

УДК 678.745.8: 543.421/424

САМЧЕНКО Ю.М., ПАСМУРЦЕВА Н.А., УЛЬБЕРГ З.Р.

**ПРИМЕНЕНИЕ УФ-СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ДИФФУЗИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ГИДРОГЕЛЕЙ МЕДИЦИНСКОГО
НАЗНАЧЕНИЯ**

Спектроскопія в ультрафіолетовій (УФ) та видимій областях використовувалась для характеризування електростимульованої дифузії лікарських препаратів із гідрогелів медичного призначення, а також у якості експрес-методу оцінки ступеня відмивки синтезованих просторово зшитих гідрогелевих матриць від залишкових кількостей непрореагованих токсичних мономерів

Ключові слова: *гідрогелі медичного призначення, спектроскопія в ультрафіолетовій та видимій областях, аналіз, залишкові кількості токсичних мономерів*

Спектроскопія в ультрафіолетовій (УФ) и видимой областях была использована для характеристики электростимулированной диффузии лекарственных препаратов из гидрогелей медицинского назначения, а также для в качестве экспрес-метода оценки степени отмывки синтезированных пространственно сшитых гидрогелевых матриц от остаточных количеств непрореагировавших токсичных мономеров

Ключевые слова: *гидрогели медицинского назначения, спектроскопія в ультрафіолетовій и видимой областях, анализ, остаточные количества непрореагировавших мономеров*

Spectroscopy in the ultraviolet and visible areas was used to characterize electrically modulated diffusion of drugs from the hydrogels of medical purposes, as well as for express-estimation method of the degree of cleaning of the synthesized spatially cross-linked hydrogel matrix from residual unreacted toxic monomers

Key words: *spectroscopy in the ultraviolet and visible areas, analysis, residual unreacted toxic monomers*

Введение

На протяжении ряда лет в различных областях медицины применяют гидрогели (сшитые гидрофильные полимеры) различного химического состава, прежде всего, на основе акриламида, винилпирролидона, поливинилового спирта и ряда природных биополимеров, таких как хитозан и коллаген. Привлекательность их применения объясняется простотой получения, высокой биосовместимостью, обусловленной близостью структуры к тканям человеческого организма, возможностью направленного изменения их свойств в широких пределах посредством варьирования химического состава гидрогелевых матриц (соотношение и природа сомономерных звеньев, частота сшивания и т.п.).

Было показано, что гидрогели представляют собой идеальную среду для культивирования микроорганизмов и клеток, в том числе стволовых, и эти разработки находят применение при лечении ожоговой болезни [1]. Гидрогели с успехом применяются для изготовления мягких контактных линз [2], эндопротезов для замещения мягких [3] и твердых тканей человеческого организма [4], противоожоговых

и хирургических повязок, сочетающих интенсивное впитывание раневого экссудата с созданием защитного барьера, предохраняющего рану от инфицирования и с пролонгированным высвобождением комплекса химико-терапевтических препаратов [5].

В последние годы синтетические и природные гидрогели все шире применяются для создания трансдермальных терапевтических систем, позволяющих сочетать пролонгированное и адресное высвобождение широкого спектра химико-терапевтических лекарственных препаратов [6, 7]. Особый интерес исследователей привлекают так называемые «умные» гидрогели, способные скачкообразно и прогнозируемо изменять свои физико-химические параметры (степень набухания, проницаемость и т.п.) под влиянием незначительных внешних воздействий (величина рН, температура, воздействие низкоинтенсивных электрического и магнитного полей и т.д.) [8]. В частности, одним из многообещающих методов интенсификации высвобождения лекарственных препаратов из гидрогелевых матриц является ионофорез, заключающийся в направленном транспорте заряженных частиц лекарств под действием малоинтенсивного постоянного электрического тока с плотностью тока до 0,5 мА/см² [9].

