

Рекомендована д. мед. н., професором І. А. Зупанцем

УДК 661.12-911.48:547.92]:543.429.22.001.53

<https://doi.org/10.24959/cphj.17.1430>

О. П. Безугла¹, А. М. Ляпунова¹, І. А. Кирилюк^{2,3}, О. М. Ляпунов¹

¹ ДНУ «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» НАН України»

² Новосибірський державний університет

³ Новосибірський інститут органічної хімії ім. М. М. Ворожцова СБ РАН

ДОСЛІДЖЕННЯ РОЗПОДІЛУ СТЕРОЇДІВ В ЕМУЛЬСІЯХ МЕТОДОМ СПІНОВИХ ЗОНДІВ

Значущим фармацевтичним фактором для забезпечення необхідних функціональних характеристик препарату, його ефективності, безпеки і при необхідності біодоступності є розчинність діючої речовини, від якої залежить дисперсний стан у лікарській формі.

Мета роботи. Модельні дослідження поведінки спінових зондів на основі стероїдів у деяких розчинниках, міцелах неіоногенних поверхнево-активних речовин (ПАР), а також емульсіях 1 і 2 роду, що мають різний склад допоміжних речовин, для прогнозування біодоступності, ефективності та безпеки лікарських препаратів зі стероїдами.

Матеріали та методи. Дослідження проводили методом спінових зондів. Використовували два спінових зонди на основі стероїдів з різною локалізацією в їх молекулах нітроксильного радикалу.

Результати. За формою спектрів ЕПР, за значеннями ізотропної константи та часом кореляції обертальної дифузії двох різних спінових зондів ідентифіковано дисперсний стан і локалізацію молекул стероїдів у деяких розчинниках, міцелах ПАР і емульсіях 1 та 2 роду. Встановлено, що різні спінові зонди на основі стероїдів, які відрізняються за гідрофільно-ліпофільними властивостями, по-різному розподіляються в дисперсійному середовищі та дисперсній фазі емульсій. Різна локалізація стероїдів в емульсіях обумовлена також типом емульсії, хімічною природою, складом і полярністю дисперсійного середовища та дисперсної фази.

Висновки. Локалізація та дисперсний стан стероїдів в основах-носіях дозволяють прогнозувати ефективність їх фармакологічної дії, біодоступність при різних шляхах введення та безпеку лікарських препаратів. При фармацевтичній розробці необхідні дослідження розчинності стероїдів, їх розподілу між дисперсною фазою та дисперсним середовищем емульсій, дисперсного стану в основах-носіях, а також проведення біофармацевтичного та/або фармакологічного скринінгу для вибору оптимального складу препарату.

Ключові слова: стероїд; спіновий зонд; спектр ЕПР; розчинник; емульсія; розподіл; ізотропна константа; час кореляції обертальної дифузії

О. P. Bezugla¹, A. M. Lyapunova¹, I. A. Kirilyuk^{2,3}, O. M. Lyapunov¹

¹ State Scientific Institution "Institute for Single Crystals" of the National Academy of Sciences of Ukraine

² Novosibirsk State University

³ Novosibirsk Institute of Organic Chemistry named after N. N. Vorozhtsov, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

The study of steroid distribution in emulsions by the spin probe method

The solubility of the active substance, which determines its dispersed state in a dosage form, is a significant pharmaceutical factor for providing the required functional characteristics of a medicinal product, its effectiveness, safety and, if necessary, bioavailability.

Aim. To study the behavior of spin probes based on steroids in some solvents, micelles of nonionic surfactants, as well as emulsions both of type 1 and type 2 with a different composition of excipients in order to predict bioavailability, efficacy and safety of medicinal products with steroids.

Materials and methods. The studies were carried out by the spin probe method. Two spin probes based on steroids with different localization of the nitroxide radical in their molecules were used.

Results. The disperse state and localization of steroid molecules in some solvents, surfactant micelles and emulsions both of type 1 and type 2 were identified using the shape of EPR spectra, the isotropic constant values and the rotational correlation time of two different spin probes. It has been found out that the spin probes based on steroids with different hydrophilic-lipophilic properties are distributed differently in the dispersion medium and in the dispersed phase of emulsions. The emulsion type, the chemical nature, the composition and polarity of the dispersion medium and the dispersed phase also cause differences in distribution of steroids in emulsions.

Conclusions. Different localization and disperse state of steroids in vehicles can affect the effectiveness of their pharmacological action, bioavailability in different routes of administration and the safety of drugs. In the pharmaceutical development of drugs it is necessary to study the solubility of steroids, their distribution between the dispersed phase and the dispersion medium of emulsions, the disperse state in the vehicles, as well as to carry out biopharmaceutical and/or pharmacological screening studies in order to select the optimal composition of the medicinal product.

Key words: steroid; spin probe; EPR spectrum; solvent; emulsion; distribution; isotropic constant; time of rotational diffusion correlation

Е. П. Безуглая¹, А. Н. Ляпунова¹, И. А. Кирилук^{2,3}, А. Н. Ляпунов¹

¹ ГНУ «Научно-технологический комплекс «Институт монокристаллов» НАН Украины»

² Новосибирский государственный университет

³ Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН

Исследование распределения стероидов в эмульсиях методом спиновых зондов

Значимым фармацевтическим фактором для обеспечения необходимых функциональных характеристик препарата, его эффективности, безопасности и при необходимости является растворимость действующего вещества, от которой зависит его дисперсное состояние в лекарственной форме.

Цель работы. Модельные исследования поведения спиновых зондов на основе стероидов в некоторых растворителях, мицеллах неионогенных поверхностно-активных веществ (ПАВ), а также эмульсиях 1 и 2 рода, имеющих разный состав вспомогательных веществ, для прогнозирования биодоступности, эффективности и безопасности лекарственных препаратов со стероидами.

Материалы и методы. Исследования проводили методом спиновых зондов. Использовали два спиновых зонда на основе стероидов с различной локализацией в их молекулах нитроксильного радикала.

Результаты. По форме спектров ЭПР, значениям изотропной константы и временам корреляции вращательной диффузии двух разных спиновых зондов идентифицировано дисперсное состояние и локализация молекул стероидов в некоторых растворителях, мицеллах ПАВ и эмульсиях 1 и 2 рода. Установлено, что разные спиновые зонды на основе стероидов в связи с различиями в гидрофильно-липофильных свойствах по-разному распределяются в дисперсионной среде и дисперсной фазе эмульсий. Разная локализация стероидов в эмульсиях обусловлена также типом эмульсии, химической природой, составом и полярностью дисперсионной среды и дисперсной фазы.

