

В. В. Туров, В. М. Гунько, В. Н. Барвинченко, С. В. Керусь,
О. А. Буряк, академик НАН Украины В. Ф. Чехун

Нанохимия в разработке новых средств трансдермального введения лекарственных препаратов

Показано, що вода в частково дегідратованих клітинах знаходиться у вигляді кластерів, основна частина яких має радіус у діапазоні 0,5–16 нм. На основі механоактивованої суміші крохмалю з високодисперсним кремнеземом (дисперсійне середовище), води і суміші полярного (ДМСО) і слабополярного (хлороформ) розчинників (дисперсійна фаза) сконструйовано модельний гель, який розчиняє більшість класів лікарських препаратів. Структура води в такому гелі аналогічна структурі води в частково дегідратованих модельних клітинних матеріалах (тканина печінки, клітини кісткового мозку), що дозволяє розраховувати на ефективність використання подібних композицій для трансдермальної доставки лікарських препаратів.

Использование некоторых эффективных лекарственных препаратов, созданных в последние годы для лечения ряда опасных заболеваний, ограничено вследствие отрицательного их влияния на здоровые органы, ткани, процессы метаболизма и др. Поэтому усилия ученых направлены на разработку специфических методов доставки препаратов, в частности путем их трансдермального введения [1–5]. Поскольку кожа является сложной полимембранной системой, процесс диффузии органических веществ через нее сильно затруднен, так что до середины прошлого века она считалась практически непроницаемой для лекарственных средств [3]. Однако было установлено, что некоторые гидрофобные (нефть, мазут) и гидрофильные (диметилсульфоксид) вещества способны в несколько раз увеличивать проницаемость кожи для многих типов лекарственных препаратов [6, 7]. Вследствие сложного строения кожи и трудностей в изучении биохимических процессов, которые в ней происходят при совместном воздействии на нее сопутствующих и лекарственных веществ, механизм такого ускорения и до настоящего времени полностью не изучен. Можно предположить, что одним из факторов, влияющих на скорость трансдермальной диффузии, является способность некоторых органических веществ, проникающих в кожу, изменять строение около- и внутриклеточной воды.

Одним из немногих методов, позволяющих анализировать особенности кластерного строения воды в гетерогенных системах, является ^1H ЯМР-спектроскопия [8–12]. По энергии взаимодействия с окружением (твердой фазой, макромолекулами) вода может быть разделена на сильносвязанную (SBW, изменение энергии Гиббса $\Delta G < -0,5$ кДж/моль) и слабосвязанную (WBW, $\Delta G > -0,5$ кДж/моль), а по структуре водородных связей — на сильноассоциированную (химический сдвиг протонов $\delta_{\text{H}} > 3$ м. д.) и слабоассоциированную ($\delta_{\text{H}} = 1 \div 2$ м. д.) (SAW и WAW соответственно) [8–10]. Снижение величины G граничного слоя воды в результате адсорбционных взаимодействий в порах сопровождается понижением температуры замерзания, а изменение среднего числа водородных связей, приходящихся на каждую молекулу воды (n), — к изменению величины δ_{H} . Поскольку при переходе от неассоциированного (газовая фаза или раствор в неполярных растворителях) к тетракоординированному состоянию (лед) молекул H_2O величина δ_{H} изменяется от 1–1,4

до 7 м. д., то по ней можно оценить величину n . Конечно, δ_H зависит и от прочности и от ориентации (угла O–H...O) водородных связей (т.е. переноса электронной плотности, что изменяет тензор экранирования протонов) [13]. Нами была предпринята попытка создания модельного геля, легко растворяющего основные типы лекарственных веществ, компоненты которого обеспечивают близкое воздействие на воду, входящую в состав клеточных структур и находящуюся в межчастичных (межмолекулярных) зазорах, формирующих этот гель.

