

## NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 2, Number 308 (2015), 97 – 100

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF “BROWN IMPURITY”  
ACCOMPANYING THE ANTIBIOTIC ROZEOFUNGIN****A. K. Sadanov, A. S. Balgimbaeva, L. P. Trenochnikova, V. E. Berezin**

RSOE “Institute of Microbiology and Virology”, CS MES RK, Almaty, Kazakhstan

**Keywords:** antibiotic, impurity, antifungal agent, complex preparation.

**Abstract.** The paper presents the findings of scientific research on the “brown impurity” of the antifungal antibiotic Rozeofungin. It has been established that the complex preparation comprises at least five components of which the component having R<sub>f</sub> value of 0.68 is the main one. It is assumed that the molecule of impurity I contains tetraene system of double bonds.

УДК 615.322:547.836

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА «БУРОЙ ПРИМЕСИ»,  
СОПУТСТВУЮЩЕЙ АНТИБИОТИКУ РОЗЕОФУНГИНУ****А. К. Саданов, А. С. Балгимбаева, Л. П. Треножникова, В. Э. Березин**

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

**Ключевые слова:** антибиотик, примесь, противогрибковое средство, комплексный препарат.

**Аннотация.** В статье представлены результаты научных исследований по изучению «бурой примеси» противогрибкового антибиотика розеофунгина. Установлено, что комплексный препарат содержит не менее пяти компонентов, основным из которых является компонент с R<sub>f</sub>0.68. Предполагается, что в молекуле примеси I содержится тетраеновая система двойных связей.

**Введение.** Поверхностные микозы кожи являются одними из наиболее распространенных заболеваний в практике врачей различных специальностей. В структуре кожной патологии заболеваемость грибковыми поражениями кожи продолжает занимать лидирующее место: по разным данным на долю микозов приходится от 37 до 42% всех заболеваний кожи и ногтей [1, 2].

На сегодняшний день арсенал противогрибковых средств чрезвычайно разнообразен. Лекарственные препараты, входящие в него, относятся к разным химическим классам и поколениям, выпускаются под разными коммерческими названиями и нередко в виде нескольких форм (мазь, крем, лосьон и т. д.).

Однако в настоящее время существует и множество неудач терапии грибковых заболеваний – отсутствие клинического и микологического излечения, частые рецидивы, отмена препарата из-за побочных эффектов, назначение препарата без учета этиологии и клиники, продолжительные схемы терапии, назначение препарата, неспособного элиминировать возбудителя инфекции.

Таким образом, препарат для проведения эффективной местной терапии поверхностных микозов кожи должен обладать следующими свойствами: широким спектром антимикотической активности действующего вещества, минимальной кратностью применения и коротким курсом терапии. В настоящее время эти критерии являются оптимальными для выбора антимикотика с позиции современной фармакотерапии микозов [3].

В Институте микробиологии и вирусологии Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан разработан новый оригинальный препарат «Розеофунгин-АС, мазь 2 %» для наружного применения, который является противогрибковым антибиотическим средством широкого спектра действия, предназначенным для лечения микозов. Данный препарат является новым природным соединением, к которому нет устойчивых форм возбудителей микозов. Действующим началом препарата является антибиотик «Розеофунгин» - мембранотропный карбонил-кониюгированный пентаен, имеющий формулу  $C_{38}H_{68}O_{10}$ . Новизна антибиотика розеофунгина защищена патентами Республики Казахстан. Антибиотик Розеофунгин *in vitro* подавляет рост возбудителей поверхностных и глубоких микозов - трихофитии, микроспории, кандидоза, криптококкоза, споротрихоза, хромомикоза, аспергиллеза и др. Принципиально важным является то, что розеофунгин превосходит по активности в отношении патогенных грибов известные аналогичные медицинские препараты, обладает большей стабильностью и меньшей токсичностью. Кроме того, установлена высокая активность антибиотика в отношении возбудителей тропических микозов. Розеофунгин обладает мембранотропной активностью и влияет на проницаемость клеточных мембран грибов, что приводит к подавлению их роста. Также установлена высокая вирусингибирующая активность антибиотика розеофунгин по отношению к различным штаммам вируса гриппа, парамиксовируса Сендай и вируса болезни Ньюкасла. Проведены доклинические исследования и I фаза клинических испытаний препарата. Доклинические исследования показали его высокую эффективность в терапии поверхностных микозов кожи в модели на экспериментальных животных. Результаты I фазы клинических испытаний показали, что «Розеофунгин-АС, мазь 2%» для наружного применения обладает высоким уровнем безопасности и приемлемости.

В Институте микробиологии и вирусологии выполнены все этапы лабораторных исследований: осуществлена селекция продуцента, подобраны условия биосинтеза антибиотика, его выделения и очистки, доказана новизна антибиотика, определена его химическая структура. Отработана технология производства с высоким выходом антибиотика.

