

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ МИЦЕЛЛЯРНЫХ РАСТВОРОВ АМИОДАРОНА ГИДРОХЛОРИДА

В. Н. Леонтьев*, О. И. Лазовская

УДК 535.34;535.372;615.451

Белорусский государственный технологический университет,
220006, Минск, ул. Свердлова, 13а, Беларусь; e-mail: leontiev@belstu.by

(Поступила 16 июля 2018)

Методом спектрофлуориметрии изучена стабильность мицеллярных растворов амиодарона гидрохлорида в присутствии полисорбата-80 и бензилового спирта при $\lambda_{\text{возб}} = 420$ нм и $\lambda_{\text{исп}} = 506$ нм. Предложена схема образования смешанных мицелл, состоящих из молекул неионогенного поверхностно-активного вещества полисорбата-80 и катионных молекул амиодарона с хлорид-ионами в качестве противоионов. Установлено, что наличие бензилового спирта снижает устойчивость смешанных мицелл и приводит к кристаллизации амиодарона гидрохлорида. Показано, что в присутствии ацетат-ионов происходит замещение противоионов и, как следствие, образование кристаллов амиодарона ацетата, имеющего в ИК спектре характеристическую полосу валентных колебаний карбонильной группы ацетата $\nu_{\text{C=O}}$ при 1734 см^{-1} . Определены растворимости амиодарона гидрохлорида и амиодарона ацетата в воде при 20°C — 0.33 и 0.058 мг/мл. Для повышения стабильности инъекционного лекарственного средства рекомендовано изменить мольное соотношение амиодарона гидрохлорида и полисорбата-80, а также не применять бензиловый спирт и ацетатсодержащие растворы.

Ключевые слова: инъекционная лекарственная форма, амиодарона гидрохлорид, полисорбат-80, бензиловый спирт, мицеллообразование, смешанные мицеллы, амиодарона ацетат, флуоресцентная спектроскопия, ИК спектроскопия.

The stability of micellar solutions of amiodarone hydrochloride in the presence of polysorbate-80 and benzyl alcohol at $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 506 \text{ nm}$ was studied by spectrofluorimetry. A scheme of the formation of mixed micelles consisting of nonionic surfactant polysorbate-80 molecules and cationic molecules of amiodarone with chloride ions as counter-ions is proposed. It is established that the presence of benzyl alcohol reduces the stability of mixed micelles and leads to the crystallization of amiodarone hydrochloride. It was shown that in the presence of acetate ions, substitution of counter-ions occurs and, as a result, the formation of crystals of amiodarone acetate takes place, which has the characteristic band of valence vibrations of the acetate carbonyl group $\nu_{\text{C=O}}$ at 1734 cm^{-1} in the IR spectrum. The solubility values of amiodarone hydrochloride and amiodarone acetate in water at 20°C were determined to be 0.33 and 0.058 mg/mL . It is recommended to change the molar ratio of amiodarone hydrochloride and polysorbate-80 and also not to use benzyl alcohol and acetate-containing solutions to improve the stability of the injectable drug.

Keywords: injectable dosage form, amiodarone hydrochloride, polysorbate-80, benzyl alcohol, micelle formation, mixed micelles, amiodarone acetate, fluorescence spectroscopy, IR spectroscopy.

Введение. Инъекционные лекарственные формы занимают значительную долю фармацевтического рынка и играют важную роль в терапии различных заболеваний. Основным показателем, характеризующим эффективность лекарственного средства, — биодоступность его действующего вещества. Однако многие активные фармацевтические ингредиенты имеют ограниченную биодоступность

APPLICATION OF SPECTRAL METHODS TO STUDY THE STABILITY OF THE AMIODARONE HYDROCHLORIDE MICELLAR SOLUTIONS

V. N. Leontiev*, O. I. Lazovskaya (Belarusian State Technological University, 13a Sverdlova Str., Minsk, 220006, Belarus; e-mail: leontiev@belstu.by)

из-за малой растворимости в воде. Одним из путей повышения растворимости является включение липофильных веществ в гидрофобное ядро мицелл — самоорганизованных в водной среде структур на основе поверхностно-активных веществ (ПАВ) [1]. В случае, если молекулы вещества, подлежащего солюбилизации в водной среде, амфифильные, они встраиваются в мицеллы детергента, образуя новые мицеллы смешанного типа, свойства которых существенно отличаются от свойств простых мицелл [2].

