

УДК 615.4

З. О. ГІХЕР¹, А. В. ЄГОРОВА¹, Г. В. АНЕЛЬЧИК¹, М. Я. ГОЛОВЕНКО², І. Ю. БОРИСЮК²¹ВAT ІнтерХім, м. Одеса²Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, м. Одеса

ВИКОРИСТАННЯ ТЕСТУ «РОЗЧИНЕННЯ» В ДОСЛІДЖЕННЯХ ЕКВІВАЛЕНТНОСТІ ПРЕПАРАТУ-ГЕНЕРИКА «ІНТАГРА ІС»

Проведено дослідження профілей розчинення двох серій препарату «Інтагра ІС» (виробник — ВAT «ІнтерХім») з оригінальним патентованим лікарським засобом «Віагра» (виробник — фірма «Pfizer PGM», Франція). Отримані результати підтверджують ідентичність профілів розчинення даних препаратів з урахуванням значень коефіцієнтів подібності f_2 вивчених серій. Визначення проникнення силденафілу крізь ізольовані сегменти кишечника щурів дало можливість розрахувати величину P_{eff} що становить $0,86 \pm 0,2 \cdot 10^{-6}$ см/с та відповідає $\approx 42\%$ біодоступності.

Незважаючи на те, що препарат «Інтагра ІС» має такі ж профілі розчинення, як і препарат «Віагра», він не може бути зареєстрований як генерик-біоєквівалент, так як за показниками розчинення та проникнення він відноситься до четвертого класу біофармацевтичної класифікаційної системи.

Ключові слова: препарат «Інтагра ІС»; препарат «Віагра»; профілі розчинення; біодоступність; біофармацевтична класифікаційна система

В останній час згідно з рішенням Державного фармакологічного центру МОЗ України є можливість замінити вивчення біоеквівалентності препаратів-генериків *in vivo* на порівняльні дослідження *in vitro*. В цьому випадку останні повинні мати тверду дозовану форму системної дії і містити таку же діючу речовину і в тій же дозі, що і референтний препарат [4, 8]. При цьому деякі допоміжні речовини можуть відрізнятися за умови, що вони не впливають на безпечність та/або ефективність лікарського засобу.

Головна мета нашого дослідження полягала у визначенні та порівнянні профілей розчинення відтвореного препарату «Інтагра ІС» з оригінальним патентованим лікарським засобом «Віагра», що вміщують силденафіл як фармацевтично активний інгредієнт. При цьому ми враховуємо, що швидкість розчинення в умовах випробування *in vitro* залежить від низки чинників, але при інших умовах пріоритет належить природі середовища розчинення [1].

Виходячи з того, що тест «Розчинення» використовується як доповнення до тесту «Проникнення», що характеризує біодоступність препаратів, у біофармацевтичній класифікаційній системі (БКС) нами наведені результати дослід-

ження, виконані на ізольованих сегментах тонкої кишки білих щурів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єкти дослідження

Таблетки «Віагра» по 0,1 г покриті оболонкою (виробник — фірма «Pfizer PGM», Франція) і таблетки препарату «Інтагра ІС» по 0,1 г, покриті оболонкою (виробник — фірма ВAT «ІнтерХім») та «Силденафіл уцитрат», порошок (субстанція) ВАНД 05-168-03.2 виробництва фірми «Shilpa Medicare Limited», Індія.

Методика проведення тесту

Для проведення тесту «Розчинення» використовували прилад з лопаттю-мішалкою виробництва фірми «Erweka», Німеччина типу DT 706 НН. Об'єм середовища розчинення — 900 мл, температура — $(37,0 \pm 0,5)$ °С. Швидкість обертання лопаті — 50 об/хв. Час розчинення — 45 хв. У якості середовищ для розчинення використовували: 1) 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої; 2) ацетатний буферний розчин рН 4,5 (USP 24); 3) фосфатний буферний розчин рН 6,8 (USP 24).