Кожный покров представляет собой наибольший орган человеческого, площадью около 2 м² и уже длительное время используется в качестве интерфейса для инкорпорирования разнообразных лекарственных препаратов. Ограничением для трансдермального введения ряда лекарственных препаратов является недостаточная проницаемость этой естественной мембраны, что зачастую не позволяет достичь требуемой терапевтической дозы [10]. Только липофильные неионизированные молекулы с молекулярной массой менее 500 дальтон могут проникать через внутренние слои кожной мембраны и попадать в циркуляцию крови. Ионы и высокомолекулярные неионизированные частицы задерживаются кожей (а именно мембранным слоем *stratum corneum* – отмершим слоем клеток, образующих интерфейс человеческого организма и окружающей его среды обитания) [11]. Ионофорез приводит к увеличению проницаемости через кожную мембрану целого ряда лекарственных препаратов, обладающих в отсутствие разницы потенциалов слабой проницаемостью.

Настоящая работа посвящена изучению методом УФ-спектроскопии диффузии лекарственных препаратов через естественные и искусственные мембраны и интенсификации указанных процессов путем наложения слабого постоянного тока. Кроме того, учитывая тот факт, что практически все синтетические гидрогели, в том числе и медицинского назначения, получают из токсичных мономеров, и крайне важной задачей является отмывка гидрогелей от остаточных микроколичеств мономеров [12], была проведена оценка возможности использования метода УФ-спектроскопии для экспресс-диагностики содержания мономеров в сополимерных гидрогелях.

Экспериментальная часть

В качестве метода количественного анализа десорбции лекарственных препаратов и химических соединений из гидрогелей (пленок) был использован метод УФ-спектроскопии, который позволяет определить в исследуемых соединениях группировки-хромофоры и предоставляет возможность количественного анализа веществ, содержащих такие группировки. Для снятия электронных спектров поглощения был использован спектрофотометр SPECORD M40 (Германия), предназначенный для регистрации спектров поглощения в УФ и видимой областях.

Для определения количества десорбируемого вещества строилась градуировочная кривая зависимости оптической плотности от концентрации вещества. Концентрации

растворов, используемых для построения градуировочных кривых, варьировались в диапазоне 10^{-6} – 10^{-4} моль/л.

Исходный раствор готовили весовым методом. Последовательным разбавлением в мерных колбах готовили растворы. Измерения оптической плотности исследуемых веществ проводили в кварцевых кюветах с сечением 1×1 см, для заполнения которых необходимо 4 мл жидкости. Для приготовления растворов использовали растворители, прозрачные в видимой и УФ областях спектра. В качестве раствора сравнения использовали дистиллированную воду и водно-метанольные растворы различных концентраций.

Полученные спектры характеризовали длиной волны, при которой наблюдается максимум поглощения, и молярным коэффициентом поглощения (экстинцией) этого раствора. Коэффициент экстинции градуировочных растворов вычисляли по формуле

$$E = D / Cl, \quad (1)$$

где

E-коэффициент экстинции, л/моль*см

D-оптическая плотность раствора

C-концентрация вещества, моль/л

l-толщина слоя раствора, см (в нашем случае $l=1$ см).

Коэффициент экстинции для каждого поглощающего вещества при данной длине волны в одном растворителе имеет постоянное значение.

Концентрацию поглощающего вещества вычисляли как $C = D/E$.

Диффузионные свойства модельных соединений и лекарственных препаратов при наложении внешнего низкоинтенсивного электрического поля и в его отсутствие исследовали с помощью горизонтальной диффузионной ячейки. Подробнее методика диффузионных измерений и измерительная ячейка описывалась в [9].

