

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2004

В. Л. Дорофеев, И. В. Титов, В. Ю. Кочин, А. П. Арзамасцев

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕСТА “РАСТВОРЕНИЕ” ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ПРИМЕРЕ ПРЕПАРАТОВ ОФЛОКСАЦИНА

Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

В настоящее время в России зарегистрировано более 18 тысяч лекарственных препаратов различных фирм-производителей. В то же время номенклатура лекарственных средств включает в себя не более 2 тысяч наименований действующих веществ. Это свидетельствует о том, что подавляющую часть фармацевтического рынка России занимают воспроизведенные лекарственные средства (дженерики). В частности, в лекарственной форме “таблетки” зарегистрировано 12 препаратов офлоксацина различных производителей [1].

Для приближенной оценки относительной биодоступности дженериков в настоящее время большое значение приобрели испытания *in vitro*, в том числе широко известный тест “растворение” [2 – 11].

Целью настоящей работы являлся подбор дифференцирующих условий теста “растворение”, позволяющих выявлять различия между препаратами-дженериками офлоксацина и валидировать процесс их производства.

Материалы и методы

Объекты исследования. Таблетки, содержащие офлоксацин: Таривид (200 мг), Aventis (Hoechst), Индия; Заноцин (200 мг), Ranbaxy Laboratories Ltd., Индия; Офлоксин 200 (200 мг), Leciva, Чехия; Тариферид (200 мг), Брынцалов А, Россия.

Методика проведения теста. Тест “растворение” проводили на приборе SOTAX AT 7 smart (Швейцария), аппарат “лопастная мешалка”. Объем среды растворения 900 мл, температура 37 °С. Скорость вращения лопастных мешалок 50 об/мин. В качестве среды растворения использовали: 0,01 н. раствор кислоты хлористоводородной, воду, ацетатный буфер pH 5,0, ацетатный буфер pH 4,0.

Ацетатные буферы со значениями pH 5,0 и pH 4,0 готовили путём смешивания 1 н. раствора кислоты уксусной (ГФ XI вып. 2), 1 н. раствора натрия гидроксида (ГФ XI вып. 2) и воды дистиллированной.

Испытание проводили на 6 образцах таблеток для каждого препарата.

Отбор проб осуществляли через 5, 15, 25, 35, 45, 60 и 70 мин после начала испытания. Объем пробы 2 мл. После отбора среду растворения восполняли в соответствующем объеме. Пробы разбавляли средой рас-

творения, после чего фильтровали через бумажный фильтр типа “белая лента”, отбрасывая первую порцию фильтрата.

Количественный анализ. Проводили методами ВЭЖХ и УФ спектрофотометрии.

В работе использовался жидкостный градиентный хроматограф BICSHOFF (Швейцария). Колонка PRONTOSIL AQ-120 (250 × 4 мм, C₁₈, 5 мкм), предколонка PRONTOSIL AQ-120 (14 × 4 мм, C₁₈, 5 мкм), температура колонки 40 °С (термостат VARIOTHERM); подвижная фаза: ацетонитрил — раствор кислоты фосфорной в воде с pH 2,3 (30:70). Скорость потока 1 мл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл (инжектор Rheodyne). Детектирование: диодно-матричный детектор DAD 3L, настроенный на длину волны 294 нм.

Количественное определение методом УФ спектрофотометрии осуществлялось на спектрофотометре СФ-103 (Аквилон, Россия) при длине волны 291 нм при растворении в воде и 294 нм при растворении в кислоте хлористоводородной и в буферах. В качестве раствора сравнения использовался соответствующий растворитель.

Для каждого исследования готовили раствор стандартного образца в концентрации 6 мкг/мл (для УФ спектрофотометрии) и 20 мкг/мл (для ВЭЖХ). Стандартные растворы фильтровали через фильтр типа “белая лента” (как и испытуемые растворы).

Результаты и их обсуждение

Известно, что на высвобождение лекарственных веществ влияют две группы факторов [4, 5, 8, 10]:

1. Физико-химические свойства субстанции: 1.1. растворимость субстанции; 1.2. размер частиц субстанции; 1.3. кристаллическое состояние субстанции.

