

ПОВЫШЕНИЕ РАСТВОРИМОСТИ ЭКДИСТЕРОНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 2-ГИДРОКСИПРОПИЛ-β-ЦИКЛОДЕКСТРИНА

Миронов В.А. к.т.н., Назаров А.К., Волков В.Л.

Экдистероиды – являются стероидными гормонами, которые регулируют линьку и репродукцию членистоногих. Обнаружение в 1966 г. молекул фитоэкдистероидов в некоторых видах растений сделало их легкодоступными в достаточных количествах для исследований на млекопитающих и разработки на их основе лекарственных препаратов.

Исследования лиганд-рецепторного взаимодействия показали, что экдистероиды не связываются с рецепторами гормонов позвоночных животных. Данный факт, по-видимому, обусловлен тем, что данные соединения по своей структуре незначительно отличаются от стероидных гормонов млекопитающих. Несмотря на эти различия, проведенные фармакологические исследования установили влияние экдистероидов на различные физиологические процессы у млекопитающих и человека.

В экспериментах по изучению влияния экдистерона (20-E) на экспрессию белка в клетках млекопитающих было показано, что экдистероиды стимулируют синтез белка в печени мышей за счет увеличения эффективности аппарата трансляции. Также было показано, что, введенный перорально крысам, 20-E снимает гипергликемию, вызванную либо глюкозагом, либо аллоксаном. Установлено, что экдистероиды стимулируют включение глюкозы в гликоген и белок в печени мышей и более общее расходование глюкозы в тканях. Кроме того экдистероиды являются гипохолестеринемическими агентами. Их действие заключается в уменьшении биосинтеза холестерина и увеличении его катаболизма. Результаты этих исследований явились основанием для создания нового лекарственного препарата «Экдистен», относящегося к группе адаптогенов, и ряда БАВ на основе экдистерона.

Исследования физико-химических свойств показали, что экдистерон практически не растворим в воде, данное обстоятельство может способствовать снижению его адсорбции из желудочно-кишечного тракта и как следствие выразиться в неудовлетворительной биодоступности при высокой биологической эффективности и как следствие снижение общего фармакологического действия. Одним из решений по устранению данного недостатка может стать повышение растворимости действующего вещества в воде с помощью производных циклодекстринов.

В качестве соединений, улучшающих растворимость лекарственных веществ, в мировой практике используют циклодекстрины – олигосахариды с гидрофобной полостью и гидрофильной внешней поверхностью. Наиболее широкое практическое применение получил 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин. Он может образовывать с лекарственными веществами «комплексы включения», в результате чего происходит улучшение их биофармацевтических свойств (растворимость и биологическая доступность), что создает возможность уменьшить дозы действующих веществ и снизить вероятность появления побочных эффектов.

Таким образом, изучение образования комплексов включения экдистерона с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином имеют большое практическое значение для целей получения новых перспективных лекарственных форм, обладающих повышенной биодоступностью на основе экдистерона.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали субстанции экдистерона с содержанием основного вещества 95% (ChemHuanDou Китай) и 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина с содержанием основного вещества 97% (AcrosOrganics), остальные реактивы и растворители имели чистоту не ниже «х.ч.». Все измерения проводили при комнатной температуре

(25 ± 0,01)°C, эксперименты повторяли по 3 раза при проведении измерений в каждой точке не менее 2 раз, данные усредняли.

Содержание экдистерона в аликвотах определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) с использованием жидкостного хроматографа «ThermoScientific» (модель Accela), с насосом Accela 1250 pump, встроенным дегазатором, оборудованный системой автоматического ввода пробы AccelaAutosampler с масс-спектрометрическим детектором Finnigan LXQ фирмы «ThermoScientific» с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении, оснащенный хроматографической колонкой HYPERSIL GoldAQ длиной 150 мм и внутренним диаметром 2,1 мм, размер сорбента 3 мкм и ЭВМ Dell фирмы «Dellelectronics» с программным обеспечением для сбора и обработки данных XCalibur, версия 2.0.6.