Кумулятивное количество вещества, CDP, проникшего через единицу площади мембраны, определяли спектрофотометрически, на основании предварительно построенных калибровочных зависимостей и определенных для молекул-диффузантов коэффициентов экстинции:

$$CDP = \frac{m}{S}, \quad \left(\frac{\text{мг}}{\text{см}^2} \right) \quad (2)$$

Исходя из угла наклона зависимости кумулятивного количества вещества (CDP), проникшего через единицу площади мембраны от времени, определяли величину стационарного потока J, мг/(см²·ч):

$$J_{ss} = \frac{CDP}{t}, \quad \left(\frac{\text{мг}}{\text{см}^2 \cdot \text{ч}} \right) \quad (3)$$

Метод УФ-спектроскопии применялся также для определения остаточного количества непрореагировавших мономеров в синтезируемых гелях после отмывки их водой. В качестве мономеров для получения гидрогелей использовались акриламид (АА), акрилонитрил (АН), акриловая кислота (АК), аллиламин, изопропилакриламид (НИПА). Радикальную сополимеризацию осуществляли при комнатной температуре, в водной среде, в присутствии бифункционального мономера N,N'-метилден-бис-акриламида

(сшивающий агент) и окислительно-восстановительной иницирующей смеси. Детально синтез сополимерных гидрогелевых матриц описывался ранее [13, 14].

Методика экстрагирования непрореагировавших мономеров из гидрогелевых образцов заключалась в следующем. В коническую колбу объемом 50 мл помещали 0,5 г гидрогеля, прибавляли 15 мл раствора метанола (обычно использовали 90 % водный раствор), закрывали пробкой и помещали на магнитную мешалку, где содержимое колбы перемешивали в течение 1 часа. Затем жидкость отфильтровывали от осадка и помещали в измерительную кювету для определения оптической плотности полученного раствора. В качестве раствора сравнения также использовали 90 %-ный водный раствор метанола. По предварительно рассчитанному значению мольного коэффициента экстинкции и определенной оптической плотности рассчитывали концентрацию остаточных количеств непрореагировавших мономеров в гидрогеле.

Результаты и их обсуждение

Спектральные характеристики лекарственных соединений и модельных веществ, исследованных с точки зрения направленного транспорта под действием низкоинтенсивного постоянного тока, представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Спектральные характеристики лекарственных соединений и модельных веществ

	Используемое вещество	Длина волны, λ_{\max}(нм)	Интервал концентраций, моль/л, 10^{-5}	Коэффициент экстинкции, E, л/моль x см
1	Анилин	230	$1,07 \times 10^{-5}$ - $26,8 \times 10^{-5}$	7650
2	Бензоат Na	225	$3,47 \times 10^{-5}$ – $13,9 \times 10^{-5}$	8014
3	Альбуцид (сульфацил Na)	260	$1,35 \times 10^{-5}$ – $13,5 \times 10^{-5}$	12815
4	Диклофенак Na	275	$0,98 \times 10^{-5}$ – $12,3 \times 10^{-5}$	10080
5	Метотрексат	305	1×10^{-5} – 4×10^{-5}	28254
6	Новокаин	293-294	$6,12 \times 10^{-5}$ – $9,16 \times 10^{-5}$	12391
7	Но-шпа	350	$2,3 \times 10^{-5}$ – $18,4 \times 10^{-5}$	10353
8	Фторурацил	266	$1,78 \times 10^{-5}$ – $28,7 \times 10^{-5}$	8188
9	Цефотаксим	240	$0,22 \times 10^{-5}$ - 11×10^{-5}	18182
10	Цефтриаксон	235	$0,9 \times 10^{-5}$ - $1,8 \times 10^{-5}$	25790
11	Этамзилат (дицинон)	300	$4,75 \times 10^{-5}$ – $47,5 \times 10^{-5}$	3954
12	Метиленовый синий	670	$0,1 \times 10^{-5}$ - $4,3 \times 10^{-5}$	52026
13	Предуктал	204-205	$0,94 \times 10^{-5}$ – $5,63 \times 10^{-5}$	29343
14	Фурацилин	266	$2,56 \times 10^{-5}$ – $25,6 \times 10^{-5}$	5800

Спектры поглощения в УФ и видимой области некоторых из исследованных диффузантов приведены на Рис. 1.