Амиодарона гидрохлорид (АГ), представляющий собой (2-бутилбензофуран-3-ил)[4-[2-(диэтил-амино)этокси]-3,5-диидфенил]метанона гидрохлорид, относится к III классу антиаритмических средств. Так как он обладает низкой растворимостью в воде (0.2—0.7 мг/мл при 25 °С), в медицинской практике применяют инъекционные лекарственные формы АГ (50 мг/мл) в виде мицеллярных растворов полисорбата-80 (100 мг/мл) в присутствии бензилового спирта (20 мг/мл), который выступает в качестве соразстворителя и консерванта [3—5].

Молекулы АГ являются амфифильными в растворах с $\text{pH} \leq 7$ за счет входящих в их структуру гидрофобных алифатических алкильных цепей и ароматических колец, с одной стороны, и гидрофильного протонированного третичного амина, — с другой. В водном растворе молекулы АГ формируют простые сферические мицеллы. Каждая мицелла состоит из ~150 молекул и имеет массу >100 кДа [6]. АГ, структурно схожий с катионным ПАВ [8], в растворе с полисорбатом-80, представляющим собой неионогенное ПАВ [7], образует смешанные мицеллы. Растворимость АГ при этом значительно повышается [9].

На растворимость АГ в воде оказывают влияние различные анионы. Согласно [10], с увеличением концентрации цитрат-ионов (pH 4.3—5.4), тартрат-ионов (pH 4.3—5.4) и сульфат-ионов (pH 4.3) растворимость АГ сначала резко возрастает, а затем быстро уменьшается до постоянного значения, в то время как в присутствии ацетат-ионов (pH 4.0—4.7) наблюдается постепенное снижение растворимости. Рост концентрации хлорид-ионов в растворе приводит к уменьшению растворимости АГ, однако при добавлении полисорбата-80 растворимость увеличивается [9]. В работе [5] показана монотонно возрастающая температурная зависимость растворимости АГ в воде. Так, при 30 °С растворимость АГ составляет 0.74 мг/мл, при 50 °С 1.2 мг/мл, при 70 °С 1.5 мг/мл, а при 90 °С 2.2 мг/мл.

Для получения прозрачного раствора инъекционного лекарственного средства с концентрацией действующего вещества 50 мг/мл, который остается стабильным при 20 °С, растворение АГ осуществляют при температурах >60 °С [3]. Разбавление этого раствора до концентрации, близкой к критической концентрации мицеллообразования (ККМ) полисорбата-80, и охлаждение до комнатной температуры приводят к появлению опалесценции [5].

Авторы работы [3] отмечают, что при хранении лекарственного средства при 20 °С в течение нескольких недель или месяцев в растворе могут выпадать кристаллы АГ. Однако эти кристаллы растворяются при температуре 66 °С и образуются снова только через несколько дней, а не сразу после охлаждения до комнатной температуры.

Таким образом, на растворимость АГ сильное влияние оказывают химические и физические факторы. Имеющиеся данные не в полной мере характеризуют стабильность инъекционных лекарственных форм АГ. Цель настоящей работы — исследование стабильности мицеллярных растворов АГ в присутствии полисорбата-80 и бензилового спирта методами флуоресцентной и ИК спектроскопии.

Эксперимент. Использованы субстанция амиодарона гидрохлорида (Cambrex Profarmaco Milano Srl., Италия, $M = 682$ г/моль, $\text{p}K_a = 6.56$), полисорбат-80 (Oleon, Бельгия, $M = 1308$ г/моль) и бензиловый спирт (Sigma-Aldrich, США, $M = 108$ г/моль).

