



УДК 541. 697-089. 22+546. 171.6

Модификация 4, 4' – диаминодиазоаминобензола карбоксилсодержащими ионитами

Каримов М.М., Мухамедиев М.Г., Мусаев У.Н.

Национальный Университет Узбекистана им. Мирзо Улугбека, Ташкент

Поступила в редакцию 20.05.2011 г.

Аннотация

С целью получения пролонгированной лекарственной формы ветеринарного препарата – 4,4'- диаминодиазоаминобензол, исследована его иммобилизация на различных карбоксильных ионитах. Выявлено влияние на процесс сорбции физиологический активного вещества морфологии и физико-химических характеристик сорбентов. Моделированием процесса вымывания иммобилизованного лекарственного вещества из полимерных лекарственных форм десорбцией установлена возможность регулирования кинетики данного процесса путём варьирования полимерной матрицы.

Ключевые слова: Сорбция, ёмкость сорбента, сшивающий реагент, лекарственное вещество, болаформный ион, пролонгация, десорбция

With aim of obtain of prolongation medicinal form of veterinary preparation 4,4'-diamidinodiazaminobenzene it's immobilization on different carboxylic ionits was investigated. Influence on the sorbtion of the physiological active compound of morphology and physically – chemically characteristics of sorbents was determined. The possibility of kinetics regulation of investigated process of washing of immobilized medicinal compound from polymeric matrix by desorbtion was determined by modulation of this process.

Keywords: capacity, sorbent, cross – linked reagent, medicinal compound, bolaphormic ion, prolongation, desorbtion

Введение

Карбоксилсодержащие функциональные полимеры из-за наличия у них стимул - чувствительных свойств находят все большее применение в медицине, ветеринарии, биотехнологии и биоинженерии [1]. Преимуществом использования в этих целях карбоксильных катионов на основе метакриловой кислоты является «мягкость» их действия благодаря небольшой кислотности. Это немаловажно при сорбции лабильных веществ типа белков, ферментов и больших органических молекул, так как сохранение структуры сорбтива это залог сохранения его физиологической активности [2]. Физико-химические свойства и морфология сорбентов зависят от условий синтеза и выбора сшивающего агента, варьирование которых позволяет получать макропористые или же макросетчатые иониты [3]. Макропористые иониты следует рассматривать как гелевые фазы с повышенной гетерогенностью. Наряду с уплотненными участками трёхмерного сетчатого

полимера, они содержат гидрофильные каналы, поверхность которых может нести заряд [4]. В макросетчатых же ионитах макроцепи сохраняют большую конформационную подвижность и образуют более или менее равномерную сетку по всем направлениям. При использовании длинноцепных сшивающих агентов достигается более высокая подвижность макроцепей, которая может способствовать сорбционной способности ионитов [5,6].

Эксперимент

В работе были использованы карбоксилсодержащие сорбенты, характеристика которых дана в таблице.

Таблица. Физико-химические характеристики использованных фракций макросетчатых карбоксильных ионитов

Код ионита	Сшивающий агент	Длина сшивающего агента, пм	Номер фракций	d, мкм	K _{наб} В воде	ПОЕ по Na ⁺ мг-экв/г	Кол-во тит-ых COOH, %
Д-18 макропористый	ЭГДМ	952	2	14	4.8	6.39	55.5
Д-18 макросетчатый	ЭГДМ	952	2	13	3.1	9.80	80.5
СГ-1М	ТЭГДМ	1832	2	11	2.8	9.69	83.3
КМДМ-2	N, N - ЭДМА	982	1	11	5.1	10.5	90.0
			2	10	4.5	10.4	86.2
КМДМ-4	N, N- ТМДМА	1290	2	7.7	3.3	8.20	77.3
			3	4.1	3.2	8.20	73.7
			4	2.8	3.2	8.10	70.6
КМДМ-6	N, N- ГМДМА	1598	1	15	4.5	8.90	76.0
			2	6	4.4	8.40	73.2
			3	5	4.2	8.20	71.8

