

МФБГОУ ВО

«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

СПЕЦИАЛЬНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

НОВИКОВ М.С.

ОЗЕРОВ А.А.

СОЛОДУНОВА Г.Н.

АНТИБИОТИКИ – АМИНОГИКОЗИДЫ

V курс IX семестр

Занятие 13

Дисциплина
СПЕЦИАЛЬНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
V курс IX семестр

ЗАНЯТИЕ № 11

АНТИБИОТИКИ – ТЕТРАЦИКЛИНЫ

ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ

1. Аминогликозиды. Стрептомицина сульфат.
2. Канамицина сульфат – фармацевтический анализ, гентамицина сульфат.
3. Получение полусинтетических аминогликозидов. Амикацин.
4. Общие требования к качеству и методы анализа.

АМИНОГЛИКОЗИДЫ

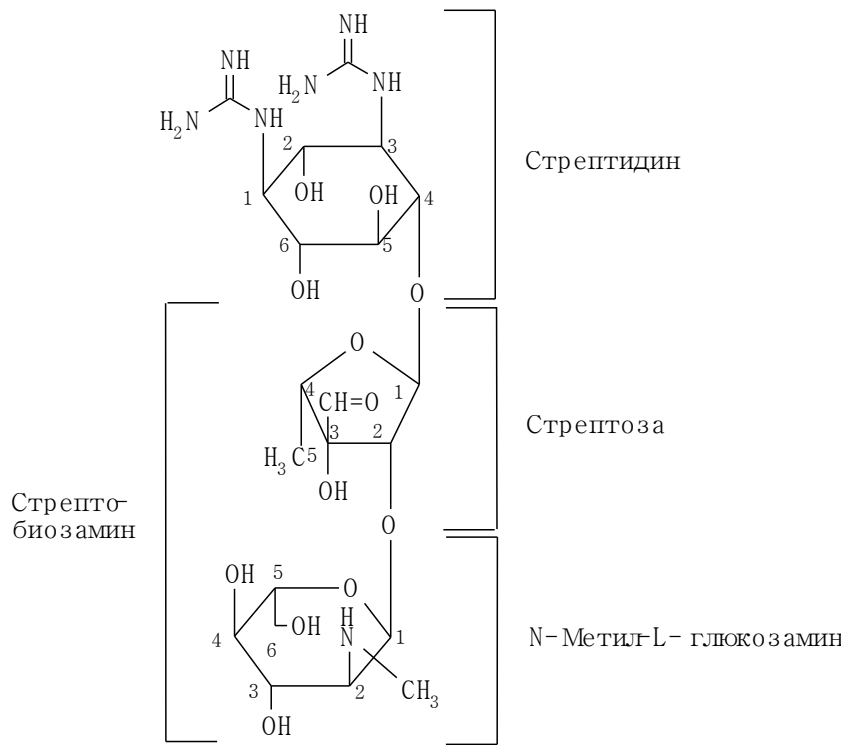
В настоящее время выделяют три поколения аминогликозидов:

- 1-е поколение – стрептомицин, неомицин, канамицин и мономицин (применение на современном этапе ограничено вследствие их токсичности);
- 2-е поколение – гентамицин, тобрамицин, сизомицин и нетилмицин;
- 3-е поколение – амикацин и изепамицин.

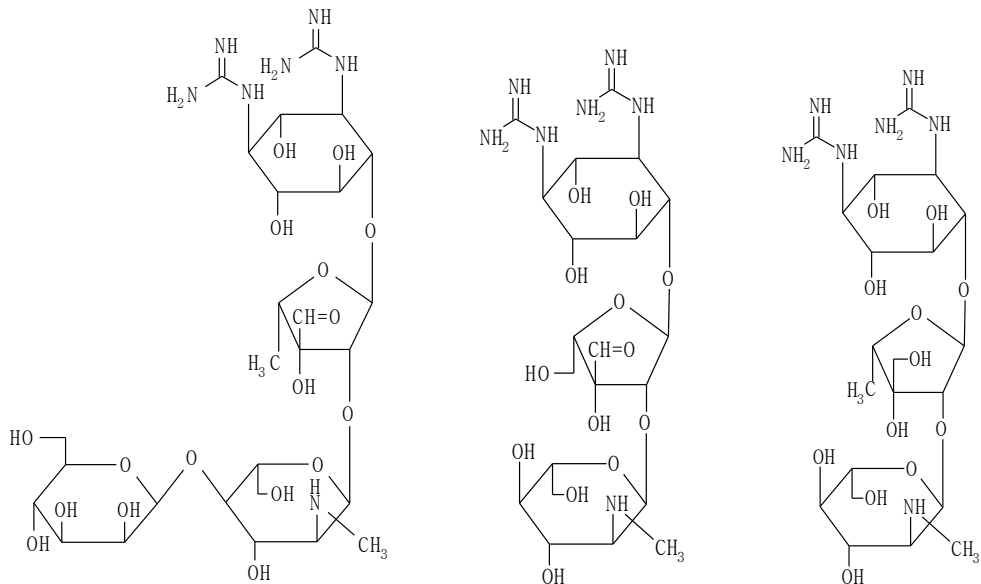
СТРЕПТОМИЦИН

Стрептомицин впервые описан в 1944 г. американским ученым З. Ваксманом, который, однако, отметил, что значительную роль в этом открытии сыграли исследования Н.А. Красильникова и других российских ученых в области изучения антагонизма актиномицетов и бактерий. В 1947-1957 гг. были выделены манно-зидострептомицин, оксистрептомицин и дигидро-стрептомицин. Из них только дигидрострептомицин обладает клинически значимой биологической активностью.