Для виконання тесту «Розчинення» брали по 12 таблеток кожного препарату. У циліндричний посуд, що містить 900 мл середовища для розчинення, поміщали 1 таблетку випробовуваного препарату. Відбір проб здійснювали

© З. О. Гіхер, А. В. Єгорова, Г. В. Анельчик,
М. Я. Головенко, І. Ю. Борисюк, 2009

через 5, 15, 25, 35 та 45 хвилин досліду. Проби (5,0 мл) поміщали в мірну колбу об'ємом 25,0 мл і доводили до мітки тим же розчинником. Отриманий розчин фільтрували через мембранний фільтр (0,20 мкм; Minisart RC 15, «Sartorius», Німеччина), відкидаючи першу порцію фільтрату [2, 3].

Кількісний аналіз

У роботі використовували спектрофотометр UV-2401PC (Shimadzu); спектральний діапазон вимірювань складав від 190 нм до 900 нм; точність — $\pm 0,003$ А (поглинання); відтворюваність — $\pm 0,001$ А; рН-метр-мілівольтметр рН-121 (діапазон вимірювань рН від -1 до +14; основна абсолютна похибка вимірювань ± 5 мВ).

Кількісний вміст силденафілу в тесті «Розчинення» визначали спектрофотометричним методом стандарту при довжині хвилі (292 \pm 2) нм в 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої та у буферних розчинах. У якості розчину порівняння використовували відповідний розчинник. Для кожного дослідження готували розчин стандартного зразка (РСЗ). При проведенні попередніх досліджень було встановлено відсутність впливу компонентів «плацебо» на спектр поглинання силденафілу цитрату.

Кількість силденафілу, який перейшов у розчин з таблетки в кожній точці пробовідбору у відсотках (X_n), розраховували за формулою:

$$X_n = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot V_n \cdot 25 \cdot 0,5 \cdot 100 \cdot 474,6}{A_0 \cdot (a - \sum_1^n b_n) \cdot 5 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 666,7} = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot V_n \cdot P \cdot 189,84}{A_0 \cdot (a - \sum_1^n b_n) \cdot 100 \cdot 666,7}$$

де: n — порядковий номер пробовідбору;

A_0 — оптична густина РСЗ силденафілу цитрату;

A_1 — оптична густина розчину, що досліджується;

m_0 — наважка РСЗ силденафілу цитрату, г;

a — вміст силденафілу в одній таблетці — 0,100 г;

P — чистота силденафілу цитрату в стандартному зразку силденафілу цитрату, %;

V_n — об'єм розчинника в n точці пробовідбору, мл;

b_n — зменшення кількості речовини в умовах відбору проб розраховували за формулою:

$$b_n = \frac{a \cdot X_{n-1} \cdot d \cdot 0,01}{V_{n-1}}$$

де d — об'єм аликвоти в мл, у даному випадку — 5,0 мл.

Умови виконання досліджень представлені в табл. 1.

Таким чином, при розрахунку кількості силденафілу в кожній точці часового терміну врахо-

Таблиця 1

УМОВИ ТА ПРОЦЕДУРА РОЗРАХУНКІВ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ СИЛДЕНАФІЛУ

Час відбору проб, хв	Об'єм розчинника V_n , мл	b_n
5	900	$b_1 = 0$
10	895	$b_2 = \frac{0,1 \cdot X_1 \cdot 5 \cdot 0,01}{900} = \frac{0,005 \cdot X_1}{900}$
15	890	$b_3 = \frac{0,1 \cdot X_2 \cdot 5 \cdot 0,01}{895} = \frac{0,005 \cdot X_2}{895}$
25	885	$b_4 = \frac{0,1 \cdot X_3 \cdot 5 \cdot 0,01}{890} = \frac{0,005 \cdot X_3}{890}$
35	880	$b_5 = \frac{0,1 \cdot X_4 \cdot 5 \cdot 0,01}{885} = \frac{0,005 \cdot X_4}{885}$
45	875	$b_6 = \frac{0,1 \cdot X_5 \cdot 5 \cdot 0,01}{880} = \frac{0,005 \cdot X_5}{880}$

вано зменшення об'єму розчину та втрати речовини при відборі проби.

Значення відносної похибки середнього результату ϵ у відсотках розраховували за формулою:

$$\epsilon = \frac{\Delta \bar{X}}{\bar{X}} \cdot 100,$$

де: $\Delta \bar{X}$ — абсолютна похибка середнього результату;

\bar{X} — середнє значення результату з 12 паралельних вимірів.