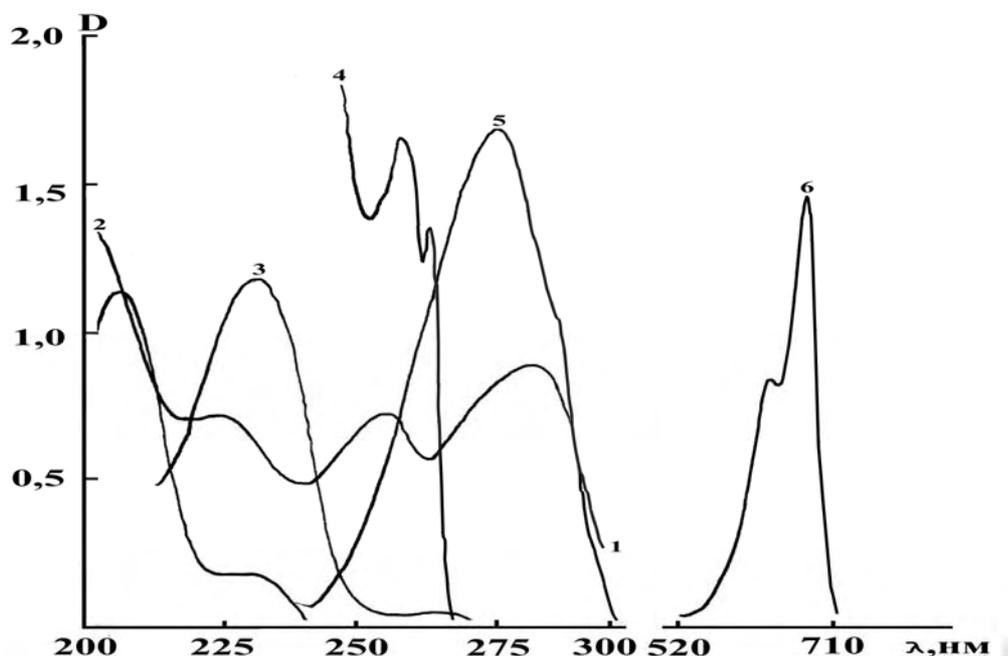


Рис. 1. Спектры поглощения исследованных модельных соединений и лекарственных веществ: 1-метотрексат, $3,3 \times 10^{-5}$ моль/л; 2-преддуктал, 4×10^{-5} моль/л; 3-бензойная кислота, $11,2 \times 10^{-5}$ моль/л; 4-лидокаин, $3,46 \times 10^{-3}$ моль/л; 5-новокаин, $14,2 \times 10^{-5}$ моль/л; 6-метиленовый синий, $2,95 \times 10^{-5}$ моль/л

Трансдермальные терапевтические системы для адресного управляемого высвобождения лекарственных препаратов были синтезированы путем радикальной сополимеризации соответствующих мономеров акрилового ряда. При этом были получены так называемые «умные» гидрогели, способные резко изменять свои эксплуатационные параметры (прежде всего, диффузионные) под воздействием незначительных изменений окружающей их среды. Так, на основе гидрогелевых сополимеров акриламида и акрилонитрила с акриловой кислотой были получены pH-чувствительные гидрогели [15], а на основе гидрогелевого сополимера акриламида (АА) и акрилонитрила (АН) с НИПА – термочувствительные гидрогелевые матрицы, резко (на порядки) меняющие свои диффузионные параметры под действием небольших изменений pH и температуры [14].

Ионофорез позволяет достичь значительного ускорения диффузии лекарственных препаратов. Выравнивание концентраций диффузанта в донорном и акцепторном отсеках наблюдается в случае диффузии через мембрану на основе полиакриламида (ПААГ) при пассивной диффузии – через 200 ч, тогда как при электростимулированной – через 4,5 ч (при 15 В) и через 1,5 ч (при 30 В). Для мембраны на основе АА-АН выравнивание концентраций анилина наблюдается через примерно 225 ч, 3 ч и 0,75 ч соответственно, т.е. диффузия ускоряется в 300 раз, а для тройного сополимера на основе АА-АН-АК – через 100 ч, 5 ч и 2,5 ч соответственно (Рис.2).

