

УДК 615.031/0.34

Использование теста на растворение для прогноза всасывания таблеток метронидазола

К. Л. Хуршудян, А.С. Оганесян

Экспертный центр РА ГНО

Экспертно-аналитическая лаборатория Научного центра по экспертизе лекарств и медицинских технологий, РА

0001, Ереван, ул. В.Саргсяна, 3

Ключевые слова: метронидазол, тест на растворение, коэффициент подобия

В настоящее время принято считать, что биоэквивалентные лекарственные препараты (дженерики) – это фармацевтические эквиваленты или альтернативы, для величин степени и скорости всасывания которых не отмечается значительных различий, когда они вводятся однократно или многократно в одной и той же молярной дозе, необходимой для создания определенного терапевтического эффекта, в идентичных экспериментальных условиях [10, 16, 17].

Действительно, неучитываемая изменчивость всасываемости лекарственного вещества может иметь серьезные клинические последствия. Применение лекарств, которые не всасываются в необходимой степени, может привести к тому, что в организм больного поступит слишком большое или слишком малое количество лекарственного вещества. Это может привести к серьезным нежелательным последствиям, когда они вводятся однократно или многократно в одной и той же дозе, необходимой для создания лечебного эффекта [13].

Последнее особо важно для твердых лекарственных форм тех препаратов, которые характеризуются быстрым и полным высвобождением активного компонента из лекарственной формы, имеют высокую скорость растворения и практически полностью всасываются в кровь из желудочно-кишечного тракта. При оценке фармацевтической и фармакокинетической эквивалентности препаратов данной группы (I группа по классификации ВОЗ) большое значение имеет их эквивалентность по тесту растворения. Многочисленные исследования, проведенные за последние годы, доказали высокую информативность данного теста для оценки биоэквивалентности лекарств данной группы [1, 7, 9]. Сравнительный анализ профилей растворения исследуемого и стандарт-

ного препарата является первым этапом исследования биоэквивалентности воспроизведенных лекарств и очень важен для лекарственных форм с измененным количеством и качеством вспомогательных веществ.

Исследования последних лет убедительно доказали, что изменения в кинетике растворения препаратов I группы или так называемых биовайверов могут существенно влиять на скорость и степень их всасывания, что в большинстве случаев приводит к изменению их терапевтического действия [6,7,12,17]. В частности, такая взаимосвязь была показана для рифампицина, эритромицина, метронидазола и др. [6,7,12,17].

Последние исследования, проведенные экспертами ВОЗ, убедительно доказывают, что метронидазол является одним из первых кандидатов, данные по тесту растворения которого можно использовать для точного прогноза его скорости и степени всасывания в организме.

Метронидазол характеризуется высокой растворимостью и проницаемостью, быстро и полностью всасывается в кровь из желудочно-кишечного тракта и включен в список эссенциальных лекарств. Кроме того, доказано, что не существует риска первичного метаболизма метронидазола в печени, исключены проявления полиморфизма, биотрансформации и резкого изменения профиля всасывания из-за дефицита метаболизирующих ферментов и т.д. [3, 17].

Таким образом, открывается возможность провести прогноз возможного изменения биоэквивалентности метронидазола на основе имеющихся данных о кинетике растворения таблеток метронидазола, с использованием предложенного нами метода исследования теста растворения, позволяющего выявить различия в кинетике растворения препарата [4,5].

Цель настоящей статьи — апробация оптимального метода проведения теста на растворение таблеток метронидазола для прогноза их биоэквивалентности.

Материал и методы

Референтный препарат. В качестве референтного препарата был выбран один из первых, зарегистрированных в РА препаратов «Метронидазол таблетки 500 мг», производства фирмы «Никомед ДАК», Дания, серия 10176021, изготовленный известным европейским производителем (табл. 1).

Испытуемые препараты. Все исследуемые препараты были приобретены в аптеках г.Еревана. Состав испытуемых таблеток приведен в табл. 1.

Таблица 1

Состав вспомогательных веществ в покрытых оболочкой таблетках исследуемых препаратов метронидазола

Код препарата	Количество метронидазола	Количество вспомогательных веществ
Референтный препарат	500 мг	6
Таблетки А	500 мг	5
Таблетки NR (незарегистрированный в РА препарат)	500 мг	количество и состав вспомогательных веществ неизвестен

Изучение профиля растворимости проводили согласно рекомендациям ВОЗ для препаратов, анализируя по 12 таблеток одной серии для каждого производителя.

Условия проведения теста растворение. Среда растворения 500 мл ацетатный буфер с pH 4,5; аппарат – вращающиеся лопасти, скорость вращения лопастей 75 об/мин, температура среды растворения 37.1°C.