По химической структуре стрептомицин может рассматриваться как гликозид – N-метил- α -L-глюкозамидино- β -L-стрептозидо-стрептидин. Он содержит в качестве агликона стрептидин (1,3-дигуанидо-2,4,5,6-тетраоксиксиклогексан), который связан гликозидной связью с дисахаридом стрептобиозамином. Стрептобиозамин состоит из N-метил-L-глюкозамина и L-стрептозы, которая, в отличие от других сахаров, содержит две альдегидные группы (при C-1 и C-3). Таким образом, в положении 3 остатка L-стрептозы молекула стрептомицина содержит свободную альдегидную группу.



Дигидрострептомицин отличается от стрептомицина наличием спиртовой группы вместо альдегидной в молекуле L-стрептозы.



Промышленным продуцентом стрептомицина является штамм актиномицета *Streptomyces griseus*, способный образовывать до 5 мг/мл антибиотика. Питательная среда содержит соевую муку, кукурузный экстракт, глюкозу, соевое масло, ряд неорганических веществ. Процесс ферментации, выделения и очистки стрептомицина во многом сходен с получением пени-

цил-линов. Для отделения от сопутствующих веществ (в частности, от малоактивного маннозидострептомицина) стрептомицин превращают в хлоркальциевый комплекс.

В ГФ включен препарат **стрептомицина сульфат**. Это белое кристаллическое вещество, легко растворимое в воде и практически нерастворимое в органических растворителях.

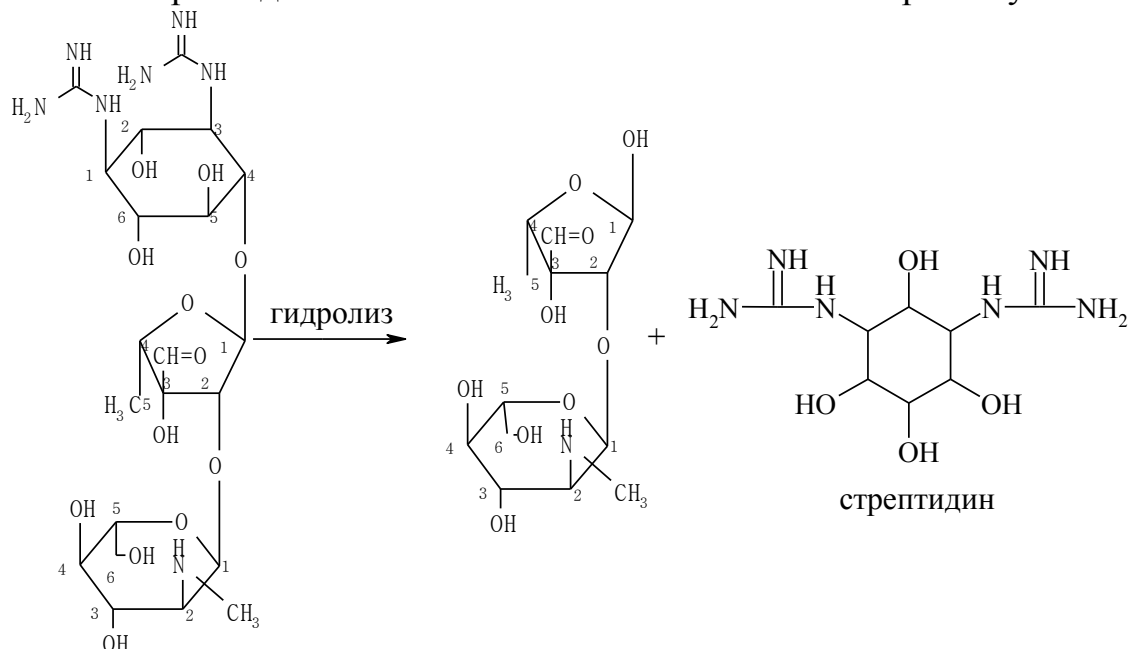
Химические свойства.

Стрептомицин представляет собой сильное трехкислотное основание (за счет двух гуанидиновых групп стрептидина и метиламиногруппы в N-метил-L-глюкозамине). Как гликозид, стрептомицин легко подвергается гидролитическому расщеплению. Под действием кислот он распадается на агликон стрептидин и сахарный остаток – стрептобиозамин. При щелочном гидролизе стрептомицина из остатка L-стрептозы образуется мальтол. Стрептомицин легко образует соли (сульфат, гидрохлорид) и комплексы с ионами двухвалентных металлов.

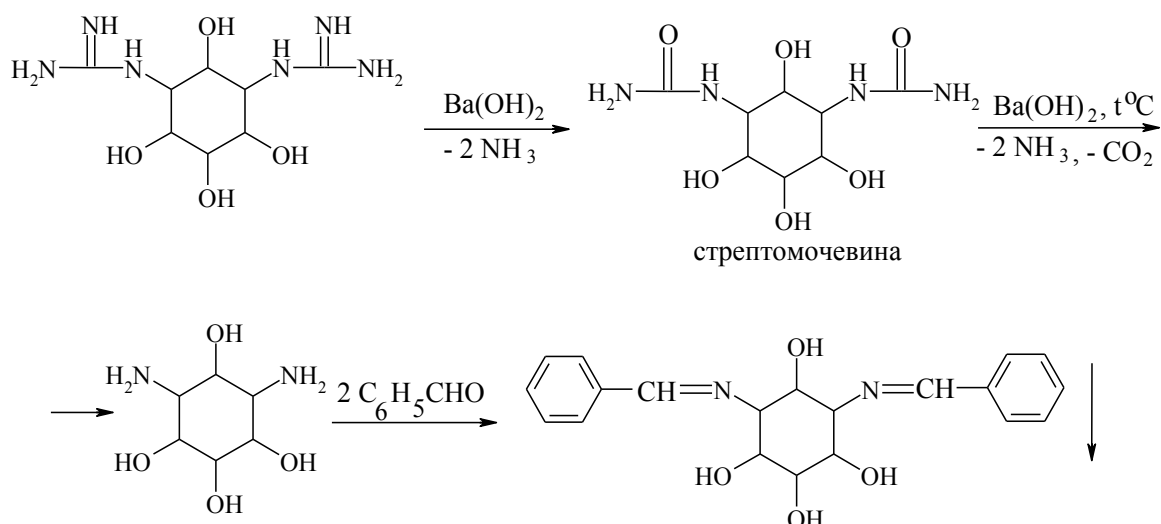
Подлинность

1. Гидролиз

В слабокислой среде растворы стрептомицина устойчивы, но он легко гидролизуется под действием сильных кислот с образованием агликона стрептидина и сахарной части в виде биозы - стрептобиозамина. Стрептобиозамин затем распадается на N-метил-L-глюкозамин и L-стрептозу.