Экспериментальная часть. Материалы. Для исследований использовали посмертный костный мозг курицы, хранившийся в течение 12–14 ч при 4 °С, и печеночную ткань от крыс линии Вистар. Для экспериментов брали по 5 г ткани и помещали в 40 мл фосфатного буфера (рН 7,4), после чего проводили гомогенизацию материала. Затем ткань высушивали, используя метод лиофильной сушки. Адсорбцию кверцетина (Qc) осуществляли методом импрегнирования крахмала (St) спиртовым раствором Qc (с последующей сушкой при 60 °С), что обеспечивало содержание кверцетина 5% (мас.) по отношению к сухому крахмалу. Нанокремнезем А-300 (удельная поверхность 297 м²/г, Калушский опытно-экспериментальный завод Института химии поверхности им. А. А. Чуйко) перед приготовлением образцов прокаливали при 400 °С в течение 4 ч. Композиты на основе крахмала и А-300 готовили путем гомогенизации водной суспензии крахмала и кремнезема (20 : 1), которую высушивали при 70 °С в течение 6 ч.

В качестве гидрофобной и гидрофильной составляющих органической компоненты дисперсионной среды были выбраны хлороформ (CDCl₃), ацетонитрил (CD₃CN) и диметилсульфоксид ((CD₃)₂SO). Использование дейтеропрепаратов было связано с необходимостью упрощения спектров ¹H ЯМР, в которых разные формы воды могут наблюдаться в той же спектральной области, что и СН₃- или СН₂-группы углеводородов. Предполагалось, что CDCl₃ по своим гидрофобным свойствам по отношению к кластеризованной воде близок к алифатическим углеводородам и поэтому может служить аналогом компонент, входящих в состав природных субстанций типа нефти или мазута.

¹H ЯМР-спектроскопия. Спектры снимали на ЯМР-спектрометре высокого разрешения Varian Mercury 400 с рабочей частотой 400 МГц при 90° зондирующем импульсе длительностью 2 мкс. Для предотвращения переохлаждения связанной воды спектры ¹H ЯМР записывали при нагревании образцов, предварительно охлажденных до 200 К. Температуру образцов регулировали, используя термopриставку Bruker VT-1000, с точностью ±1 К. Интегральные интенсивности сигналов определяли с точностью ±10%.

Определение характеристик связанной воды с помощью ¹H ЯМР-спектроскопии подробно изложено ранее [8–12]. Расчеты методом ЯМР-криопорометрии выполнены согласно методологии, описанной ранее [8, 9], с использованием соотношения Гиббса–Томсона для снижения температуры замерзания связанной воды, которое обратно пропорционально радиусу цилиндрических пор.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 приведены результаты измерения спектров ¹H ЯМР воды в частично дегидратированных клеточных материалах и в среде органических растворителей. Спектр воды в клетках костного мозга (20% остаточной воды, рис. 1, а) представляет собой два широких, перекрывающихся сигнала, из которых основной имеет химический сдвиг $\delta = 4,5$ м. д., что близко к химическому сдвигу жидкой воды. На правом крыле этого сигнала можно различить значительно менее интенсивный сигнал с химическим сдвигом $\delta = 1$ м. д. В соответствии с классификацией, приведенной в [8], более интенсивный сигнал следует относить к сильноассоциированной воде (SAW), молекулы ко-

