

УДК 543.421.424

МЕЖФАЗНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУНОДЕПРЕССАНТОВ В ЭКСТРАКЦИОННЫХ СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ ГИДРОФИЛЬНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ И ПОЛИМЕРОВ

© 2014 Я. И. Коренман¹, О. А. Логинова¹, Н. Я. Мокшина², Г. В. Шаталов³, Д. В. Быковский³

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр. Революции, 19,
394036 Воронеж, Россия
e-mail: olkrivosheeva@mail.ru

²Военно-воздушная академия имени профессора Н. Е. Жуковского и Ю. А. Гагарина, ул. Старых большевиков,
54 а, 394064 Воронеж, Россия

³Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1,
394000 Воронеж, Россия

Поступила в редакцию 03.06.2014 г.

Аннотация. Для извлечения иммунодепрессантов 6-меркаптопурина и азатиоприна из водных растворов применена экстракция в присутствии высаливателя сульфата аммония гидрофильными растворителями — алифатическими спиртами, эфирами уксусной кислоты и растворами полиакриламида, полиакриловой кислоты, поливинилформамида. Изучено влияние сольвотропного реагента дибутилфталата на степень извлечения иммунодепрессантов. Для достижения практически полного извлечения 6-меркаптопурина и азатиоприна из водно-солевых растворов применена повторная экстракция.

Ключевые слова: экстракция, 6-меркаптопурин, азатиоприн, гидрофильные растворители, полиакриламид, полиакриловая кислота, поливинилформамид.

ВВЕДЕНИЕ

6-Меркаптопурин (1,7-дигидро-6Н-пурин-6-тион) и азатиоприн (6-[(1-метил-4-нитро-1Н-имидазол-5-ил)тио]-1Н-пурин) — распространенные иммунодепрессивные вещества, входящие в состав аутоиммунных препаратов. Они нарушают биосинтез нуклеотидов, подавляют рост пролиферирующих тканей и оказывают цитотоксическое влияние, благодаря чему их применяют при лечении острого лейкоза и ретикулезоз. По сравнению с 6-меркаптопурином азатиоприн оказывает более выраженное иммунодепрессивное действие [1].

Для экстракции биологически активных веществ из водных растворов с начала 80-х годов XX века успешно применяются гидрофильные растворители, в частности, алифатические спирты и эфиры, а также гидрофобные, например, хлороформ [2, 3].

В качестве экстрагентов для извлечения иммунодепрессантов в данном исследовании впервые применены спирты C₃ — C₅ нормального строения, алкилацетаты C₂ — C₅, их смеси с сольвотропным

реагентом (дибутилфталатом), а также водорастворимые полимеры такие как полиакриламид, полиакриловая кислота, поливинилформамид. Сольвотропные реагенты практически нерастворимы в воде, их введение в экстракционную систему значительно повышает степень извлечения органических веществ разных классов [4].

Для образования двухфазных систем в водный раствор до экстракции вводили электролит (неорганическую соль). Экстракция в присутствии высаливателей — распространенный прием повышения количественных характеристик процесса [5]. При уменьшении молекулярной массы гидрофильных экстрагентов их растворимость в воде возрастает, образование двухфазной системы становится практически невозможным. Обязательным условием экстракции такими растворителями является насыщение водного раствора электролитом, понижающим растворимость распределяемого вещества в воде и обеспечивающим расслаивание системы. Ранее нами показано, что оптимальные параметры экстракции (коэффициент распределе-

ния D , степень извлечения R , %) достигаются в системах с сульфатом аммония [6].

Установление подлинности и безопасности аутоиммунных препаратов на основе 6-меркаптопурина и азатиоприна — актуальная задача, решение которой возможно с применением жидкостной экстракции.