Синтез макросетчатых ионитов на основе метакриловой кислоты: СГ-1М, сшивающий агент – триэтиленгликольдиметакрилат (ТЭГДМ), Д-18, сшивающий агент – этиленгликольдиметакрилат (ЭГДМ), КМДМ – 6, сшивающий агент –N, N – гексаметилендиметакриламид (N, N- ГМДМА) и КМДМ-4 сшивающий агент –N, N- тетраметилендиметакриламид (N, N- ТМДМА) осуществляли в водном растворе уксусной кислоты, являющейся хорошо сольватирующим растворителем для мономерной смеси и образующегося полимера. Растворители, сольватирующие полимерные цепи, способствуют образованию сеток с большей конформационной подвижностью межузловых участков цепей. Отличительной чертой катионита КМДМ-2, сшивающий агент –N, N- этилендиметакриламид (N, N- ЭДМА), является то, что он был синтезирован в воде. Все катиониты перед использованием были измельчены и подвергнуты фракционированию по размерам [7].

Из таблицы видно, что макропористые сорбенты, даже имеющие большие коэффициенты набухания, содержат меньше процент титруемых карбоксильных групп по сравнению с макросетчатым сорбентом. Очевидно, с увеличением размера

противоиона значение ПОЕ по нему будет уменьшаться и различие между макросетчатым и макропористым сорбентами должно проявляться более чётко.

Сорбцию 4,4'-диамидиподиаминобензола (азидин^x) изучали статическим методом. Для этого, к водным суспензиям предварительно измельчённых до размеров 5-20 мкм и очищенных ионитов при активном перемешивании добавляли концентрированный (10-15%) водный раствор азидина. Содержание иммобилизованного лекарственного вещества -азидин^x до и после сорбции и при десорбции определяли спектрофотометрическим методом по измерению оптической плотности среды при длине волны 370нм на спектрофотометре Specord – M-40. Десорбцию азидин^x из лекарственных форм проводили изучали пропусканием фосфатного буферного раствора (рН=7,5) через термостатируемые колонки (диаметром 0,5 см, высотой 10 см). Скорость прохождения десорбата 0,1 мл/мин.

Потенциометрическое титрование проводили на рН-метре 673 М. Теплоты сорбции определяли на микрокалориметре ДАК-1.1А. Коэффициенты набухания ($K_{\text{наб}}$) сорбентов определяли пикнометрическим методом, а ПОЕ по ионам Na^+ определяли методом обратного потенциометрического титрования.

Обсуждение результатов

Как было отмечено выше, для модификации азидина^x были использованы карбоксилсодержащие иониты с различными сшивающими агентами. Отличительной чертой ионита КМДМ-4 является хорошая диспергируемость до однородных по размерам частиц. Тонкоизмельчённые фракции КМДМ-4 образуют сравнительно устойчивые коллоидные растворы. Размер частиц сорбента, очевидно, должен иметь существенное значение при сорбции.

На рис. 1 представлена зависимость изменения тепловыделения при сорбции азидина^x на частицах сорбента КМДМ-4 различного размера. Видно, что процесс протекает с выделением тепла, однако тепловой эффект незначителен, что свидетельствует о слабом связывании азидина^x сорбентом.

С уменьшением размера частиц ионита доступность функциональных групп сорбента по органическому веществу возрастает и приближается к показателю для растворимой ПМАК. Интересно, что аналогичные показатели для этих же сорбентов по ионам Na^+ близки, вследствие малого размера иона и сравнительно лёгкой доступности функциональных групп. При размерах частиц более 2 мкм доступность функциональных групп, расположенных в объёме частиц, для больших органических ионов затрудняется [8].

Сорбция исследуемого вещества происходит в два этапа: на начальном этапе происходит быстрое взаимодействие ионов органического вещества с поверхностным слоем сорбента, а затем происходит медленное, диффузионно лимитируемая, сорбция азидина^x в объёме сорбента (рис.2).