Испытание проводили на приборе ERWEKA DT-6, технические и эксплуатационные характеристики которого полностью соответствовали Фармакопеи США 26, Британской Фармакопеи 2002 и Европейской Фармакопеи 2002. Пробы для анализа (10 мл среды растворения) отбирали через 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 и 120 мин после начала эксперимента. Для фильтрования аликвот, отобранных из среды растворения, использовался фильтр MN640d (MACHEREY-NAGEL, Art-Nr.:205009). Предварительно было доказано, что данный тип фильтра не абсорбирует метронидазол при фильтрации раствора стандарта и не содержит веществ, способных экстрагироваться средой растворения. Определение содержания метронидазола, высвободившегося в среду растворения, проводилось методом УФ-спектрофотометрии на спектрофотометре Beckman UV VIS DU640i. Оптическая плотность измерялась относительно стандартного раствора метронидазола, в качестве которого использовался рабочий стандарт метронидазола («Метронидазол рабочий стандарт» эталон № 3600, Polpharma, Польша). В растворах стандарта метронидазола в ацетатном буфере с pH 4,5 независимо от его концентрации наблюдался характерный для метронидазола пик поглощения при 320 ± 2 нм.

Сопоставимость полученных профилей растворения оценивалась с помощью коэффициента подобия с референтным препаратом:

$$f_2 = 50 \cdot \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{i=1}^n [\bar{R}(t) - \bar{T}(t)]^2}{n}}} \right],$$

методика определения которого была одобрена ВОЗ и приведена в соответствующих руководствах FDA и Евроагентства по оценке медицинских продуктов в качестве критериев оценки подобия профилей растворимости [1,2,8,10-12].

Для общности рассчитывали также коэффициент различия [1,2]:

$$f_1 = 100 \cdot \frac{\sum_{i=1}^n |\bar{R}(t) - \bar{T}(t)|}{\sum_{i=1}^n \bar{R}(t)}.$$

Здесь $\bar{R}(t)$ – среднее количество растворенного референтного препарата в процентах для времени t ; $\bar{T}(t)$ – среднее количество растворенного испытуемого препарата в процентах для времени t . Для расчетов величин f_1 и f_2 следует использовать не менее 3 временных точек (кроме нулевой), при этом только одна точка может превышать значение 85%. Для каждой временной точки следует использовать не менее 12 единиц лекарственного средства. Абсолютное стандартное отклонение (в процентной шкале) для всех временных точек не должно превышать 10% [18].

Значения $f_2 = 50-100$ и $f_1 < 15$ подтверждают, что два профиля растворения являются подобными. Если более 85% лекарственного препарата растворяется в течение 15 минут, профили растворения могут быть признаны подобными без последующей математической оценки [2].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы Statistic for Windows 6.0. Оценивались средние арифметические величины, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (CV). Использовались статистические методы, базирующиеся на дисперсионном анализе и тестах Стьюдента. С помощью непараметрического анализа рассчитывали разницу в средних величинах высвобождения метронидазола с оценкой F-, t-, df- критериев. Статистический анализ результатов исследования соответствия профилей растворения референтного и исследуемых препаратов метронидазола проводили непарным t-тестом [15]. Достоверными считались различия

со значениями $P < 0,050$. При определении соответствия критериям ВОЗ использовали расчеты с применением нижнего и верхнего предела 95% доверительного интервала [15].

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что в отличие от референтного препарата и таблеток А, процент высвобождения метронидазола из таблеток NR через 15 мин был ниже 85% (табл. 2). Кинетика растворения метронидазола из таблеток NR существенно отличалась как от профиля растворимости референтного препарата, так и таблеток А (рис.).

Однако уже через 30 мин высвобождение метронидазола из таблеток А было выше 85%, а из таблеток NR достигало необходимых 85% только через 1 час после начала эксперимента. Необходимо также отметить, что статистический анализ, позволяющий оценить разницу между средними значениями параллельных определений метронидазола из исследуемых таблеток за фиксированный промежуток времени (15 мин), проведенный с использованием непараметрического анализа, показал, что при использовании метода с рН 4.5 отмечается статистически достоверная разница между таблетками NR, референтным препаратом и таблетками А (табл. 2).