Выводы. Локализация и дисперсное состояние стероидов в основах-носителях позволяют прогнозировать эффективность их фармакологического действия, биодоступность при разных путях введения и безопасность лекарственных препаратов. При фармацевтической разработке необходимы исследования растворимости стероидов, их распределения между дисперсной фазой и дисперсионной средой эмульсий, дисперсного состояния в основах-носителях, а также проведение биофармацевтического и/или фармакологического скрининга для выбора оптимального состава препарата.

Ключевые слова: стероид; спиновый зонд; спектр ЭПР; растворитель; эмульсия; распределение; изотропная константа; время корреляции вращательной диффузии

Невідомою частиною фармацевтичної розробки є біофармацевтичні дослідження [1, 2], в ході яких необхідно встановити вплив фармацевтичних факторів на вивільнення і біодоступність діючої речовини, ефективність фармакологічної дії та/або токсичність лікарського препарату [2]. Значущим фармацевтичним фактором для зазначених властивостей є розчинність діючої речовини, від якої залежить її дисперсний стан у лікарській формі (істинний розчин, мицелярний розчин, суспензія, емульсія). У гетерогенних дисперсних системах з рідким або в'язко-пластичним дисперсійним середовищем розчинність конкретної діючої речовини в дисперсійному середовищі і дисперсних фазах може істотно відрізнятись, що, в свою чергу, буде впливати на її розподіл і локалізацію в основі-носії. У зв'язку з цим слід здійснити науково обґрунтований вибір не тільки лікарської речовини та її концентрації, але також складу допоміжних речовин і типу дисперсної системи. Так, при розробці м'яких лікарських засобів (МЛЗ) для нашкірного застосування слід обґрунтувати тип і склад основи, що має забезпечити функціональні характеристики препарату, ефективність фармакологічної дії, безпеку і при необхідності біодоступність. Тобто, вибір типу і складу основи для даної діючої речовини має бути заснований, в тому числі, на результатах комплексних біофармацевтичних досліджень, які передбачають вивчення фармацевтичних факторів

і відповідний скринінг у досліджах *in vitro* та/або *in vivo* [1, 2].

Мета даної роботи – модельні дослідження поведінки спинових зондів на основі стероїдів у деяких розчинниках, мицелах неионогенних поверхнево-активних речовин (ПАВ), а також емульсіях 1 і 2 роду, що мають різний склад допоміжних речовин, для прогнозування біодоступності, ефективності та безпеки лікарських препаратів зі стероїдами.

Матеріали та методи

Дослідження проводили методом спинових зондів [3, 4]. В експерименті використовували два спинових зонди на основі стероїдів з різною локалізацією в їх молекулах нитроксильного радикалу.

Зонд 1, що вперше був синтезований І. А. Кирилюком, являє собою (3*S*,13*R*,17*R*)-5',5'-діетил (²H₄₋₇)-4',10,13-триметил-17-((*R*)-6-метилгептил-2)-1,1',2,4,5,5',6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-октадекагідро[циклопента[α]фенантрен-3,2'-імідазол]-1'-оксил. Рівняння реакції наведено на схемі 1.

Щоб отримати зонд 1, використовували 3-гідроксіаміно-3-етилпентанону-2 гідрохлорид-D₄₋₇ (3), отриманий за методикою, описаною в літературі [5]. Відповідно до методу отримання зазначена речовина являє собою суміш сполук, що містять два атоми дейтерію в одній етильній групі та два або п'ять – в іншій у співвідношенні 1:2; всього у середньому 6 атомів дейтерію.

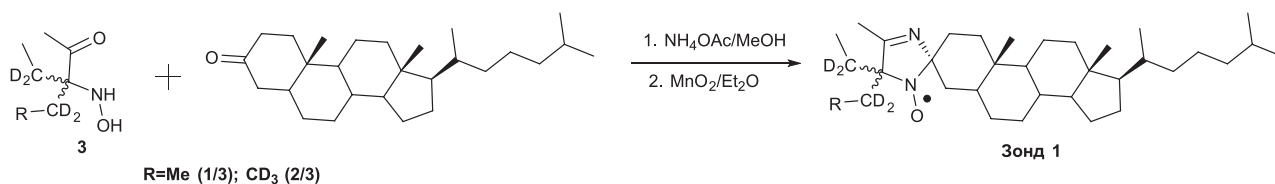


Схема 1

У конічну колбу місткістю 25 мл поміщали 378 мг (2 ммоль) гідроксіамінокетону **3**, 776 мг (2 ммоль) 5- α -холестан-3-ону, 1,25 г ацетату амонію, 7 мл метанолу та магнітний якір. Вміст колби продували аргоном, після чого колбу ретельно закупорювали. Реакційну масу перемішували на магнітній мішалці при температурі 40 °С впродовж 14 діб, колбу відкривали, вміст розбавляли 20 мл води і екстрагували діетиловим ефіром. Екстракт промивали водою, сушили за допомогою Na₂CO₃, додавали 5 г діоксиду марганцю (каталізаторного) і перемішували протягом 1 ч. Окиснювач видаляли фільтруванням, ефір відганяли при зниженому тиску, залишок хроматографували на колонці з силікагелем, елюент хлороформ – гексан 1:1. Вихід зонда 1 становить 550 мг (50 %), Т. пл. – 174-175 °С (з гексану); ІК (KBr), см⁻¹: 2955, 2932, 2866, 2826, 2230, 2120, 1638, 1595, 1468, 1454, 1447, 1381, 1332, 1306, 1288, 1213, 1177, 1121, 1055, 1015, 980, 957, 935, 706, 546, 528, 505; мас-спектр з високою роздільною здатністю (спектрометр DFS (Thermo Scientific)), знайдено: m/z, 518,5061 (M⁺), обраховано для C₃₄H₅₂ON₂D₇⁺: m/z = 518,5060; знайдено, %: С 78,59, N 5,41, обчислено для C₃₄H₅₃ON₂D₆ (середня брутто-формула), %: С 78,85, N 5,41.

Аналітичні і спектральні дослідження сполук, отриманих при синтезі зонда 1, виконані в Хімічному Сервісному Центрі колективного користування СВ РАН.

Зонд 2, синтезований у НДІ біомедичної хімії РАМН А. І. Мішарінін [11], являє собою [17(20)E]-3 β -гідроксипрегна-5,17(20)-дієн-21-оїл-(ТЕМПО-4)амід (М.м. 484,5) (схема 2).