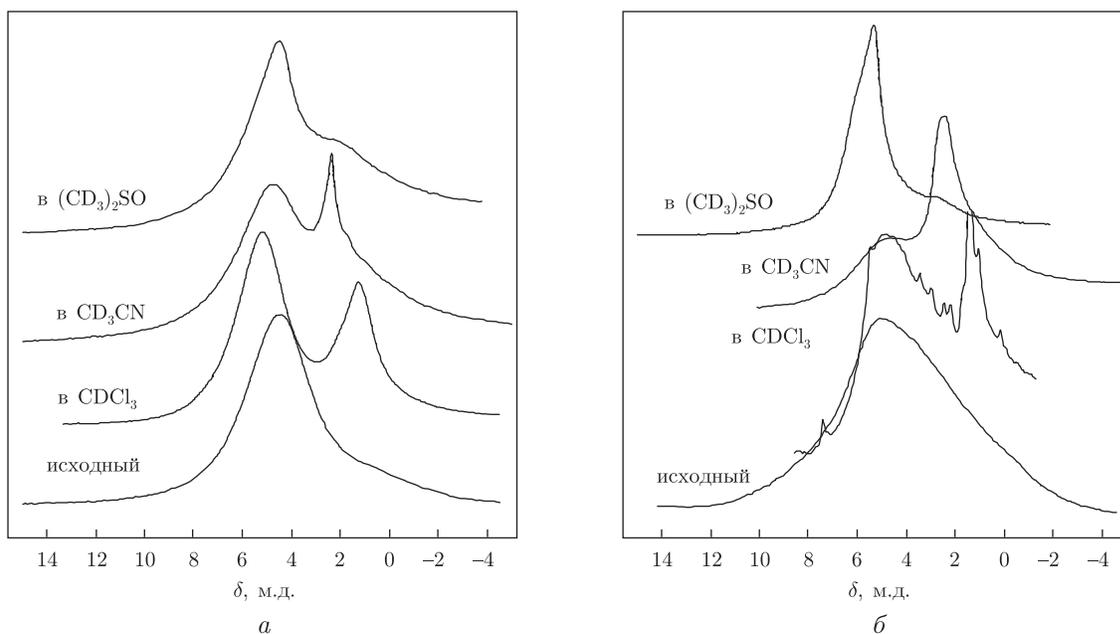


Рис. 1. Спектры ^1H ЯМР воды в частично дегидратированных клеточных материалах, снятые при 280 К, исходные и в среде органических растворителей: *a* — в клетках костного мозга курицы; *б* — в гомогенате печени крысы

торой принимают участие в образовании 2–3 водородных связей, а менее интенсивный — к слабоассоциированной воде (WAW), входящей в состав кластеров с малым числом молекул воды, неассоциированных молекул воды или водородносвязанных кластеров воды с сильно искривленными торсионными углами. Последнее обуславливает неоптимальную ориентацию неподеленных электронных пар атомов O на атомы H соседних молекул воды.

Среда слабополярного органического растворителя — CDCl_3 кардинальным образом изменяет спектр внутриклеточной воды (см. рис. 1). Сигнал SAW уменьшается за счет роста интенсивности сигнала WAW. Среда ацетонитрила слабо влияет на соотношение интенсивностей сигналов SAW и WAW, однако в спектрах появляется интенсивный сигнал воды с химическим сдвигом $\delta = 2$ м. д. Поскольку вода хорошо растворяется в CD_3CN и образует с ним водородносвязанные комплексы $\text{HO}-\text{H} \dots \text{N} \equiv \text{CCH}_3$, этот сигнал следует относить к ассоциированной воде (ASW), перешедшей из внутриклеточного пространства в органическую среду. Следует отметить, что концентрация ASW относительно невелика, несмотря на значительно большее количество присутствующего в системе CD_3CN , т. е. замещение CD_3CN воды во внутриклеточном пространстве с образованием гомогенного раствора оказывается термодинамически невыгодным. Раствор вода– CD_3CN формируется либо во внутриклеточном пространстве (не смешиваясь с SAW), либо вне клеток. Условия проведения экспериментов выбирали таким образом, чтобы визуальной жидкой фазы в образце не было, т. е. в измерительной ампуле была влажная клеточная масса. При использовании среды $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, одного из наиболее полярных органических растворителей, разрушения нанодоменов SAW (1–3 нм) также не происходит. Более того, химический сдвиг SAW несколько увеличивается, что может быть обусловлено повышением координационного числа молекул воды за счет формирования H-связей между молекулами $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ и молекулами воды на границах доменов SAW. На рис. 1, *б* приведены результаты изучения