На первом этапе исследований проводили выбор оптимальных условий хроматографирования и работы масс-спектрометра. В результате подобрали оптимальные условия, приведенные ниже.

Для хроматографического разделения использовали градиентный режим элюирования с применением 3-х компонентной подвижной фазы: компонент А – деионизированная вода; компонент В – ацетонитрил марки «для ВЭЖХ»; компонент С – 1% раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде.

Температура термостата колонки была установлена 40°C, объем ввода пробы составлял 0,001 мл, время анализа – 20 мин.

Условия работы масс-спектрометра представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Условия работы масс-селективного детектора LXQ «ThermoScientific»

Масс-спектрометрический детектор	Масс-спектрометр LXQ «ThermoScientific» с источником ионизации ESI
Режим источника ионизации	положительная ионизация электростатическим распылением при атмосферном давлении
Режим детектирования	детектирование в режиме полного ионного тока от 100 до 1000 Da
Полярность детектируемых ионов	детектирование положительных ионов
Температура газа-осушителя	350°C
Скорость потока газа-осушителя	5 ед.
Скорость потока вспомогательного газа	10
Скорость потока газа на распылителе	40 ед.
Напряжение на капилляре	5,5 кВ
Температура капилляра	350°C

О подборе оптимальных условий свидетельствуют результаты анализа растворов стандартных образцов экдистерона приведенные на рисунках 1,2.

Рис. 1. Хроматограмма анализа раствора стандартного образца экдистерона по выделенному иону (463) с концентрацией 50 мкг/мл

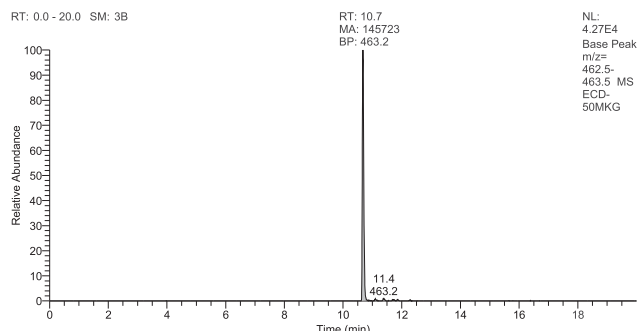
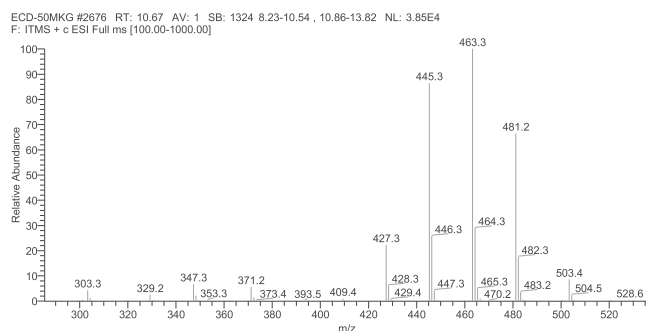
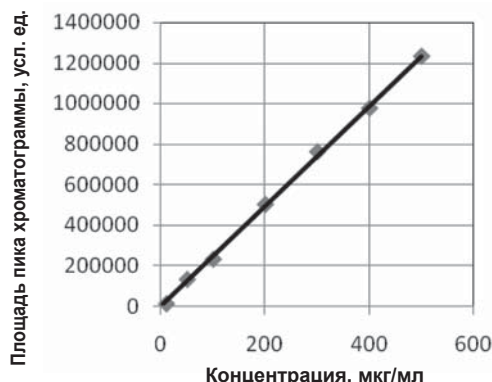


Рис. 2. Масс-спектр экдистерона, полученный при анализе раствора стандартного образца с концентрацией 50 мкг/мл



На следующем этапе определяли линейность градуировочного графика. Для этого были приготовлены градуировочные растворы с концентрациями экдистерона в метиловом спирте от $5,0 \cdot 10^{-3}$ мг/мл до 10 мг/мл. Линейность градуировочного графика и стабильность измерений наблюдалась в диапазоне концентраций от $1,0 \cdot 10^{-2}$ мг/мл до 0,5 мг/мл. Градуировочный график представлен на рис. 3.