ИК спектры зарегистрированы на ИК-фурье-спектрометре NEXUS E.S.P. (Thermo Scientific, США) в таблетках KBr (2.0 мг вещества на 200.0 мг KBr). Из спектров возбуждения и испускания флуоресценции растворов полисорбата-80 установлено, что оптимальными условиями для спектральных измерений являются $\lambda_{\text{возб}} = 420$ нм и $\lambda_{\text{исп}} = 506$ нм. Интенсивность флуоресценции анализируемых растворов измерена на спектрофлуориметре FP-8500 (JASCO Corporation, Япония) в 1-см кварцевой кювете.

Математическая обработка полученных экспериментальных данных выполнена с помощью программы Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и их обсуждение. Поскольку полисорбат-80 повышает растворимость АГ в воде [6], целесообразно сначала найти ККМ этого детергента. Среди разнообразных методов определения ККМ выбран флуоресцентный метод, обладающий высокой чувствительностью [11, 12]. Для определения ККМ готовили водные растворы полисорбата-80 с концентрациями в диапазоне 10^{-6} — 10^{-4} М.

Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации полисорбата-80 представлена в полулогарифмических координатах (рис. 1). Как видно, для полисорбата-80 ККМ = $2 \cdot 10^{-5}$ М, что хорошо согласуется с данными [7, 13, 14]. Далее к растворам полисорбата-80 добавляли АГ и бензиловый спирт, сохраняя мольные соотношения всех компонентов такими же, как в растворе инъекционного лекарственного средства, а затем измеряли интенсивность флуоресценции (рис. 2).

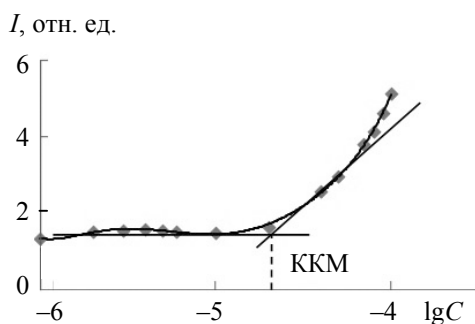


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации полисорбата-80

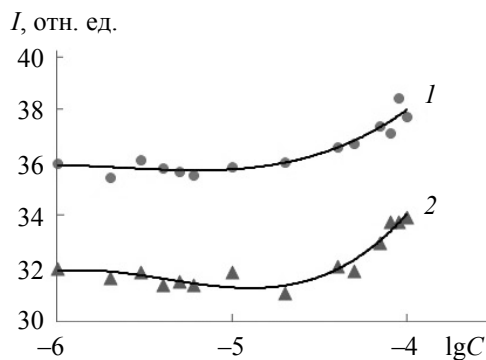


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации полисорбата-80 (в области ККМ) в присутствии амиодарона гидрохлорида и бензилового спирта: 1 — полисорбат-80 + амиодарона гидрохлорид; 2 — полисорбат-80 + амиодарона гидрохлорид + бензиловый спирт

Результаты свидетельствуют о том, что введение АГ в раствор полисорбата-80 увеличивает интенсивность флуоресценции, а последующее добавление бензилового спирта, который снижает полярность среды, незначительно уменьшает ее интенсивность. Обращает на себя внимание тот факт, что для кривых рис. 1 и 2 характерны разные углы наклона после точки ККМ. Можно предположить, что это связано с влиянием бифильных молекул АГ и бензилового спирта на свойства мицелл полисорбата-80, такие как размер, форма и степень гидратации полярных групп.

На следующем этапе исследований необходимо выяснить, наблюдаются ли такие же закономерности при концентрациях полисорбата-80 в диапазоне $(6.9\text{—}8.4) \cdot 10^{-2}$ М ($\pm 10\%$ от его номинального содержания в лекарственном средстве). Для этого измерена интенсивность флуоресценции растворов полисорбата-80, смеси полисорбата-80 и АГ (50 мг/мл), а также этой смеси с бензиловым спиртом (20 мг/мл). Полученные зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации неионогенного ПАВ имеют линейный характер (рис. 3).

В отличие от результатов, представленных на рис. 1 и 2, добавление АГ и бензилового спирта к раствору полисорбата-80 в области высоких концентраций привело к снижению интенсивности флуоресценции. В данном случае можно говорить об изменении структуры мицелл полисорбата-80, а именно об образовании мицелл смешанного типа в связи с тем, что концентрация АГ на два порядка превышает его растворимость в воде.