У рідини та МЛЗ зонди вводили у концентрації 10⁻⁴ моль/л. Спектри електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) знімали за допомогою ЕПР-спектрометра «ESR Spectrometer CMS8400» («Adani») при температурі 25 °С. За спектрами ЕПР визначали час кореляції оберտальної дифузії зондів (τ) за формулами [3, 4]:

$$\tau_{+1} = \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} - 1 \right) \cdot \Delta H_0 / 2 \cdot 10^8, \quad (1)$$

$$\tau_{-1} = \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1 \right) \cdot \Delta H_0 / 3,6 \cdot 10^9, \quad (2)$$

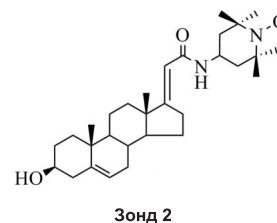


Схема 2

$$\tau_{\pm 1} = \left(\sqrt{\frac{h_{+1}}{h_{-1}}} - 1 \right) \cdot \Delta H_{+1} \cdot 6,65 \cdot 10^{-10}, \quad (3)$$

де: h_{+1} , h_0 та h_{-1} – інтенсивності низькопольної, центральної та високопольної компонент спектра ЕПР, а ΔH_{+1} та ΔH_0 – ширина низькопольної та центральної компонент.

Переорієнтація несферичних молекул, розчинених у рідині, характеризується двома різними показниками часу кореляції: τ_{-1} , що пов'язаний з флуктуаціями у напрямках, які є перпендикулярними довгій осі зонда, а також τ_{+1} , пов'язаний з його обертанням навколо довгої осі [3]; $\tau_{\pm 1}$ усереднює ці показники часу кореляції [4]. Час кореляції оберտальної дифузії (τ) прямо пропорційний ефективному радіусу (R) молекули та мікрров'язкості (η) її локального оточення і обернено пропорційний абсолютній температурі (T) [3]:

$$\tau = \frac{4 \cdot \pi \cdot R^3 \cdot \eta}{3 \cdot k \cdot T}. \quad (4)$$

За спектрами ЕПР визначали також ізотропну константу (A_N), що характеризує полярність оточення радикалу [3, 4].

Об'єктами досліджень були допоміжні речовини, які застосовуються у складі МЛЗ [7-10]: ізопропілміристат (ІПМ), октилдодеканол (ОДД) і гексилдецилстеарат (ГДС) («BASF»), вазелінове масло («Merkur Vaseline GmbH & Co. KG»), гексилгліколь (ГГ) («Shell Chemicals»), пропіленгліколь (ПГ) та макрогол 400 (поліетиленгліколь 400) («BASF»), вода очищена (далі вода), макрогол-40 стеарат (тип I) (MYRJ S40-PA-(RB), «Croda»), макрогол-20 цетостеариловий ефір (Eumulgin B 2, «BASF»), цетостеариловий спирт (ЦСС) («Kollifix CSA 50», «BASF») та гліцерилмоностеарат 40-55 (тип II) (ГМС-II) («BASF»).

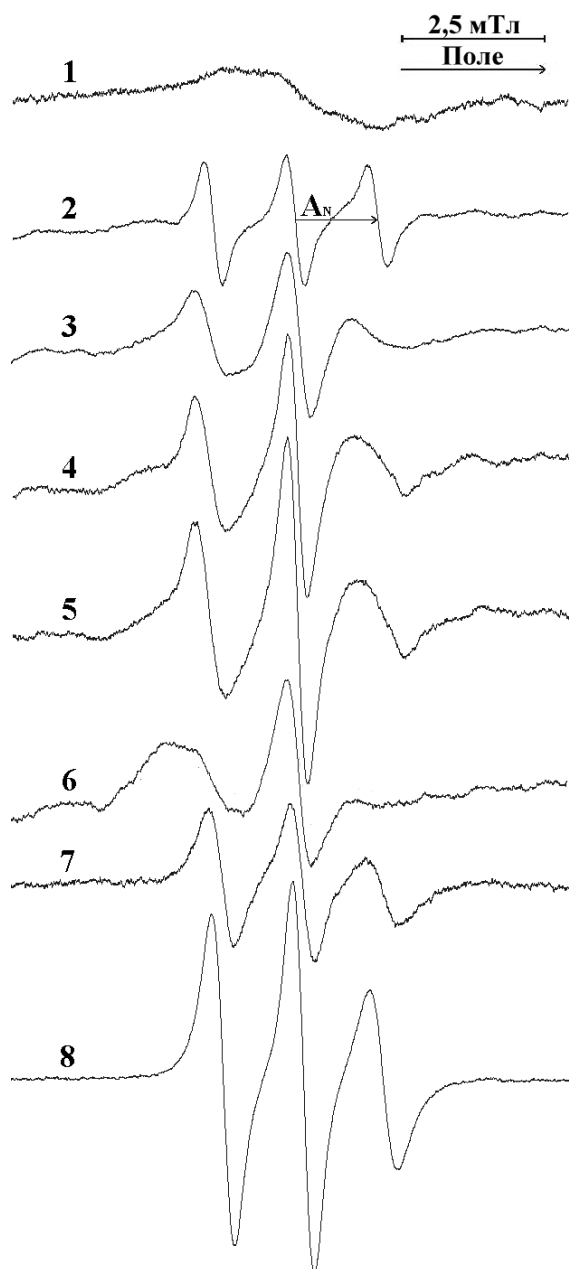


Рис. 1. Спектри ЕПР спінового зонда 1 при температурі 25 °С у: 1) 4,6 % водному розчині ПГ; 2) ІПМ; 3) макроголі 400; 4) 3 % водному розчині макрогол-40 стеарату; 5) 3 % водному розчині макрогол-20 цетостеарилового ефіру; 6) колоїдній дисперсії емульгаторів 1 і 2 роду; 7) емульсії 1 роду (в формі крему); 8) змішаному ліпофільному розчиннику, що складається з ІПМ, ОДД і ГДС

Об'єктами досліджень були 2 в'язко-пластичні емульсії 1 і 2 роду. Склад **емульсії 1 роду** (% мас.): ІПМ 7,0, ОДД 7,0, ГДС 7,0, макрогол-40 стеарат 1,5, ЦСС 1,14, ГМС-II 11,36, ПГ 3,0 та вода 62,0. Змішаний ліпофільний розчинник, що складається з ІПМ, ОДД та ГДС, є дисперсною фазою, макрогол-40 стеарат – емульгатором 1 роду, ЦСС і ГМС-II – емульгаторами 2 роду, 4,6 % водний розчин ПГ – дисперсійним середовищем.

