

*Посвящается дорогому Михаилу Григорьевичу Воронкову
по случаю его славного юбилея*

Т. И. Вакульская*, Л. И. Ларина, В. А. Лопырев

ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСА МЕТРОНИДАЗОЛА С ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОМ

В буферных растворах Бриттона–Робинсона исследовано полярографическое поведение комплекса метронидазола с поливинилпирролидоном, обладающего пролонгированным антимикробным действием. Показано, что комплексообразование с поливинилпирролидоном изменяет механизм восстановления метронидазола и способствует повышению его растворимости в воде. Температурные зависимости предельных токов свидетельствуют об образовании дополнительных водородных связей в комплексе, что ограничивает диффузию деполяризатора к катоду.

Ключевые слова: 1-(2-гидроксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазол, метронидазол, поливинилпирролидон, буферные среды Бриттона–Робинсона, водородная связь, комплексы, полярография, электрохимическое восстановление.

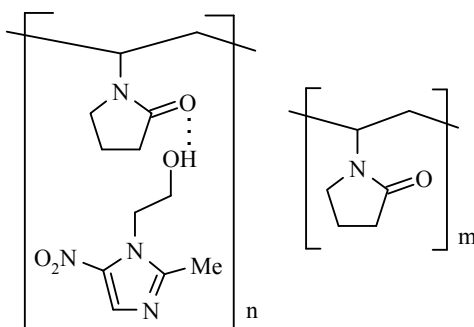
Впервые 1-(2-гидроксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазол (МН) синтезирован в 1957 г. и к настоящему времени является наиболее изученным представителем семейства 5-нитроимидазолов, используемых в качестве лекарств. Спектр его биологической активности очень широк [1–6]. МН применяется против различных анаэробных микроорганизмов в клинической и хирургической практике [1, 2], а также в лучевой терапии раковых заболеваний в качестве радиосенсибилизатора гипоксильных клеток [3].

Антибактериальные, антипротозойные и радиопротекторные свойства [7–12] метронидазола и других нитрогетероциклов обусловлены их достаточно низким потенциалом восстановления и способностью к одноэлектронному переносу [9, 13–20] с образованием промежуточных свободных радикалов, что подтверждается полярографией и ЭПР [6, 21]. Однако метронидазол имеет два существенных недостатка – он плохо растворим в воде (около 1 г на 100 мл) [22] и быстро выводится из организма, что сопряжено с необходимостью его многократного введения в течение суток для поддержания требуемой терапевтической дозы.

Электрохимическое восстановление самого метронидазола в буферных средах изучалось в ряде работ [23–27]. Исследовано влияние рН на величину потенциала и механизм его восстановления [23], изучена корреляционная зависимость между потенциалом восстановления, с одной стороны, и радиопротекторными свойствами [26], антимикробной активностью [8] и способностью метронидазола ингибировать синтез ДНК [24], с другой. Повышению биоработоспособности и изучению эффективности многочисленных систем лекарство–поливинилпирролидон (ПВП) различ-

ными методами посвящён недавний обзор [28]. Но анализ литературных данных показал, что исследования влияния ПВП на редокс-свойства метронидазола методом полярографии не проводились.

Ранее нами было обнаружено, что эффективность метронидазола против возбудителей некоторых анаэробных инфекций существенно повышается при его взаимодействии с ПВП [29] и показано, что в водных растворах метронидазол образует комплекс с ПВП. Как оказалось, этот комплекс обладает пролонгированным действием и в сочетании с антибиотиками усиливает влияние последних [29, 30], что позволяет уменьшить суточные дозы приёма препаратов и избежать побочных эффектов [31].