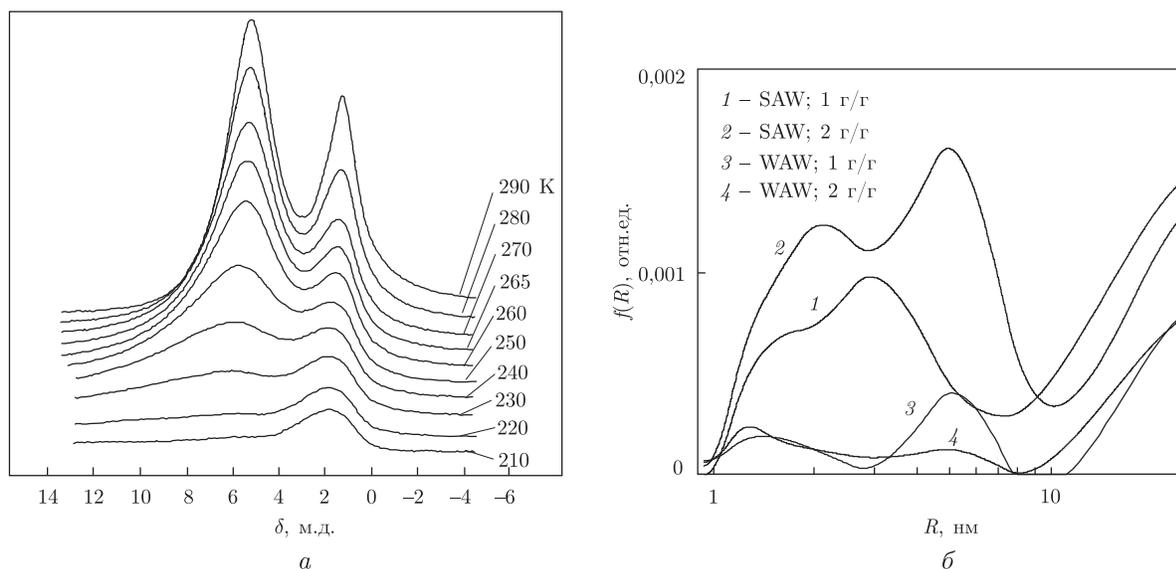


Рис. 2. Спектры ^1H ЯМР воды в клеточной массе костного мозга курицы, содержащей 20% остаточной воды, в среде CDCl_3 (2 г/г) при разных температурах (а) и распределения по радиусам структур SAW и WAW для двух образцов, содержание CDCl_3 в которых составляло 1 и 2 г/г клеточной массы (б)

влияния полярных и неполярных растворителей на состояние воды в частично дегидратированном гомогенате печени крыс при 280 К.

При использовании смесей слабополярного (CDCl_3) и полярных (CD_3CN , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) органических растворителей вид спектра воды упрощается (вероятно, из-за ускорения молекулярного обмена между структурами воды, локализованными в полостях разного размера). При этом в спектрах могут разделяться сигналы SAW, WAW и ASW. Соотношение интенсивностей этих сигналов зависит от состава смеси и количества органической фазы.

Размер водных структур, формирующихся в частично дегидратированной клеточной массе, может быть оценен на основании измерения температурных зависимостей интенсивности сигналов SAW и WAW. На рис. 2, а в качестве примера показаны температурные изменения спектров воды в образце клеточного материала (костный мозг курицы), содержащего 20% остаточной воды, помещенной в среду CDCl_3 (2 г на 1 г клеточной массы). Поскольку общая концентрация воды до замораживания известна, измерение площадей пиков SAW и WAW позволяет для каждого типа воды рассчитать зависимости $C_{uw}(T)$, на основании которых могут быть построены распределения по размерам водных структур, присутствующих в клеточной массе. Соответствующие зависимости приведены на рис. 2, б для двух образцов, содержащих 1 и 2 г/г CDCl_3 .