2. Факторы, зависящие от лекарственной формы: 2.1. технология изготовления; 2.2. вспомогательные вещества.

В руководстве FDA для промышленности по тесту “растворение” для твердых лекарственных форм [8] используется биофармацевтическая классификация лекарственных средств, предложенная в 1995 году. В основу этой классификации положены два важных свойства лекарственного вещества: растворимость и всасывание в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ).

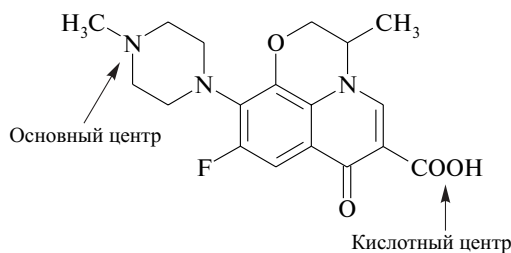


Рис. 1. Наиболее значимые кислотно-основные центры в молекуле офлоксацина.

Принято считать, что вещество “хорошо растворимо”, если при значениях pH 1 – 8 в 250 мл буфера растворяется вся доза действующего вещества. Считается также, что вещество “хорошо всасывается”, если из ЖКТ всасывается не менее 90 % дозы. Следует отметить, что термины “биодоступность”, “системный кровоток” и “пресистемный метаболизм” здесь не употребляются. Речь идет только о всасывании.

В соответствии с данными критериями выделяют 4 группы веществ: 1. хорошо растворяются + хорошо всасываются; 2. плохо растворяются + хорошо всасываются; 3. хорошо растворяются + плохо всасываются; 4. плохо растворяются + плохо всасываются.

Для лекарственных веществ 4 группы предпочтительно использовать парентеральные способы введения.

Лекарственные средства 2 группы являются классическими объектами для исследования по тесту “растворение”, поскольку именно для них наибольшее значение имеет технология производства: размер частиц субстанции, ее кристаллическое состояние, вид и свойства лекарственной формы.

Однако для нашего исследования наибольший интерес представляют вещества 1 и 3 групп. Свойства лекарственной формы, размер частиц и кристаллическое состояние субстанции в данном случае не столь значительно влияют на высвобождение действующего вещества. Причем в 1 группе вообще отсутствуют “узкие места”. Например, практически бессмысленно проводить испытание таблеток метамизола натрия (анальгин) по тесту “растворение”, поскольку действующее вещество переходит в раствор в течение нескольких минут после начала испытания.

В этой связи возникает вопрос о ценности теста “растворение” для лекарственных средств 1 и 3 групп. Для решения данной проблемы нами были выбраны лекарственные средства группы фторхинолонов, в частности офлоксацин.

Одновременное присутствие в молекуле офлоксацина основного (алифатический атом азота) и кислотного (карбоксильная группа) центров (рис. 1) обуславливает хорошую растворимость этого соединения в растворах минеральных кислот и щелочей и ограниченную растворимость в воде [6, 9, 11].

Очевидно, что в среде желудочного сока, который имеет значение pH от 1 до 4, третичный алифатический атом азота находится преимущественно в ионизированном состоянии, что обуславливает хорошую

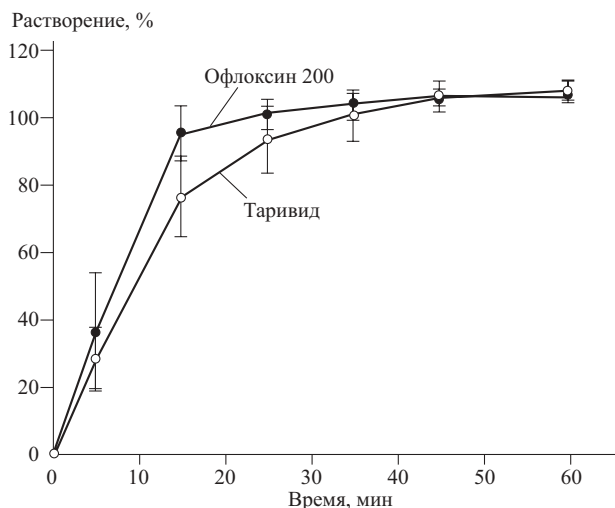


Рис. 2. Профили высвобождения офлоксацина в среде 0,01 н. кислоты хлороводородной (значение pH около 2).