Целью настоящей работы являлось изучение влияния комплексообразования метронидазола с ПВП на окислительно-восстановительные характеристики первого и механизм его электровосстановления, а также оценка содержания метронидазола в комплексе (субстанции), полученном по специально разработанной методике [29]. Поэтому мы предприняли изучение методом полярографии поведения системы метронидазол–ПВП при pH 6.8 и 11.0. Для сравнения в идентичных условиях проводили восстановление самого метронидазола. Его волна восстановления (четырёх-электронная при pH 6.8 с $E_{1/2} = -0.47$ В, шестиэлектронная при pH 11.0 с $E_{1/2} = -0.62$ В [23]) при концентрациях выше $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л искажена максимумом первого рода (рис. 1, 1). Последний легко устраняется добавками в полярографируемые растворы небольшого количества того же ПВП, который играет в данном случае роль поверхностно-активного вещества (ПАВ) (рис. 1, 2). В отсутствие ПВП потребляемый ток растёт пропорционально увеличению концентрации метронидазола ($0.625 \cdot 10^{-4} - 2.0 \cdot 10^{-3}$ моль/л) при сдвиге потенциала четырёхэлектронной волны в отрицательную область на 3.5 мВ. Добавка ПВП в количестве менее 0.01 г ($0.28 \cdot 10^{-6}$ моль/л) к 5 мл полярографируемого раствора метронидазола с концентрацией $2.0 \cdot 10^{-3}$ моль/л (pH 6.8) приводит к раздвоению волны восстановления последнего на две – одноэлектронную обратимую и трёхэлектронную необратимую, а также к сдвигу потенциалов в катодную область почти на 0.3 В (рис. 1, 3). Добавление в раствор ПВП в количестве более 0.02 г ($0.6 \cdot 10^{-6}$ моль/л) снижает интенсивность волн восстановления деполаризатора, причём вторая волна уменьшается по высоте существенно первой. Однако последовательное увеличение добавки ПВП в полярографируемый раствор метронидазола до 0.08 г ($2.3 \cdot 10^{-6}$ моль/л) приводит к уменьшению суммарной высоты волн в 1.5 раза.

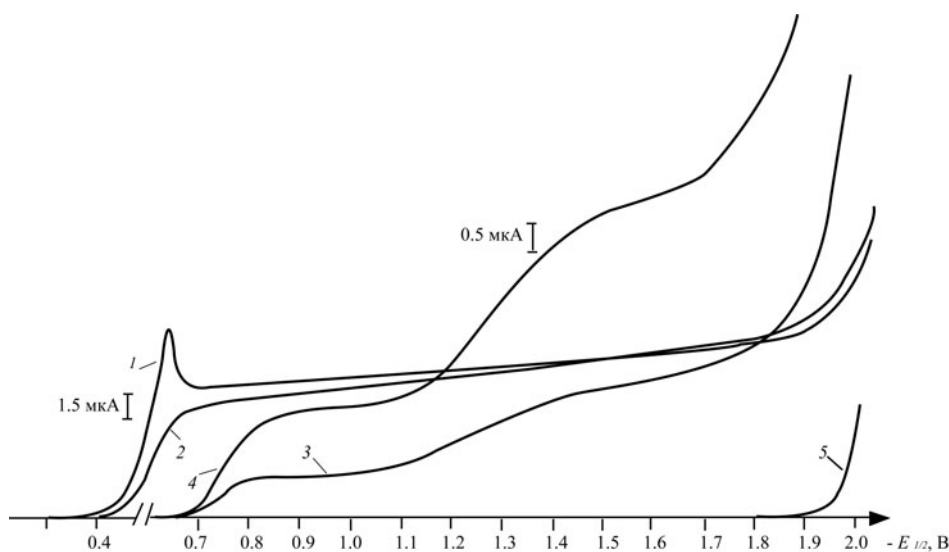


Рис. 1. Полярограммы МН ($c = 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л) в отсутствие (1) и в присутствии 0.005 г (2) и 0.020 г (3) ПВП (M_n 35000); раствора 0.032 г сухого комплекса метронидазол–ПВП (субстанции) в 5 мл буфера (4); фонового электролита (5). Полярограммы 1–3, 5 записаны при чувствительности $3 \cdot 10^{-7}$ мкА; 4 – при $1 \cdot 10^{-7}$ мкА и рН 6.8