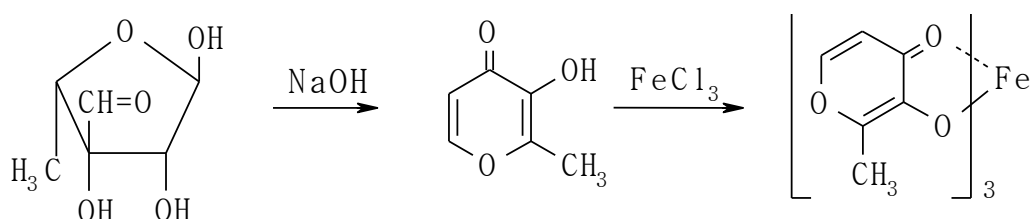


При обработке стрептидина свежеприготовленным раствором $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и последующим кипячением происходит отщепление двух молей аммиака, при этом образуется производное стрептомочевины – стрептамин. Стрептамин обнаруживается по реакции конденсации с ароматическим альдегидом с образованием основания Шиффа – осадка жёлтого цвета:



2. Мальтольная проба.

В щелочной среде стрептомицин быстро инактивируется (при комнатной температуре на 50 % в течение 3 ч под действием 0,1 М раствора гидроксида натрия). Инактивация обусловлена гидролизом стрептомицина, дегидратацией и изомеризацией L-стрептозы, которая превращается в мальтол (α -метил- β -окси- γ -пирон):



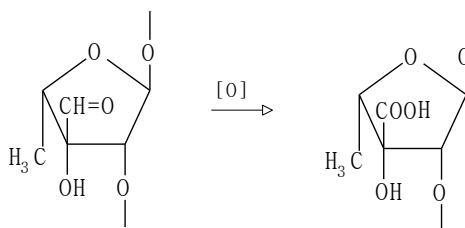
Мальтол образуется значительно быстрее (в течение 4 мин), если препарат нагревать с 0,5 М раствором гидроксида натрия на кипящей водяной бане. Наличие в составе молекулы мальтола гидроксильной группы и карбонила позволяет ему при взаимодействии с солями железа (III) в кислой среде образовывать соединение, имеющее фиолетовую окраску. Эту реакцию используют для определения подлинности стрептомицина и для фотокolorиметрического количественного определения препарата.

Мальтольная проба обусловлена наличием альдегидной группы в молекуле стрептомицина, и поэтому дигидрострептомицин, который вместо альдегидной группы в остатке L-стрептозы содержит оксиметильную группу, реакции на мальтол не дает, что отличает его от стрептомицина.

Методика. К 0,01 г стрептомицина сульфата прибавляют 2 мл раствора 0,5 М гидроксида натрия и нагревают на кипящей водяной бане в течение 3-4 мин. Раствор окрашивается в желтый цвет и ощущается запах аммиака. После охлаждения к раствору добавляют 4 мл разведенной хлористоводородной кислоты и 2-3 капли 3 %-ного раствора хлорида железа (III). Появляется фиолетовое окрашивание.

3. Реакции на альдегидную группу в остатке *L*-стрептозы.

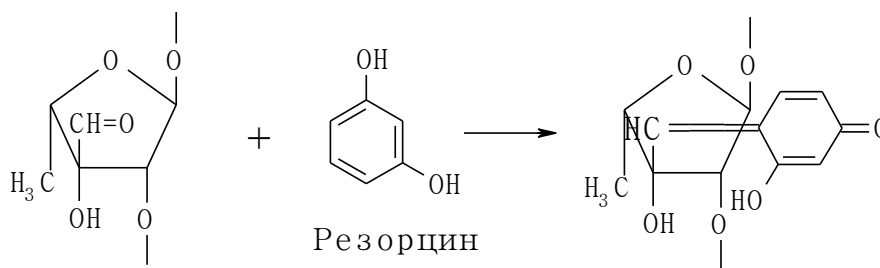
3.1. Альдегидная группа в силу своей высокой реакционной способности обуславливает положительные реакции стрептомицина с реактивом Несслера (бурое окрашивание вследствие восстановления металлической ртути), аммиачным раствором нитрата серебра (реакция серебряного зеркала) и реактивом Фелинга (красный осадок восстановленной меди (I)). Являясь хорошим восстановителем, альдегидная группа в этих реакциях и под влиянием других окислителей образует карбоксильную группу, превращаясь в биологически неактивную стрептомициновую кислоту:



Методика 1. К 2 мл 1 %-ного раствора стрептомицина сульфата прибавляют 0,5 мл реактива Несслера. Появляется черный осадок металлической ртути.

Методика 2. К 2 мл 1 %-ного раствора стрептомицина сульфата прибавляют 1 мл аммиачного раствора нитрата серебра и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2-3 мин. На стенках пробирки появляется серебряное зеркало.