Как видно из рис. 2, сорбционная способность по отношению к азидину^x ионитов сшитых акриламидными мостиками несколько выше, чем у ионитов, сшитых этиленгликольдиметакрилатом. Аналогичная зависимость была обнаружена и при исследовании процесса методом динамической сорбции азидин^x, хотя $K_{\text{наб}}$ в воде и ПОЕ по Na^+ катионита Д-18 больше, чем у катионита КМДМ-6 (табл. 1). Аналогичное различие наблюдается между катионитами СГ-1М и КМДМ-4, несмотря на то, что катионит СГ-1М сшит более длинными мостиками. Высокую сорбционную способность катионитов, сшитых N, N- метилендиметакриламидами, можно объяснить их большей гибкостью и гидрофильностью, что способствует

образованию внутримолекулярных водородных связей. В работе [3] отмечалось, что эти связи разрушаются при увеличении рН.

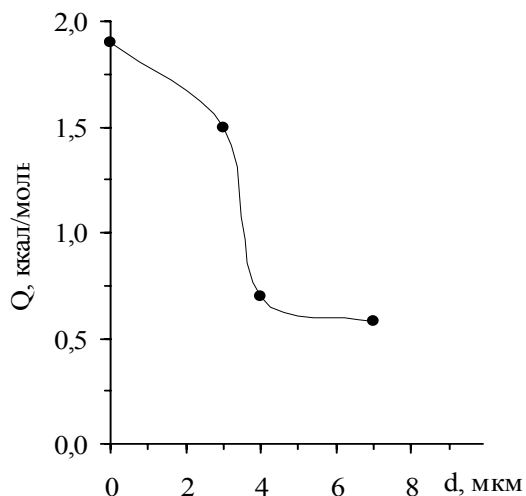


Рис. 1. Зависимость теплового эффекта от размера частиц при сорбции азидина из водных растворов фракциями ионита КМДМ-4. Соотношение азидин/ионит 0,0264 г/г. $T=308\text{K}$

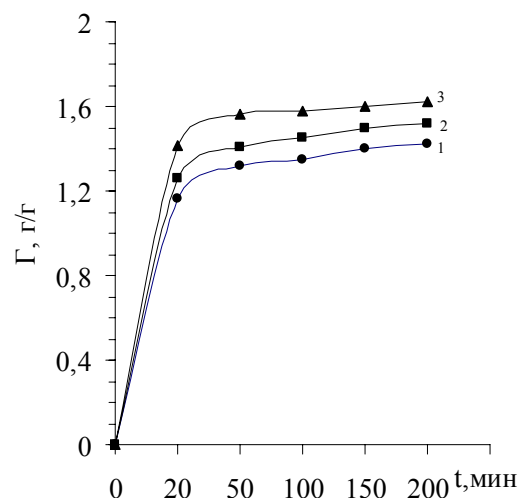


Рис. 2. Кинетика стационарной сорбции азидина^x на ионитах: 1-Д-18 2 фр, СГМ-1М 2 фр; 2 –КМДМ-4 2 фр; 3-КМДМ-6 1 фр. Начальная концентрация азидина $3,55 \cdot 10^{-4}$ моль/л, соотношение азидин/полимер 0,4 г/г. $T=308\text{K}$

Различие сорбционных свойств ионитов КМДМ-6, КМДМ-4 и КМДМ - 2 также обнаружено проведением динамической сорбции. Ёмкость ионита КМДМ-6 по отношению к азидину^x выше, чем у ионита КМДМ-2, тогда как ПОЕ по Na^+ у второго намного больше (таблица). Установлено также увеличение ёмкости по азидину^x фракций ионита КМДМ-2 при увеличении $K_{\text{наб}}$ от 4.5 до 5.1, у которых другие физико-химические характеристики очень близки. Это обусловлено, по всей вероятности, большей подвижностью макроцепей между узлами сшивки при более редком сшивании. Полученные данные коррелируют с описанными в литературе закономерностями связи увеличения сорбционных свойств ионитов и коэффициента набухания [9]. Сорбционная способность ионитов КМДМ-2 и КМДМ-4 также существенно отличается. Наблюдаемое различие обусловлено условиями синтеза: при синтезе ионита в воде происходит образование сеток с конформационно подвижными участками цепей между узлами сшивок в силу взаимного отталкивания заряженных макроцепей.