Эти факты свидетельствуют об изменении механизма восстановления метронидазола в присутствии ПВП за счёт образования комплекса [32], а сопоставление его полярограмм с полярограммой нитробензола, полученной в аналогичных условиях, даёт основание полагать, что снижение количества потребляемых электронов является следствием целого ряда факторов. Среди них особо следует отметить торможение электродных процессов при адсорбции ПАВ на поверхности ртутной капли [33] и изменение коэффициента диффузии молекул метронидазола, связанных с ПВП. Так, значения вязкости η идентично приготовленных растворов комплексов для 5 и 20% содержания ПВП составляют 1.56 и 2.96 сСт соответственно. Уменьшение концентрации 20% комплекса разбавлением в буферном растворе в 20 раз даёт величину вязкости 1.75 сСт. Рассчитанные по уравнению Стокса–Эйнштейна

$$D = \frac{2.96 \cdot 10^{-7} \cdot \rho^{1/3}}{\eta \cdot M^{1/3}}$$

коэффициенты диффузии (D) для чистого метронидазола и его 5% комплекса с ПВП (35000) при 25 °С составляют $5.33 \cdot 10^{-6}$ и $7.70 \cdot 10^{-7}$ $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ соответственно. В уравнении: ρ , η и M – плотность, вязкость и молярная масса деполаризатора соответственно.

Для ответа на вопрос, как же осуществляется восстановление комплекса метронидазола с ПВП, полученного по специальным методикам для пролонгации лекарственного действия метронидазола, были получены полярограммы точных навесок сухих образцов лиофильно высушенного комплекса (субстанции) [29] в буферном растворе при рН 6.8 (рис. 1, 4). На их полярограммах также обнаруживаются две волны с $E'_{1/2} = -0.75$ В и $E''_{1/2} = -1.31$ В. Судя по наклону первой волны (80–85 мВ) [34], полученному из графиков $\lg[i/(i_d - i)] - E$ [34, с. 52], первая одноэлектронная волна

является необратимой. Добавка в полярографируемый раствор комплекса дополнительного количества метронидазола приводит к пропорциональному увеличению интенсивности волн практически без изменения потенциалов восстановления. Это может свидетельствовать о том, что ПВП, уже связанный в комплекс с метронидазолом, образует дополнительное количество водородных связей с добавленным метронидазолом. Расчётное содержание метронидазола в водном растворе комплекса (для точных навесок субстрата) по градуировочной прямой составляет 1.33 г, а по уравнению Ильковича [34, с. 20] с учётом коэффициента диффузии – 1.53 г на 100 мл воды. То есть комплексообразование метронидазола с ПВП способствует повышению его растворимости в воде примерно в 1.5 раза.

Полярограммы водных растворов метронидазола с ПВП, содержащих 5, 10, 15, 20, 30 и 50% ПВП с M_n 35000 и 5, 10 и 20% ПВП с M_n 12600, полученные в тех же условиях, при pH 6.8 также имеют две волны в области потенциалов от -0.68 до -0.77 В (первая волна) и от -1.23 до -1.50 В (вторая волна), причём увеличение процентного содержания ПВП (табл. 1, 2) приводит к преобразованию первой волны восстановления в квазиобратимую (в координатах $\lg[i/(i_d - i)] - E$ две пересекающиеся прямые) [34]. Зависимость потенциалов полуолн и предельного тока от концентрации деполаризатора при pH 11.0 приведена в табл. 2. И если концентрационная зависимость предельного тока метронидазола всегда пропорциональная, то при увеличении концентрации комплекса в растворе в 20 раз (т. е. при увеличении содержания метронидазола как минимум в 20 раз) с учётом эффекта разбавления суммарный ток обеих волн возрастает примерно в 12–15 раз (табл. 1, 2). По-видимому, это различие обусловлено образованием дополнительных водородных связей, в результате чего уменьшается коэффициент диффузии деполаризатора за счёт увеличения его массы.