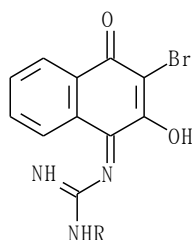
3.2. Альдегидная группа в кислой среде способна конденсироваться с фенолами с образованием окрашенных продуктов:



Методика. К 2 мл 1 %-ного раствора стрептомицина сульфата прибавляют 2 мл концентрированной серной кислоты, 10 мг резорцина и нагревают на кипящей водяной бане. Появляется красно-вишневое окрашивание.

4. Реакции на остатки гуанидина.

4.1. Реакция Сакагучи. Остатки гуанидина в молекуле стрептомицина можно открыть по образованию красно-фиолетового (малинового) окрашивания, которое возникает в щелочной среде под действием α -нафтола и гипобромита натрия. Происходит процесс окисления и бромирования α -нафтола с образованием имеющего хиноидный цикл нафтохинонимина:



Нафтохинонимин

Методика. К 5 мл 0,5 %-ного раствора стрептомицина сульфата прибавляют 2 мл свежеприготовленного 0,05 %-ного раствора α -нафтола в 10 %-ном растворе гидроксида натрия и 5 капель бромной воды. Появляется малиновое окрашивание.

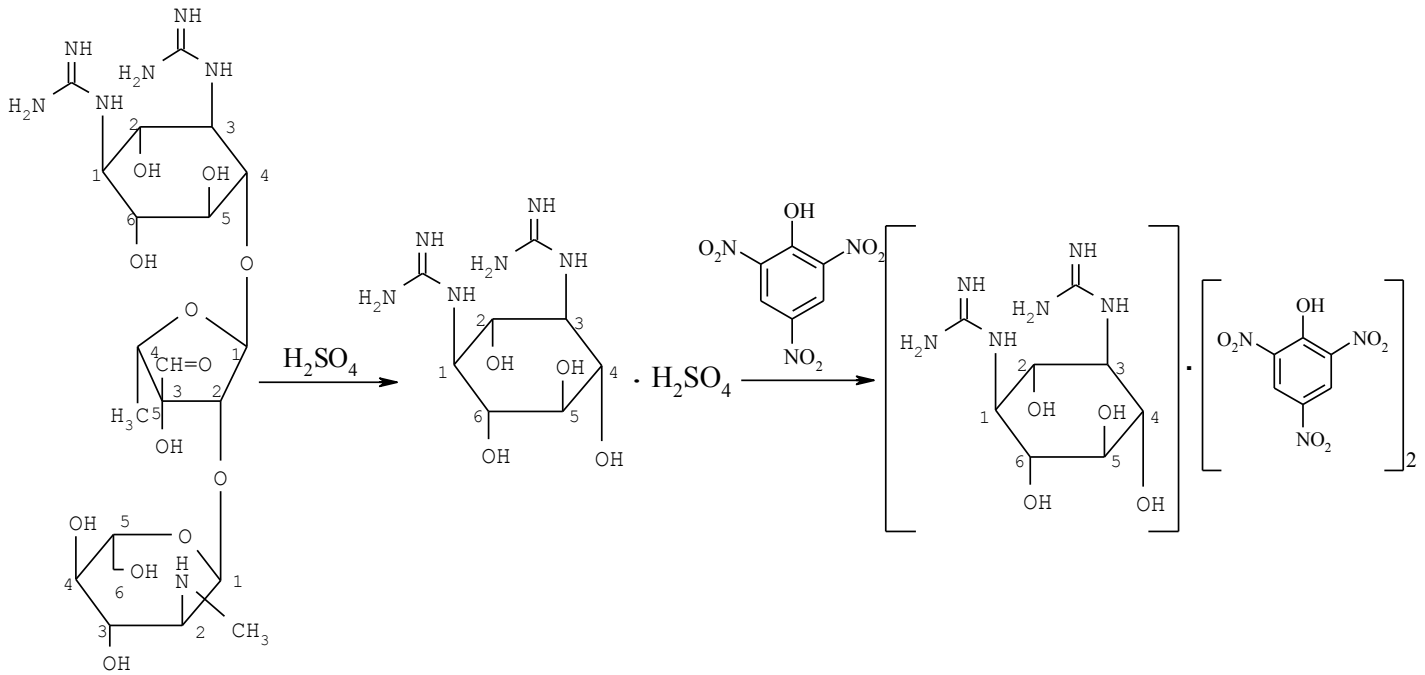
4.2. Реакция с нитропруссидом натрия. Остатки гуанидина в молекуле стрептомицина можно идентифицировать при гидролизе в щелочной среде с помощью смеси растворов нитропруссиды натрия и гексацианоферрата (III) калия.

Методика. 0,01 г стрептомицина сульфата растворяют в 2 мл воды, прибавляют 1 мл раствора окисленного нитропруссиды натрия. Появляется красное окрашивание. (Методика приготовления раствора окисленного нитропруссиды натрия: смешивают равные объемы 10 %-ного раствора нитропруссиды натрия, 10 %-ного раствора гексацианоферрата (III) калия и 10 %-ного раствора гидроксида натрия. Через 15-20 мин 1 мл полученного раствора доводят до объема 10 мл).

4.3. Остатки гуанидина в молекуле стрептомицина в щелочной среде подвергаются гидролитическому разложению и при этом выделяется аммиак, который обнаруживают по запаху или по посинению влажной лакмусовой бумаги.

5. Образование пикрата.

Стрептомицин можно идентифицировать по образованию пикрата стрептидина (Т. пл. 283-284 °С). Вначале на раствор препарата в метаноле действуют концентрированной серной кислотой и получают кристаллический сульфат стрептидина, который обрабатывают в горячей воде раствором пикриновой кислоты, превращая в пикрат:



5. Открытие сульфат-иона.

Ион сульфата открывают реакцией с растворимой солью бария.

6. Спектральные методы.