Склад **емульсії 2 роду** (% мас.): ГГ 12,0, вода 3,0, пропіленглікольмонопальмітостеарат (Monosteol[®], «Gattefosse») 2,0, віск білий («The British Wax Refining Co. Ltd») 5,0, вазелін білий («JLC Chemie Handels GmbH») 78,0 [7-10]. Змішаний гідрофільний розчинник, що складається з ГГ та води, є дисперсною фазою, пропіленглікольмонопальмітостеарат – емульгатором 2 роду, сплав воску білого та вазеліну білого – гідрофобним дисперсійним середовищем. Така емульсія 2 роду є основою препарату Елоком[®] мазь 0,1 % («Schering Plough Central East») та розробленого нами препарату-генерика Молескін[®] мазь 0,1 % (ПАТ «Фармак») [11].

В експерименті використовували: 1) змішаний ліпофільний розчинник, що складається з ІПМ, ОДД і ГДС в рівних масових співвідношеннях (масляна фаза емульсії 1 роду); 2) змішаний гідрофільний розчинник, що складається з ГГ і води в масовому співвідношенні 8:2 (гідрофільна фаза емульсії 2 роду); 3) 3,0 % водні розчини поверхнево-активних речовин (ПАР) макрогол-40 стеарату і макрогол-20 цетостеарилового ефіру, що утворюють у воді міцели [12]; 4) колоїдну дисперсію емульгаторів 1 і 2 роду, що містить 1,5 г макрогол-40 стеарату, 1,14 г ЦСС, 11,36 г ГМС-II, 3,0 г ПГ і 62,0 г води.

Результати та їх обговорення

На рис. 1 і 2 представлені спектри ЕПР спінового зонда 1 в різних середовищах, а в табл. 1 і 2 – деякі параметри, розраховані за цими спектрами.

Як видно зі спектра 1 на рис. 1, у 4,6 % водному розчині ПГ відбувається агрегація молекул гідрофобного стероїдного зонда 1, про що свідчить спектр ЕПР, який є синглетом. Тобто, стероїдний зонд 1 практично не розчинний у воді і змішаних розчинниках вода – гліколь з невеликими концентраціями гліколю, в яких превалює структура води [2, 9]. У такому водному середовищі гідрофобний стероїд може перебувати переважно у вигляді суспензії.

Як видно зі спектра 2 на рис. 1, в ІПМ гідрофобний стероїдний зонд 1 розчинний, його молекули зазнають швидкого обертання (табл. 1) [3, 4], а його спектр ЕПР є триплетом. Ізотропна константа (A_N) спектра ЕПР при цьому становить близько 1,37 мТл (табл. 1). Тобто, стероїди потенційно можуть бути розчинні в дисперсійній фазі, що являє собою ІПМ або інші ліпофільні полярні розчинники, зокрема, суміші ІПМ, ОДД і ГДС (табл. 1), комбінація яких раціональна при аплікаціях МЛС на шкіру, оскільки ці розчинники мають різні коефіцієнти розтікання [10].

Як видно зі спектрів 4 і 5 на рис. 1, при розчиненні у воді колоїдних ПАР спектри ЕПР зонда 1 трансформуються з синглету у триплети.

Таблиця 1

Деякі параметри і форма спектрів електронного парамагнітного резонансу спінового зонда 1 в різних середовищах, зазначених у підписах до рис. 1, при температурі 25 °С

Спектр, № на рис. 1	Середовище	A_N , мТл	$\tau_{+1} \cdot 10^{10}$, с	$\tau_{-1} \cdot 10^{10}$, с	Форма спектра
1	4,6 % Водний розчин ПГ				Синглет
2	ІПМ	1,37	2,93	1,62	Триплет
3	Макрогол 400	1,39	27,39	14,27	Триплет
4	3 % Водний розчин макрогол-40 стеарату	1,43	16,78	10,10	Триплет
5	3 % Водний розчин макрогол-20 цетостеарилового ефіру	1,44	40,80	18,47	Триплет
6	Колоїдна дисперсія емульгаторів 1 и 2 роду				Суперпозиція спектрів
7	Емульсія 1 роду (у формі крему)	1,36	14,91	6,15	Триплет
8	Ліпофільний змішаний розчинник (ІПМ + ОДД + ГДС)	1,38	15,9	4,83	Триплет

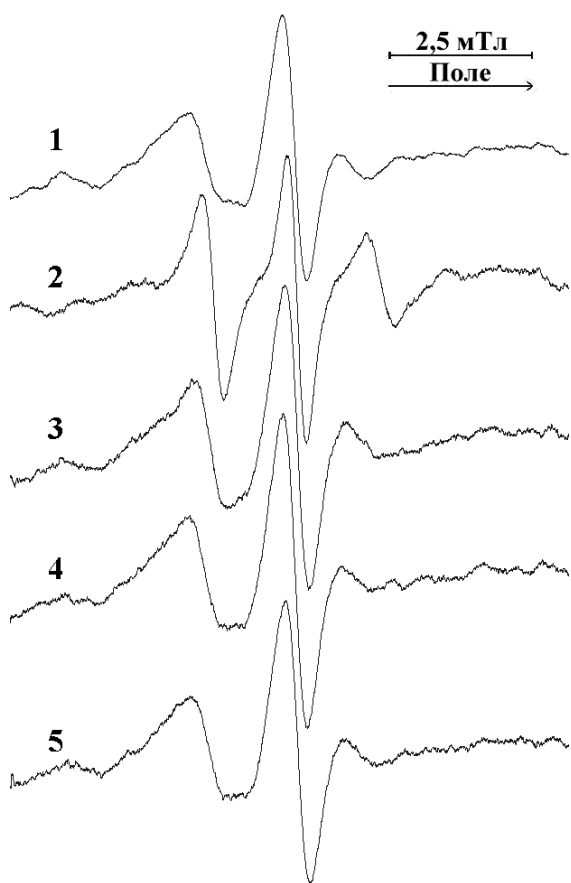


Рис. 2. Спектри ЕПР спінового зонда 1 при температурі 25 °С у: 1) вазеліновому маслі; 2) змішаному гідрофільному розчиннику ГГ – вода (8:2); 3) емульсії 2 роду (в формі мазі); 4) емульсії 2 роду, що містить 15 % змішаного гідрофільного розчинника ГГ – вода (8:2) у вазеліновому маслі (зонд 1 введений в емульсію); 5) емульсії 2 роду, що містить 15 % змішаного гідрофільного розчинника ГГ – вода (8:2) у вазеліновому маслі (зонд 1 введений заздалегідь у змішаний гідрофільний розчинник ГГ – вода)