Таким образом, вода во внутриклеточном пространстве формирует систему кластеров (< 1 нм) и нанодоменов (> 1 нм), в которых она может находиться в сильно- или слабоассоциированном состоянии. Эти структуры достаточно стабильны и не разрушаются в присутствии таких сильнополярных органических веществ, как CD_3CN и $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, в то время как слабополярные углеводороды типа CDCl_3 могут существенно влиять на соотношение концентраций SAW и WAW.

На рис. 3 приведены результаты исследования структуры кластеров воды в гомогенате печени крыс, содержащем 13% остаточной воды, в среде, состоящей из смеси CDCl_3 и

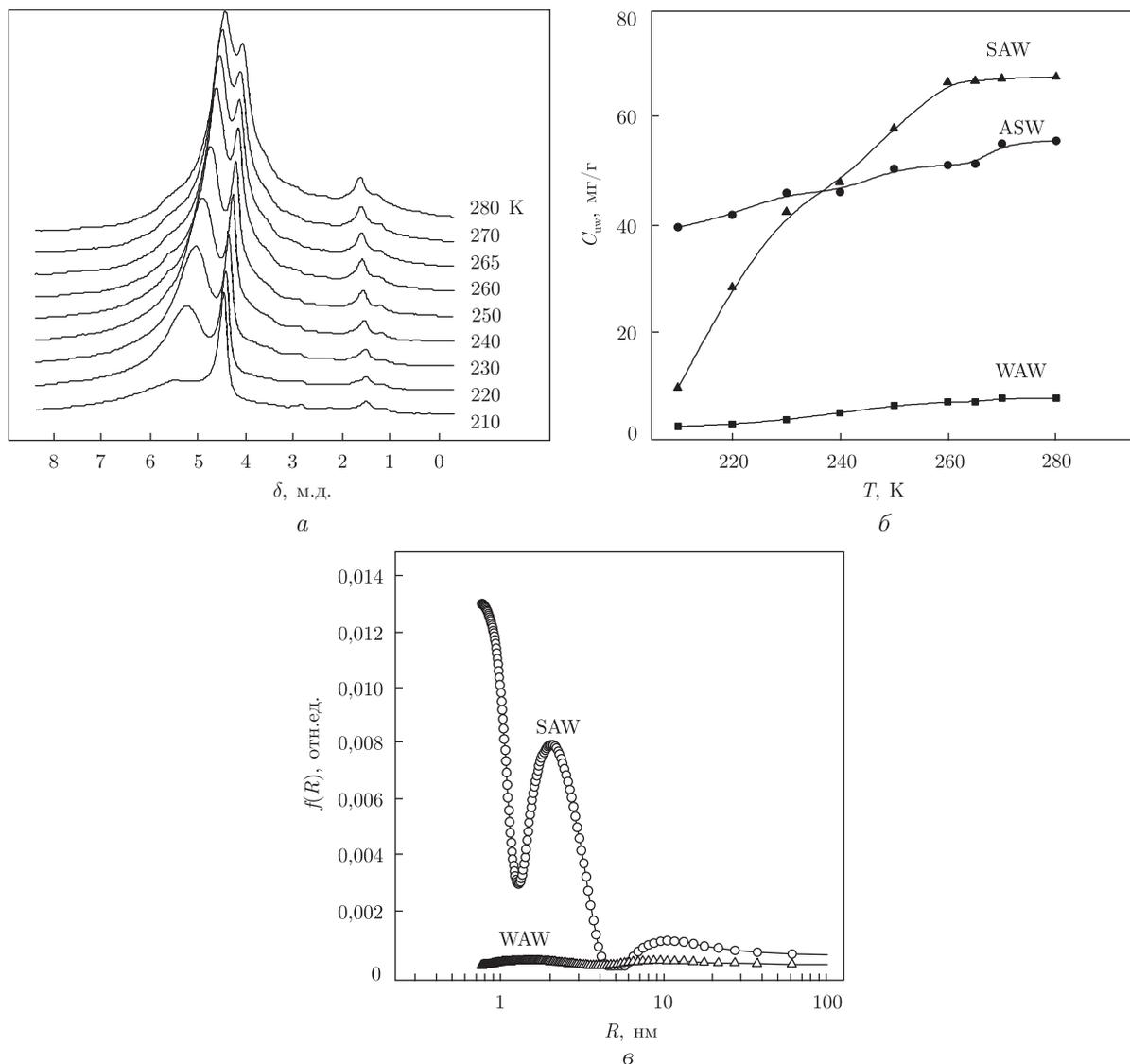


Рис. 3. Кластеризация внутриклеточной воды (13% массы сухого гомогената) в печеночном гомогенате под влиянием смеси $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ с CDCl_3 (3 : 1): *a* — температурные изменения спектров ^1H ЯМР воды; *б* — зависимость от температуры концентрации разных типов межфазной воды; *в* — распределения по радиусам структур SAW и WAW

$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (3 : 1). Из рис. 3, *a* видно, что во всем диапазоне температур в спектрах регистрируются сигналы SAW, WAW и ASW. Как и в рассмотренном выше случае клеток костного мозга, с понижением температуры происходит уменьшение интенсивности всех сигналов воды за счет ее частичного вымораживания. При этом наиболее сильно уменьшается концентрация SAW. Следовательно, эта вода является наименее сильно связанной. Полного смешивания связанной воды с органической фазой не происходит, а вода существует в виде доменов, обмен между которыми затруднен. Анализ распределения по размерам структур SAW и WAW (см. рис. 3, *в*) показал, что для WAW регистрируются два максимума при значениях R 1 и 10 нм, а для SAW — три максимума при значениях R 0,6, 2 и 10 нм.

