.С., Леонидов Н.Б., Кулакова И.И., Лисичкин Г.В.* // Рос. хим. ж. 2012. Т. 56. № 3–4. С. 114).
9. Carbon Nanomaterials Sourcebook: Graphene, Fullerenes, Nanotubes, and Nanodiamond. Vol. I. / Ed. K.D. Sattler. Boca Raton. 2016.
10. *Kulakova I.I.* // Phys. Solid State. 2004. Vol. 46. P. 621. (*Кулакова И.И.* // Физика твердого тела. 2004. Т. 46. № 4. С. 621).
11. *Kulakova I.I., Korol'kov V.V., Yakovlev R.Yu., Lisichkin G.V.* // Nanotechnologies in Russia. 2010. V. 5. P. 474. (*Кулакова И.И., Корольков В.В., Яковлев Р.Ю., Лисичкин Г.В.* // Российские нанотехнологии. 2010. Т. 5. № 7–8. С. 66).
12. *Kulakova I.I.* // Ross. Khim. Zhurn. 2004. Vol. 48. N. 5. P. 97. (*Кулакова И.И.* // Рос. хим. ж. 2004. Т. 48. № 5. С. 97).
13. *Krueger A.* // J. Mater. Chem. 2008. Vol. 18. P. 1485.
14. *Shenderova O.A., McGuire G.E.* // Biointerphases. 2015. Vol.10. N. 3. P. 030802.
15. *Liu K.K., Zheng W.W., Wang C.C., Chiu Y.C., Cheng C.L., Lo Y.S., Chen C., Chao J.I.* // Nanotechnology. 2010. Vol. 21. P. 315106.
16. *Shugalei I.V., Voznyakovskii A.P., Garabadzhiu A.V., Tselinskii I.V., Sudarikov A.M., Ilyushin M.A.* // Russ. J. Gen. Chem. 2013. Vol. 83. P.851. (*Шугалей И.В., Возняковский А.П., Гарабаджю А.В., Целинский И.В., Сударикив А.М., Илюшин М.А.* // Ж. общ. химии. 2013. Т. 83. № 5. С. 709).
17. *Rodina E.V., Valueva A.V., Yakovlev R.Y., Vorobyeva N.N., Kulakova I.I., Lisichkin G.V., Leonidov N.B.* // Biointerphases. 2015. Vol. 10. N. 4. P. 041005.
18. *Chen M., Pierstorff E.D., Lam R., Li S.Y., Huang H., Osawa E., Ho D.* // ACS Nano. 2009. Vol. 3. P. 2016.
19. *Chow E.K., Zhang X.Q., Chen M., Lam R., Robinson E., Huang H., Schaffer D., Osawa E., Goga A., Ho D.* // Sci. Trans. Med. 2011. Vol. 3. N. 73. 73ra21.
20. *Pham D., Fattal E., Tsapis N.* // Int. J. Pharm. 2015. Vol. 478. P. 517.
21. *Xie J., Talaska A.E., Schacht J.* // Hear. Res. 2011. Vol. 281. P. 28.
22. *Brummetti R.E., Fox K.E.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1989. Vol. 33. N. 6. P. 797.
23. *Turnidge J.* // Infect. Dis. Clin. N. Am. 2003. Vol. 7. P. 503.
24. *Hottendorf G.H., Gordon L.L.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1980. Vol. 18. N. 1. P. 176.
25. *Yakovlev R.Y., Leonidov N.B., Gubanok A.I.* // Antibacterial agent and method for preparing it. / RU Pat 2476215. 2012. (*Яковлев Р.Ю., Леонидов Н.Б., Губанок А.И.* // Антибактериальное средство и способ его получения / Пат. РФ 2476215. 2012).
26. Handbook of Radioactivity Analysis. 3rd Edition / Ed. M.F. L'Annunziata. Amsterdam. 2012.
27. *Feinendegen L.E.* // Tritium-labeled molecules in biology and medicine. / N.Y., 1967.
28. *Badun G.A., Chernysheva M.G., Tyasto Z.A., Kulikova N.A., Kudryavtsev A.V., Perminova I.V.* // Radiochim. Acta. 2010. Vol. 98. N. 3. P. 161.
29. *Badun G.A., Chernysheva M.G., Grigorieva A.V., Eremina E.A., Egorov A.V.* // Radiochim. Acta. 2016. Vol. 104. N. 8. P. 593.
30. *Badun G.A., Chernysheva M.G., Yakovlev R.Y., Leonidov N.B., Semenenko M.N., Lisichkin G.V.* // Radiochim. Acta. 2014. Vol. 102. N. 10. P. 941.
31. *Yakovlev R.Y., Solomatin A.S., Kulakova I.I., Lisichkin G.V., Korolev K.M., Leonidov N.B.* // Method for selective final purification of nanodiamond. / RU Pat 2506095. 2012. (*Яковлев Р.Ю., Соломатин А.С., Кулакова И.И., Лисичкин Г.В., Корольков К.М., Леонидов Н.Б.* // Способ селективной доочистки наноалмаза / Пат. РФ 2506095. 2012).
32. *Korolkov V.V., Kulakova I.I., Tarasevich B.N., Lisichkin G.V.* // Diamond Relat. Mater. 2007. Vol. 16. P. 2129.
33. *Ushizawa K., Sato Y., Mitsumori T., Machinami T., Ueda T., Ando T.* // Chem. Phys. Lett. 2002. Vol. 351. P. 105.
34. *Yakovlev R.Y., Osipova A.S., Solomatin A.S., Kulakova I.I., Murav'eva G.P., Avramenko N.V., Leonidov N.B., Lisichkin G.V.* // Russ. J. Gen. Chem. 2015. Vol. 85. N 6. P. 1565.