Цель исследования состоит в разработке способа извлечения 6-меркаптопурина и азатиоприна из водных растворов, включающего экстракционное концентрирование с последующим спектрофотометрическим анализом органического концентрата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Готовили водно-солевые растворы меркаптопурина и азатиоприна с концентрацией 0.05 мг/см^3 . Навеску препарата фармакопейной чистоты (5 мг) помещали в мерную колбу вместимостью 100 см^3 , растворяли в небольшом объеме воды и при перемешивании доводили до метки насыщенным раствором высаливателя. Меркаптопурин и азатиоприн концентрировали с применением гидрофильного растворителя или растворов полимера различных концентраций. Для этого к 10 см^3 анализируемой водной пробы, содержащей иммунодепрессант, добавляли сульфат аммония, затем 1 см^3 экстрагента. Экстрагировали на вибросмесителе ($20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 4.2 \div 4.5$), в течение 10 мин устанавливается межфазное равновесие, раствор оставляли на 3—5 мин для расслаивания системы.

При экстракции в присутствии сольватропного реагента предварительно готовили серию растворов дибутилфталата в *n*-пропиловом спирте с концентрациями 0.27; 0.34; 0.45; 0.68 и 0.90 моль/дм^3 (максимальная концентрация, на пределе растворимости дибутилфталата в экстрагентах). При этом объемные соотношения растворитель: дибутилфталат составляли 10 : 1; 7 : 1; 5 : 1; 3 : 1 и 2 : 1 соответственно.

В градуированную пробирку вместимостью 25 см^3 помещали 10 см^3 водно-солевого раствора иммунодепрессанта и 1 см^3 смеси растворитель — дибутилфталат (исходное соотношение объемов водно-солевой и органической фаз 10 : 1) и экстрагировали 10 мин. Затем 1 см^3 органического концентрата разбавляли в 25 раз дистиллированной водой, измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре SHIMADZU UV MINI-1240, длина светопоглощающего слоя 1 см, максимум светопоглощения при 286 нм.

При проведении повторной экстракции 1 см^3 органического концентрата разбавляли в 10 раз

дистиллированной водой и извлекали иммунодепрессанты как описано выше.

Синтез полиакриламида (ПАА), полиакриловой кислоты (ПАК) и поливинилформамида (ПВФ) с молекулярной массой M_n , соответственно, $1.0 \cdot 10^4$; $1.8 \cdot 10^4$ и $6.5 \cdot 10^4$ осуществлен радикальной полимеризацией в изопропиловом спирте с содержанием мономера 10 масс. % и инициатора динитрила азо-бис-изомасляной кислоты 1 масс. % с выходом 65—70% при температуре $70 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 6 часов. Молекулярная масса полимеров M_n вычислена на основании данных вискозиметрии по уравнению Марка-Куна-Хаувинка с учетом констант K и α для ПАА [7], ПАК [8] и ПВФ [9].

Коэффициент распределения (D_I) и степень извлечения иммунодепрессантов после первой экстракции (R_p , %), а также степень извлечения после двукратной экстракции ($R_{\text{общ}}$, %) рассчитывали по известным уравнениям [6]:

$$D_I = \frac{c_0}{c_e}, R_I = \frac{D_I}{D_I + f} \cdot 100\%,$$

$$R_{\text{общ}} = \frac{(100 - R_I) \cdot R_{II}}{100} + R_I,$$

где c_0 и c_e — концентрации меркаптопурина (азатиоприна) в органической и водной фазах; f — соотношение объемов равновесных водной и органической фаз, R_{II} — степень извлечения иммунодепрессанта после второй экстракции, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для экстракции 6-меркаптопурина и азатиоприна применены, прежде всего, вследствие невысокой токсичности, гидрофильные растворители, в частности, алифатические спирты нормального строения C_3 — C_5 и алкилацетаты C_2 — C_5 [10, 11]. Установлены в идентичных условиях коэффициенты распределения D и степень извлечения R иммунодепрессантов в системах спирт (алкилацетат) — высаливатель — вода (табл. 1). Приведенные данные показывают, что максимальная степень извлечения 6-меркаптопурина и азатиоприна достигается при экстракции наиболее гидрофильными растворителями — *n*-пропиловым спиртом (74.0 и 74.8% соответственно) и этилацетатом (85.9 и 86.2%). Как установлено, после повторной экстракции степень извлечения 6-меркаптопурина и азатиоприна повышается, соответственно, до 88.2 и 89.1% в системе с *n*-пропиловым спиртом, и до 94.3 и 95.5% — с этилацетатом.