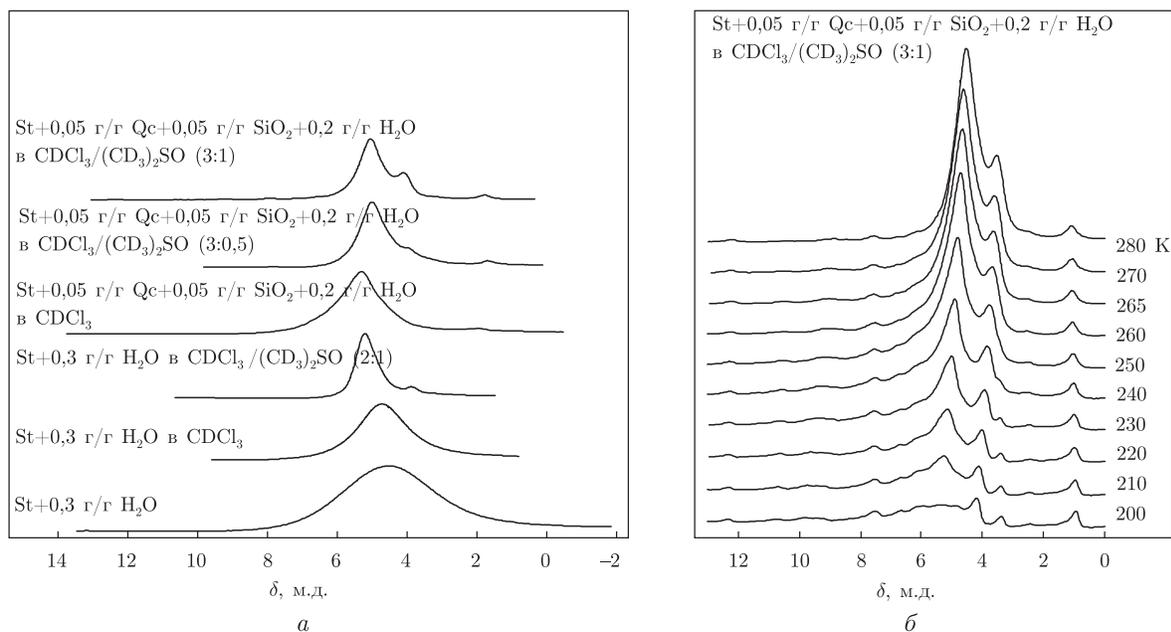


Рис. 4. Изменение состояния межфазной воды в процессе конструирования модельного геля для трансдермального переноса лекарственных средств при 280 К (а) и температурные изменения в спектрах ^1H ЯМР воды, входящей в состав композита, приготовленного на основе смеси крахмала с кремнеземом и содержащего 0,05 г/г Qc в среде $\text{CDCl}_3/(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (3 : 1) (б)

Таким образом, смесь полярного $((\text{CD}_3)_2\text{SO})$ и слабополярного (CDCl_3) органических растворителей стабилизирует кластерное состояние внутриклеточной воды, в котором 10–15% составляет WAW, до 50% — SAW, а остальная часть — сольватированные водородсвязанные ассоциаты ASW. Поскольку WAW легко образует гидратные комплексы со слабополярными или неполярными молекулами и характеризуется ослабленными (искаженными) Н-связями между молекулами воды [8], можно ожидать, что существенно изменится растворимость и скорость диффузии таких веществ в WAW. С другой стороны, во внеклеточном пространстве (или на внешней стороне кожного покрова) такая смесь органических растворителей хорошо растворяет различные типы лекарственных веществ как гидрофильной, так и липофильной природы, что может способствовать их внедрению во внешние слои кожи. При этом критерием оптимального состава композита можно считать кластеризацию межфазной воды (одновременную регистрацию нескольких сигналов воды в спектрах ^1H ЯМР) и наличие максимального количества WAW.

