

УДК 615.45:615.074

О. В. БАБІЙ, К. Ф. ВАЩЕНКО

*Вінницький медичний коледж ім. акад. Д. К. Заболотного  
Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького*

## БІОФАРМАЦЕВТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ВИВІЛЬНЕННЯ ТІЛОРОНУ ІЗ МАЗЕЙ НА ГІДРОФІЛЬНИХ ОСНОВАХ

*Вивчено вивільнення тілорону в дослідженнях in vitro з мазей на поліетиленоксидних основах. Розроблено методику спектрофотометричного кількісного визначення тілорону в діалізі методом добавок. Проведено валідаційну оцінку методики за критеріями точності, лінійності, відтворюваності та показано, що вона може бути використана в лабораторних умовах при вивченні вивільнення тілорону з мазевих основ.*

*Ключові слова:* тілорон; мазь; діаліз; спектрофотометричний метод аналізу; валідація

### ВСТУП

Інфекційні ураження людини, етіологічним чинником яких є вірус простого герпесу (ВПГ) 1-го та/або 2-го типу, обіймають широке коло клінічних проблем. Серед них на особливу увагу заслуговує лікування рецидивів і профілактика загострень герпетичної інфекції (ГІ). Актуальність вирішення цих проблем обумовлена підвищенням ступеня інфікованості ВПГ, а також зростанням частоти рецидивів та поширеності клінічних проявів герпетичного процесу [7]. На теперішній час існують три основні напрямки в лікуванні та профілактиці загострень ГІ: хіміотерапія (використання противірусних препаратів); імунотерапія (неспецифічна та специфічна); комплексний метод лікування, що включає імунотерапію у поєднанні з противірусною терапією [6].

Лікування загострення ГІ, крім системних препаратів, обов'язково включає місцеве застосування противірусних мазей, кремів та гелів [3]. Зовнішнє призначення противірусних препаратів при герпесі шкіри та слизових оболонок необхідне для зменшення клінічних проявів у місці ураження, прискорення епітелізації та скорочення часу видалення вірусу з місця ураження. Основними лікарськими засобами (ЛЗ) для лікування ГІ на сьогоднішній день є ациклічні нуклеозиди – інгібітори реплікації вірусу герпесу, які специфічно взаємодіють з вірусним ферментом тимідинкіназою. Найчастіше застосовують ацикловір. У клінічній практиці ацикловір має репутацію безпечного засобу, але його низька біодоступність (20%) та комплаєнтність стали причиною розробки препаратів II покоління – валацикловіру та фамцикловіру [1], проте і стосовно даних препаратів також відмічається ріст резистентності збудника, а також високі показники рецидивування [7].

Розвиток резистентності до ацикловіру у хворих, які страждають на рецидивуючий герпес, спонукає дослідників при розробці м'яких лікарських засобів для лікування ГІ застосовувати імуномодулятори, індуктори інтерферону, одним з яких є тілорон.

Нами запропонована мазь з тілороном, яка призначена для зовнішнього лікування герпетичної інфекції. Механізм противірусної дії тілорону пов'язаний з інгібуванням трансляції вірус-специфічних білків в інфікованих клітинах, внаслідок чого пригнічується репродукція вірусів. Для зменшення болю та свербіння в місцях ураження в мазеву композицію був введений ментол [4]. Оскільки ефективність ЛЗ залежить не тільки від активного фармацевтичного інгредієнта, але і від інших чинників, зокрема, від виду і кількості допоміжних речовин (ДР) [9], метою нашої роботи є вивчення впливу основи на вивільнення тілорону з мазей.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для проведення експерименту були виготовлені мазі з тілороном на гідрофільних (поліетиленоксидних) основах. Кількість тілорону в усіх зразках складає 2%, ментолу – 0,5%. Склад модельних мазевих основ представлено в табл. 1.

Здатність лікарської речовини (ЛР) вивільнятися з основи оцінювали за результатами дифузії тілорону через напівпроникну мембрану в дослідженнях in vitro [9]. В якості напівпроникної мембрани використовували кишку свині. Для цього використовували діалізаційну камеру, що складається із зовнішнього та внутрішнього циліндрів. До нижнього отвору внутрішнього циліндра герметично прикріплювали напівпроникну мембрану. Наважку дослідного зразка (0,5 г) рівномірно наносили на поверхню мембрани, внутрішній циліндр з дослідним зразком вміщували в діалізаційну камеру. Як акцепторний розчин

© Бабій О. В., Ващенко К. Ф., 2013

**СКЛАД МОДЕЛЬНИХ МАЗЕВИХ ОСНОВ**

Зразок, №	Назва інгредієнтів основи					
	гліцерин	пропіленгліколь	ПЕО-400	ПЕО-1500	ПЕО-4000	твін-80
1	+	-	+	+	-	+
2	-	+	+	+	-	+
3	+	-	+	-	+	+
4	-	+	+	-	+	+

\* Примітка: (+) – наявність речовини в основі; (-) – відсутність речовини в основі.

використовували воду очищену. Перші 10 год відбір проб (1 мл) проводився кожні 30 хв, останню пробу відбирали через 24 год з початку експерименту. Діаліз проводили в термостаті ТС-80-М-2 при температурі 34±1°C, що відповідає температурі шкіри здорової людини [5].

Кількісний вміст тілорону визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Helios γ з використанням методу добавок при довжині хвилі 270 нм і товщині кювети 10 мм; розчин порівняння – вода очищена. Метод добавок є різновидом методу порівняння. Визначення концентрації розчину за допомогою цього методу засноване на порівнянні оптичної густини досліджуваного розчину і того ж розчину з додаванням відомої кількості досліджуваної речовини. Цей метод використовується для спрощення роботи, для усунення сторонніх домішок. Невідому концентрацію знаходять розрахунковим або графічним методами. При дотриманні основного закону світлопоглинання і постійної товщини шару відношення оптичної густини дослідного розчину і дослідного розчину з добавкою буде дорівнювати відношенню їх концентрацій:

$$\frac{A_1}{A_{1+0}} = \frac{C}{(C + C_0)}, \text{ звідки } C = \frac{C_0 \cdot A_1}{A_{1+0} - A_1},$$

де:  $A_1$  – оптична густина досліджуваного розчину;  $A_{1+0}$  – оптична густина досліджуваного розчину з добавкою;

$C$  – невідома концентрація досліджуваної речовини в досліджуваному забарвленому розчині;

$C_0$  – концентрація добавки в досліджуваному розчині.

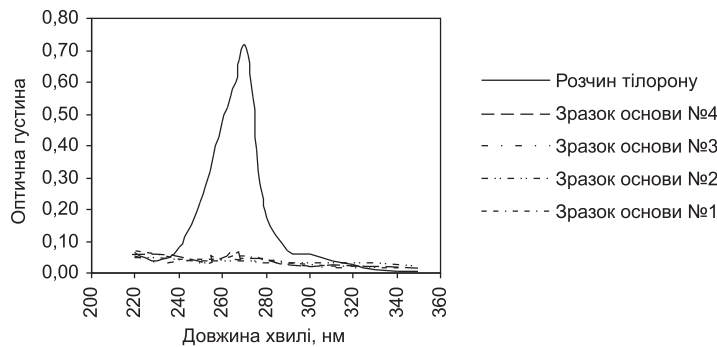
Попередньо була вивчена можливість визначення тілорону в присутності діалізату з маzewої основи та ДР. З цією метою спектрофотометричному аналізу був підданий діалізат маzewих основ.

На рис. 1 наведені спектри поглинання розчину тілорону з концентрацією  $0,333 \cdot 10^{-5}$  г/мл.

Як видно з рис. 1, максимум поглинання діалізату маzewої основи при довжині хвилі 270 нм (аналітична область тілорону) є низькоінтенсивним, тому така методика кількісного визначення тілорону в діалізаті специфічна та дозволяє визначати діючу речовину в присутності компонентів основи.

Для отримання достовірних результатів методика кількісного визначення тілорону в діалізаті була піддана валідаційній оцінці відповідно до рекомендацій Міжнародної конференції по гармонізації (ICH) за показниками: лінійність, точність, відтворюваність [9]. З цією метою на модельній маzewій основі №4 були виготовлені модельні композиції з вмістом тілорону 0,50%, 0,75%, 1,00%, 1,25%, 1,50%, 1,75%, 2,00%, 2,25%, 2,50% відповідно.

Визначення точності методики проводили на модельному зразку, з якого було взято діалізат мазі з вмістом тілорону 2% після 6-годинного діалізу. Концентрація тілорону в ньому складала  $2,432 \cdot 10^{-4}$  г/мл ( $2,432 \cdot 10^{-2}\%$ ). З цього діалізату готували розведення 1:2, 1:1, 1:0,5 та розраховували вміст тілорону. Потім діалізат розводили водою очищеною відповідно до вказаних розведень, вимірювали оптичну густина



**Рис. 1.** УФ-спектри поглинання розчину тілорону з концентрацією  $0,333 \cdot 10^{-5}$  г/мл та діалізату плацебо модельних маzewих основ.

**ОЦІНКА ТОЧНОСТІ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ТІЛОРОНУ В ДІАЛІЗАТІ  
(ПОЧАТКОВИЙ ВМІСТ  $2,432 \cdot 10^{-2} \%$ )**

Дослід. №	Розведення модельного зразка діалізату	Значення оптичної густини діалізату	Розрахунковий вміст тілорону в діалізаті, $\% \cdot 10^{-2}$	Знайдена кількість тілорону в діалізаті, $\% \cdot 10^{-2}$	Знайдена кількість тілорону в діалізаті, $\% \cdot 10^{-2}$ (з урахуванням розведення)	Знайдений вміст, у % до введеного, Z
1	1:2	0,126	0,8107	0,8088	2,4264	99,77
2	1:2	0,128	0,8107	0,8106	2,4318	99,99
3	1:2	0,129	0,8107	0,8127	2,4380	100,25
4	1:1	0,209	1,2160	1,2153	2,4310	99,96
5	1:1	0,210	1,2160	1,2191	2,4380	100,25
6	1:1	0,207	1,2160	1,2115	2,4230	99,63
7	1:0,5	0,275	1,6213	1,6018	2,4000	98,68
8	1:0,5	0,277	1,6213	1,6057	2,4090	99,04
9	1:0,5	0,276	1,6213	1,6038	2,4060	98,93
Метрологічні характеристики						
Середнє значення (X), $\% \cdot 10^{-2}$					2,423	
Стандартне відхилення ( $S_y$ ), $\% \cdot 10^{-3}$					0,142	
$X \pm \Delta X$ (%)					$2,423 \cdot 10^{-2} \pm 0,109 \cdot 10^{-3}$	
Відносне стандартне відхилення RSD, %					0,59	
Середнє значення Z, %					99,61	
Відносне стандартне відхилення $S_z$ , %					0,59	
Відносний довірчий інтервал $\Delta_{\%}$ , %					1,36	
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{\%}$ , %					<2,95	
Систематична похибка $\delta$ , %					0,39	
Критерій невизначеності системної похибки					< 0,45	

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$ ;  $t(P, n) = 2,31$ ;  $n = 9$ .

та розраховували фактичний вміст тілорону методом добавок. Далі розраховували значення стандартного відхилення методики ( $S_y$ ), довірчий інтервал, значення відносного стандартного відхилення (RSD). Результати оцінки точності методики наведені в табл. 2.

Як видно з даних, наведених у табл. 2, значення відносного стандартного відхилення не перевищує 3%, що відповідає рекомендаціям Міжнародної конференції по гармонізації (ICH) [10].

Відтворюваність аналітичної методики визначає ступінь близькості між відомим значенням та значенням цієї величини, отриманим за даною методи-

кою. Для цього аналізу піддавали обробці діалізати дев'яти паралельно проведених діалізів мазі з тілоронном з концентрацією 2% (протягом 6 год). Результати представлені в табл. 3.

Отже, значення відносного стандартного відхилення складає 0,76%, що підтверджує достатню відтворюваність отриманих результатів.

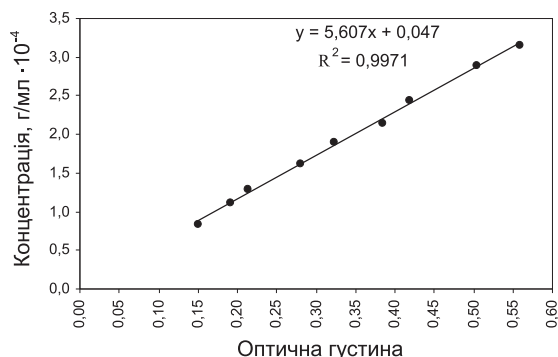
Лінійність методики характеризує можливість одержання аналітичних величин, у нашому випадку

Таблиця 3

**РЕЗУЛЬТАТИ ТЕСТУВАННЯ МЕТОДИКИ  
ЗА КРИТЕРІЄМ ВІДТВОРЮВАНOSTI**

Дослід. №	Значення оптичної густини діалізату	Кількість тілорону в діалізаті, $\% \cdot 10^{-2}$	Метрологічні характеристики
1	0,419	2,432	$\bar{X} (\%) = 2,438 \cdot 10^{-2}$ $S_y (\%) = 0,186 \cdot 10^{-3}$ RSD (%) = 0,76 $\bar{X} \pm \Delta X (\%) = 2,438 \cdot 10^{-2} \pm 0,143 \cdot 10^{-3}$
2	0,416	2,418	
3	0,421	2,442	
4	0,423	2,450	
5	0,424	2,456	
6	0,422	2,447	
7	0,421	2,442	
8	0,418	2,427	
9	0,419	2,432	

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$ ;  $t(P, n) = 2,31$ ;  $n = 9$ .



**Рис. 2.** Графік залежності оптичної густини від концентрації тілорону в діалізаті, рівняння регресії та коефіцієнт кореляції.

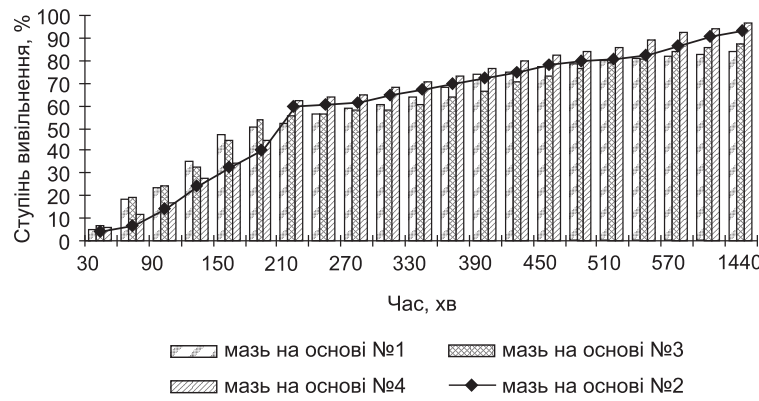


Рис. 3. Динаміка вивільнення тілорону з мазей.

це значення оптичної густини, які пропорційні кількості речовини, що визначається. Для проведення експерименту були виготовлені мазі з тілороном з концентрацією 0,5%, 0,75%, 1,0%, 1,25%, 1,5%, 1,75%, 2,0%, 2,25%, 2,5%. З виготовлених зразків мазей був проведений діаліз за вищеприписаною методикою, а діалізати проаналізовані. Результати експерименту представлені на рис. 2.

На представленому графіку майже всі експериментальні точки лежать на лінії тренду. Для з'ясування того, наскільки міцна ця залежність, розраховували коефіцієнт кореляції, який складає 0,9971. В аналітичній хімії в більшості випадків використовують лінійні залежності коефіцієнта кореляції  $\geq 0,98$ , а при аналізі слідових кількостей розглядають лінійні залежності з коефіцієнтом кореляції  $\geq 0,9$  [2]. Оскільки розраховане нами значення коефіцієнта кореляції максимально наближене до 1, то це дозволяє говорити про наявність жорсткої залежності оптичної густини від концентрації тілорону в діалізаті.

Таким чином, запропонована методика кількісного визначення тілорону методом спектрофотометрії в діалізаті є точною, відтворюваною, лінійною та може застосовуватися для вивчення вивільнення останнього з мазевих основ.

Дана методика була використана для визначення швидкості вивільнення тілорону з поліетиленоксидних мазевих основ.

Концентрацію одержаних у результаті діалізу розчинів розраховували, використовуючи дані оптичної густини досліджуваних розчинів та тих же розчинів з додаванням відомої кількості тілорону.

$$C = \frac{C_0 \cdot A_1 \cdot b}{A_{1+0} - A_1}$$

де:  $A_1$  – оптична густина досліджуваного розчину;  
 $A_{1+0}$  – оптична густина досліджуваного розчину з відомою добавкою тілорону;  
 $C$  – концентрація досліджуваного розчину, г/мл;  
 $C_0$  – концентрація добавки тілорону в досліджуваному розчині, г/мл;  
 $b$  – розведення.

При розрахунку загальної кількості тілорону, що перейшов у розчин, враховували його кількість, яка містилась у відібраних раніше пробах:

$$X_n = C_n \cdot V_p + \frac{X_{n-1}}{V_p} \cdot V_a,$$

де:  $X_n$  – загальна кількість речовини, що перейшла у розчин за  $n$  годин дослідження;

$C_n$  – концентрація речовини в діалізаті, г/мл через за  $n$  годин дослідження;

$V_p$  – загальний об'єм розчину в діалізаційній камері (30 мл);

$X_{n-1}$  – загальна кількість речовини, що перейшла у розчин за  $n-1$  годин дослідження;

$V_a$  – об'єм аликвоти, вибраної для аналізу (1 мл).

Ступінь вивільнення (%) тілорону з мазевої основи розраховували за відношенням загальної кількості ЛР, що перейшла у розчин за  $n$  годин дослідження (г) до кількості ЛР у мазевій основі (г).

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати вивчення вивільнення тілорону із мазей на поліетиленоксидних основах наведені на рис. 3.

Як видно з даних, наведених на рис. 3, вивільнення тілорону з мазей залежить від складу мазевих основ. Найбільший ступінь вивільнення тілорону за перші 4 год дослідження спостерігається із зразків мазей на основах №2 і №4 та складає відповідно 60,24% і 63,48%. Наприкінці експерименту (на 24-й годині дослідження) теж більш повне вивільнення тілорону спостерігається із зразків мазей на цих основах і становить відповідно 93,48% і 96,54%. Оскільки основи відрізняються наявністю різних зволожувачів, то, очевидно, пропіленгліколь, який входить до складу мазей №2 і №4, сприяє більш повному вивільненню тілорону з мазевої основи, а також більш швидкій дифузії молекул останнього через пори напівпроникної мембрани.

### ВИСНОВКИ

1. Розроблено та проведено валідаційну оцінку методики кількісного визначення тілорону в діалізаті методом спектрофотометрії.



2. Методом рівноважного діалізу крізь напівпроникну мембрану вивчено вивільнення тилорону і встановлено, що введення до складу поліетиленоксидних мазевих основ пропіленгліколю значно підвищує біодоступність тилорону з мазей.
4. Машковский М. Д. Лекарственные средства: в 2-х т. / М. Д. Машковский. – 14-е изд., перераб. и доп. – М.: Новая волна, 2000. – Т. 1. – 540 с.

**ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ  
ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ**

1. Аковбян В.А. Генитальный герпес: современные проблемы и пути их решения / [В. А. Аковбян, С. А. Масюкова, Е. В. Владимирова и др.] // Клини. микробиол. и антимикробная химиотерапия. – 2003. – Т. 5, № 1. – С. 4-18.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – 556 с. – Доп. 2, 2008. – 620 с.
3. Маркевич К. Г. Рациональна комплексна діагностика та терапія рецидивуючого генітального герпесу / К. Г. Маркевич, В. І. Степаненко // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол. – 2007. – № 4 (27). – С. 77-94.
5. Нормальная физиология / За ред. В. И. Філімонова. – К.: Здоров'я, 1994. – 608 с.
6. Панкратов О.В. Иммуномодуляторы в лечении герпетической инфекции, вызванной вирусом простого герпеса / О. В. Панкратов // Мед. новости. – 2011. – № 4. – С. 18-24.
7. Петрунин Д. Д. Использование препаратов интерферона альфа для лечения урогенитальных инфекций / Д. Д. Петрунин // АГ-инфо. – 2009. – № 2. – С. 6-12.
8. Степаненко В. І. Рецидивний генітальний герпес / В. І. Степаненко // Therapia. – 2008. – № 12 (32). – С. 21-29.
9. Тихонов А. И. Биофармация: учеб. для студ. высш. учеб. завед. и фармацевтов / [А. И. Тихонов, Т. Г. Ярных, И. А. Зупанец и др.]; Под ред. А. И. Тихонова. – Х.: Изд-во НФаУ; Золотые страницы, 2003. – 240 с.
10. Validation of analytical procedures: methodology Q2B / Intern, conf. on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. – Geneva: ICH Secretariat, 1996. – 8 p.

**УДК 615.45:615.074**

**Е. В. Бабий, Е. Ф. Ващенко**

**БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ТИЛОРОНА ИЗ МАЗЕЙ НА ГИДРОФИЛЬНЫХ ОСНОВАХ**

Изучено высвобождение тилорона в исследованиях *in vitro* из мазей на полиэтиленоксидных основах. Разработана методика спектрофотометрического количественного определения тилорона в диализате методом добавок. Проведена валидационная оценка методики по критериям точности, линейности, воспроизводимости и показано, что она может быть использована в лабораторных условиях при изучении высвобождения тилорона с мазевых основ.

**Ключевые слова:** тилорон; мазь; диализ; спектрофотометрический метод анализа; валидация

**UDC 615.45:615.074**

**E. V. Babiy, K. F. Vashchenko**

**BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH OF TILORONE RELEASE FROM OINTMENTS ON THE HYDROPHILIC BASIS**

It has been studied release of tilorone in *in vitro* studies from ointments on the polyethylenoxide basis. The technique of spectrophotometric quantitative determination of tilorone in dialysate using supplements has been created. Evaluation of methods has been carried out on the criteria of accuracy, linearity, repeatability, what showed that this methods can be used *in vitro* by study of tilorone release from ointment bases.

**Key words:** ointment; tilorone; dialysis; spectrophotometric analysis; validation

Адреса для листування:  
79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69.  
Львівський національний медичний університет  
ім. Данила Галицького.  
Тел. (32)275-59-56. E-mail: himmedvin@gmail.com.

Надійшла до редакції:  
24.10.2013 р.