Проникнення силденафілу крізь біологічні мембрани (ентероцити) визначали на органо-типових моделях [7], ізольованих сегментах кишечника (ІСК). Розраховували ефективне проникнення сполуки (P_{eff}) у відповідності з рівнянням:

$$P_{eff} = \frac{(C_{in} - C_{out}) \cdot Q_{in}}{C_{out} \cdot 2\pi RL},$$

де: C_{in} та Q_{in} — концентрація та кількість речовини на вході ІСК;

C_{out} — концентрація на виході;

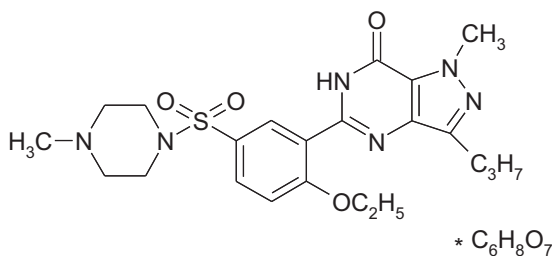
R — радіус;

L — довжина ІСК. Ми враховували наступні показники ІСК: L — 5 см, R — 0,5 см, площа поверхні — 7,85 см², об'єм у середині ІСК — 1 мл, поза ними — 4 мл.

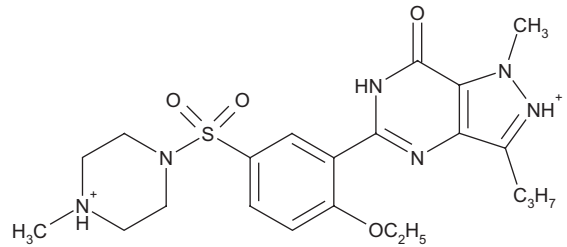
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Застосування тесту «Розчинення» для оцінки біоеквівалентності замість досліджень *in vivo* можливе лише для таблеток, що містять швидкокорозчинні лікарські речовини [3]. Тому попередньо нами було проведено встановлення рівноважної розчинності активного фармацевтичного інгредієнту (АФІ) в трьох буферних розчинах у діапазоні рН 1,2-6,8 (рекомендовані значення рН 1,2; 4,5 та 6,8) при температурі (37 ± 1) °С.

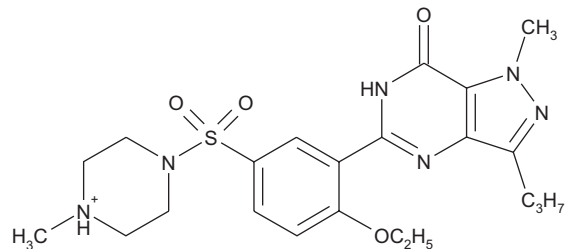
АФІ у таблетках препарату «Інтагра ІС» (виробник — ВАТ «ІнтерХім») міститься силденафілу цитрат (1-[[3-(6,7-дигідро-1-метил-7-оксо-3-пропіл-1Н-піразоло [4,3-d]піримідин-5-іл) — 4-етоксифеніл]сульфоніл]-4-метилпіпазіну цитрат):



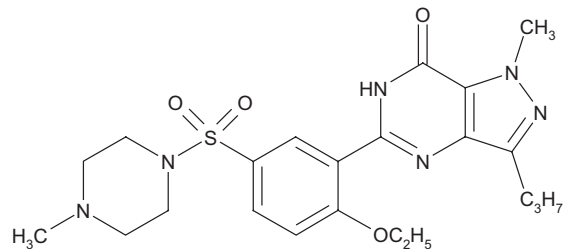
Наявність аміногруп обумовлює здатність молекули протонуватись та утворювати солі з сильними кислотами (HCl, H₂SO₄ і т.п.). Тому молекула силденафілу може існувати в чотирьох протолітичних формах:



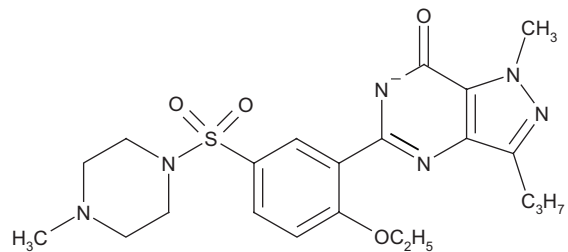
Форма [BH₃²⁺]