При стандартизации антибиотика розеофунгина очень важно знать состав и свойства специфических примесей, сопутствующих препарату.

### Материалы и методы

Масс-спектры исследуемых соединений записывали на хромато-масс-спектрометре – LKB-9000 с прямым вводом (энергия ионизирующих электронов 70 эВ, температура ионизационной камеры – 230<sup>0</sup>С). Спектры <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР получали на спектрофотометре АС-200 «Bucker» и записывали в режиме полного подавления спин-спинового взаимодействия с протонами. Химические сдвиги в обоих спектрах отсчитывали от внутреннего стандарта TMS. Оптическое вращение определяли на спектрополяриметре А1-ЕЛО.

Кислотный гидролиз. 20 мг примеси 1 и 2 нагревали в запаянной ампуле на кипящей водяной бане с 1.5 мл 2н HCl в течение 1 часа. После нейтрализации раствора Dowex1x2 (ОН/) раствор концентрировали и далее хроматографировали на пластинках скизельгелем, забуференным борной кислотой, в системе этилацетат-изопропанол-вода (65:25.5:11.5). Пятна проявляли раствором винилинового альдегида, анизидинфталата и нингидрином.

Каталитическое гидрирование примесей проводили в растворе этанола в присутствии 10% Pd на асбесте.

### Результаты и их обсуждение

Результаты очистки розеофунгина показали, что антибиотику сопутствует неактивная «бурая примесь». В исследуемых образцах содержание этой примеси было до 3%. Установлено также, что примесь в условиях инактивации розеофунгина не изменяется. С этой целью методом противоточного распределения выделен комплексный препарат с  $K_p = 4.0$ . Противоточное распределение проводилось в аппарате Крейга с объемом фаз 50/50 мл в системе хлороформ-метанол-эфир-боратный буфер pH 7.6 [2:4:3:2]. Для этого образец розеофунгина (4.5 г с  $E_{1\text{см}}^{1\%} 620$  при 364 нм) растворяли в верхней и нижней фазах системы и вносили в первые две трубки. Делали

50-60 переносов, после чего из каждой трубки отбирали 0.1 мл верхней фазы (для определения розеофунгина) и 0.1 мл нижней фазы (для определения примесей), добавляли 5 мл метанола и определяли оптическую плотность при 364 нм (розеофунгин) и при 320 нм (примеси). Строили кривую противоточного распределения.

На основании данных кривой распределения розеофунгин выделяли из 15-30 трубок, примеси – из 37-46 трубок. Для выделения розеофунгина к объединенным трубкам добавляли 0.7 л петролейного эфира (т.кип.40-60<sup>0</sup> С). Антибиотик при этом переходит в нижнюю фазу. Последнюю отделяли и упаривали в вакууме при роторном испарителе до вспенивания. Затем к остатку добавляли 50 мл н-бутанола и упаривали досуха. Остаток дважды промывали водой (по 100 мл), трижды – ацетоном (по 20 мл) и, наконец, – эфиром. Полученный порошок лимонно-желтого цвета, высушенный в вакуум-эксикаторе над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> в течение 2-х суток, имел E<sup>1%</sup><sub>1см</sub> 800 при 364 нм.

Примеси выделяли из нижней фазы 37-46 трубок. После удаления растворителей досуха в вакууме в остатке получали порошок коричневого цвета, который промывали дважды эфиром и высушивали.

Установлено, что выделенная примесь представляет собой кристаллический продукт, хорошо растворимый в спиртах, диметилсульфоксиде, малорастворимый в ацетоне и хлороформе, нерастворимый в воде, эфире, углеводородах. Комплексный препарат имеет в УФ-спектре максимумы поглощения при 318-320, 306- 310 (Sh), 340-344 (Sh) нм, в щелочном метаноле наблюдается дополнительный максимум поглощения при 275-277 нм, в кислом – при 269 нм. Препарат оптически неактивен в этаноле, диметилсульфоксиде и хлороформе, не плавится до 300<sup>0</sup> С. Изучение биологической активности «бурой примеси» выявило, что она слабо подавляет дрожжи и дрожжеподобные грибы и неактивна в отношении грибов и бактерий.

Методом тонкослойной хроматографии показано, что выделенная примесь является смесью 5 компонентов. Результаты представлены в таблице.