Це пов'язано з тим, що макрогол-40 стеарат і макрогол-20 цетостеариловий ефір утворюють у воді міцели [12], які солюбілізують гідрофобний стероїдний зонд 1. Слід зазначити, що час кореляції обертальної дифузії та, відповідно, мікрів'язкість локального оточення солюбілізованих молекул зонда 1 в ядрах міцел макрогол-20 цетостеарилового ефіру мають більші значення, ніж у міцелах макрогол-40 стеарату (табл. 1), що пов'язано з різними величинами гідрофільно-ліпофільного балансу (ГЛБ) цих ПАР [7, 14]. Величини ГЛБ цих двох ПАР, розраховані за Davies [14], становлять відповідно 8,73 і 16,13, тобто, при більш високому ГЛБ макрогол-40 стеарату час кореляції обертальної дифузії (τ_c) зонда 1 виявляється меншим, що зумовлено нижчою мікрів'язкістю ядер міцел. При цьому величини ізотропної константи спектрів ЕПР солюбілізованого зонда 1 в міцелах обох ПАР ($A_N \approx 1,44$) свідчать, що його нітроксильний радикал локалізований в гідратованих або розчинених у воді поліетиленоксидних ланцюжках, оскільки величина A_N спектра ЕПР зонда 1 у безводному макроголі 400 (поліетиленгліколі 400) виявляється меншою і становить 1,39 мТл (табл. 1). Додавання води до гідрофільних неводних розчинників приводить до збільшення значення ізотропної константи спектрів ЕПР; наприклад, при додаванні 20 % мас. води до ГГ ізотропна константа збільшується з 1,31 мТл до 1,45 мТл. На жаль, встановити вміст води в полярній частині міцел макрогол-40 стеарату за ізотропною константою зонда 1 не виявилось можливим, оскільки вже у 70 % водному розчині макроголю 400 зонд 1 практично не розчинний.

Здатність колоїдних дисперсій, утворених макрогол-40 стеаратом (емульгатор 1 роду) і емульгаторами 2 роду в воді, до солюбілізації стероїдів виявляється іншою порівняно з міцелярними

Таблиця 2

Деякі параметри і форма спектрів електронного парамагнітного резонансу спінового зонда 1 в різних середовищах, зазначених у підписах до рис. 2, при температурі 25 °С

Спектр, № на рис. 2	Середовище	A_N , мТл	$\tau_{+1} \cdot 10^{10}$, с	$\tau_{-1} \cdot 10^{10}$, с	Форма спектра
1	Вазелінове масло	1,03	47,27	26,02	Триплет
2	Гідрофільний змішаний розчинник (ГГ – вода)	1,45	11,59	7,19	Триплет
3	Емульсія 2 роду (в формі мазі)	1,12	35,09	20,73	Триплет
4	Емульсія 2 роду (зонд 1 введений в емульсію)	1,07	46,76	28,44	Триплет
5	Емульсія 2 роду (зонд 1 введений у розчинник ГГ – вода)	1,09	42,57	24,73	Триплет

розчинами ПАР, про що свідчить зміна форми спектра ЕПР (рис. 1, спектри 3 і 6). Спектр ЕПР з триплету трансформується у суперпозицію двох триплетів (широкого і вузького), які добре розділяються у низькопольній компоненті (рис. 1, спектр 6), що, можливо, пов'язано з латеральним поділом фаз в асоціатах, утворених ПАР і емульгаторами 2 роду [2]. При цьому в емульсіях 1 роду солюбілізація гідрофобних стероїдів змішаними асоціатами, що складаються з ПАР і емульгаторів 2 роду, може виявитися меншою, ніж у міцелах колоїдних ПАР, оскільки емульгатори 2 роду мають низькі значення ГЛБ і не розглядаються як солюбілізатори [14]. У той же час зі спектра ЕПР 6 на рис. 1 стає зрозуміло, що гідрофобний стероїдний зонд 1 локалізований в скупченнях ліпофільних емульгаторів 2 роду, де його обертання істотно повільніше, ніж у міцелах емульгатора 1 роду. Очевидно також, що частина гідрофобного зонда 1, локалізованого в скупченнях гідрофільного емульгатора 1 роду, виявляється меншою, оскільки сумарна концентрація емульгаторів 2 роду більше в 8,3 рази.

В емульсії 1 роду, дисперсна фаза якої становить 21 % мас. і представлена змішаним ліпофільним розчинником, що складається з ІПМ, ОДД і ГДС в рівних масових частинах, гідрофобний спіновий зонд 1 переважно локалізується в масляній дисперсній фазі. Про це свідчать майже ідентична форма спектрів ЕПР (рис. 1, спектри 7 і 8), практично однакові значення ізотропної константи спектрів ЕПР 1,36 мТл і 1,38 мТл відповідно, а також дуже близькі значення часів кореляції обертальної дифузії зонда 1 (табл. 1). Так, для зонда 1 в масляній фазі і в емульсії 1 роду $\tau_{\pm 1} \cdot 10^{10}$ становить 9,8 с і 11,5 с відповідно, що відрізняється в межах помилки визначення [3, 4].

У вазеліновому маслі, що є повністю гідрофобною неполярною речовиною, спектр ЕПР зонда 1 є триплетом, що має характерну форму (рис. 2, спектр 1), яка відрізняється від форми спектра ЕПР зонда 1 в гідрофільному змішаному розчиннику, що складається з 80 % мас. ГГ і 20 % мас. води. В емульсії 2 роду цей зміша-

ний розчинник виконує роль дисперсної фази. Ізотропні константи спектрів ЕПР зонда 1 у вазеліновому маслі і в змішаному гідрофільному розчиннику становлять 1,03 мТл і 1,45 мТл відповідно, тобто істотно відрізняються одна від одної. В емульсії 2 роду спектр ЕПР спінового зонда 1 за формою дуже близький до спектра ЕПР зонда 1 у вазеліновому маслі (рис. 2, спектри 3 і 1 відповідно). Ізотропна константа спектра ЕПР зонда 1 в емульсії 2 роду дорівнює 1,12 мТл, що відповідає локалізації нітроксильного радикалу в гідрофобному середовищі. Можливо, спектр 3 на рис. 2 є суперпозицією декількох сигналів від молекул зонда, локалізованих в гідрофобному середовищі, асоціатах емульгатора 2 роду і гідрофільній фазі, але очевидна перевага сигналу з гідрофобного середовища.

Щоб усунути вплив емульгатора на спектри ЕПР, зонд 1 вводили в емульсію 2 роду, що складається тільки з 85 % мас. вазелінового масла і 15 % мас. змішаного розчинника ГГ – вода (8:2). За величиною ізотропної константи, значеннями часу кореляції обертальної дифузії і формою спектра ЕПР зонда 1 в цій емульсії відповідав спектру ЕПР зонда 1 у вазеліновому маслі (табл. 2, рис. 2, спектри 4 і 1).