Форма [BH₂⁺]



Форма [BH]



Форма [B⁻]

З метою доведення еквівалентності препаратів «Інтагра ІС» та «Віагра» нами була використана процедура порівняльних досліджень *in vitro*, що ґрунтується на теорії, яка отримала назву «біофармацевтична класифікаційна система». В ній діючі сполуки розділені на ті, що мають високу або низьку біофармацевтичну розчинність та високий або низький ступінь проникнення крізь біологічні мембрани. Останній показник свідчить про відповідну біодоступність препарату. Існує, принай-

РОЗЧИННІСТЬ СИЛДЕНАФІЛУ ЦИТРАТУ В РІЗНИХ БУФЕРНИХ РОЗЧИНАХ

Буферний розчин	Розчинність силденафілу цитрату	
	%	мг/мл
0,1 М Хлористоводнева кислота (рН = 1,2)	99,88	0,040
Ацетатний буферний розчин (USP 24) (рН = 4,5)	98,15	0,039
Фосфатний буферний розчин (USP 24) (рН = 6,8)	11,72	0,005

мні, три випадки стосовно розчинності діючої речовини препарату. 1. Лікарський засіб вважається дуже швидко розчинним, якщо не менше 85% від вказаного у маркуванні активного інгредієнту переходить у розчин за 15 хв при використанні приладу з лопаттю (50 або 75 об/хв) або з кошиком (100 об/хв) у кожному з досліджуваних середовищ (рН 1,2; 4,5; 6,8) об'ємом 900 мл або менше. 2. Лікарський засіб є швидко розчинним, якщо не менше 85% переходить у розчин за 30 хв в умовах, зазначених у позиції 1. 3. Всі інші препарати відносяться до категорії з повільним розчиненням.

Отримані експериментальні дані розчинення силденафілу цитрату в різних буферних розчинах представлені у табл. 2.

Як видно з табл. 2, субстанція препарату має високу розчинність у буферних розчинах з рН 1,2 і 4,5 і низьку — в буферному розчині з рН 6,8. Звідси видно, що в середовищі шлункового соку (який має рН від 1 до 4) третинний аліфатичний атом азоту буде знаходитися в іонізованому стані, що обумовить високу розчинність сполуки [1]. В той же час у кишечнику, де рН середовища має значно більші значення, всмоктування препарату буде обмежене.

Отже, отримані результати свідчать про те, що діюча речовина (силденафіл) препарату «Інтагра ІС» не відноситься до речовин, зазначених у позиціях 1 та 2.

Враховуючи той факт, що біодоступність більшості лікарських форм силденафілу складає 41% (25–63%), препарат необхідно віднести

до четвертого класу БКС (низька розчинність, низький ступінь проникнення).

Проведення порівняльних досліджень *in vitro* для генеричних лікарських засобів у твердій дозованій формі для орального застосування залежно від класу діючої речовини має деякі особливості [8]. Для препаратів, що відносяться до 1–3 класів БКС, як генерик, так і референтний аналог повинні мати ідентичні профілі розчинення, які розраховуються за допомогою фактора подібності (f_2) при трьох значеннях рН.

На рис. 1 представлені профілі вивільнення силденафілу цитрату з таблеток «Віагра» (виробник — фірма «Pfizer PGM», Франція) та двох серій таблеток препарату «Інтагра ІС» (виробник — ВАТ «ІнтерХім») у «стандартних» умовах у середовищі розчинення (0,1 М розчин хлористоводневої кислоти).

Як видно з рис. 1, силденафілу цитрат досить швидко переходить у розчин, вже через 5 хв досліду вивільняється 69,6% з таблеток «Віагра» та 78% і 75,34% з двох серій таблеток препарату «Інтагра ІС» (020709 і 080709 відповідно), а через 35 хв досліду практично вивільняється вся доза АФІ.

Статистично достовірних різниць між кривими не відмічено, що свідчить про ідентичність препаратів у даних умовах, а загальні вимоги «не менше 70% за 45 хвилин», очевидно, будуть завжди виконуватись [4].