Такие макросетчатые (точнее гетеросетчатые) иониты весьма удобны для иммобилизации биологически активных соединений, так как, практически, не разрушают их нативную структуру [9,10].

Взаимодействие азидина с ионитами сопровождается вытеснением ацетуровой кислоты. Выделяющуюся ацетуровую кислоту можно оттитровать потенциометрически. Количество иммобилизованного азидина^x, вычисленное по данным потенциометрии, на ионитах КМДМ-6, КМДМ-4 и КМДМ-2 (рис.3) хорошо согласуется с результатами определения количества связанного ЛВ методом динамической сорбции. Видно, что сорбционная способность ионита КМДМ-6 по отношению к азидину^x на много больше, чем у ионита КМДМ-4, хотя по физико-

химическим параметрам эти фракции достаточно близки (таблица). Вместе с тем можно видеть, что даже при использовании коротких сшивающих агентов можно получать ёмкие сорбенты. Таким образом можно резюмировать, что длина сшивающего агента в макросетках оказывает существенное влияние на сорбцию органических ионов, в то время, как при связывании малых ионов эта разница не выявляется.

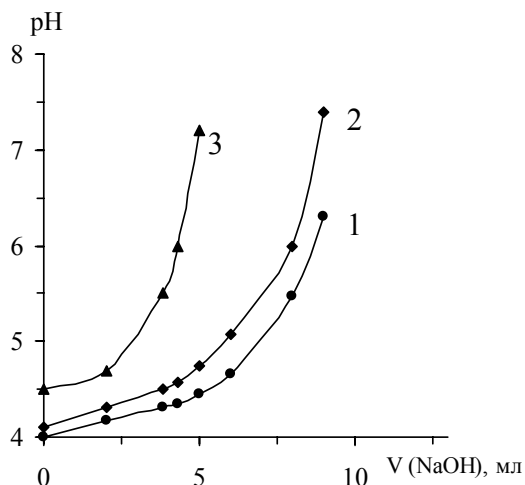


Рис. 3. Кривые потенциометрического титрования ацетуровой кислоты, выделившейся при взаимодействии азидина с ионитами: 1-КМДМ-6 3 фр; 2-КМДМ-2 1-фр; 3- КМДМ-4 3 фр, раствором 0,0082 Н раствором NaOH. Время сорбции 50 часов, соотношение азидин/полимер 2/1 г/г

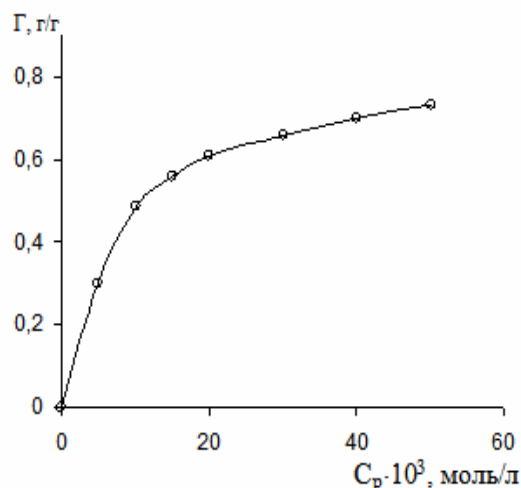


Рис. 4. Изотерма сорбции азидина^x на ионите КМДМ-6, T=298K

По данным потенциометрического титрования выделенной ацетуровой кислоты (рис.3) вычислены константы устойчивости полимерных комплексов азидина^x с исследуемыми сорбентами по формуле:

$$K_{уст} = \frac{[\text{полимерный комплекс}]}{[\text{азидин}][\text{COOH}]}$$

где [азидин]- начальная концентрация азидина в растворе; [COOH] - начальная концентрация карбоксильных групп; [полимерный комплекс]- равна концентрации иммобилизованного на ионитах азидина^x.