В іншому досліді зонд 1 ввели в змішаний розчинник ГГ – вода (8:2) і виготовили аналогічну емульсію 2 роду. У цій емульсії спектр ЕПР за своєю формою, величиною ізотропної константи, значеннями часу кореляції обертальної дифузії також свідчить про локалізацію зонда 1 у середовищі вазелінового масла (табл. 2, рис. 2, спектри 5 і 1). Тобто, в процесі виготовлення емульсії відбувся перерозподіл зонда 1 з гідрофільної фази в гідрофобне масляне середовище.

На рис. 3 представлені спектри ЕПР стероїдного зонда 2 в змішаному гідрофільному розчиннику, що складається з 80 % мас. ГГ і 20 % мас. води (спектр 1), а також в емульсії 2 роду (спектр 2), яка є основою препарату Молекскін® мазь 0,1 % [11].

Як видно з рис. 3, обидва спектри ЕПР є триплетами, форма яких ідентична. Ізотропна кон-

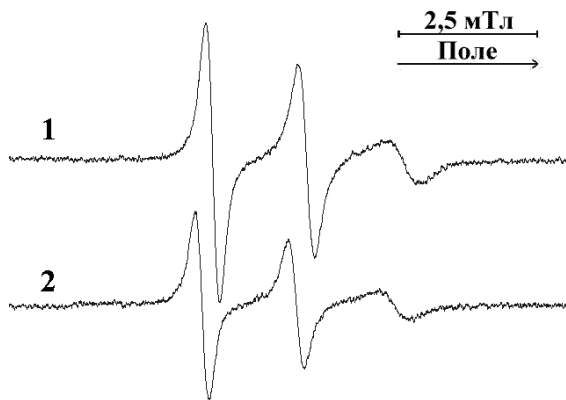


Рис. 3. Спектри ЕПР спінового зонда 2 при температурі 25 °С: 1) у змішаному гідрофільному розчиннику, що складається з 80 % мас. ПГ і 20 % мас. води; 2) в емульсії 2 роду

станта спектра ЕПР зонда 2 в змішаному розчиннику становить 1,75 мТл, а $\tau_{\pm 1} \cdot 10^{10} = 23,5$ с. Ізотропна константа спектра ЕПР зонда 2 в основі препарату Молескін® мазь 0,1 % становить 1,73 мТл, а $\tau_{\pm 1} \cdot 10^{10} = 23,9$ с. Отримані дані свідчать, що стероїдний зонд 2 практично повністю розчинений (локалізований) в дисперсній (гідрофільній) фазі емульсії 2 роду на відміну від стероїдного зонда 1, що локалізується в дисперсійному (гідрофобному) середовищі такої емульсії.

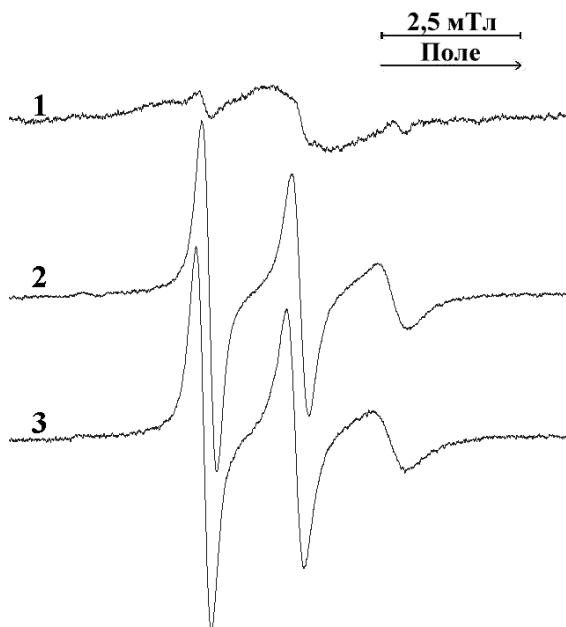


Рис. 4. Спектри ЕПР спінового зонда 2 при температурі 25 °С: 1) у змішаному розчиннику, що складається з 95,4 % мас. води і 4,6 % мас. ПГ; 2) змішаному розчиннику, що складається з ІПМ, ОДД і ГДС у рівних масових частинах; 3) в емульсії 1 роду.

На рис. 4 представлені спектри ЕПР зонда 2 в емульсії 1 роду, а також у змішаних розчинниках, які є масляною фазою і дисперсійним середовищем цієї емульсії.

Спектр ЕПР стероїдного зонда 2 в 4,6 % водному розчині ПГ представляє суперпозицію синглету і більш вузького сигналу – триплету, зумовленому розчиненими молекулами зонда 2 (рис. 4). На відміну від цього спектр ЕПР стероїдного зонда 1 в 4,6 % водному розчині ПГ є синглетом (рис. 1), який свідчить про те, що зонд 1 є більш гідрофобною речовиною порівняно з зондом 2. Відмінності в гідрофільно-ліпофільних властивостях зондів зумовило їх різний розподіл в емульсії 2 роду, що є основою препарату Молескін® мазь 0,1 % [11].

Спектри ЕПР зонда 2 у змішаному ліпофільному розчиннику, що складається з рівних масових частин ІПМ, ОДД і ГДС, а також в емульсії 1 роду, що містить як масляну фазу 21 % мас. цього змішаного розчинника, є триплетами, форма яких ідентична (рис. 4). Ізотропні константи спектрів ЕПР зонда 2 у змішаному ліпофільному розчиннику і емульсії 1 роду однакові і становлять 1,61 мТл, а часи кореляції обертальної дифузії ($\tau_{\pm 1} \cdot 10^{10}$) – 23,1 с і 26,3 с відповідно; відмінності в значеннях $\tau_{\pm 1}$ знаходяться в рамках помилки визначення [3, 4]. Отримані дані свідчать, що стероїдний зонд 2 практично повністю розчинений (локалізований) в масляній фазі емульсії 1 роду на відміну від емульсії 2 роду, в якій він локалізований в гідрофільній фазі.

Таким чином, в емульсіях ліпофільний стероїдний зонд 2 локалізується як у гідрофільних, так і в ліпофільних полярних фазах, в той час як більш гідрофобний стероїдний зонд 1 локалізується в полярній ліпофільній фазі емульсії 1 роду і перерозподіляється в неполярне гідрофобне середовище, з якого стероїдний зонд 2, на відміну від нього, перерозподіляється в фазу гідрофільного неводного розчинника. Відмінності в розподілі стероїдних зондів в емульсіях пов'язані, як мінімум, з двома факторами: по-перше, типом емульсії, хімічною природою, складом і полярністю дисперсійного середовища і дисперсної фази, а, по-друге, з гідрофільно-ліпофільними властивостями молекул стероїдів. Крім того, певну роль може відігравати склад емульгаторів, що утворюють асоціати, де можуть локалізуватися молекули стероїдів.