В інших середовищах (рис. 2, 3) також не відмічено статистично достовірних відмінностей

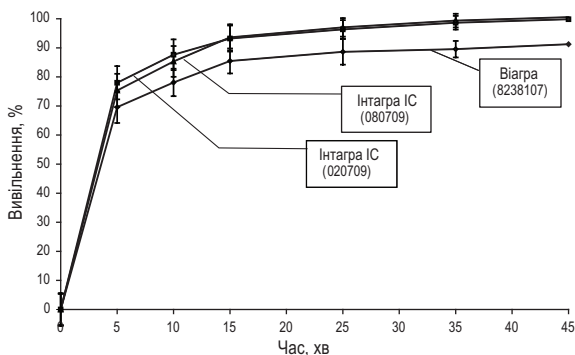


Рис. 1. Профілі розчинення трьох досліджуваних серій препаратів при розчиненні в 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти.

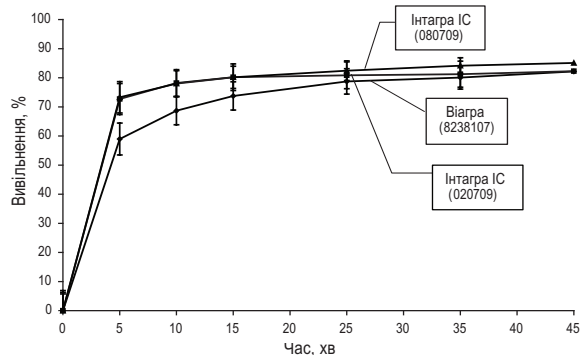


Рис. 2. Профілі розчинення трьох досліджуваних серій препаратів в ацетатному буферному розчині з рН 4,5.

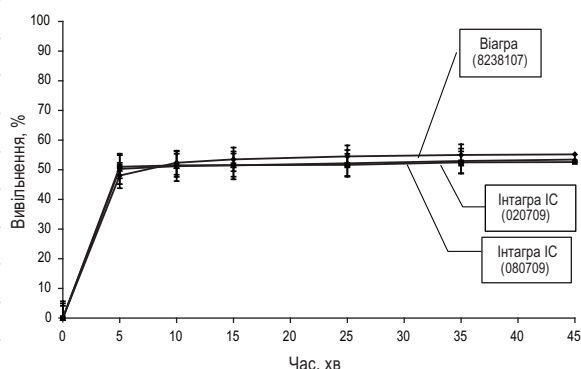


Рис. 3. Профілі розчинення трьох досліджуваних серій препаратів у фосфатному буферному розчині з рН 6,8.

між препаратом порівняння та двома серіями таблеток препарату «Інтагра ІС». Окрім того, в даних умовах спостерігається недостатньо високе розчинення. Слід відмітити, що показники вивільнення силденафілу цитрату з двох серій препарату «Інтагра ІС» значно вище, ніж з таблеток «Віагра». Це обумовлено включенням до складу препарату «Інтагра ІС» допоміжних речовин, що покращують розчинність субстанції.

Оцінку подібності кривих профілів розчинення проводили, виходячи з коефіцієнту подібності f_2 , який розраховується за формулою [8]. Значення розрахованих коефіцієнтів подібності f_2 наведені в табл. 3.

Результати дослідження профілів розчинення підтверджують ідентичність профілів розчинення препарату «Віагра» (виробник — фірма «Pfizer PGM», Франція) серії 8238107 і препарату «Інтагра ІС» (виробник — ВАР «ІнтерХім») серій 020709 та 080709. Значення коефіцієнтів подібності f_2 , вказані в табл. 3, підтверджують подібність профілів розчинення ($50 < f_2 < 100$) вивчених серій.