Компонентный состав примеси

№	Система органических растворителей	R <sub>f</sub> примеси	R <sub>f</sub> розеофунгина
1	Метанол-хлороформ (1:1)	0.15, 0.66, 0.80, 0.90	0.82
2	Этанол-вода-конц. (8:1:1)	0.45, 0.66, 0.80, 0.88	0.80, 0.88
3	Н-бутанол-этанол-вода (4:1:5, верхняя фаза)	0.28, 0.50, 0.68, 0.80	0.74
4	Этанол-н-бутанол-0.1н (1:1:1)	0.75, 0.83	0.82
5	Н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5)	0.22, 0.40, 0.63, 0.75, 0.85	0.70
6	Этилацетат-изопропанол-вода (65:25.5: 11.5)	0.30, 0.54, 0.57, 0.65	0.52

Пятна проявляли в УФ-свете с фильтром УФС-3. Основным компонентом является примесь I (R<sub>f</sub> 0.68 в системе 3), содержание которой в смеси составляет до 80%. Примесь I в УФ-спектре имеет максимумы поглощения при 288-292, 305, 319, 340-345 (Sh) нм. Примесь II (R<sub>f</sub> 0.50 в системе 3) имеет максимумы поглощения в УФ-свете при 277-278, 305-307 (Sh) нм. Компоненты представляют собой светло-коричневые кристаллические соединения. Растворимость их близка к растворимости комплексного препарата. В <sup>13</sup>C-ЯМР-спектре имеются сигналы 8.47, 10.22, 11.45, 12.63, 13.06, 17.20, 23.22, 23.80, 27.97, 32.98, 34.46, 35.91, 37.05, 38.17, 39.30, 41.40, 42.74, 43.45, 44.95, 45.38, 45.81, 46.66, 47.08, 47.51, 59.85, 61.95, 62.42, 63.05, 63.58, 63.88, 65.66, 67.69, 69.23, 71.36, 95.38, 168.0 неразрешенный сигнал в области 125-140 м.д. Молекулярная масса примеси I равна 824 (масс-спектрометрически). Примесь I оптически неактивна в растворах хлороформа, этанола и диметилсульфоксида.

При гидрировании над платиной поглощается 4 моля водорода, при этом в ИК-спектре исчезает полоса поглощения при 670 см<sup>-1</sup>. В УФ-спектре октагидропроизводного примеси I наблюдаются максимумы поглощения при 275-277 и 306-310 (Sh) нм. На основании приведенных данных можно предположить, что в молекуле примеси I содержится тетраеновая система двойных связей. Продукт гидрирования плавится при 158-160<sup>0</sup>С. Его элементный состав (%): С 59.83, Н

8.70, N 337. Хроматография кислотного гидролизата показывает, что в составе примеси I присутствуют сахара. В примеси II, напротив, сахаров не обнаружено.

Таким образом, противоточным распределением из трубок 37-46 выделена примесь антибиотика розеофунгина в виде коричневых кристаллов, слабо подавляющая рост дрожжей и дрожжеподобных грибов и не обладающая активностью против грибов и бактерий. Комплексный препарат содержит не менее пяти компонентов, основным из которых является компонент с R<sub>f</sub>0.68. Предполагается, что в молекуле примеси I содержится тетраеновая система двойных связей.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Сергеев А.Ю., Иванов О.Я, Сергеев Ю.В. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2002. – № 3. – С. 31-35.  
[2] Сергеев Ю.В., Кудрявцева Е.В., Сергеев А.Ю. // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2004. – № 1. – С. 37-41.  
[3] Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции: Руководство для врачей. – М.: Изд-во «Бином», 2008. – 480 с.

#### REFERENCES

- [1] Sergeev A.Yu., Ivanov O.Ya, Sergeev Yu.V. Journal of Dermatology and Venereology. 2002. N 3. P. 31-35. (in Russ.).  
[2] Sergeev Yu.V., Kudryavtseva E.V., Sergeev A.Yu. Russian Journal of Skin and Venereal Diseases. 2004. N 1. P. 37-41. (in Russ.).  
[3] Sergeev A.Yu., Sergeev Yu.V. Fungal infections: a guide for physicians. Moscow: Publ. house «Binom», 2008. 480 p. (in Russ.).

### РОЗЕОФУНГИН АНТИБИОТИГИНЕ ҚОСЫЛАТЫН «ҚОҢЫРҚОСПАНЫ» БӨЛІП АЛУ ЖӘНЕ ОҒАН СИПАТТАМА БЕРУ

**А. К. Саданов, А. С. Балғымбаева, Л. П. Треножникова, В. Э. Берзин**

РМК «Микробиология және вирусология институты» ҒК БҒМҚР, Алматы, Қазақстан

**Тірек сөздер:** антибиотик, қоспа, саңырауқұлақтарға қарсы заттар, кешенді препарат.

**Аннотация.** Мақалада саңырауқұлақтарға қарсы розеофунгин антибиотигінің «қоңыр қоспасын» ғылыми зерттеу бойынша нәтижелер көрсетілген. Кешенді препарат 5-тен аз емес компоненттен тұратыны анықталған, олардың ішіндегі ең негізгі компонент – R<sub>f</sub> 0.68-бен. Қоспа I-дің молекуласы екі байланысты тетраенді жүйелерден тұрады деп жобаланған.

*Поступила 27.02.2015 г.*