Таблица 2

Сравнительный анализ высвобождения метронидазола из референтного и исследуемых препаратов (таблеток) через 15 мин после начала теста ($n=12$); процент высвобождения $\pm$ SD

Препарат	Процент высвобождения	Разница в средних величинах, %	F	t	f	P
Референтный	91.073 $\pm$ 4.71	-	-	-	-	-
Таблетки А	92.903 $\pm$ 3.15	1.829 $\pm$ 1.63	2.23	1.11	9	0,0986 ns
Таблетки NR	72.127 $\pm$ 6.24	18.95 $\pm$ 2.25	1.75	8.38	20	0.0001***

* Степень достоверности; достоверными считались различия со значениями $P < 0,050$

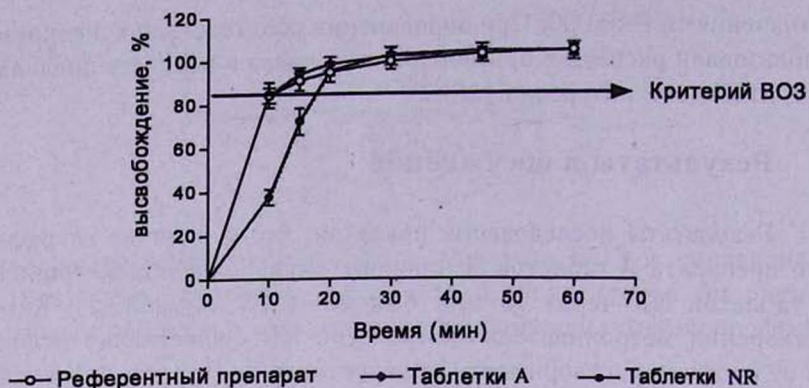


Рисунок. Профили растворения исследуемых и референтного (R) препаратов метронидазола. Средние значения $\pm$ SD; критерий ВОЗ 85% за 15 мин

Коэффициенты подобия таблеток А и NR к референтному препарату составляют 81 и 42% соответственно (табл. 3).

Полученные данные подтверждены также результатами расчета дополнительного параметра – коэффициента различия с референтным препаратом (f_1). Согласно литературным данным, в случае соответствия референтному препарату величина f_1 для исследуемых таблеток не должна превышать 15%. Как видно из таблицы, этому условию полностью соответствуют таблетки А, а несоответствие для таблеток NR отмечается в значительной степени (табл. 3).

Таблица 3

Коэффициенты подобия (f_2) и различия (f_1) с референтным препаратом для исследуемых таблеток метронидазола ($n=12$)

Параметры	А	NR	Требование ВОЗ
f_1 , %	81,07	34,22	$\geq 50\%$
f_2 , %	1,87	24,11	$\leq 15\%$

Статистический анализ показал также наличие значительной вариации для таблеток NR, не характерных для качественных таблеток препарата.

Таким образом, в случае использования данной методики уже через 15 мин заметны достоверные различия между качественными и некачественными таблетками. Профили растворения в интервале 10-60 мин также существенно отличаются у некачественных препаратов.

Известно, что метронидазол хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта. Биодоступность таблеток метронидазола составляет 90-100%, с коэффициентом вариации примерно 10%. При использовании таблеток, обеспечивающих высвобождение более 85% за 15 мин, концентрация метронидазола в крови через 15, 30 и 60 мин составляет 4, 7 и 10 мкг/мл соответственно. Константа всасывания (K_a) 2 - 4 ч⁻¹ [3,14]. При этом считается, что всасывание препарата заканчивается уже к 45 мин. Анализ соотношений площадей под фармакокинетическими кривыми (AUC) через определенные промежутки времени после внутривенного введения раствора метронидазола и введения внутрь таблеток препарата показывает, что уже через 45 мин оно составляет более 98% [14,17]. Полученные в ходе исследования результаты указывают на то, что к 45 мин площадь под кривыми растворения метронидазола ($AUC_{раств}$) для таблеток NR составляет в среднем 76% (65-82%) от $AUC_{раств}$ референтного препарата. В отличие от таблеток NR, $AUC_{раств}$ таблеток А составляет 102% от $AUC_{раств}$ референтного препарата.

Исходя из полученных результатов и имеющихся в литературе данных, можно предположить, что применение исследованных таблеток NR может привести к нежелательным клиническим последствиям, вследствие значительного изменения биодоступности метронидазола.

Таким образом, можно заключить, что предложенный метод исследования кинетики растворения таблеток метронидазола позволяет провести прогноз степени и скорости его всасывания в организме. Проведение предварительного анализа теста на растворение в предложенных условиях позволит провести оценку биоэквивалентности таблеток метронидазола и, возможно, сразу дать заключение о соответствии испытуемых и референтного препаратов.