Т а б л и ц а 1

Значения предельных токов ($i'_{пр}$ и $i''_{пр}$) и потенциалов полуолн ($E'_{1/2}$ и $E''_{1/2}$) в зависимости от концентрации деполаризатора и содержания ПВП в комплексе (pH 6.8)

ПВП		Количество деполаризатора, мл в 5 мл буфера	$i'_{пр}$, мкА	$-E'_{1/2}$, В	$i''_{пр}$, мкА	$-E''_{1/2}$, В	i_{Σ} , мкА	
Содержание, %	M_n							
5	35000	0.1	1.34	0.74	2.40	1.28	3.74	
		2.0	16.30	0.75	17.00	1.35	33.30	
10	12600	0.5	5.25	0.74	6.30	1.34	11.55	
		1.0	9.60	0.75	9.00	1.34	18.60	
		2.0	17.00	0.75	12.00	1.39	29.00	
			35000	0.05	0.68	0.73	1.20	1.28
15	12600	0.5	5.70	0.75	5.40	1.37	11.10	
		1.0	9.90	0.75	9.20	1.39	19.10	
		2.0	16.65	0.76	12.00	1.41	28.65	
			35000	0.05	0.70	0.75	1.45	1.29
20	35000	0.05	0.54	0.74	1.38	1.28	1.92	
		0.1	1.02	0.74	1.75	1.30	2.77	
		2.0	15.80	0.76	14.50	1.35	30.30	
		12600	0.5	5.85	0.75	6.21	1.35	12.06
			1.0	10.20	0.76	6.86	1.41	17.06
			2.0	16.80	0.76	7.64	1.45	24.44

Таблица 2

Значения предельных токов ($i'_{пр}$) и потенциалов полуволн ($E'_{1/2}$) в зависимости от концентрации деполяризатора и содержания ПВП в комплексе (M_n 35000, рН 11)

Содержание ПВП, %	Количество деполяризатора, мл в 5 мл буфера	$i'_{пр}$, мкА	$-E'_{1/2}$, В
20	0.50	14.79	0.78
30	0.05	1.28	0.75
	0.10	2.35	0.74
	0.125	3.15	0.75
	0.20	5.00	0.75
	0.25	6.70	0.75
40	0.50	13.20	0.76
	0.10	2.32	0.70
50	0.10	2.31	0.70

Молекулярная масса ПВП (12600 или 35000) для одного и того же процентного содержания ПВП слабо влияет на высоту первой волны, но существенно влияет на высоту второй волны и, соответственно, на величину потребляемого суммарного тока (табл. 1). С этим согласуются данные температурной зависимости предельного тока для 5, 20 и 30% комплексов метронидазол–ПВП (35000) (рис. 2). Рассчитанные энергии активации электровосстановления комплексов по величине наклона прямолинейных зависимостей предельных токов от значений $1/T$ составляют соответственно 13.6, 13.5 и 10.4 кДж·моль⁻¹.

Таким образом, комплекс МН–ПВП имеет более низкую энергию активации электровосстановления по сравнению с метронидазолом, энергия активации которого составляет 26.5 кДж·моль⁻¹ (6.31 ккал·моль⁻¹ [8]), что обусловлено образованием водородных связей. За счёт этого в комплексе удерживается большее количество метронидазола. Вышесказанное даёт основание предполагать, что увеличение эффективности метронидазола обусловлено не только увеличением концентрации последнего в комплексе, но и образованием самих комплексов, обеспечивающих пролонгированное антимикробное действие метронидазола.