Рис. 3. Градуировочный график зависимости площади пика на хроматограмме ВЭЖХ-МС от концентрации раствора экдистерона



Коэффициент корреляции составлял 0,999, что позволило использовать данный график для количественного определения экдистерона.

Следующим этапом работы было изучение растворимости экдистерона в присутствии 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина.

Растворимость экдистерона в дистиллированной воде составила 4 мг/мл. При исследовании растворимости в присутствии 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина исходили из того, что максимальное молярное отношение не должно превышать 1/3 (экдистерон/2-гидроксипропил-β-циклодекстрин). Для этого готовили образцы с различным содержанием циклодекстрина при постоянной концентрации экдистерона. Состав исследуемых образцов представлен в таблице 2.

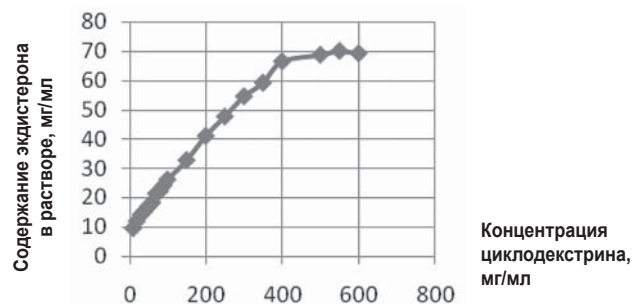
Таблица 2 — Содержание экдистерона и циклодекстрина в исследуемых образцах

№ образца	Содержание экдистерона, мг	Содержание циклодекстрина, мг	Содержание воды, мл
1	100	10	1
2	100	20	1
3	100	30	1
4	100	40	1
5	100	50	1
6	100	60	1
7	100	70	1
8	100	80	1
9	100	90	1
10	100	100	1
11	100	150	1
12	100	200	1
13	100	250	1
14	100	300	1
15	100	350	1
16	100	400	1
17	100	500	1
18	100	550	1
19	100	600	1

Для определения растворимости экдистерона в присутствии циклодекстрина в воде образцы растворов тщательно перемешивали с использованием ротатор-миксера в течение 20 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали при 4,4 тыс. об/мин в течение 20 минут. Надосадочный слой отбирали и пропускали через фильтрующую насадку Spartan с размерами пор 0,2 мкм. Из фильтратов отбирали по 0,1 мл раствора и перерастворяли в 19,9 мл метилового спирта. Далее из каждой виалы отбирали по 0,001 мл раствора и анализировали при условиях приведенных выше.

График изменения растворимости экдистерона в растворе от концентрации 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина приведен на рис. 4.

Рис. 4. График изменения растворимости экдистерона от концентрации 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина



Полученные данные свидетельствуют, что в присутствии 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина растворимость экдистерона увеличивается, максимальное значение составило около 70,0 мг/мл.

Таким образом, растворимость экдистерона в присутствии 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина увеличилась примерно в 17 раз, что свидетельствует о специфических межмолекулярных взаимодействиях в исследуемой системе. Максимального значения растворимости экдистерона достигает в присутствии циклодекстрина в концентрации 400–500 мг/мл. Полученные данные об изменении растворимости экдистерона в присутствии циклодекстрина могут быть использованы при разработке новых лекарственных форм.

ВЫВОДЫ

1. Доказана возможность увеличения растворимости экдистерона в воде в присутствии 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина в 17 раз и составляет 70 мг/мл.

2. Разработана методика количественного определения экдистерона в водном растворе, для оценки степени растворимости его в воде в присутствии 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина.