

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра аналитической химии и химической экологии

**АНАЛИТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ МАССОПЕРЕНОСА НЕКОТОРЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНЫ КОЖИ
ЧЕЛОВЕКА**

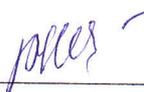
АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента IV курса 411 группы
направления 04.03.01 Химия

Института химии

Янкина Дмитрия Андреевича

Научный руководитель
заслуженный деятель науки РФ,
профессор, д.х.н., профессор


17.06.2017
подпись, дата

Р.К. Чернова

Зав. кафедрой
д.х.н., доцент


17.06.2017
подпись, дата

Т.Ю. Русанова

Саратов 2017

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. В последние годы во всем мире способ трансдермальной доставки лекарственных средств (ЛС) разрабатывается как важная альтернатива их традиционного введения (перорального или инъекционного). Управляемый процесс диффузии действующего вещества лекарственного средства позволяет обеспечить его быстрое и пролонгированное действие, обладающее рядом преимуществ.

Трансдермальный транспорт обеспечивает прохождение молекул или ионов ЛС через кожу различными путями: через межклеточное пространство, клеточные мембраны, придатки кожи. Однако имеется ряд ограничений, связанных с прохождением молекулами (ионами) лекарства кожного покрова, так, например, масса молекулы ЛС не должна превышать 500 Да.

Следует также отметить, что изучение мембранного транспорта ЛС моделируется либо через искусственные мембраны, либо тканевые срезы животных, и практически отсутствуют исследования на *мембранах кожи человека*. Изучение влияния последних, мало исследованных факторов (ионного состояния ЛС и их липофильности), на которое нацелена представленная тема, позволит получить новые знания с целью оптимизации не только молекулярного, но и ионного транспорта ЛС через мембраны кожи человека.

Современная техника проведения эксперимента по исследованию трансдермального массопереноса требует специального оборудования, что сопряжено с определенными условиями пробоотбора. Для такого рода эксперимента используется ячейка вертикальной диффузии Франца, которая требует отбор очень малого объема пробы (до 100 мкл), поэтому очень важен вопрос *аналитического контроля* содержания лекарственных веществ в растворе, прошедшем через такую мембрану. В этом случае необходимо предварительное концентрирование, т.к. реализация спектрофотометрического определения в таком случае осложняется большим разбавлением аликвоты, в результате чего теряется чувствительность метода.

Цель работы: обоснование выбора метода аналитического контроля лекарственных веществ при их прохождении через мембраны кожи человека при использовании ячеек горизонтальной и вертикальной диффузии.

Материалы исследования

Водные растворы тетрациклина (ТЦ) и доксициклина (ДЦ) гидрохлоридов, кожа человека (*in vitro*), ячейки горизонтальной и вертикальной диффузии.

Описание структуры

Выпускная квалификационная работа включает: введение, 3 главы, заключение, список использованных источников (77 литературных источников), приложения. Работа изложена на 56 страницах текста, содержит 25 рисунков и 20 таблиц.

Глава 1 представляет собой обзор литературы по исследованиям трансмембранного переноса, особенностям строения кожи и массопереноса через нее, роли спектрофотометрии в анализе.

Глава 2 содержит описание объектов и методик исследования (мицеллярной экстракции, сорбционно-люминесцентного анализа и т.д.)

Глава 3 включает в себя описание основных результатов и их обсуждение: исследование устойчивости растворов ТЦ и ДЦ, определение основных количественных характеристик массопереноса данных веществ через мембрану кожи человека; определение основных характеристик мицеллярной экстракции данных веществ и описание методики сорбционно-люминесцентного анализа содержания ДЦ с предварительной мицеллярной экстракцией, проверка методики.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