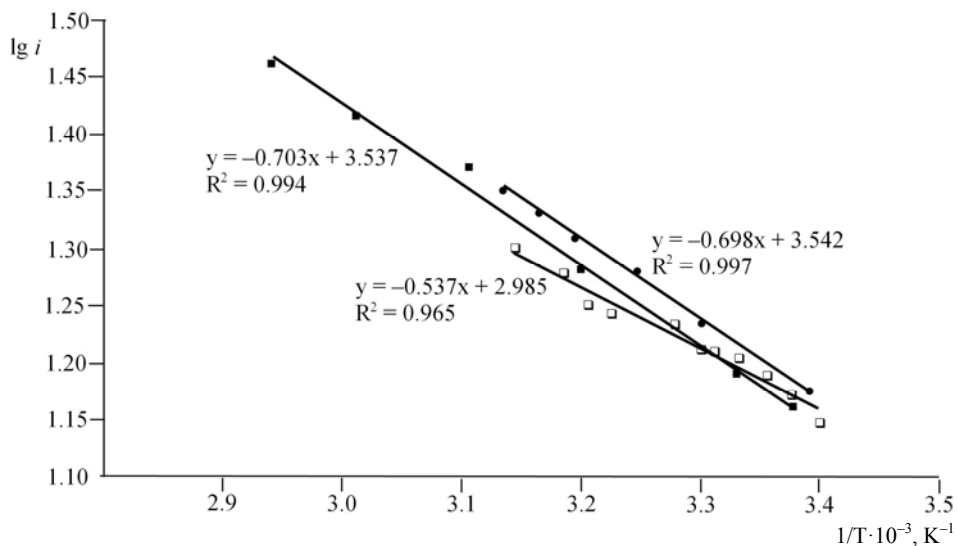


Рис. 2. Зависимость $\lg i_{пр}$ от обратной температуры для 5% (■), 20% (●) и 30% (□) комплексов метронидазол–ПВП (M_n 35000, рН 11.0)

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика получения комплекса метронидазола с ПВП подробно описана в работе [29]. Вязкость растворов определена на вискозиметре Оствальда при 25 °С. Полярограммы записаны на полярографе ОН-105 относительно насыщенного каломельного электрода в буферной среде Бриттона–Робинсона при рН 6.8 и 11.0. Восстановление проведено в термостатированной ячейке на ртутном каплющем электроде с принудительным отрывом капли. Характеристики капилляра: $m = 1.06$ мг/сек, $t = 0.4$ сек. Контроль осуществлён сопоставлением с полярограммами нитробензола, полученными в идентичных условиях. Об обратимости полярографических волн судят по наклону прямых, полученных при спрямлении волн в координатах $E_{1/2} - \lg i / (i_d - i)$ и $E_{1/2} - \lg i^{2/3} / (i_d - i)$ [34]. Для приготовления образцов для полярографирования к 5 мл буфера добавляют 0.05, 0.1, 0.2, 0.25, 0.5 или 2.0 мл водного раствора комплексов метронидазол–ПВП, полученных взаимодействием 1 г метронидазола с 5, 10, 15, 20, 30, 40 или 50 г ПВП на 100 мл воды. Кислород из полярографической ячейки выдувают тщательно очищенным аргоном.