Поступила 25.03.08

Լուծելիության թեստի կիրառումը մետրոնիդազոլի դեղահաբերի ներծծման կանխատեսման համար

Զ.Լ.Խուրշուդյան, Ա.Ս. Հովհաննիսյան

Իրականացվել է մետրոնիդազոլի դեղահաբերի լուծելիության թեստի օպտիմալ մեթոդի ապրոբացիա՝ դրանց կենսահամարժեքության կանխատեսման համար: Հաստատվել է, որ ացետատային բուֆեր рН-4.5 միջավայրով մեթոդի կիրառման դեպքում, 15 րոպե անց ռեֆերենտ պրեպարատից մետրոնիդազոլի արտազատումը բարձր էր 85%-ից: Հաս-

տատվել է, որ տվյալ մեթոդի կիրառման դեպքում արդեն 15 րոպե անց նկատելի են որակյալ և անորակ դեղահաբերի մեջև ստույգ տարբերություններ: ՀՀ-ում չգրանցված անորակ պրեպարատի և ռեֆերենտ դեղահաբերի մոտ, լուծելիության թեստի սկզբից 10-60 րոպե ընկած ժամանակահատվածում, լուծելիության պրոֆիլները նույնպես էապես տարբերվում են:

Ստացված արդյունքներից և մետրոնիդազոլի դեղակինետիկայի վերաբերյալ գրականության տվյալներից ելնելով՝ կարելի է ենթադրել, որ նշված պայմաններում լուծելիության թեստի ՀՀԱԿ-ի պահանջներին չբավարարող մետրոնիդազոլի դեղահաբերի կիրառումը կարող է հանգեցնել ոչ ցանկալի կլինիկական հետևանքների՝ մետրոնիդազոլի կենսամատչելիության նկատելի փոփոխման արդյունքում:

Use of dissolution test for prediction of absorption of metronidazole tablets

K.L. Khurshudyan, A.S. Hovhannisyan

Approbation of the dissolution test for metronidazole tablets for prediction of their bioequivalence has been carried out. It has been established that at use of this method with acetate buffer of pH- 4.5 as dissolution medium, after 15 min liberation of metronidazole from reference drug was above 85 %, while from not registered in RA tablets it reached the necessary 85 % only 1 hour after the beginning of the test.

The statistical analysis, allowing to estimate the difference between average values of parallel definitions of metronidazole from investigated tablets, has shown that in case of use of the given technique, already after 15 min authentic distinctions between qualitative and poor-quality tablets are found. The dissolution profile in an interval of 10-60 min also essentially differed at poor-quality preparations.

Proceeding from the obtained results, and the data available in the literature of pharmacokinetics of metronidazole it is possible to assume that application of the investigated not registered in RA tablets can lead to undesirable clinical consequences, owing to significant change in the bioavailability of metronidazole.

Литература

1. Арзамасцев А.П., Лутцева Т.Ю., Садчикова Н.П. и др. Химико-фармацевтический журнал, 2004, 6, с. 40-42.
2. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Лутцева Т.Ю. Фармация, 2004, 4, с. 6-9.
3. Кивман Г.Я., Рудзит Э.А., Яковлев В.П. Фармакокинетика химиотерапевтических препаратов. 1982, М., с 131-133.

4. Оганесян А.С., Хуришудян К.Л. Вестник МАНЭБ, 2005, т.10, 5. с.132-136.
5. Хуришудян К.Л., Оганесян А.С. Вестник МАНЭБ, 2006, т.11, 8. с.123-131.
6. Costa P., Lobo J.M.S. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2001, v.13, p. 123-133.
7. Classification of orally administered drugs on the WHO model list of essential medicines according to the biopharmaceutical classification system WHO, WD QAS/04.083, 2004.
8. Guidance for Industry. Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation Center for Drug Evaluation and Research (CDER), November 1995 CMC 5.
9. Guidance for Industry Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, 2004.
10. Huey Lin Ju. Drug Information Journal, 1997, v.31. p. 1273-1289.
11. In vitro dissolution testing methods for oral immediate release drug products containing BCS class I drugs, WHO, WD QAS/04.062, 2004.
12. Jensen J.C., Gugler R. Clin.Pharm.Ther., 1983, v.34, p.481-487.
13. Liu J.P., Chow S.C. Drug Inf. J., 1996, v.30. p. 881-889.
14. Note for guidance on the investigation of Bioavailability and Bioequivalence – The European Agency for the Evaluation of Medical Products, *Evolution of Medicines for Human Use*, London 2001.
15. Ritschel W.A., Kearm G.L. Handbook of basic pharmacokinetics, 5thed., Drug Intelligence Publication, Hamilton, 1998, pp.481-503 Gibaldi M., Perrier D. *Pharmacokinetics* 2nd ed. 1982, Marcel Dekker, New York, NY.