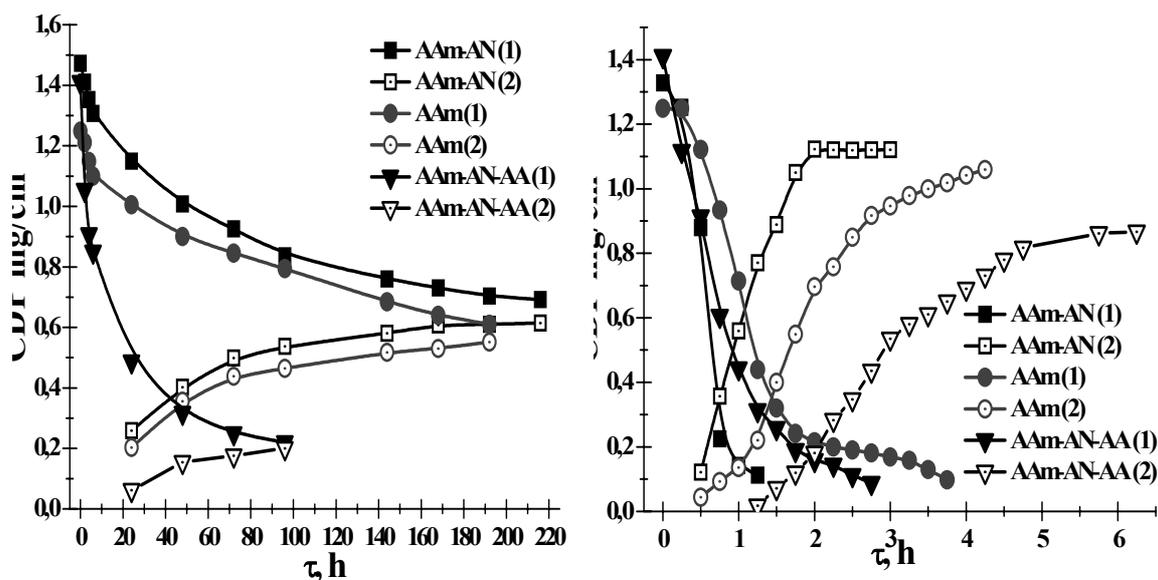


Рис.2. Диффузия анилина через различные типы гидрогелевых мембран без (а) и при (б) наложении постоянного электрического тока (напряжение 29 V) (1 – донорный отсек диффузионной ячейки; 2 – акцепторный отсек диффузионной ячейки)

Аналогичная картина наблюдается применительно к диффузии метиленового синего – в случае ПААГ выравнивание концентраций происходит через 120 ч в пассивном режиме и через 3,5 и 1,5 часа при приложении разности потенциалов 15 и 29 В соответственно. В случае диффузии через АА-АН мембрану выравнивание концентрации метиленового синего происходит через 100 ч, 3,75 и 1,75 ч.

Приложение к системе разности потенциалов приводит к усилению и ускорению диффузии модельных соединений через гидрогелевую мембрану, причем чем выше разность потенциалов, тем выше скорость проникновения и большая доля вещества, присутствующего в системе, проникает через мембрану. В то же время, если размер молекулы диффузанта превышает средний размер пор мембраны, даже наложение разности потенциалов в 30 В не позволяет достичь проникновения. Примером является диффузия витамина В12 с молекулярной массой 1357 Да, который вообще не проникал ни через одну из исследованных полимерных мембран.

Применительно к другим исследованным модельным соединениям, коэффициент усиления диффузии при наложении постоянного электрического тока возрастает на один - два порядка в сравнении с диффузией в пассивном режиме. Так, применительно к анилину рассчитанный по формуле (3) коэффициент усиления диффузии при 15 В составлял для анилина 23,55 (гомо-полиакриламидная матрица) и 20,37 (гидрогелевый сополимер АА-АН). При 30 В фактор усиления составлял 62,17 и 100 соответственно. Коэффициент усиления диффузии в случае гидрогелевой мембраны на основе тройного сополимера АА-АН-АК составлял при 30 В 53,6.