Установлено, что $K_{уст}$ полимерного комплекса на основе сорбента КМДМ-6 ($9.7 \cdot 10^8$ л/моль) больше чем у полимерного комплекса на основе сорбента КМДМ-2 ($7.6 \cdot 10^8$ л/моль) и КМДМ-4 ($5.1 \cdot 10^8$ л/моль), что указывает на более прочное связывание органических ионов сорбентом КМДМ-6.

Помимо выше упомянутого, иммобилизация азидина^x на КМДМ-6 исследована также методом стационарной сорбции (рис. 4). Изотермы сорбции азидина^x ионитом указывают на идентичность и независимость центров связывания ионита и подчинения процесса обычным законам сорбции низкомолекулярных веществ. Для количественного описания исследуемого процесса было использовано уравнение Хилла [11], использовавшееся ранее для описания взаимодействия белок - низкомолекулярное вещество:

$$Y/(1-Y) = KC_p^q$$

где Y - доля насыщения макромолекулы лигандом и равна отношению количества связанного лиганда к количеству центров связывания; K - константа ионного равновесия; C_p - равновесная концентрация низкомолекулярного соединения в растворе; q - константа Хилла - показатель степени, характеризующий меру кооперативности процесса связывания. Логарифмирование это уравнения позволяет преобразовать кривую изотермы сорбции в линейную форму:

$$\lg Y/(1-Y) = \lg K + q \lg C_p$$

Графическим методом из зависимости $\lg Y/(1-Y)$ от $\lg C_p$ были определены константой равновесия начальной и конечной стадий сорбции, которые имеют следующие значения: $K_1=166$ и $K_2=1.78$, а также значение константы Хилла (q) соответственно равные 1,1 и 0,4.

Изотерма связывания болаформного иона ионитом (рис.4) состоит из двух участков с разными наклонами, что свидетельствует о наличии двух процессов: начального – кооперативного ($q_1 > 1$) и дальнейшего - некооперативного ($q_2 < 1$) связывания азидина^x. Такое различие значений констант Хилла обусловлено тем, что при сорбции болаформного иона на ионите участки макроцепей между узлами сшивок могут претерпевать конформационные превращения. Кроме этого этот процесс существенно осложняется неадекватностью функциональных групп на поверхности и в объёме ионита.

Построением зависимости C_p/Γ от $1/C_p$ позволило определить значения предельной сорбции (Γ_∞), константу сорбции (K^1) и вывести уравнение для описания сорбции азидина^x на ионите КМДМ-6:

$$\Gamma = \Gamma_\infty \frac{K^1 C}{1 + K^1 C} = 0,7 \frac{357C}{1 + 357C}$$

Необходимо отметить, что константа сорбционного равновесия (K^1) в уравнении косвенно связано с энергией взаимодействия адсорбата с адсорбентом: чем сильнее это взаимодействие, тем больше K^1 . Найденное значение $K^1=357$, незначительно отличается от значения константы равновесия найденной методом Хилла и характерно для хемосорбции низкомолекулярных соединений сорбентами.

Полимерные комплексы азидина^x могут быть использованы в ветеринарии. Немаловажное значение при этом играет скорость выделения (десорбирования) азидина^x из лекарственной формы, которая определяет длительность поддержания оптимальной концентрации ЛВ в организме. Эти вопросы, как правило, предварительно исследуют *in vitro*, а затем *in vivo*. Оптимальная скорость ликвидации лекарственных соединений из лекарственных форм позволяет достичь уменьшения лечебной и общей дозы, уменьшить возможность коммуляции в органах, возникновения аллергии, быстрой адаптации к ним организма [12, 13].

Как было показано выше, связывание молекул азидина^x ПМАК происходит «мягко», что способствует сохранению его химической структуры при иммобилизации его на рассмотренных макросетчатых ионитах. Подтверждением этому является УФ-спектр водного раствора десорбированного лекарственного вещества, который был идентичен УФ-спектру азидина, и высокая физиологическая активность синтезированных лекарственных форм азидина^x.

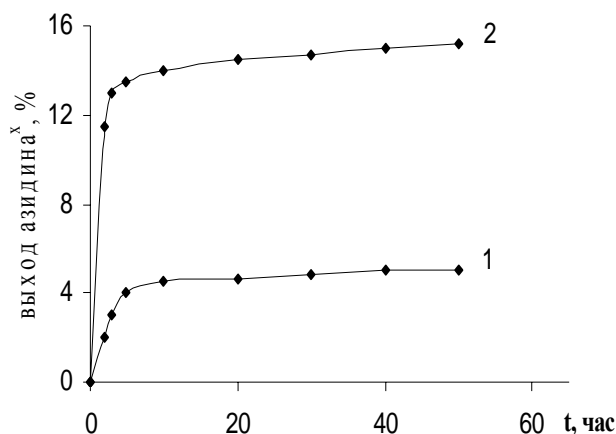


Рис. 5. Зависимость содержания азидина^x в элюате при его десорбции из полимерного комплекса на основе ионита Д-18 (1) и ПМАК (2) от времени. Содержание азидина^x в комплексах 20,5%. T=298K

Оценка скорости десорбции иммобилизованного азидина^x из лекарственных форм даёт возможность оценить длительность пролонгирующего действия. Для сравнения в стационарных условиях исследована десорбция азидина^x из полимерных комплексов на основе растворимой и сшитой ПМАК, результаты которой убедительно показали существенное различие этих систем. Как видно из рис.5 сшивка полимерной матрицы позволяет уменьшить начальную скорость десорбции в несколько раз. Механизм десорбции азидина^x из лекарственных форм на основе макросетчатых карбоксильных ионитов должен отличаться от такового, наблюдаемого для обычных полимерных комплексов. Ионитный комплекс лекарственного вещества более неоднороден по срезу: в нём должен наблюдаться определённый градиент концентрации ЛВ от периферии к центру частицы. По-видимому, именно это обуславливает заметную двухступенчатость десорбции. На первом этапе происходит вымывание ЛВ с поверхности и из поверхностного слоя, затем, на втором этапе, происходит десорбция из глубинных слоёв. В отличие от этого десорбция азидина^x из полимерного комплекса на основе растворимой ПМАК происходит значительно быстрее, особенно на первом этапе (рис. 5). Здесь, очевидно, нужно учесть, что по мере десорбирования ЛВ полимерная матрица разрыхляется, что приводит к облегчению диффузии остального азидина^x.

Особый интерес представляет возможность регулирования скорости десорбции лекарственного вещества путём изменения структуры полимерной матрицы. Установлено, что ликвидация иммобилизованного ЛВ из полимерного комплекса на основе ионита КМДМ-2 меньше, чем аналогичный показатель у полимерного комплекса на основе ионита КМДМ-6, хотя $K_{наб}$ у первого сорбента больше (таблица), что можно объяснить различием микроструктур данных сорбентов. КМДМ-6 содержит более длинные, а значит более гибкий сшивающий агент, чем ионит КМДМ-2 (таблица), что обеспечивает более подвижную структуру первого сорбента и большую диффузия молекул азидина^x. В отличие от полимерного комплекса азидин^x – ПМАК у полимерных комплексов на основе ионитов через сравнительно короткое время устанавливается постоянная скорость десорбции, что можно объяснить медленной ликвидацией азидина^x изнутри частиц. В комплексе же азидин^x–ПМАК молекулы органического вещества «экранированы» макромолекулами.

Заключение

Методами сорбции и потенциометрии изучено иммобилизация физиологически активного вещества 4, 4' – диамидиподиазоаминобензола карбоксильными ионитами. Показано что связывание физиологически активного соединения увеличивается при использовании длиноцепных гидрофильных сшивающих агентов, а также при уменьшений частоты сшивки и размеры частиц.

Проведением десорбции в условиях *in vitro* выявлено, что высвобождение иммобилизованного ФАВ из полимерных комплексов происходит в два этапа: начального, где наблюдается сравнительно быстрая ликвация его (до 40% от связанного количества) и второго, где устанавливается медленная стационарная скорость ликвации лекарственного вещества. Выявлена зависимость ликвации физиологически активного вещества из полимерных форм от типа полимер-носителя, а также длины и гибкости сшивающего агента, размера частиц.