Для определения подлинности стрептомицина сульфата используют ПМР-спектроскопию. Спектр ПМР должен соответствовать спектру, прилагаемому к ФС. Регистрируют ПМР-спектры на ЯМР-спектрометре, устанавливая характерные сигналы при 1,26; 2,89; 3,31; 5,32; 5,57 и 6,07 м.д.

Количественное определение

1. Фотокolorиметрическое определение.

Количественно стрептомицина сульфат по МФ определяют *фотокolorиметрическим* методом, используя реакцию образования мальтола. Светопоглощение его измеряют в максимуме при 525 нм.

Мальтольная проба лежит и в основе *цериметрического* метода определения стрептомицина сульфата. Навеску препарата растворяют в воде, добавляют 1 М раствор гидроксида натрия, кипятят на водяной бане 5 мин, охлаждают и после подкисления 1 М раствором серной кислоты добавляют 2 %-ный раствор хлорида железа (III). Полученную смесь титруют 0,01 М раствором сульфата церия до исчезновения характерной красноватой окраски.

2. Биологический метод.

Биологическую активность стрептомицина сульфата устанавливают методом диффузии в агар с тест-микробом (ГФ XI, т. 2, с. 210). Препарат должен содержать не менее 730 мкг/мл (ЕД/мл) в пересчете на сухое вещество (1 мкг химически чистого стрептомицина соответствует активности, равной 1 ЕД).

Хранение

Стрептомицина сульфат хранят по списку Б в сухом помещении (учитывая гигроскопичность) при температуре не выше 25 °С. Упаковывают во флаконы, герметически закрывают резиновыми пробками, обжатыми алюминиевыми колпачками по 0,25, 0,5 и 1,0 г активного вещества в пересчете на стрептомицин-основание, что соответствует 250 000, 500 000 и 1 000 000 ЕД.

Применение

Антибиотическая активность стрептомицина имеет более широкий спектр, чем у пенициллинов. Он эффективен против кислотоустойчивых бактерий, проявляет высокую туберкулостатическую активность. Дигидрострептомицин практически идентичен стрептомицину по своему действию.

Назначают препараты стрептомицина главным образом для лечения различных форм туберкулеза, а также при заболеваниях, вызванных чувствительными к стрептомицину бактериями (пневмония, перитонит, гонорея, бруцеллез и др.). Вводят внутримышечно по 0,5 - 1,0 г (500 000 - 1 000 000 ЕД) в сутки. Высшие дозы: разовая 1,0 г, суточная 2,0 г.

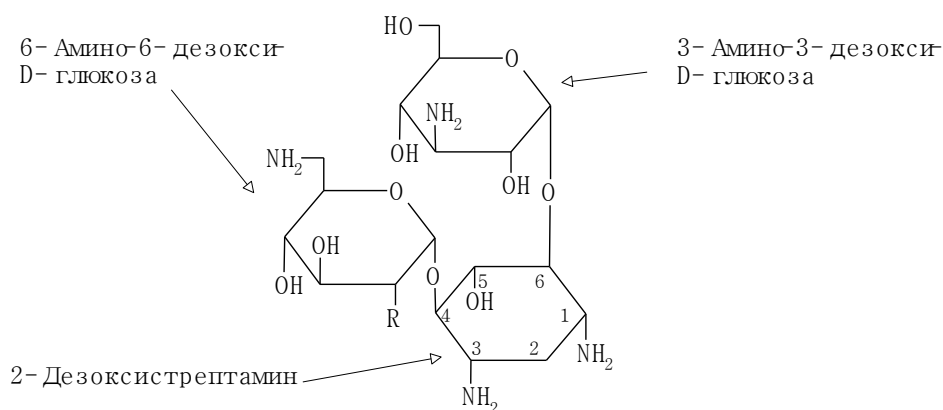
При применении стрептомицина и дигидрострептомицина возможны токсико-аллергические реакции. У лиц, систематически работающих с этими препаратами, могут развиваться контактные дерматиты, поэтому необходимо соблюдать меры предосторожности.

КАНАМИЦИН АМИКАЦИН

За последние годы арсенал лекарственных средств пополнился новыми, родственными стрептомицинам антибиотиками-гликозидами, которые продуцируются различными микроорганизмами.

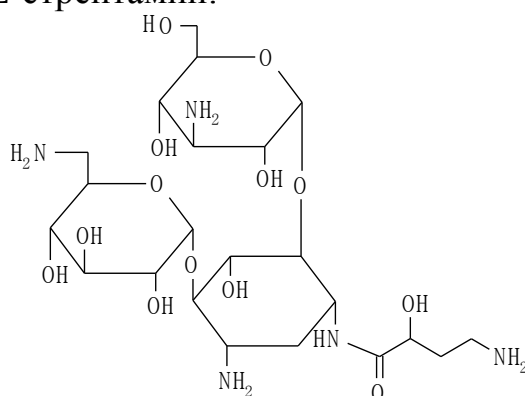
В 1952 г. Х. Умегава описал антибиотик канамицин, продуцируемый лучистым грибом *Streptomyces kanamyceticus*. Позднее было обнаружено, что этот актиномицет образует три антибиотика: канамицин А, канамицин В и канамицин С.