Раніше з використанням стероїдного зонда, що є прегніл-4-діон-3,20-[16 α -17 α -d]-2,2-диметилказолідин-1-оксидом, було показано, що цей стероїд солюбілізується міцелами неіоногенних ПАР ($A_N = 1,58$ мТл) і в емульсіях 1 роду, що містять 20 % мас. неполярної дисперсної фази (вазелинового масла), локалізується переважно в асоціатах емульгаторів ($A_N = 1,52$ мТл).

При додаванні до міцелярних розчинів ПАР і емульсій 1 роду ПГ спектри ЕПР з триплетів трансформувалися в суперпозиції широкого і вузького сигналів, які розділялися у високопольній компоненті. Чим вищою була концентрація ПГ у дисперсійному середовищі, тим більшою ставала частка вузького сигналу з більш високою ізотропною константою, що відповідає локалізації спінового зонда у водно-гліколевому середовищі [13]. Однак цей спосіб перерозподілу стероїдів у гетерогенній дисперсійній системі знову-таки залежить від гідрофільно-ліпофільних властивостей молекули стероїду. Так, навіть при наявності в дисперсійній фазі 80 % ГГ (ГЛБ = 7,950), який є більш гідрофобним порівняно з ПГ (ГЛБ = 9,375), гідрофобний стероїдний зонд 1 локалізується в неполярному середовищі (примітка: розрахунок ГЛБ проводили за методом Davies [14]).

При експериментальних дослідженнях спінові зонди на основі стероїдів можна використовувати в невеликих концентраціях 10^{-4} моль/л, що відповідає приблизно 0,005 %. У лікарських препаратах стероїди можуть використовуватись у більш високих концентраціях, при яких вони можуть не розчинятися у відповідних фазах; це зумовить їх введення в лікарську форму у вигляді суспензії. При цьому частина стероїду може перебувати в розчиненому стані, що при певних умовах може призвести до термодинамічної нестійкості суспензії (перекристалізації лікарської речовини в процесі зберігання препарату), а також вплинути на ефективність фармакологічної дії, біодоступність і, відповідно, безпеку. Тому на етапі фармацевтичної розробки необхідно вивчати розчинність стероїдів у використовуваних допоміжних речовинах, їх розподіл між дисперсною фазою і дисперсійним середовищем емульсійних основ, дисперсійний стан

в основі-носії, а також здійснювати біофармацевтичні та/або фармакологічні скринінгові дослідження. Залежно від результатів цих досліджень і медико-біологічних вимог до лікарського препарату має бути обраний його оптимальний склад, включаючи концентрацію стероїду, склад допоміжних речовин і тип основи-носія.

ВИСНОВКИ

1. За формою спектрів ЕПР, значеннями ізотропною константи і часу кореляції обертальної дифузії двох спінових зондів на основі стероїдів, що відрізняються за розташуванням у молекулах нітроксильного радикалу, ідентифікований дисперсійний стан і локалізація молекул стероїдів у деяких розчинниках, міцелях ПАР, асоціатах емульгаторів 1 і 2 роду, а також в емульсіях 1 і 2 роду.

2. Встановлено, що різні спінові зонди на основі стероїдів, що відрізняються за гідрофільно-ліпофільними властивостями, по-різному розподіляються в дисперсійному середовищі і дисперсійній фазі емульсій. Відмінності в розподілі стероїдів в емульсіях обумовлює також тип емульсії, хімічна природа, склад і полярність дисперсійного середовища і дисперсійної фази.

3. Різна локалізація і різний дисперсійний стан стероїдів в основах-носіях може вплинути на ефективність їх фармакологічної дії, біодоступність при різних шляхах введення і безпеку лікарських препаратів. У зв'язку з цим у ході фармацевтичної розробки необхідно вивчати розчинність конкретних стероїдів, їх розподіл між дисперсною фазою і дисперсійним середовищем емульсій, дисперсійний стан в основі-носії, а також здійснювати біофармацевтичні та/або фармакологічні скринінгові дослідження для вибору оптимального складу препарату.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Перелік використаних джерел інформації

1. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8) : СТ-Н МОЗУ 42-3.0:2011 / М. Ляпунов, О. Безугла, Ю. Підпрудников та ін. // Стандартизація фармацевтичної продукції. – К. : МОЗ України, МОРІОН, 2016. – Т. 1. – С. 39–74.
2. Фармацевтическая разработка лекарственных препаратов. Глава 9 / Н. А. Ляпунов, Е. П. Безуглая, Ю. М. Столпер и др. // Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств (в 3 томах) / под ред. В. П. Георгиевского. – Т. 3. – Метрологическое и нормативное обеспечение создания, производства и контроля качества лекарственных средств. – Х. : НТМТ, 2011. – Т. 3. – С. 1419–1512.
3. Лихтенштейн, Г. И. Метод спиновых зондов в молекулярной биологии / Г. И. Лихтенштейн. – М. : Наука, 1974. – 256 с.
4. Кузнецов, А. Н. Метод спинового зонда (Основы и применение) / А. Н. Кузнецов. – М. : Наука, 1976. – 210 с.
5. EPR and Quantum Chemical Studies of the pH-sensitive Imidazoline and Imidazolidine Nitroxides with Bulky Substituents / A. A. Bobko, I. A. Kirilyuk, N. P. Gritsan et al. // Appl. Magn. Reson. – 2010. – Vol. 39, Issue 4. – P. 437–451. doi: 10.1007/s00723-010-0179-z
6. Spin Labeled [17(20)E]-pregna-5,17(20)-dien-21-oilamides. Synthesis, Structure, and Possible Applications / A. Y. Misharin, S. V. Stulov, Y. V. Tkachev, V. P. Timofeev // 6th SPIN Conference. – Marseille, 2011. – Poster/Oral № XX.
7. Pharmaceutical Excipients / Eds. R. C. Rowe, P. J. Sheskey, S. C. Owen. – Pharmaceutical Press, London, 2006.
8. European Pharmacopoeia. 9th Edition. – European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). – Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France 2016. – 4016 p.
9. Растворимость мометазона фууроата в смешанном растворителе вода – гексиленгликоль / А. П. Краснопёрова, Г. Д. Юхно, А. Н. Ляпунова и др. // Вісник Харківського національного університету. – 2011. – Вип. 20 (43). – С. 147–155.
10. Handbook of Cosmetic Science and Technology / Andre O. Barel, Marc Paye, Howard I. Maibach, Marcel Dekker. – New York–Basel, 2001. – 903 p.