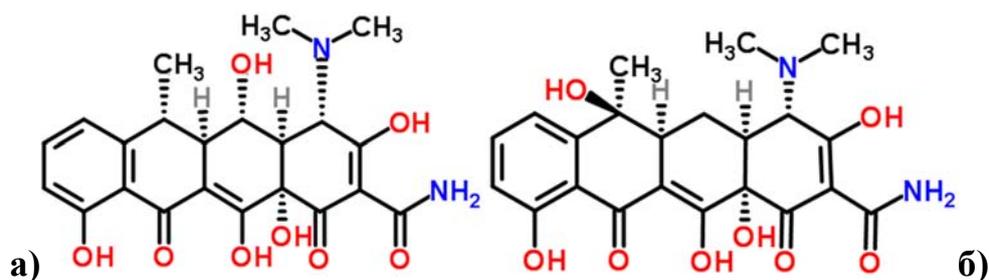


Рисунок 1 – Структурные формулы ДЦ(а) и ТЦ(б)

*Предварительное исследование устойчивости лекарственных средств.
Влияние pH и температуры*

В качестве предварительных испытаний была исследована устойчивость водных растворов ТЦ и ДЦ во времени и при нагревании. В результате чего было выяснено, что водные растворы ТЦ и ДЦ являются устойчивыми в течении как минимум 14 дней при хранении в темной посуде в холодильнике.

Исследование термической устойчивости показало, что водный раствор ТЦ является неустойчивым при нагревании до 80°C, тогда как раствор ДЦ в данных условиях стабилен.

Исследование массопереноса ТЦ и ДЦ через мембрану кожи человека

Для проведения эксперимента по трансдермальному переносу готовился раствор ТЦ и ДЦ с $C(\text{ЛС}) = 7,2 \cdot 10^{-4}$ М путем растворения навески массой $m(\text{ТЦ})=0,0693$ г, $m(\text{ДЦ})=0,0767$ г в 200 мл физиологического раствора. Эксперимент проводился в ячейке горизонтальной диффузии, устройство которой изображено на рисунке 2

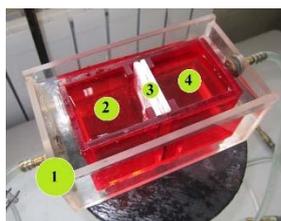


Рисунок 2 – Устройство ячейки горизонтальной диффузии

(1 – камера термостата, 2 – ячейка с раствором-донором, 3 – мембрана, 4 – ячейка с раствором-акцептором)

После начала эксперимента проба раствора-акцептора отбиралась каждые 5 минут и спектрофотометрировалась без разбавления, после чего возвращалась ячейку-акцептор. Количество лекарственного средства определялось по предварительно построенной градуировочной зависимости. После чего строились зависимости количества вещества, прошедшего через единицу площади мембраны (Q) от времени t (рисунок 3). Определялся угловой коэффициент наклона и рассчитывались основные характеристики массопереноса по следующим формулам:

$$D = \frac{Jh}{C_0} \qquad P = \frac{J}{C_0}$$

где D – коэффициент диффузии (см²·ч⁻¹), J – поток вещества (мкг·см⁻²·ч⁻¹), h – толщина мембраны (мм), C₀ – начальная концентрация ЛС, моль/л, P – коэффициент проницаемости (см⁻²·с⁻¹).



Рисунок 3 – Кинетические зависимости массопереноса ТЦ и ДЦ

В таблице 1 сведены основные характеристики молекул исследуемых лекарственных средств и приведены количественные характеристики их массопереноса через мембрану кожи человека.

Таблица 1 – Основные характеристики молекул лекарственных веществ и количественные характеристики массопереноса

Вещество	M, г/моль	Заряд	Log P _{o/w}	J, мкг·см ⁻² ·ч ⁻¹	D, см ² ·ч ⁻¹	P, см ⁻² ·с ⁻¹
Тетрациклина гидрохлорид	480,935	Цвиттер-ион	-1,19	106,7	6·10 ⁻⁵	5,6·10 ⁻⁷
Доксициклина гидрохлорид	480,935	Цвиттер-ион	-0,72	45,7	2,6·10 ⁻⁵	2,4·10 ⁻⁷

Из данных, приведенных в таблице 1 и рисунке 3 можно сделать вывод, что ТЦ и ДЦ, несмотря на одинаковую молекулярную массу, схожие геометрические параметры и заряд молекул, обладают различной проницаемостью, т.к. данные лекарственные средства имеют различный коэффициент распределения (октанол/вода). Тетрациклин является более неполярной молекулой ($\log P_{o/w} = -1,19$), что способствует его более легкому проникновению через мембраны кожи человека, о чем свидетельствует большее значение величины потока проникновения (J).