Наименьшую токсичность проявляет канамицин А, поэтому он составляет основную массу (94 %) препарата **канамицина сульфата**. В структуру канамицина сульфата входит агликон 2-дезоксистрептамин (мезо-1,3-ди-амино-4,5,6-триоксициклогексан) и два остатка сахаров: 6-амино-6-дезоксид-Д-глюкоза и 3-амино-3-дезоксид-Д-глюкоза. Через гидроксил в положении 4 агликона присоединяется 6-амино-6-дезоксид-Д-глюкоза, а через гидроксил в положении 6 – 3-амино-3-дезоксид-Д-глюкоза:



Канамицин А ($R = OH$), Канамицин В ($R = NH_2$)
 (Химическое строение канамицина С окончательно не установлено)

Полусинтетическим аналогом канамицина является сходный с ним по химической структуре **амикацин**, который в виде сульфата применяется в медицинской практике. Основное его структурное отличие от канамицина заключается в наличии 4-амино-L-2-оксибутирильного радикала. Кроме того, вместо агликона 2-дезоксид-Д-стрептамина у амикацина в молекуле содержится 2-дезоксид-L-стрептамин:



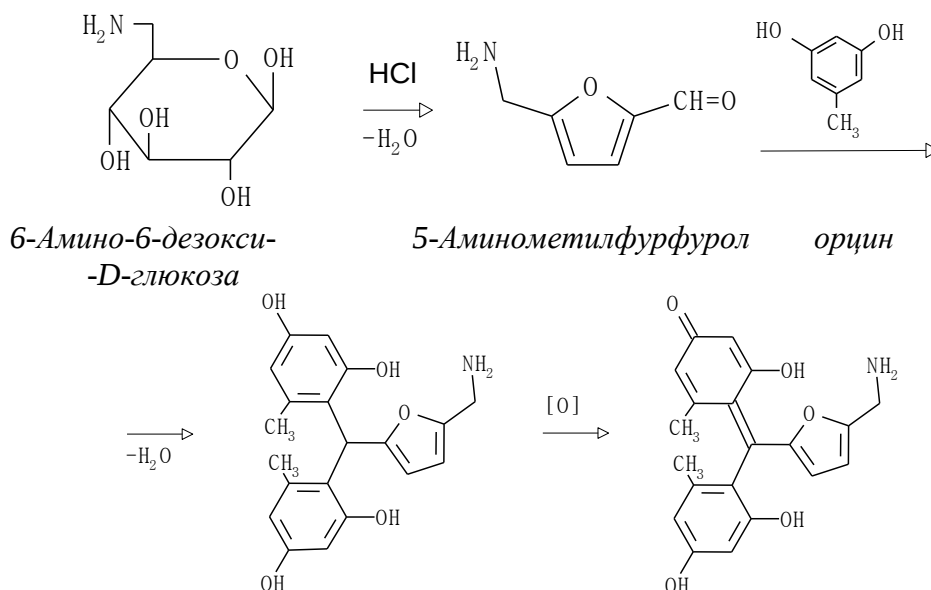
Химические свойства.

Канамицина моносульфат как гликозид способен гидролизоваться (особенно при нагревании) в кислой среде с потерей антибактериальной активности. Однако, в отличие от стрептомицина, канамицин устойчив в растворах щелочей.

Подлинность

1. Реакция с орцином.

Для испытания подлинности канамицина моносульфата используют цветную реакцию со спиртовым раствором орцина и концентрированной соляной кислотой в присутствии хлорида железа (III). В результате взаимодействия 6-амино-6-дезоксид-Д-глюкозы с концентрированной соляной кислотой образуется 5-аминометилфурфурол, который конденсируется с орцином и окисляется хлорида железа (III). Предполагают, что реакция протекает следующим образом:

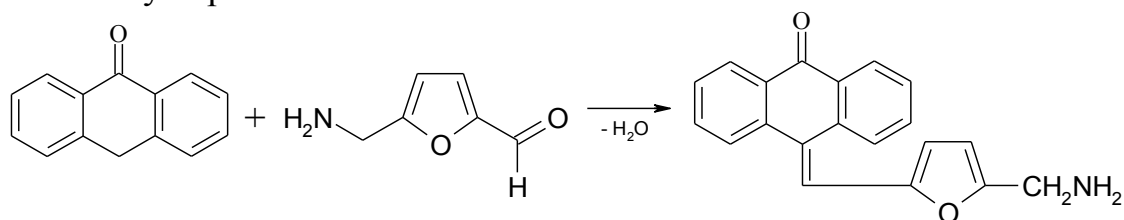


Методика. 0,1 г канамицина моносульфата растворяют в 20 мл воды. К 2 мл этого раствора прибавляют 0,8 мл 20 %-ного спиртового раствора орцина, 10 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, содержащей 0,06 % хлорида железа (III), и помещают в кипящую баню на 20 мин. Появляется зеленое окрашивание. (Примечание: вместо раствора орцина можно использовать 20 %-ный спиртовый раствор α -нафтола).

2. Реакция с антроном.

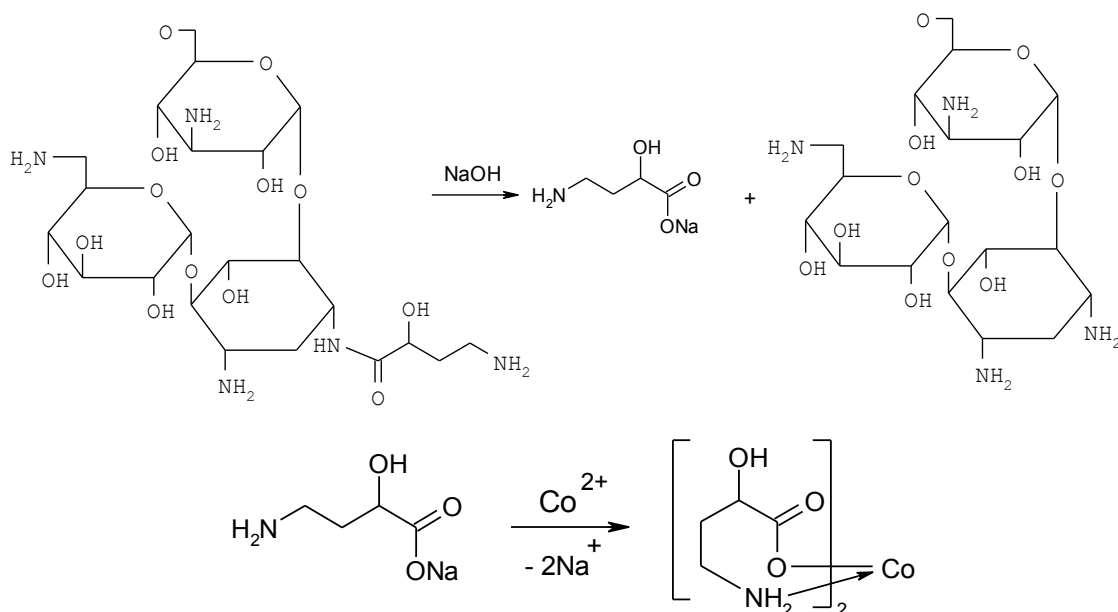
После кислотного гидролиза амикацин дает реакции на сахара (с реактивом Фелинга, Несслера, аммиачным раствором нитрата серебра).