11. Компендиум 2016 – лекарственные препараты / под ред. В. Н. Коваленко. – К. : МОРИОН, 2016. – 2416 с.
12. Русанов, А. И. Мицеллообразование в растворах поверхностно-активных веществ / А. И. Русанов. – СПб : Химия, 1992. – 280 с.
13. Биофармацевтическое исследование эстрогенов в форме пенообразующих аэрозолей / Н. А. Ляпунов, Л. В. Иванов, Н. Г. Сергиенко и др. // Фармация. – 1985. – № 5. – С. 25–29.
14. Гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) и методы его определения / Г. С. Башура, Н. А. Ляпунов, Р. Д. Дильбарханов и др. // Изв. АН КазССР. Сер. Биология. – 1977. – № 5. – С. 74–80.

References

1. Liapunov, M., Bezugla, O., Pidpruzhnykov Yu. et al. (2016). *ST-N MOZU 42-3.0:2011. Likarski zasoby. Farmatsevtichna rozrobka (ICH Q8)*. Kyiv, MOZ Ukrainy, MORION, 1, 39–74.
2. Liapunov, N. A., Bezuglaia, E. P., Stolper, Yu. M. et al. (2011). *Farmatsevticheskaia razrabotka lekarstvennykh preparatov. Glava 9*. Kharkov: NTMT, 3, 1419–1512.
3. Likhtenshtein, G. I. (1974). *Metod spinovykh zondov v molekuliarnoi biologii*. Moscow: Nauka, 256.
4. Kuznetsov A. N. (1976). *Metod spinovogo zonda (Osnovy i primeneniye)*. Moscow: Nauka, 210.
5. Bobko, A. A., Kirilyuk, I. A., Gritsan, N. P., Polovyanenko, D. N., Grigor'ev, I. A., Khramtsov, V. V., Bagryanskaya, E. G. (2010). EPR and Quantum Chemical Studies of the pH-sensitive Imidazoline and Imidazolidine Nitroxides with Bulky Substituents. *Applied Magnetic Resonance*, 39 (4), 437–451. doi: 10.1007/s00723-010-0179-z
6. Misharin, A. Y., Stulov, S. V., Tkachev, Y. V., Timofeev, V. P. (2011). *Spin Labeled [17(20)E]-pregna-5,17(20)-dien-21-oilamides. Synthesis, Structure, and Possible Applications*. 6th SPIN Conference. Marseille, Poster/Oral № XX.
7. Rowe, R. C., Sheskey, P. J., Owen, S. C. (2006). *Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press, London.
8. European Pharmacopoeia. 9th Edition. (2016). *European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM)*. Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France, 4016.
9. Krasnoporova, A. P., Yukhno, G. D., Liapunova A. N. et al. (2011). *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho universytetu*, 20 (43), 147–155.
10. Barel, A. O., Paye, M., Maibach, H. I., Dekker, M. (2001). *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. New York–Basel, 903.
11. Kovalenko, V. N. (2016). *Kompendium 2016 – lekarstvennye preparaty*. Kiev: MORION, 2416.
12. Rusanov, A. I. (1992). *Mitselloobrazovanie v rastvorakh poverhnostno-aktivnykh veshchestv*. Sankt–Peterburg: Khimiia, 280.
13. Liapunov, N. A., Ivanov, L. V., Sergienko, N. G. et al. (1985). *Farmatciia*, 5, 25–29.
14. Bashura, G. S., Liapunov, N. A., Dilbarkhanov, R. D. et al. (1977). *Gidrofilno-lipofilnyi balans (GLB) i metody ego opredeleniia*. *Izv. AN KazSSR. Ser. biolog.*, 5, 74–80.

Відомості про авторів / Information about authors / Інформація об авторах

Безугла О. П., кандидат фармацевтичних наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії технології та аналізу лікарських засобів, ДНУ «Науково-технологічний комплекс» Інститут монокристалів» НАН України» (м. Харків)

Bezugla O. P., Candidate of Pharmacy (Ph.D.), senior researcher; head of the Laboratory for Technology and Analysis of Medicinal Products of the State Scientific Institution “Institute for Single Crystals” of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv)

Безуглая Е. П., кандидат фармацевтичних наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторією технології та аналізу лікарських засобів, ГНУ «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» НАН України» (г. Харків)

Ляпунова А. М., молодший науковий співробітник лабораторії технології та аналізу лікарських засобів, ДНУ «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» НАН України» (м. Харків)

Lyapunova A. M., junior researcher of the Laboratory for Technology and Analysis of Medicinal Products of the State Scientific Institution “Institute for Single Crystals” of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv)

Ляпунова А. Н., молодший науковий співробітник лабораторії технології та аналізу лікарських засобів, ГНУ «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» НАН України» (г. Харків)

Кирилюк І. А., кандидат хімічних наук, доцент, провідний науковий співробітник, Новосибірський інститут органічної хімії імені М. М. Ворожцова Сибірського відділення РАН, старший науковий співробітник, Новосибірський державний університет

Kiriluk I. A., Candidate of Chemistry (Ph.D.), associate professor, leading researcher of the Novosibirsk Institute of Organic Chemistry named after N. N. Vorozhtsov, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, senior researcher of the Novosibirsk State University

Кирилюк И. А., кандидат химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, Новосибирский институт органической химии имени Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН, старший научный сотрудник, Новосибирский государственный университет

Ляпунов О. М., інженер 1 категорії лабораторії технології та аналізу лікарських засобів, ДНУ «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» НАН України» (м. Харків)

Lyapunov O. M., engineer of the 1st category of the Laboratory for Technology and Analysis of Medicinal Products, State Scientific Institution “Institute for Single Crystals” of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv)

Ляпунов А. Н., інженер 1 категорії лабораторії технології та аналізу лікарських засобів, ГНУ «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» НАН України» (г. Харків)

Адреса для листування: 61072, м. Харків, пр. Науки, 60, лабораторія технології та аналізу лікарських засобів, ДНУ «НТК «Інститут монокристалів» НАН України». E-mail: bezuglaya@isc.lharkov.com, bezugla.op@gmail.com

Mailing address: 60, Nauki av., Kharkiv, 61072, Laboratory for Technology and Analysis of Medicinal Products, State Scientific Institution “Institute for Single Crystals” of the National Academy of Sciences of Ukraine. E-mail: bezuglaya@isc.lharkov.com, bezugla.op@gmail.com

Адрес для переписки: 61072, г. Харьков, пр. Науки, 60, лаборатория технологии и анализа лекарственных средств, ГНУ «НТК «Інститут монокристалів» НАН України». E-mail: bezuglaya@isc.lharkov.com, bezugla.op@gmail.com