Необходимость концентрирования при определении лекарственных средств в ячейке-акцепторе вертикальной диффузии Франца

В дальнейшем, при переходе к изучению массопереноса веществ через биологические мембраны, имеющие ограниченную площадь поверхности (например, мембраны внутренних органов), требуется использование ячейки вертикальной диффузии Франца (рисунок 4), особенностью строения которой является возможность использования участка мембран площадью 1 см^2 и объем отбираемой аликвоты 30 мкл.

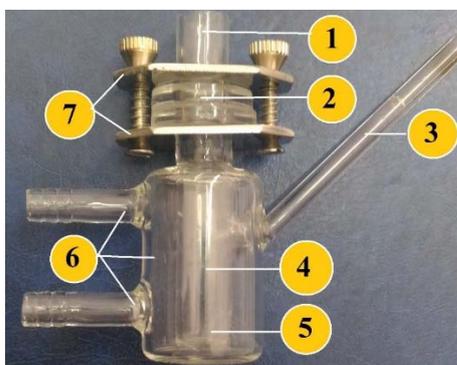


Рисунок 4 – Ячейка вертикальной диффузии Франца для исследования трансмембранного переноса веществ

В связи с малым объемом отбираемой пробы, необходимо предварительное концентрирование и поиск других подходов к определению содержания аналитов.

Аналитическим решением данной проблемы стала разработка методики сорбционно-люминесцентного определения ДЦ с предварительной мицеллярной экстракцией в системе (ОП-10) – Na₂SO₄ – H₂O при 25°С.

Нами была исследована мицеллярная экстракция ТЦ и ДЦ в изотермическом и политермическом режимах, условия проведения которых приведены в таблице 2. Нами использовалась методика мицеллярной экстракции, приведенная в работе 1.

Таблица 2 – Условия мицеллярной экстракции в различных режимах

Параметр	Изотермический режим (25°С)	Политермический режим (80°С)
С(ОП-10)	10%	10%
С(Na ₂ SO ₄)	0,2 М	0,6 М
С(НСI)	0,025 Н	0,025 Н
τ	10 мин	30 мин

Далее, по приведенным ниже формулам рассчитывались основные характеристики мицеллярной экстракции, приведенные в таблице 3.

$$D = \frac{C_o}{C_B}; \quad R, \% = \frac{D \times 100}{D + \frac{V_B}{V_o}},$$

где D — коэффициент распределения; V_B — объем водной фазы, мл;

V_o — объем мицеллярной фазы, мл.

Таблица 3 – Основные параметры мицеллярной экстракции ТЦ и ДЦ

Вещество	Политермический режим		Изотермический режим	
	D	R, %	D	R, %
ТЦ	—	—	5,8 ± 0,3	77 ± 2
ДЦ	9,2 ± 0,4	78 ± 1	20 ± 3	92 ± 3

Как видно из представленных данных, для мицеллярной экстракции ТЦ, в следствие его термической неустойчивости, применим только изотермический режим, тогда как для ДЦ эффективно могут использоваться оба режима экстракции.

Сорбционно-флуоресцентное определение доксициклина с предварительной мицеллярной экстракцией в системе (ОП-10) – H₂O – Na₂SO₄ при 25°C

Нами была изучена и несколько изменена методика сорбционно-люминесцентного определения доксициклина гидрохлорида с предварительной мицеллярной экстракцией, представленная в работе [1]. В [2] происходит обоснование выбора в качестве сорбента пластин для ТСХ «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А-УФ, так же описывается процедура активации платины при ее нагревании до $t=110^{\circ}\text{C}$ и прокаливании в течении 40-60 минут. Нами был изменен режим экстракции (с политермического на изотермический), а также в качестве нПАВ выбран ОП-10. После проведения МЭ и разделения фаз, на ТСХ-пластину наносили три точки по 2 мкл для каждого раствора МФ с различной концентрацией ДЦ, высушивали, снимали изображение на видеоденситометре при $\lambda=365\text{нм}$ (рисунок 5).