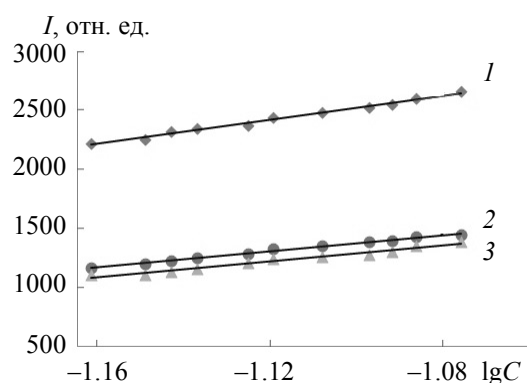
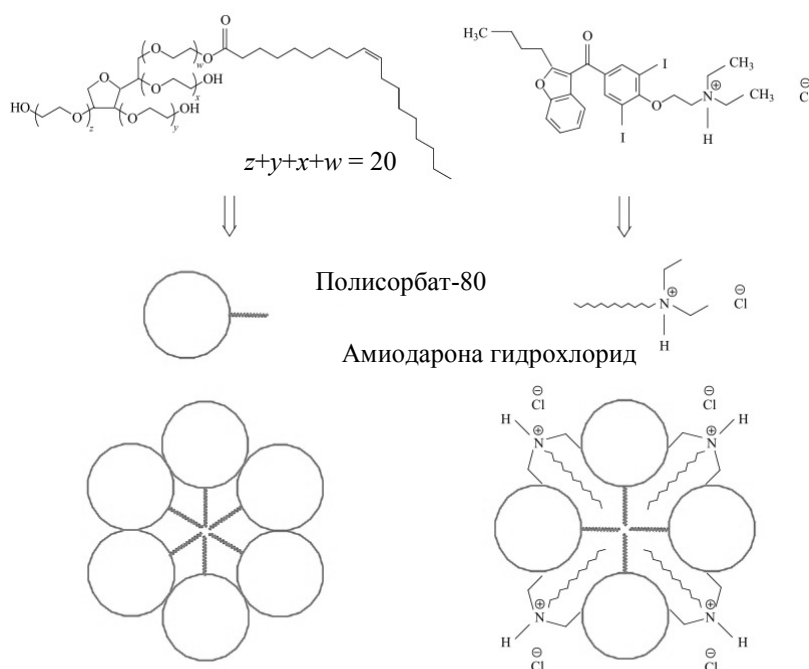


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации полисорбата-80 (в области высоких концентраций) в присутствии амиодарона гидрохлорида ($7.33 \cdot 10^{-2}$ М) и бензилового спирта (0.19 М): 1 — полисорбат-80; 2 — полисорбат-80 + амиодарона гидрохлорид; 3 — полисорбат-80 + амиодарона гидрохлорид + бензиловый спирт

Молекулы полисорбата-80 имеют очень объемные гидрофильные головки и короткие гидрофобные хвосты, поэтому в образуемых ими мицеллах гидрофобные области небольшие. При встраивании молекул АГ в мицеллы полисорбата-80 более объемные гидрофобные области АГ устремляются внутрь мицелл, раздвигая молекулы неионогенного ПАВ. При этом размеры образующихся смешанных мицелл увеличиваются, а на их поверхности появляется положительный заряд.

Процессы формирования простых мицелл полисорбата-80 и встраивания в них молекул АГ с образованием смешанных мицелл схематически представлены ниже:



Как отмечено выше, стабильность смешанных мицелл существенно зависит от температуры, снижение которой приводит к кристаллизации солюбилизированного вещества.

Для изучения процесса кристаллизации готовили модельные растворы лекарственного средства следующего состава: АГ 50 мг/мл, полисорбат-80 90.2—110.0 мг/мл ($\pm 10\%$ от его номинального содержания в лекарственном средстве), бензиловый спирт 20 мг/мл. Модельные растворы хранили при 4°C в течение 30 сут. В качестве контроля использован раствор, содержащий полисорбат-80 (100.1 мг/мл) и АГ (50 мг/мл) без бензилового спирта. Образования кристаллов в контроле при 4°C не наблюдалось. Результаты представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Влияние концентрации полисорбата-80 на скорость кристаллизации амиодарона гидрохлорида при температуре 4 °С

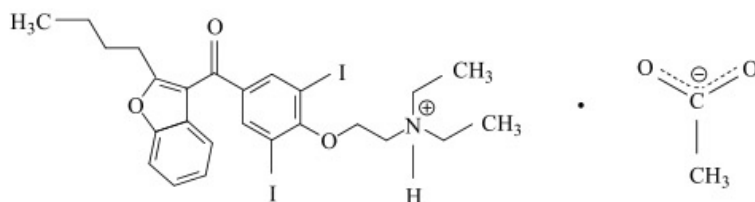
Концентрация полисорбата-80		– lgC	Содержание полисорбата-80, % от номинального	Образование кристаллов через 30 сут
мг/мл	10 ² , моль/л			
110.0	8.4	1.076	110	±
107.8	8.2	1.086	108	+
105.6	8.1	1.092	106	+
104.5	8.0	1.097	104	++
102.3	7.8	1.108	102	++
100.1	7.6	1.119	100	+++
97.9	7.5	1.125	98	+++
95.7	7.3	1.137	96	++
94.6	7.2	1.143	94	++
92.4	7.1	1.149	92	+
90.2	6.9	1.161	90	+

П р и м е ч а н и е. “±” — неполное растворение амиодарона гидрохлорида; “+” — образуются единичные кристаллы; “++” — хорошо заметное образование отдельных скоплений кристаллов; “+++” — на дне пробирки образуется сплошной слой кристаллов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в модельных растворах лекарственного средства максимальное количество кристаллов за 30 сут образовывалось в пробах со 100 и 98 %-ным содержанием полисорбата-80. Уменьшение и увеличение содержания полисорбата-80 относительно номинального значения приводят к снижению скорости кристаллизации АГ, что обусловлено изменением состава смешанных мицелл и различным влиянием на них молекул бензилового спирта, в результате чего стабильность смешанных мицелл при температуре 4 °С падает.

Таким образом, изменение мольного соотношения АГ, полисорбата-80 и бензилового спирта (1:1:2.5), используемого в растворах инъекционного лекарственного средства, приводит к повышению стабильности. Кроме того, исключение из состава лекарственного средства бензилового спирта еще больше увеличивает устойчивость мицеллярных растворов при низких температурах.

Для инъекционных лекарственных форм АГ используют мицеллярные растворы с pH 4.0 [6], достигаемым с помощью хлористоводородной кислоты или ацетатного буферного раствора. При использовании последнего может происходить замещение противоионов в смешанных мицеллах — хлорид-ионов на ацетат-ионы, что приведет к экранированию заряда на поверхности мицелл и образованию гидрофобного экрана, вытесняющего молекулы воды из окружения мицелл и, как следствие, к выпадению кристаллов. Для подтверждения того, что кристаллы, образующиеся в таких мицеллярных растворах, представляют собой амиодарона ацетат, зарегистрирован ИК спектр кристаллов и проведено его сравнение с ИК спектром АГ (рис. 4). Как видно, интенсивная полоса при 1631 см⁻¹ в спектрах АГ и амиодарона ацетата относится к валентным колебаниям карбонильной группы амиодарона. В ИК спектре кристаллов появляется дополнительная полоса при 1734 см⁻¹, соответствующая валентным колебаниям карбонильной группы ацетата. Слабая интенсивность этой полосы обусловлена делокализацией электрона по карбоксилат-иону:



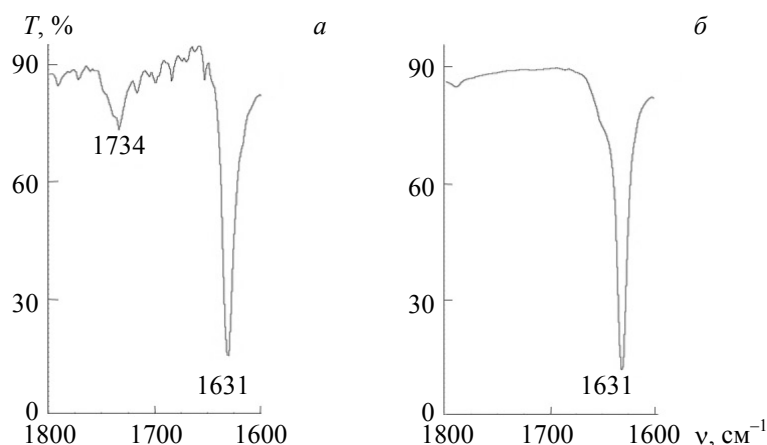


Рис. 4. ИК спектры амиодарона ацетата (а) и амиодарона гидрохлорида (б)

Известно, что растворимость четвертичных аммониевых оснований с хлорид-ионами в качестве противоионов в воде существенно выше, чем растворимость таких соединений с органическими противоионами. Определенная в соответствии с [15] растворимость амиодарона ацетата (кристаллов) в воде составила 0.058 мг/мл при 20 °С, в то время как для АГ 0.33 мг/мл.

Заключение. Показано, что полисорбат-80 и амиодарона гидрохлорид образуют мицеллы смешанного типа, стабильность которых снижается при добавлении бензилового спирта. Изучено влияние концентрации полисорбата-80 на скорость кристаллизации амиодарона гидрохлорида. Установлено, что в присутствии ацетат-ионов образуются кристаллы, представляющие собой амиодарона ацетат, растворимость которого на порядок ниже, чем амиодарона гидрохлорида. Для повышения стабильности инъекционных лекарственных форм амиодарона гидрохлорида следует изменить концентрацию полисорбата-80 и отказаться от использования бензилового спирта, а для доведения pH вместо ацетатного буферного раствора применять хлористоводородную кислоту.

- [1] D. Hörter, J. B. Dressman. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **25**, N 1 (1997) 3—14
- [2] К. Холмберг, Б. Йенссон, Б. Кронберг, Б. Линдман. Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах, Москва, БИНОМ, Лаборатория знаний (2007)
- [3] Y. Bouligand, F. Boury, J.-M. Devoisselle, R. Fortune, J.-C. Gautier, D. Girard, H. Maillol, J.-E. Proust. *Langmuir*, **14**, N 2 (1998) 542—546
- [4] A. M. Rubim, J. B. Rubenick, E. Gregolin, L. V. Laporta, R. Leitenberg, C. M. B. Rolim. *Braz. J. Pharm. Sci.*, **51**, N 4 (2015) 957—966
- [5] L. Benedini, P. V. Messina, R. H. Manzo, D. A. Allemandi, S. D. Palma, E. P. Schulz, M. A. Frechero, P. C. Schulz. *J. Colloid Interface Sci.*, **342**, N 2 (2010) 407—414
- [6] P. F. Souney, W. D. Cooper, D. J. Cushing. *Expert Opin. Drug Saf.*, **9**, N 2 (2010) 319—333
- [7] B. A. Kerwin. *J. Pharm. Sci.*, **97**, N 8 (2008) 2924—2935
- [8] F. Boury, J. Gautier, Y. Bouligand, J. Proust. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **20**, N 3 (2001) 219—227
- [9] L. J. Ravin, E. G. Shami, A. Intoccia, E. Rattie, G. Joseph. *J. Pharm. Sci.*, **58**, N 10 (1969) 1242—1245
- [10] L. J. Ravin, E. G. Shami, E. S. Rattie. *J. Pharm. Sci.*, **64**, N 11 (1975) 1830—1833
- [11] A. Mehreteab, B. Chen. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**, N 1 (1995) 49—52
- [12] M. G. Miguel. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **89-90** (2001) 1—23
- [13] K. Szymczyk, A. Taraba. *J. Therm. Anal. Calorim.*, **126**, N 1 (2016) 315—326
- [14] M. E. Mahmood, D. A. F. Al-Koofee. *GJSFR*, **13**, N 4 (2013) 1—7
- [15] ГОСТ 33034-2014 Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Растворимость в воде