Амикацина сульфат при нагревании с концентрированными минеральными кислотами образует 5-аминометилфурфурол, который можно обнаружить с помощью цветной реакции с антроном по голубовато-фиолетовому окрашиванию:



3. Комплексообразование.

В отличие от канамицина, амикцин за счёт амидной группы образует комплексы с солями тяжёлых металлов. Если к водному раствору амикацина сульфата добавить раствор гидроксида натрия, а затем раствор нитрата кобальта, то появляется фиолетовое окрашивание:



4. Хроматографические методы.

Поскольку канамицина моносulfат является смесью нескольких веществ, то для испытания подлинности используют метод ТСХ на пластинках с закрепленным слоем сорбента. Хроматограмму канамицина моносulfата проявляют нингидрином и сравнивают с хроматограммой стандартных образцов. В канамицине моносulfате определяют содержание канамицина В (не более 5 %). Метод ТСХ на закрепленном слое сорбента используется также и для установления подлинности амикацина sulfата (проявитель нингидрин), а также для обнаружения в нем примеси канамицина.

5. Открытие сульфат-иона.

Препарат дает положительную реакцию на сульфат-ион.

6. Спектральные методы.

Для идентификации канамицина А применяется ПМР-спектроскопия. Наличие в слабом поле ПМР-спектров дублетных сигналов аномерных протонов углеводных фрагментов и сигналов, характерных для агликона, является общим для всей группы антибиотиков аминогликозидов. Спектроскопия ЯМР ¹³С используют для идентификации канамицина А и его полусинтетического аналога – амикацина.

7. Биологические методы.

Биологическую активность препаратов (ГФ XI, т. 2, с. 210) устанавливают методом диффузии в агар с тест-микробами; 1 мкг каждого химически чистого антибиотика соответствует специфической активности, равной 1 ЕД.

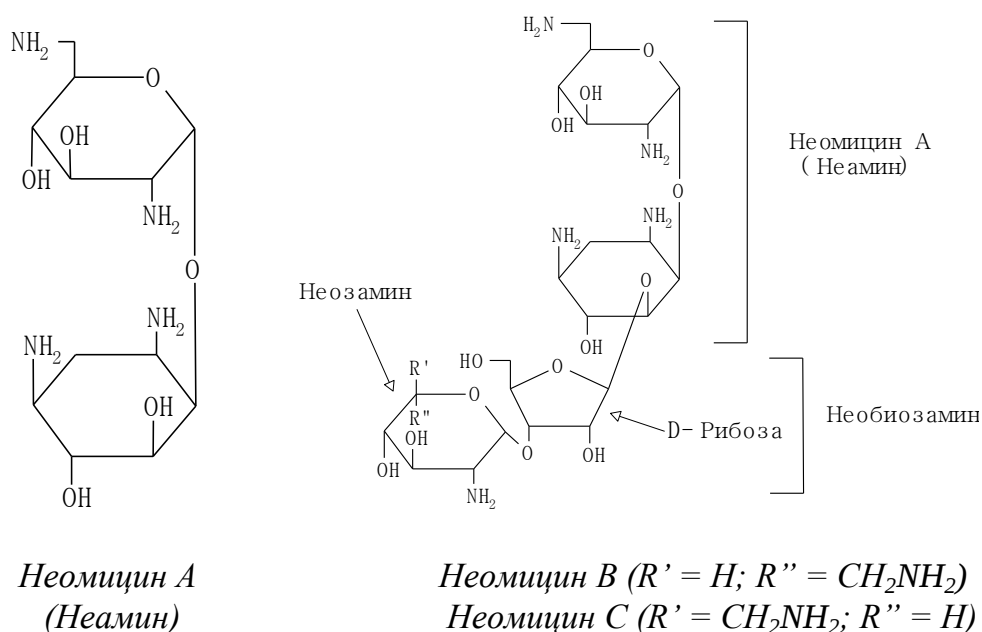
Хранение

Хранят препараты по списку Б в сухом, защищенном от света месте, канамицина моносульфат – при комнатной температуре. Упаковывают в банки или полиэтиленовые пакеты, так же как препараты тетрациклиновых антибиотиков.

НЕОМИЦИН

В 1949 г. З. Ваксман и Х. Лешевалье из культуры *Streptomyces fradiae* выделили антибиотик неомицин. Было установлено, что он состоит из смеси антибиотиков, которая получила название неомицинового комплекса. Комплекс включает неомицины А (неамин), В, С, D, Е и F. В настоящее время установлены структуры неомицина А, В и С.

В виде сульфатов неомицин В и неомицин С входят в состав препарата **неомицина сульфат**. По химической структуре неомицины сходны между собой. Неомицин В содержит в молекуле тот же, что и у канамицина, агликон – 2-дезоксистрептамин, два остатка диаминопиранозы и D-рибозу. Неомицин С представляет собой стереоизомер неомицина В. Неомицин А (неамин) является продуктом гидролиза неомицинов В или С. Молекула неамина включает агликон 2-дезоксистрептамин и только один сахар – диаминопиранозу.