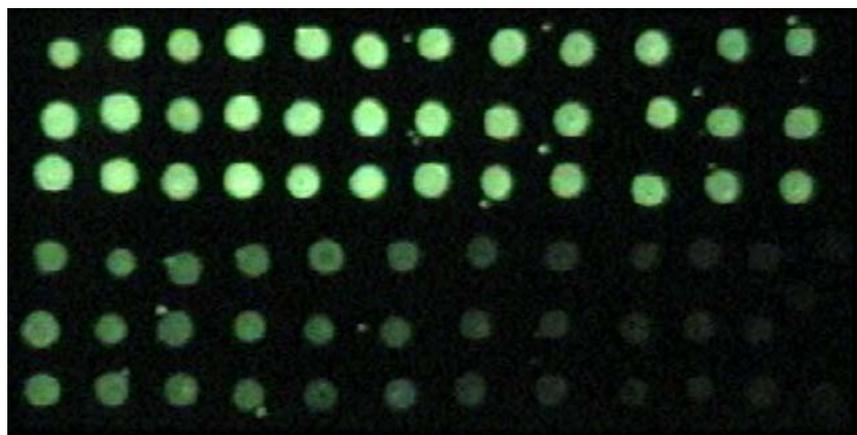


Рисунок 5 – Фотография ТСХ-пластины с нанесенной МФ в УФ свете ($\lambda=365\text{ нм}$)

Далее изображение обрабатывали в программе AdobePhotoshopCC 2015. После разложения полученного сигнала на компоненты выбирали канал «G» (Green), как наиболее интенсивный, и строили градуировочную зависимость интенсивности основного цвета от содержания исследуемого вещества (рисунок 6).

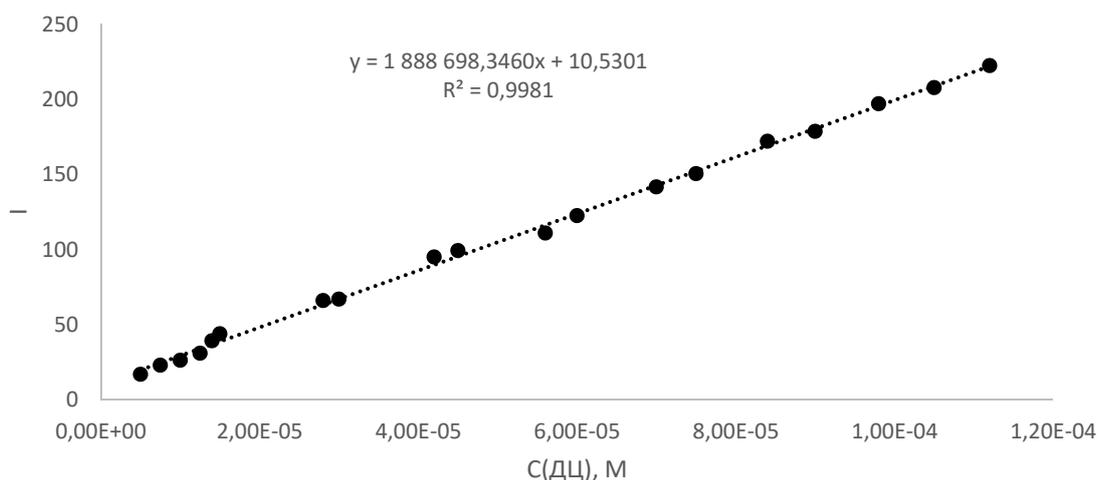


Рисунок 6 – Градуировочная зависимость интенсивности флуоресценции от содержания ДЦ

Методика сорбционно-люминесцентного определения доксициклина гидрохлорида с предварительной мицеллярной экстракцией была проверена методом «Введено-найдено». Результаты проверки приведены в таблице 20.