Применительно к диффузии метиленового синего величина коэффициента усиления диффузии составляла при 15 В составляла 16,47 (ПААГ) и 22,87 (АА-АН), а при 29 В – 38, 31 и 30,49 соответственно. Таким образом, в случае меньшей молекулы (анилин) коэффициент электрофоретического ускорения достигает большей величины.

Таким образом, было продемонстрировано, что ионофорез приводит к увеличению проницаемости через кожную мембрану целого ряда лекарственных препаратов, обладающих в отсутствии разницы потенциалов слабой проницаемостью, а метод УФ-

спектроскопии может с успехом применяться для определения миграции диффузантов через пористую гидрогелевую матрицу.

Метод УФ-спектроскопии был также с успехом применен для контроля уровня непрореагировавших мономеров в сополимерных гидрогелевых матрицах и оптимизации технологии их отмывки. Спектральные характеристики исследованных мономеров приведены в Табл. 2 и на Рис. 3.

Таблица 2.

Спектральные характеристики исследованных мономеров.

	Название мономера	Длина волны λ_{max} (нм)	Интервал концентраций, моль/л,	Коэффициент экстинкции, л/моль*см	Используемый растворитель
1	Акриламид	200	$0,14 \times 10^{-5}$ - 14×10^{-5}	14000	90% водный метанол
2	Акрилонитрил	200	$1,88 \times 10^{-5}$ - $1,88 \times 10^{-4}$	97,06	10% водный метанол
3	Акриловая кислота	200	$1,39 \times 10^{-4}$	8280	Дист. вода
4	Аллиламин	200	$0,175 \times 10^{-5}$ - $8,76 \times 10^{-5}$	1119	10% водный метанол
5	N-изопропил акриламид	200, 240	$0,0884 \times 10^{-5}$ - $4,42 \times 10^{-5}$	12158	10% водный метанол

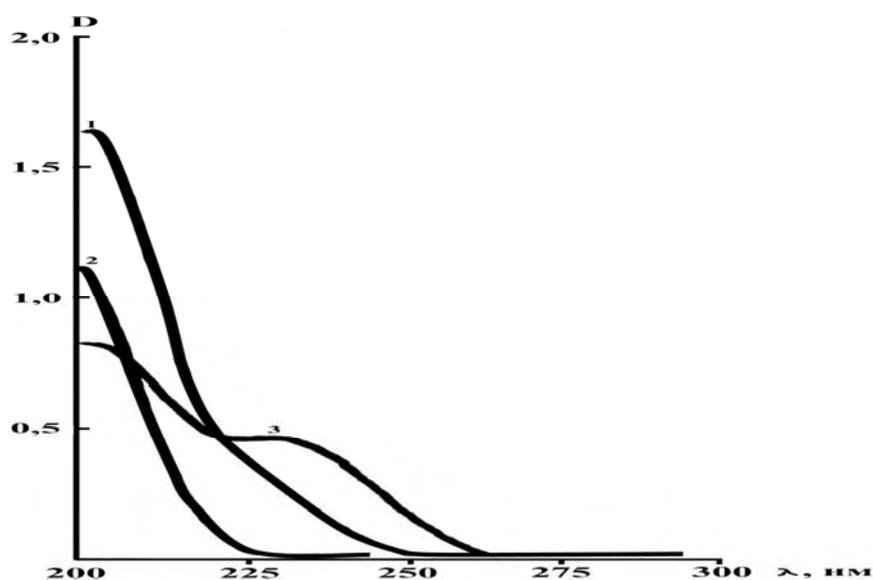


Рис. 2. УФ-спектры мономеров, применявшихся для синтеза гидрогелевых матриц: 1- акриламид, $C=1,41 \times 10^{-4}$ моль/л; 2-акриловая кислота, $C=1,39 \times 10^{-4}$ моль/л; 3- N-изопропилакриламид, $C=8,84 \times 10^{-5}$ моль/л.