Авторы благодарят Л. Г. Розинovu за предоставление объектов для исследования и помощь в подготовке эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Н. Ивченко, В. М. Мельник, *Клиническая хирургия*, 45 (1983).
2. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая Волна, Москва, 2003, т. 2, с. 345.
3. C. D. Freeman, N. E. Klutman, K. C. Lamp, *Drugs*, **54**, 679 (1997).
4. W. Raether, H. Hänel, *Parasitol. Res.*, **90**, S19 (2003).
5. H. Werner, D. H. Wittmann, J. F. Riemann, *Fortschritte der Antimikrobiellen und Antineoplastischen Chemotherapie (FAC)*, Futuramed Verlag, München, 1983, vol. 2–4, 786 p.
6. L. I. Larina, V. A. Lopyrev, *Nitroazoles: Synthesis, Structure and Applications*, Springer, New York, 2009, p. 407.
7. A. Bendesky, D. Menéndez, P. Ostrosky-Wegman, *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.*, **511**, 133 (2002).
8. Y. W. Chien, S. S. Mizuba, *J. Med. Chem.*, **21**, 374 (1978).
9. D. Barety, B. Resibois, G. Vergoten, *J. Electroanal. Chem.*, **162**, 335 (1984).
10. J. B. Rodriguez, E. G. Gros, *Curr. Med. Chem.*, **2**, 723 (1995).
11. A. M. Rauth, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **10**, 1293 (1984).
12. C. Viode, C. De Albuquerque, G. Chauviere, C. Houee-Levin, J. Perie, *New J. Chem.*, **21**, 1331 (1997).
13. P. Wardman, E. D. Clarke, *NATO Adv. Study Inst. Ser., Ser. C*, 535 (1978).
14. R. M. Ings, J. A. McFadzean, W. E. Ormerod, *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 1421 (1974).
15. P. J. Declerck, C. J. De Ranter, *Analisis*, **15**, 148 (1987).
16. P. J. Declerck, C. J. De Ranter, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **83**, 257 (1987).
17. E. D. Clarke, P. Wardman, *Int. J. Radiat. Biol.*, **37**, 463 (1980).
18. L. Sjöberg, T. E. Eriksen, I. Mustea, L. Revesz, *Radiochem. Radioanal. Lett.*, **29**, 19 (1977).
19. P. Wardman, E. D. Clarke, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 942 (1976).
20. C. Viodé, N. Bettache, N. Cenas, R. L. Krauth-Siegel, G. Chauvière, N. Bakalara, J. Périé, *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 549 (1999).

21. D. E. Moore, C. F. Chignell, R. H. Sik, A. G. Motten, *Int. J. Radiat. Biol.*, **50**, 885 (1986).
22. D. Kosanovic, D. Dumanovic, J. Iovanovic, *J. Serb. Chem. Soc.*, **53**, 559 (1988).
23. D. Dumanovic, J. Volke, V. Vajgand, *J. Pharm. Pharmacol.*, **18**, 507 (1966).
24. P. L. Olive, *Br. J. Cancer*, **40**, 89 (1979).
25. S. C. Leach, R. D. Weaver, K. Kinoshita, W. W. Lee, *J. Electroanal. Chem.*, **129**, 213 (1981).
26. M. A. La-Scalea, S. H. P. Serrano, I. G. R. Gutz, *J. Braz. Chem. Soc.*, **10**, 127 (1999).
27. A. M. O. Brett, S. H. P. Serrano, I. Gutz, M. A. La-Scalea, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **42**, 175 (1997).
28. R. Chadha, V. K. Кароор, A. Kumar, *J. Sci. Ind. Res.*, **65**, 459 (2006).
29. В. А. Лопырев, Л. Г. Розина, Н. И. Процук, Е. Г. Григорьев, А. С. Коган, Э. Э. Кузнецова, А. В. Астахова, Б. В. Михалев, Н. В. Тарасов, А. В. Камышанов, Пат. РФ 2157384; *Б. И.*, № 28, 254 (2000).
30. Э. Э. Кузнецова, Т. И. Маякова, Г. В. Козлова, Е. Т. Шарапова, Л. Г. Розина, В. А. Лопырев, *Клиническая лабораторная диагностика*, № 9, 24 (1998).
31. Е. Г. Григорьев, А. С. Коган, *Хирургия тяжелых гнойных процессов*, Наука, Новосибирск, 2000, с. 286.
32. Я. П. Страдынь, в кн. *Полярография. Проблемы и перспективы*, под ред. Я. П. Страдыня, С. Г. Майрановского, Зинатне, Рига, 1977, с. 21.
33. R. W. Schmid, C. N. Reilly, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2087 (1958).
34. С. Г. Майрановский, Я. П. Страдынь, В. Д. Безуглый, *Полярография в органической химии*, Химия, Москва, 1975, с. 48.

*Иркутский институт химии
им. А. Е. Фаворского СО РАН,
ул. Фаворского, 1. Иркутск 664033, Россия
e-mail: vti@irioch.irk.ru*

Поступило 10.06.2011