Таблица 20 – Результаты проверки правильности определения методом «Введено-найдено»

№	С _{дц} , М Введено	С _{дц} , М Найдено	С _{дц} , М среднее	S	ΔX (t=4,30)	Δ	δ , %
1	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$9,43 \cdot 10^{-5}$	$1,01 \cdot 10^{-4}$	$1,13 \cdot 10^{-5}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$	16
2		$9,38 \cdot 10^{-5}$					
3		$1,14 \cdot 10^{-4}$					
4	$9 \cdot 10^{-5}$	$9,77 \cdot 10^{-5}$	$1,02 \cdot 10^{-4}$	$5,00 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	13
5		$1,07 \cdot 10^{-4}$					
6		$9,98 \cdot 10^{-5}$					
7	$6 \cdot 10^{-5}$	$8,21 \cdot 10^{-5}$	$7,53 \cdot 10^{-5}$	$7,17 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	26
8		$7,60 \cdot 10^{-5}$					
9		$6,78 \cdot 10^{-5}$					
10	$3 \cdot 10^{-5}$	$4,01 \cdot 10^{-5}$	$3,64 \cdot 10^{-5}$	$4,81 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$6,4 \cdot 10^{-6}$	21
11		$3,80 \cdot 10^{-5}$					
12		$3,10 \cdot 10^{-5}$					
13	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$1,64 \cdot 10^{-5}$	$1,63 \cdot 10^{-5}$	$2,04 \cdot 10^{-6}$	$5,1 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-6}$	9
14		$1,42 \cdot 10^{-5}$					
15		$1,83 \cdot 10^{-5}$					

Как видно, относительная погрешность данной методики колеблется в интервале 9-26%. Это может быть вызвано неравномерностью распределения ДЦ в мицеллярной фазе, перемешивание которой затруднено из-за большой вязкости раствора.

Методика сорбционно-люминесцентного определения ДЦ позволяет уменьшить объем отбираемой аликвоты, минимизировать расход используемых реагентов и имеет более низкий и широкий диапазон определяемых концентраций ($1,12 \cdot 10^{-4}$ – $5,0 \cdot 10^{-6}$ М) чем методика спектрофотометрического определения ($9,0 \cdot 10^{-5}$ – $9,0 \cdot 10^{-6}$ М).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Обобщено и проанализировано более 70 библиографических источников, посвященных особенностям массопереноса веществ через синтетические и биологические мембраны, показана роль и возможности спектрофотометрии как метода идентификации и контроля содержания лекарственных средств.

2. Рассмотрены протолитические процессы, протекающие в водных растворах тетрациклина и доксициклина гидрохлоридов. Сделано предположение о возможных формах существования данных лекарственных веществ в водных средах. Исследована их устойчивость во времени.

3. Исследована термическая устойчивость водных растворов тетрациклина и доксициклина. Показано, что при нагревании раствора до 80°C тетрациклин разрушается, переходя в ангидротетрациклин. Растворы доксициклина в этих условиях устойчивы.

4. Определены основные количественные характеристики массопереноса (значение потока вещества J , коэффициент диффузии D , коэффициент проницаемости P) тетрациклина и доксициклина через мембрану кожи человека *in vitro*. Высказаны соображения о механизме неиндуцированного массопереноса.

5. Исследована возможность мицеллярной экстракции тетрациклина и доксициклина в системах (ОП-10) – Na_2SO_4 – H_2O в изо- и политермическом режимах. Обоснован выбор изотермического режима экстракции тетрациклина.

6. Разработана методика сорбционно – люминесцентного определения доксициклина в малых объемах разбавленных растворов с предварительным концентрированием мицеллярной экстракцией. Определены основные метрологические характеристики разработанной методики.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Шестопалова Н.Б. Системы НП АВ –Н₂О –ЭЛЕКТРОЛИТЫ в мицеллярной экстракции и фотометрическом определении синтетических пищевых красителей. дис.... канд. хим. наук. Саратов: СГУ им. Н. Г. Чернышевского, 2014. 203 с.
2. Паращенко, И.И. Применение сенсibilизированной флуоресценции и мицелл ПАВ для определения физиологически-активных веществ в растворе и на поверхности: дис. ... к.х.н. Саратовский государственный университет, Саратов, 2013.