Пример конструирования модельного гелеобразного состава для трансдермального переноса лекарственных веществ (Qc) на основе крахмала и высокодисперсного кремнезема приведен на рис. 4, а. Как видно из этого рисунка, вода, связанная чистым крахмалом, наблюдается в спектрах в виде одиночного сигнала SAW. При помещении этого образца в среду CDCl_3 тип воды не изменяется, хотя имеет место некоторое сужение сигнала, связанное с уменьшением неоднородного уширения [14]. В среде, содержащей $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, некоторая часть воды растворяется в его объеме и в спектрах регистрируется небольшой сигнал ASW. Однако, если дисперсная фаза представляет собой механоактивированную смесь крахмала с кремнеземом (1 : 1 по объему), в среде CDCl_3 в спектрах появляется небольшой сигнал WAW. При использовании смеси органических растворителей его интенсивность увеличивается

ется, и при соотношении концентраций $\text{CDCl}_3/(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (3 : 1) вид спектров (см. рис. 4, б) становится аналогичным приведенному на рис. 3, а для внутриклеточной воды.

Можно предположить, что основным фактором, обеспечивающим способность некоторых типов органических веществ или их смесей оказывать сильное влияние на процессы, проходящие в сложных гетерогенных системах, к которым относятся как клеточные материалы, так и гелеобразные основы лекарственных средств, является их способность осуществлять структурную и энергетическую дифференциацию воды, локализованной на межфазных границах структурных элементов клеток и наноразмерных коллоидных частиц, формирующих гели. Присутствующие в гелях плохо растворимые в воде лекарственные препараты (например, Qc) переходят в раствор, о чем свидетельствует появление пиков Qc в ^1H ЯМР-спектрах (слабоинтенсивные пики на рис. 4, б). Их интенсивность практически не изменяется по мере заморозания SAW. Поэтому можно заключить, что лекарственный препарат взаимодействует с ASW или WAW.