Полученные результаты свидетельствуют о сравнительно невысокой эффективности экс-

Таблица 1. Коэффициенты распределения и степень извлечения иммунодепрессантов в системах со спиртами и алкилацетатами, высаливатель — $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Экстрагент	<i>D</i>	<i>R</i> , %	<i>D</i>	<i>R</i> , %
	6-Меркаптопурин		Азатиоприн	
Н-пропиловый спирт	28.4±2.5	74.0	29.7±2.3	74.8
Н-бутиловый спирт	24.2±1.7	70.7	25.4±1.9	71.8
Н-пентиловый спирт	15.5±1.2	60.5	18.5±1.5	65.9
Этилацетат	59.9±3.3	85.9	62.4±3.8	86.2
Н-бутилацетат	44.8±2,8	81.8	54.3±3.1	84.4
Н-пентилацетат	35.1±2,8	77.8	47.2±2.6	82.5

тракционных систем на основе алифатических спиртов. Известно, что самоассоциация растворителя снижает вероятность образования водородных связей извлекаемого вещества с экстрагентом [12]. Спирты относятся к самоассоциирующим растворителям, однако, в системах спирт — вода происходит ослабление энергии водородных связей между молекулами спирта [13]. Сольватация спиртами, в отличие от эфиров, осуществляется преимущественно за счет свободных электронных пар атомов азота иммунодепрессанта и атома водорода ОН-группы спирта и характеризуется меньшей способностью образовывать гидрато-сольватные комплексы с распределяемым веществом. Высокую экстрагирующую способность этилацетата можно объяснить отсутствием самоассоциации, экранированием атома кислорода, что характерно для эфиров уксусной кислоты [14].

С увеличением длины углеводородного радикала экстрагирующая способность гомологов по отношению к иммунодепрессантам закономерно снижается. Это объясняется ослаблением водородной связи между экстрагентом и распределяемым веществом, уменьшением доли ОН-групп спиртов или атомов кислорода в молекулах алкилацетатов (снижение гидрофильности).

С целью повышения количественных характеристик экстракции иммунодепрессантов применены смеси н-пропилового спирта и этилацетата с дибутилфталатом (ДБФ). Введение сольватропного реагента в экстрагент при извлечении иммунодепрессантов сопровождается существенным повышением коэффициентов распределения и степени извлечения по сравнению с системами индивидуальный растворитель — водно-солевой раствор.

Зависимость коэффициентов распределения и степени извлечения иммунодепрессантов в системах растворитель — дибутилфталат — высаливатель с разной концентрацией ДБФ приведена на рис. Видно, что с повышением концентрации дибутилфталата в экстрагентах закономерно возрастают коэффициенты распределения. Это объясняется образованием легкорастворимых в экстрагентах и практически нерастворимых в воде молекулярных комплексов иммунодепрессантов с диалкилфталатами.

Для извлечения иммунодепрессантов применены такие водорастворимые полимеры, как ПАА, ПАК и ПВФ, характеризующиеся повышенной комплексообразующей способностью по отношению ко многим соединениям [15]. Полимеры успешно применяют для извлечения из водных растворов гидратированных комплексов металлов и других веществ [16]. Двухфазные водные системы на основе полимеров наиболее полно отвечают требованиям, предъявляемым к экстракционным системам.

С целью выбора оптимального содержания полимеров в системе изучена экстракция в широком диапазоне их концентраций 1—10 мас. % (табл. 2). Полученные результаты показывают, что максимальные коэффициенты распределения достигаются при содержании полимеров в растворе с концентрацией ~ 10 мас.%. Найдено, что при возрастании концентрации полимеров степень извлечения иммунодепрессантов практически не изменяется.

Комплексообразование в системах с полимерами обусловлено образованием «сетки» связей в виде цепеподобных «мостиков» — ассоциатов между N-атомами 6-меркаптопурина (азатиоприна) и функциональными группами полимера [15, 17].

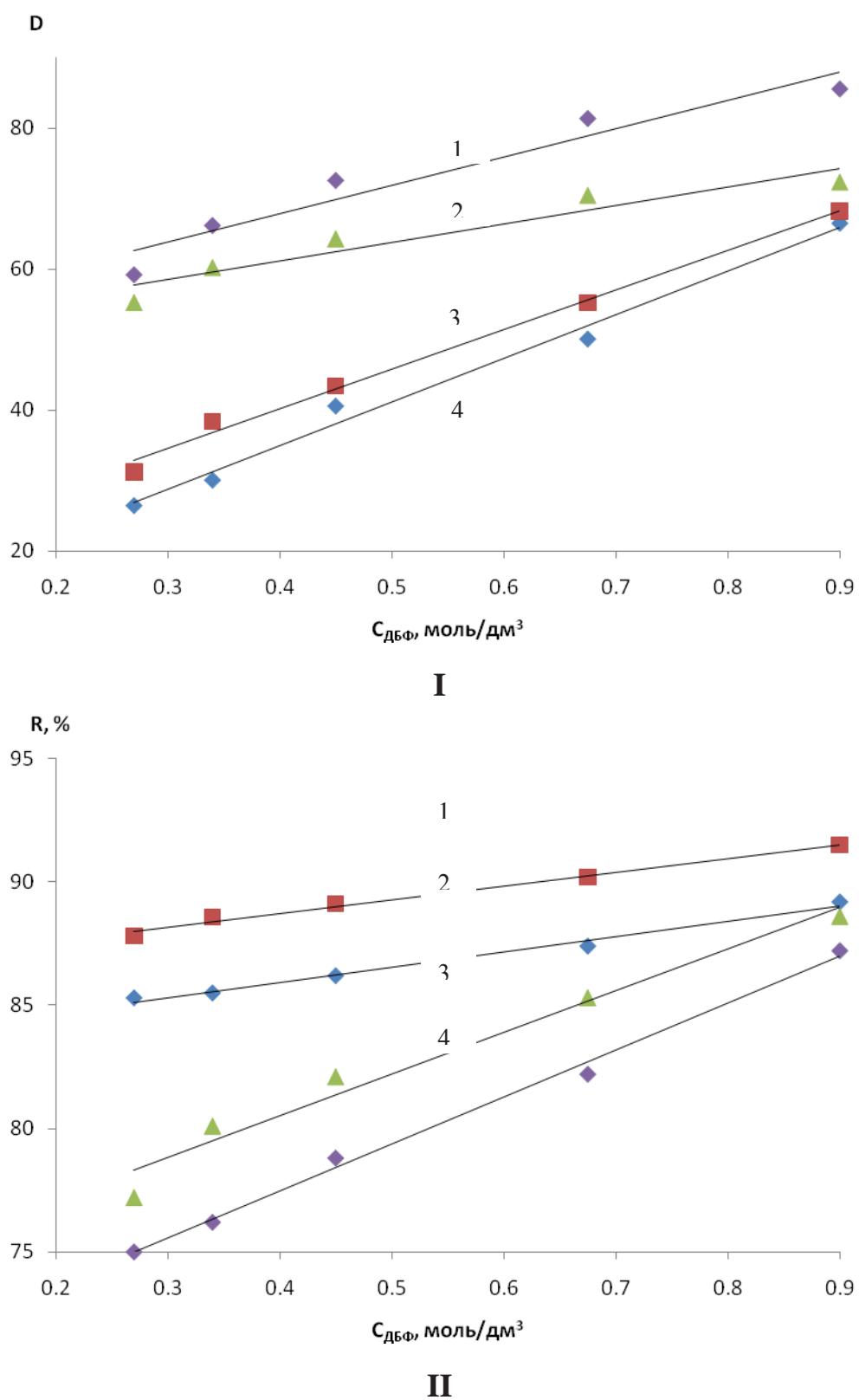


Рис. Зависимость коэффициентов распределения (I) и степени извлечения (II) иммунодепрессантов от концентрации дибутилфталата в *n*-пропиловом спирте (1, 2) и в этилацетате (3, 4)

Таблица 2. Степень извлечения 6-меркаптопурина и азатиоприна при экстракции растворами полимеров разных концентраций, высаливатель — $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Иммунодепрессант	Полимер, мас. %				
	1.0	2.0	5.0	7.0	10.0
	полиакриламид				
6-Меркаптопурин	50.9	58.3	65.3	71.2	72.4
Азатиоприн	48.6	53.1	60.9	64.4	66.4
	полиакриловая кислота				
6-Меркаптопурин	55.2	61.3	69.9	76.7	81.9
Азатиоприн	51.1	57.6	61.2	69.4	72.3
	поливинилформамид				
6-Меркаптопурин	56.7	62.6	72.4	80.5	82.6
Азатиоприн	52.6	60.1	69.8	75.4	79.7

Установлено, что степень извлечения иммунодепрессантов из водных растворов алкилацетатами и полимером ПВФ после первой экстракции практически одинакова. Повторная экстракция

повышает степень извлечения в присутствии ПВФ до 95 % [15]. Воспроизводимость полученных данных проверена методом «введено–найдено» (табл. 3).

Таблица 3. Определение меркаптопурина и азатиоприна в водных растворах $n=3$, $P=0.95$

Иммунодепрессант	Введено, мг	Найдено, мг	Стандартное отклонение, S_r
6-Меркаптопурин	0.05	0.04±0.01	0.08
	1.00	0.85±0.26	0.08
	2.00	1.87±0.54	0.12
	10.0	9.8±0.7	0.10
	20.0	19.8±1.2	0.13
Азатиоприн	0.05	0.04±0.01	0.08
	1.00	0.96±0.22	0.09
	2.00	1.91±0.72	0.15
	10.0	9.7±0.6	0.11
	20.0	19.6±1.6	0.12

Различия в коэффициентах распределения и степени извлечения 6-меркаптопурина и азатиоприна в одних и тех же экстракционных системах обусловлены различной растворимостью этих веществ в воде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлена возможность практически полностью (~95 %-ного) извлечения иммунодепрессантов из водных растворов. Для экстракции иммунодепрессантов рекомендуются системы на основе водорастворимых полимеров вследствие их экологической безопасности и высокой комплексообразующей способности по отношению к извлекаемым веществам. Разработанный способ легко выполним, продолжительность анализа 30—40 мин. Минимально определяемые концентрации иммунодепрессантов по предлагаемой методике находятся на уровне 0.05 мг/см³. Степень извлечения иммунодепрессантов повышается при проведении повторной экстракции.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2014—2016 годы. Проект № 1296.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арзамасцев А. П. Фармацевтическая химия. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 640 с.
2. Коренман И. М. Экстракция органических веществ. Горький: Горьк. гос. ун-т, 1973. 160 с.
3. Коренман Я. И. Коэффициенты распределения органических соединений. Справочник. Воронеж: Воронеж. гос. ун-т, 1992. 336 с.

Коренман Яков Израильевич — д. х. н., профессор кафедры физической и аналитической химии Воронежского государственного университета инженерных технологий; тел.: (473) 2521160, e-mail: moksnad@mail.ru

Логина Олеся Александровна — аспирант кафедры физической и аналитической химии, Воронежский государственный университет инженерных технологий; тел.: (473) 2550762, e-mail: olkrivosheeva@mail.ru

Мокшина Надежда Яковлевна — д. х. н., доцент кафедры физики и химии ВУНЦ ВВС «Военно-воздушная академия им. профессора Н. Е. Жуковского и Ю. А. Гагарина» тел.: (473) 2588338, e-mail: moksnad@mail.ru

4. Суханов П. Т. Дис. ... докт. хим. наук. Саратов: Саратов. гос. ун-т, 2007. 385 с.