Список литературы

1. Галаев Ю.В. «Умные» полимеры в биотехнологии и медицине // Успехи химии .- Т.64.- 1995.-№5.-С.505-523.
2. Ashok Kumar, Akshay Srivastava, Igor Yu Galaev, Bo Matiasson. Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications // Prog. Polym. Sci.- 2007.- 32.- 10.-P. 1205-1237.
3. Demin A.A., Melenevsky A.T., Papukova K.P., Samsonov G.V. The improvement of the efficiency of biologically active substances separation on some composite adsorbents. // European Polymer J.-V.37.-2001.-№1.- P.113-117.
4. Дёмин А.А., Ионообменные сорбенты для препаративной хроматографии белков (новые подходы). // Сорбционные и хроматографические процессы.-Т.1.-2001.-№2.- С.289-293.
5. Schacht E., Luc R., Johan V. Controlled release polymeric drags with potential anti-arithmetic activity // Int. UnionPure and Apple chem. 28th Macromol/ Symp/ AmherstMass^-1982.-51.-P.390.
6. Каримов М.М. Исследование взаимодействий гидрофильных полиэлектролитов с антипротозойным веществом-4,4-диами-динодиазоаминобензол диацетуратом //Республиканская научно-произ-водственная конференция «Внедрение научно-исследовательских работ по химии и химической технологии»: Тез.докл. Караганда, 1985.- С.27.
7. Самсонов Г.В. Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров. М.-Л.:Наука, 1966.-С.287-288.
8. Ануфриева Е.В., Самсонов Г.В., Кузнецова Н.П., Роль топологии полимеров в комплексообразовании полиметакриловая кислота – лизоцим в воде// !-Всесоюзная научная конференция «Интерполимерные комплексы »: Тез.докл. –М., 1984.-С.143.
9. Schacht E., Goethals E., GyselinckP. Polymer drug combinations. VI. Sustained release of levamisole from ion exchange resins // J/ Pharm. Belg. -1982.-37.-No .- P/163-188.
10. Москвичёв Б.В., Морголина Н.А., Миргородская О.А. Сорбция пектиназы карбоксильными катионитами // Микробиол. промышленность. 1974.- Т.7.-С.10-12.
11. Кузнецова Н.П., Мишаева Р.Н., Самсонов Г.В. Анализ коперативности связывания белков с карбоксильными макросетчатыми полиэлектролитами// Высокомол. соедин.- 1987.-Б1.-С.10-14.

12. Каримов М.М., Ким А.А., Папукова К.П., Мусаев У.Н. «Исследование взаимодействия линейных полимеров с органическим ионом» // Докл. АН УзССР, - 1988, -№5, ст.31-32.

13. Мусаев У.Н., Папукова К.П., Рахимов Г.Х., Каримов Б.А., Гафуров А.Г. «Полимерный комплекс 4, 4' – диамидиподиазоаминобензола с макросетчатыми сополимером обладающий повышенным пролонгирующим и антипротозойным действием» Авт. Св. СССР №1398367-1988.

Каримов Махмуд Муратович – с.н.с., к.х.н., Национальный университет Узбекистана, Ташкент, Узбекистан

Мухамедиев Мухтаржан Ганиевич – заведующий кафедрой химии полимеров, д.х.н., Национальный университет Узбекистана, Ташкент, Узбекистан

Мусаев Уткур Насирович – Заслуженный деятель науки РУз, д.х.н., профессор, Национальный университет Узбекистана, Ташкент, Узбекистан

Karimov Mahmud M. – d.ph., o.s.w., National University of Uzbekistan, of chemistry, Uzbekistan, e-mail: mmuxamediev@mail.ru

Mukhamediev Mukhtarjan G. – chief of department of Polymer chemistry, d.s., National University of Uzbekistan, of chemistry, Uzbekistan, E-mail: mmuxamediev@mail.ru

Musaev Utkur N. – d. s. of chemistry , professor, Honoured Scientist of RUz, Uzbekistan