Работа выполнена при финансовой поддержке УНТЦ (грант № 3832).

1. Трансдермальные лекарственные формы: Обзор. информ. – Москва, 1989. – Вып. 12: Лекарственные средства. Экономика, технология и перспективы получения. – 41 с.
2. Васильев А. Е., Краснюк И. И., Равикумар С., Максименко О. О. Трансдермальные терапевтические системы с индометацином // Хим.-фарм. журн. – 2001. – **35**, № 10. – С. 51–52.
3. Мизина П. Г., Быков В. А., Настина Ю. И. и др. Введение лекарственных веществ через кожу – достижения и перспективы (Обзор) // Вестн. Воронеж. гос. ун-та. Сер. Химия. Биология. Фармация. – 2004. – № 1. – С. 176–183.
4. Gandi R. D., Robinson J. R. Bioadhesion in drug delivery // Indian Pharm. Sci. – 1988. – **50**, No 3. – P. 145–152.
5. Clissold S. P., Hell K. C. Transdermal hyoscine (Scopolamine). A preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy // Drugs. – 1985. – **29**, No 3. – P. 189–207.
6. Амирова И. А., Ахмедов И. А. Проницаемость кожи после контакта с нефтью и мазутом // Вестн. дерматологии и венерологии. – 1996. – № 1. – С. 46–47.
7. Балабанова Р. М., Мач Э. С., Астахова Т. И. и др. Диметилсульфоксид как проводник вазоактивных препаратов при лечении системной склеродермии // Терапевт. архив. – 1982. – № 2. – С. 118–121.
8. Гунько В. М., Туров В. В., Горбик П. П. Вода на межфазной границе. – Киев: Наук. думка, 2009. – 694 с.
9. Turov V. V., Leboda R. Application of ^1H NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbents // Adv. Colloid and Interface Sci. – 1999. – **79**. – P. 173–211.
10. Gun'ko V. M., Turov V. V., Bogatyrev V. M. et al. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces // Ibid. – 2005. – **118**. – P. 125–172.
11. Turov V. V., Gun'ko V. M., Leboda R., Brei V. V. A method for determination of free surface energy and adhesion forces. Highly dispersed oxides, mesoporous and microporous materials // Ann. UMCS. Sect. Chemia. – 2001. – **56**. – P. 209–241.
12. Gun'ko V. M., Turov V. V. Structure of hydrogen bonds and ^1H NMR spectra of water at the interface of oxides // Langmuir. – 1999. – **15**. – P. 6405–6415.
13. Гурьянова Е. Н., Гольдштейн И. П., Перепелкова Т. И. Полярность и прочность межмолекулярной водородной связи // Успехи химии. – 1976. – **45**, № 9. – С. 1568–1593.
14. Полл Дж., Шнейдер В., Бернштейн Г. Спектры ядерного магнитного резонанса высокого разрешения. – Москва: Изд-во иностр. лит., 1962. – 430 с.

*Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко
НАН Украины, Киев
Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого
НАН Украины, Киев*

Поступило в редакцию 24.12.2009

V. V. Turov, V. M. Gun'ko, V. N. Barvinchenko, S. V. Kerus, O. A. Buryak,
Academician of the NAS of Ukraine **V. F. Chekhun**

Nanochemistry in preparation of new systems for transdermal introduction of medicines

It is shown that water is in clustered and nanodomain states in partially dehydrated cells, and sizes of a major portion of these structures are of 0.5–16 nm in radius. A model gel system is constructed using varied component concentrations in mechanoactivated blends with starch and nanosilica (dispersion phase), water, and a mixture of polar (DMSO) and weakly polar (chloroform) solvents (dispersion medium). Main classes of medicines can be dissolved in this gel, and there the water structure is analogous to one in partially dehydrated cells (liver and marrow cells). This allows us to assume that similar compositions can be effective systems for transdermal delivery of medicines.