растворимость офлоксацина. Вместе с тем, биодоступность офлоксацина при пероральном применении составляет 95 – 100 % [13]. Поэтому данное лекарственное средство можно отнести к 1 группе.

На рис. 2 представлены профили высвобождения офлоксацина из таблеток Таривид и Офлоксин 200 в “стандартных” условиях: лопастная мешалка со скоростью вращения 50 об/мин; среда растворения 0,01 М раствор HCl (pH 2.0); объем среды растворения 900 мл; температура среды 37 °С.

Из рис. 2 видно, что офлоксацин достаточно быстро переходит в раствор: уже через 5 мин высвобождается не менее 20 % действующего вещества, а через 30 мин вся доза офлоксацина находится в растворенном состоянии.

Статистически значимые различия (тест Стьюдента для независимых выборок) наблюдаются только в точке 15 мин. Следовательно различить дженерики в данных условиях между собой практически невозможно, а общее требование “не менее 70 % за 45 мин” [2], очевидно, всегда будет выполняться.

При подборе дифференцирующих условий нами были получены кривые высвобождения офлоксацина при использовании в качестве среды растворения воды (рис. 3). Данные условия являются кардинально противоположными, поскольку офлоксацин в воде мало растворим. В начале теста значение pH растворителя составляло около 5,5, в конце растворения около 6,9. Из рисунка видно, что данная среда не выявила статистически значимых различий в профилях Заноцина, Офлоксина 200 и Таривида. Кроме того, в данных условиях наблюдается недостаточно высокое растворение. Следует отметить, что показатели высвобождения Тариферида значительно выше, чем у его аналогов. Это обусловлено включением в состав вспомогательных веществ Тариферида поверхностно-активных соединений, что повышает растворимость субстанции.

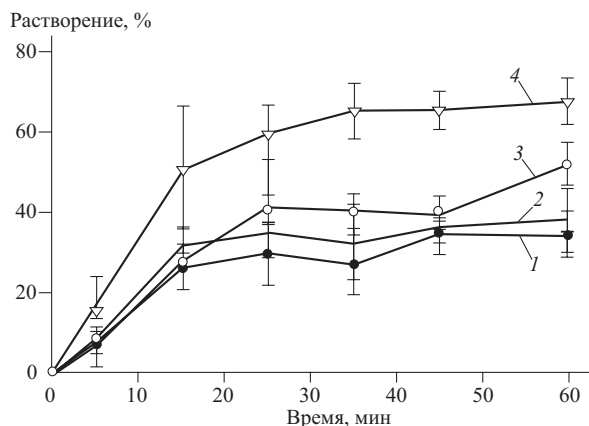


Рис. 3. Профили высвобождения офлоксацина в воде: 1 – Таривид, 2 – Офлоксин 200, 3 – Заноцин, 4 – Тариферид.

Для достижения более значимых различий в профилях с одновременным улучшением высвобождения офлоксацина было решено в качестве среды растворения использовать ацетатный буфер со значением pH 5,0. В более кислой среде по сравнению с водой происходит более активное протонирование третичного атома азота, соответственно, улучшается растворимость офлоксацина. Рис. 4 демонстрирует значительную разницу в показателях растворения Таривида и Тариферида. Тем не менее, процент высвобождения еще недостаточно высокий.

Тенденция к увеличению растворимости с увеличением кислотности среды говорит о том, что возможен подбор значения pH, при котором высвобождение Тариферида достигнет 100 %, с возможным сохранением статистически значимых различий между препаратами офлоксацина разных фирм-производителей.

Как видно из рис. 5, ацетатный буфер со значением pH 4,0 оказался оптимальным с точки зрения выявления различий между профилями с одновременно достаточно высоким процентом высвобождения офлоксацина в “стандартной” точке 45 мин. Вместе с тем, данные условия можно считать приближенными к условиям в желудке, так как в отсутствие пищи значение pH желудочного сока может достигать 4,0 [12, 14].