35. Badun G.A., Chernysheva M.G., Ksenofontov A.L. // *Radiochim. Acta*. 2012. Vol. 100. P. 401.
36. European pharmacopoeia, 8th Edition, Amikacin, P. 1533.
37. Chernysheva M.G., Myasnikov I.Y., Badun G.A. // *Diamond Relat. Mater.* 2015. Vol. 55. P. 45.
38. Pretsch E., Büllmann P., Affolter C. // *Structure determination of organic compounds. Tables of spectral data. 3rd Completely Revised and Enlarged English Edition.* N.Y., 2000.
39. Silverstein R.M., Webster F.X., Kiemle D.J., Bryce D.L. // *Spectrometric Identification of Organic Compounds.* 8th Edition. / New York. 2015.
40. Solomatin A.S., Yakovlev R.Y., Fedotcheva N.I., Kondrachova M.N., Leonidov N.B. // *Method of determining biological inequivalence of nanodiamonds.* / RU Pat 2538611. 2013. (Соломатин А.С., Яковлев Р.Ю., Федотчева Н.И., Кондрашова М.Н., Леонидов Н.Б. // Способ определения биологической неэквивалентности нанодIAMAZOB. Пат. РФ 2538611. 2013).

Поступила в редакцию 12.10.17

TRITIUM LABELLING AMIKACIN AND ITS SORPTION IMMOBILIZATION ON THE FUNCTIONALIZED NANODIAMONDS

A.S. Solomatin^{1,2*}, R.Y. Yakovlev^{2,3}, N.B. Leonidov², G.A. Badun¹, M.G. Chernysheva¹, I.I. Kulakova¹, A.N. Stavriani¹, O.A. Shlyakhtin¹, G.V. Lisichkin¹

(¹Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University) Chemistry Faculty; ²Ryazan State Medical University; ³Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry of Russian Academy of Sciences; *e-mail: solo-msu@yandex.ru)

Tritium labeling Amikacin was used to study its adsorption on detonation nanodiamonds. It was observed that adsorption capacity of carboxylated nanodiamond was two times higher than adsorption capacity of nanodiamond with hydrogenated surface. In plateau region the adsorption values were equal to 48 and 22 mg/g for carboxylated ($S_{\text{specif}} = 283 \pm 5 \text{ m}^2/\text{g}$) and hydrogenated ($S_{\text{specif}} = 289 \pm 5 \text{ m}^2/\text{g}$) nanodiamonds respectively. The storage of Amikacin-immobilized nanodiamonds in aqueous suspension within one month results 9,6 and 6,4 mg/g drug release respectively. The results of this study represent one of many components of the rational design of nanodiamond-enabled Amikacin delivery platforms.

Key words: nanodiamond, amikacin, tritium-labeled compounds, adsorption, drug delivery system.

Сведения об авторах: Соломатин Андрей Сергеевич – мл. науч. сотр. кафедры химии нефти и органического катализа химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, аспирант фармацевтического факультета РязГМУ имени И.П. Павлова (solo-msu@yandex.ru); Яковлев Руслан Юрьевич – мл. науч. сотр. ЦНИЛ РязГМУ имени И.П. Павлова, науч. сотр. лаборатории радиохимии Института геохимии и аналитической химии им. Вернадского РАН, канд. хим. наук (yarules@yandex.ru); Леонидов Николай Борисович – профессор фармацевтического факультета РязГМУ имени И.П. Павлова, докт. биол. наук; Бадун Геннадий Александрович – доцент кафедры радиохимии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (badunga@yandex.ru); Чернышева Мария Григорьевна – доцент кафедры радиохимии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (masha.chernysheva@gmail.com); Кулакова Инна Ивановна – вед. науч. сотр. кафедры химии нефти и органического катализа химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, доцент, канд. хим. наук (inna-kulakova@yandex.ru); Ставрианиди Андрей Николаевич – науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (stavrianiidi.andrey@gmail.com); Шляхтин Олег Александрович – вед. науч. сотр. кафедры неорганической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (oleg@inorg.chem.msu.ru); Лисичкин Георгий Васильевич – глав. науч. сотр. кафедры химии нефти и органического катализа химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор, докт. хим. наук (lisich@petrol.chem.msu.ru).