Указанный метод уступает по чувствительности и селективности методу ВЭЖХ, которому будет посвящена следующая публикация, однако, может быть использован для экспресс-диагностики чистоты гидрогелей медицинского назначения.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Косенко О.О., Лукаш Л.Л., Самченко Ю.М., Рубан Т.А., Ульберг З.Р., Лукаш С.І.** Кополімерні гідрогелеві мембрани для іммобілізації та культивування стовбурових клітин людини. // Біополімери і клітина.- 2006.- Т.22. - N 2.- С.143-148
2. **Wheeler J, Woods J, Cox M:** Evolution of hydrogel polymers as contact lenses, surface coatings, dressings and drug delivery systems. // Journal Long Term Eff Med Implants.- 1996.-N 6.- P 207.
3. **M.Gertsyuk, Y.Samchenko.** Separation of Nonreacted Acrylamide from polyacrylamide gel for endoprothesing.//Ars Separatoria Acta.- 2007.-№ 5.- P.99-102
4. **Grant C., Twigg P., Egan A.** Poly(vinyl alcohol) Hydrogel as a Biocompatible Viscoelastic Mimetic for Articular Cartilage // Biotechnol. Prog. – 2006. – Vol.22, № 5. – P. 1400 –1406.
5. **Tetsuro Kiyozumi, Yasuhiro Kanatani, Masayuki Ishihara, Daizoh Saitoh, Jun Shimizu, Hirofumi Yura, Shinya Suzuki, Yoshiaki Okada, Makoto Kikuchi** // Burns.- 2007.-Vol. 33.- P. 642.
6. **Васильев А.Е., Краснюк И.И., Равикумар С.** Трансдермальные терапевтические системы доставки лекарственных веществ // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, -№ 11. – С. 29-42.
7. **Самченко Ю.М., Пасмурцева Н.А., Ульберг З.Р.** Диффузия лекарственных препаратов из гидрогелевых нанореакторов // Доповіді НАН України.- 2007. -№6 - С. 143-148.
8. **Галаев И.Ю.** «Умные» полимеры в биотехнологии и медицине // Успехи химии. – 1995. – Т. 64. - № 5. – С. 505-524.
9. **О.Kosenko, Yu.Samchenko, N.Pasmurceva, Z.Ulberg.** Electrically Modulated Transport of Model Compounds through Hydrogel Membranes: Proceedings of the XXVth International Symposium on Physico-Chemical Methods of Separation “Ars Separatoria 2010”, July 4-7, Torun, Poland.- P.226-229.
10. **Tuncer Degim.** Understanding Skin Penetration: Computer Aided Modeling and Data Interpretation. // Current Computer-Aided Drug Design.- 2005/- Vol. 1, N1.- P. 11-19.
11. **Banga A.K.** Electrically assisted transdermal and topical drug delivery.- London: Taylore and Frances.- 1998. 172 p.
12. **Самченко Ю.М., Герцюк М.Н.** Оптимизация отмывки полиакриламидного геля от остаточных мономеров. // Журнал Хроматографічного товариства.- 2005.- Т.5.- N3.- С. 11-18
13. **Samchenko Yu., Ulberg Z., Pertsov N.** Hydrogel medicinal systems of prolonged action. // Progress in Colloid and Polymer Science.-1996.- Vol.102.- P.118-122/
14. **Yu.Samchenko, V.Konovalova, T.Poltoracka, G.Pobigay, A.Burban, Z.Ulberg.** Hydrogel Membranes with pH- and Thermo-Responcive Parametres: Proceedings of the XXVth International Symposium on Physico-

Chemical Methods of Separation “Ars Separatoria 2010”, July 4-7, Torun, Poland.- P. 222-225.

15. **Самченко Ю.М., Пасмурцева Н.А., Ульберг З.Р.** Диффузия лекарственных препаратов из гидрогелевых нанореакторов. // Доклади НАН України.- 2007.- №6.- С. 143-148

*Институт биокolloидной химии им. Ф.Д.Овчаренко НАН Украины,
м.Київ*

Надійшло до редакції 28.04.2011