Более того, полученные в данных условиях профили растворения являются специфичными для каждого из исследованных препаратов и могут служить критерием их подлинности, то есть тест “растворение” можно использовать для выявления фальсифицированных препаратов, содержащих офлоксацин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный реестр лекарственных средств.
2. Общая фармакопейная статья 42-0003-00 “Растворение”.
3. ОСТ 91500.05.001.00 “Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения”.
4. А. И. Тенцова, И. С. Ажгихин, *Лекарственная форма и терапевтическая эффективность лекарств*, Медицина, Москва (1974).
5. *Bio-International 2: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. International Conference of F. I. P., Munich, Germany, June 15 – 17 (1994)*, Henning H. Blume, Kamal K. Midha (eds.), Medpharm Scientific Publ., Stuttgart (1995).

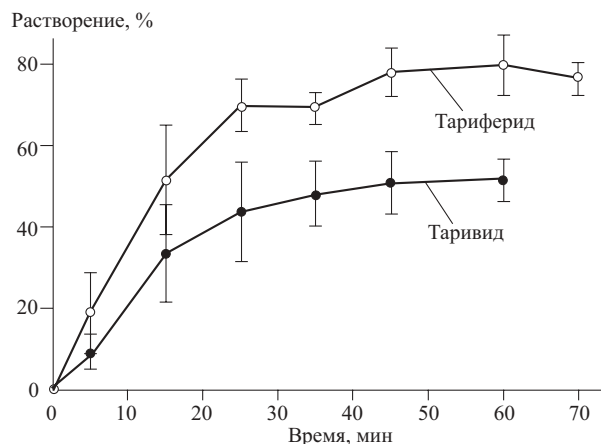


Рис. 4. Профили высвобождения офлоксацина в среде ацетатного буфера со значением pH 5,0.

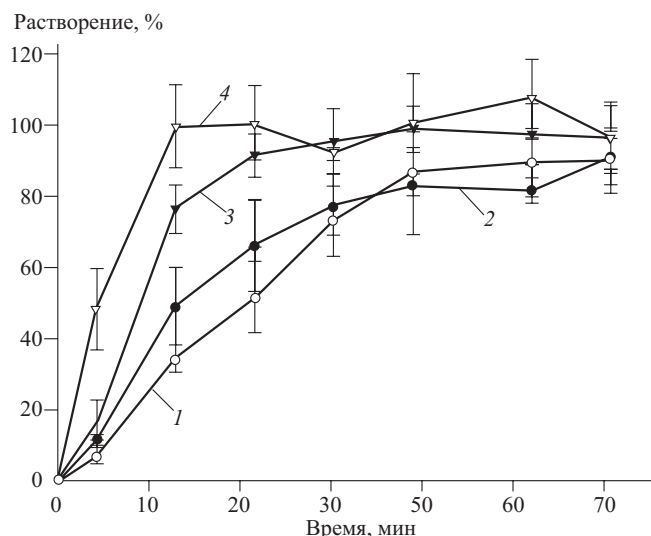


Рис. 5. Профили высвобождения офлоксацина в среде ацетатного буфера со значением pH 4,0: 1 – Заноцин, 2 – Таривид, 3 – Офлоксин 200, 4 – Тариферид.

6. British Pharmacopoeia (2001).
7. Dissolution Discussion Group. Vol. 1: A User’s Perspective on Dissolution. —VanKel Technology Group (1999).
8. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Guidance for Industry. —U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (1997).
9. European Pharmacopoeia, 4th ed. (2002).
10. L. J. Leeson, J. T. Carstensen, *Dissolution Technology*, Whitlock Press Inc. (1974).
11. *The United States Pharmacopoeia*, 26th revision (2003).
12. Л. Е. Холодов, В. П. Яковлев, *Клиническая фармакокинетика*, Медицина, Москва (1985).
13. *Drug Information for the Health Care Professional. USP DI, Vol. 1*, 21st edition. MICROMEDEX Thomson Healthcare (2001).
14. Р. Флиндт, *Биология в цифрах: Сборник таблиц, включающих более 10000 данных; Пер. с нем.*, Мир, Москва (1992).

Поступила 24.06.03.