Получение

Неомицин получают путём биосинтеза на средах с крахмалом (основной источник углерода), куда добавляется соевая мука, дрожжи, сульфат аммония (источник азота), и соли фосфора, магния, цинка, железа, марганца.

Для разделения неомицинового комплекса на индивидуальные компоненты (А, В и С) используется метод противоточного распределения, метод распределения на бумаге и на окиси алюминия.

Для получения сульфата осуществляют нейтрализацию шести аминогрупп. При этом получают сульфаты полной и неполной нейтрализации. Медицинским препаратом является смесь сульфатов неомицинов.

В промышленности неомицина сульфат получают упариванием и сушкой водного раствора, нейтрализованного серной кислотой. При рН 4,5 образуется трисульфат.

Неомицина сульфат – белый или желтовато-белый порошок, легко растворим в воде, мало в спирте. Гигроскопичен.

Химические свойства.

Неомицина сульфат обладает всеми свойствами гликозида и способен гидролизаться (особенно при нагревании) в кислой среде с потерей антибактериальной активности. Однако при нагревании водного раствора препарата, содержащего 5% NaOH в течение 30 минут на водяной бане, антибактериальная активность сохраняется.

Подлинность

1. Реакция с орцином.

Неомицина сульфат дает цветную реакцию со спиртовым раствором орцина и концентрированной соляной кислотой в присутствии хлорида окисного железа. Препарат образует окрашенные в зеленый цвет продукты при нагревании реакционной смеси в кипящей водяной бане. Реакция протекает за счет наличия в молекуле неомицина 2-дезоксистрептамин (см. химизм и методику для канамицина сульфата).

2. Открытие сульфат-иона.

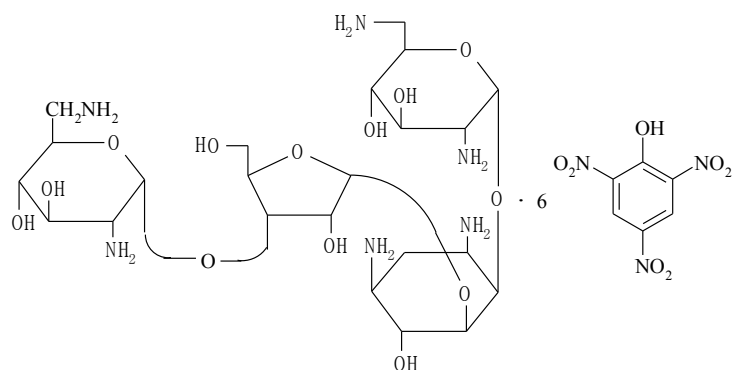
Неомицина сульфат дает положительную реакцию на сульфаты.

3. Физические константы.

Характерными константами для неомицинов являются температура плавления и удельное вращение. Кроме того, неомицины имеют характерные максимумы поглощения в ультрофиолетовом свете.

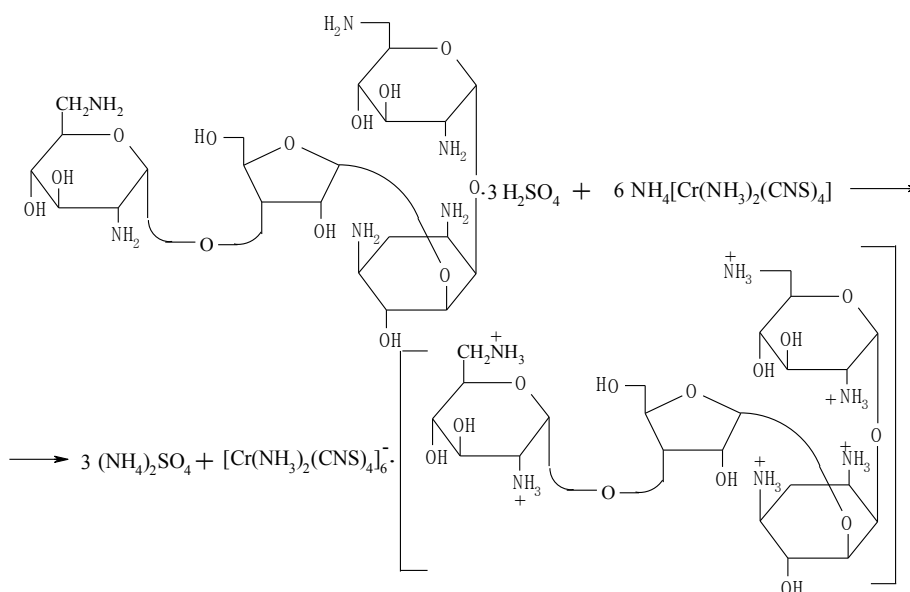
4. Образование пикратов.

Неомицин образует нерастворимые в воде пикраты за счёт наличия шести основных аминогрупп:



3. Взаимодействие с реактивом Рейнеке.

Неомицина сульфат вступает в обменную реакцию с раствором рейнеката аммония с образованием сложной комплексной соли, окрашенной в розовый цвет:



Применение

Неомицина сульфат обладает широким спектром действия. Он подавляет грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы и активен в отношении микроорганизмов, устойчивым к другим антибиотикам. Применяется главным образом в дерматологии и в хирургической практике — при гнойных процессах в лёгких, брюшной и плевральной полости. В зависимости от показаний применяется местно, внутрь и внутримышечно. Следует учитывать, однако, что антибиотики неомицинового ряда дают нежелательные побочные явления, как, например. Поражение почек, слухового нерва.

Выпускается препарат в виде порошка в герметически закрытых флаконах по 0,5 г, в виде таблеток по 0, 1 и 0,2 г и мази 0,5 и 2,0 %. Растворы неомицина сульфата готовят *ex tempore*.

Хранят в защищённом от света месте при комнатной температуре. Относится к списку Б.