5. Соловкин А. С. Высаливание и количественное описание экстракционных равновесий. М.: Атомиздат, 1969. 124 с.

6. Мокшина Н. Я. Экстракция аминокислот и витаминов. Воронеж: Воронеж. гос. технол. акад., 2007. 246 с.

7. Рафиков С. Р., Павлова С. А., Твердохлебова И. И. Методы определения молекулярных весов и полидисперсности высокомолекулярных соединений. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 326 с.

8. Энциклопедия полимеров. Т. 1. М.: Советская энциклопедия, 1972. С. 38.

9. Кири Ю. Э. Поли-*N*-винилпирролидон и другие поли-*N*-виниламиды. М.: Наука, 1998. 252 с.

10. Мокшина Н. Я. Дис. ... докт. хим. наук. Краснодар: Кубанский гос. ун-т, 2007. 328 с.

11. Пахомова О. А. Дис. ... канд. хим. наук. Воронеж: Воронеж. гос. технол. акад., 2007. 151 с.

12. Сайкс П. Механизм реакций в органической химии. М.: Химия, 1991. 320 с.

13. Мокшина Н. Я., Коренман Я. И., Пахомова О. А. и др. // Аналитика и контроль. 2009. Т. 13. № 4. С. 169.

14. Нейланд О. Я. Органическая химия. М.: Высш. шк., 1990. 332 с.

15. Шляхина Ю. В., Мокшина Н. Я., Хохлов В. Ю. и др. // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2006. Т. 46. № 6. С. 20.

16. Маслова Н. В., Коренман Я. И., Суханов П. Т. // Сб. статей «Актуальные проблемы химической науки, практики и образования». Курск. 2009. Ч. 1. С. 138.

17. Шкинев В. М., Нифантьева Т. И. // Журн. аналит. химии. 1989. Т. 44. № 8. С. 1368.

18. Молочникова Н. П., Шкинев В. М., Мясоедов Б. Ф. // Радиохимия. 1995. Т. 37. № 5. С. 385.

Korenman Yakov I. — Dr. Sci. (Chem.), Professor of the Department of Physical and Analytical Chemistry, Voronezh State University of Engineering Technologies; tel.: (473) 2521160, e-mail: moksnad@mail.ru

Loginova Olesya A. — post graduate student, Department of Physical and Analytical Chemistry, Voronezh State University of Engineering Technologies; tel.: (473) 2550762, e-mail: olkrivosheeva@mail.ru

Mokshina Nadezhda Ya. — Dr. Sci. (Chem.), Associative Professor of the Department of Physics and Chemistry, N. Zhukovskii and Yu. Gagarin Air Force Academy; tel.: (473) 2588338, e-mail: moksnad@mail.ru

Шаталов Геннадий Валентинович — д. х. н., профессор, заведующий кафедрой химии высокомолекулярных соединений и коллоидов, Воронежский государственный университет; тел.: (473) 2208956, e-mail: chhml158@chem.vsu.ru

Shatalov Gennady V. — Dr. Sci. (Chem.), Professor, Head of the Department of Polymer Science and Colloids, Voronezh State University; tel.: (473) 2208956, e-mail: chhml158@chem.vsu.ru

Быковский Дмитрий Владимирович — аспирант кафедры химии высокомолекулярных соединений и коллоидов, Воронежский государственный университет; тел.: (473) 2208956, e-mail: nasredinne@mail.ru

Bikovskiy Dmitry V. — post graduate student of the Department of Polymer Science and Colloids, Voronezh State University; tel.: (473) 2208956, e-mail: nasredinne@mail.ru