Визначення ступеня проникнення силденафілу крізь біомембрани було проведено на ІСК. Необхідно відзначити, що препарати тонкої кишки, поряд з культурою клітин Сасо-2, знайшли широке розповсюдження у біофармації для з'ясування механізмів всмоктування ліків

Таблиця 3

КОЕФІЦІЄНТИ ПОДІБНОСТІ

Середовище для розчинення	f_2	
	0020709	080709
0,1 М Розчин хлористоводневої кислоти	53,28	54,09
Ацетатний буферний розчин рН 4,5	55,53	55,04
Фосфатний буферний розчин рН 6,8	79,31	82,85

та підтвердження їх еквівалентності у твердих дозованих формах системної дії. Розрахована величина P_{eff} становила $0,86 \pm 0,2 \cdot 10^{-6}$ см/с, що відповідає по цьому показнику $\approx 42\%$ біодоступності in vivo [5, 6].

Відсутність стандартних біомаркерів для зазначеної моделі змусило нас провести валідацію за допомогою близької по структурі сполуки — ацикловіру. Її розчинність складала 1,62 мг/мл (у воді); $\log P$ — 0,94; P_{eff} — $1,08 \cdot 10^{-6}$ см/с; $\log P_{app}$ — (-6,15); біодоступність — 10–20% [5]. Для силденафілу ці показники є наступними: розчинність — 3,5 мг/мл; $\log P$ — 1,9; рК — 10,67; біодоступність — 15–54% [5, 6].

Незважаючи на те, що «Інтагра ІС» має такі ж профілі розчинення, розраховані за допомогою фактора подібності, як і «Віагра», вона не може бути зареєстрована як генерик-біоєйвер, так як за показниками розчинення та проникнення силденафіл відноситься до четвертого класу БКС.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Головенко Н.Я. Физико-химическая фармакология. — Одесса: Астропринт, 2004. — 720 с.
2. ГОСТ 8.010-99 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений.
3. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» — 1-е вид. — Доп. 2. — Х.: РІРЕГ, 2008. — 620 с.
4. Чумак В.Т., Баула О.П., Соловійов А.І. та ін. Проведення порівняльних досліджень in vitro для підтвердження еквівалентності лікарських засобів у твердій дозованій формі системної дії: метод. рекомендації. — К., 2007. — 42 с.
5. DrugBank <http://www.drugbank.ca/drugs/>
6. PubChem substance <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
7. Ruan L., Chen S., Yu B. et al. Prediction of human absorption of natural compounds by non-everted rat intestinal sac model // Eur. J. Med. Chem. — 2006. — Vol.41. — P. 605-610.
8. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system. — U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). — August 2000.

УДК 615.4

З. А. Гихер, А. В. Егорова, А. В. Анельчик, Н. Я. Головенко, И. Ю. Борисюк
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕСТА «РАСТВОРЕНИЕ» В ИССЛЕДОВАНИЯХ ЭК-
ВИВАЛЕНТНОСТИ ПРЕПАРАТА-ГЕНЕРИКА «ИНТАГРА ИС»

Проведено исследование профилей растворения двух серий препарата «Интагра ИС» (производитель — ВАТ «Интерхим») с оригинальным патентованным лекарственным средством «Виагра» (производитель — фирма «Pfizer PGM», Франция). Полученные результаты подтверждают идентичность профилей растворения данных препаратов с учетом значений коэффициентов сходства f_2 изученных серий. Определение проникновения силденафила сквозь изолированные сегменты кишечника крыс дало возможность рассчитать величину P_{eff} , что составляет $0,86 \pm 0,2 \cdot 10^{-6}$ см/с и соответствует $\approx 42\%$ биодоступности.

Несмотря на то, что препарат «Интагра ИС» имеет такие же профили растворения, как и препарат «Виагра», он не может быть зарегистрирован как генерик-биовейвер, так как по показателям растворения и проникновения он относится к четвертому классу биофармацевтической классификационной системы.

Ключевые слова: препарат «Интагра ИС»; препарат «Виагра»; профили растворения; биодоступность; биофармацевтическая классификационная система

UDC 615.4

Z. O. Gikher, A. V. Yegorova, G. V. Anelchik, M. Ya. Golovenko, I. Yu. Borisyyuk
THE «DISSOLUTION» TEST USE IN GENERIC DRUG INTAGRA IC EQUIVALENCE STUDY

The studying of two «dissolution» profiles for Intagra IC (producer — OAO Interchim) and original patented drug Viagra (producer — Pfizer PGM, France). The obtained data confirm their dissolution profiles identify with the note to similarity coefficients f_2 for series. The studying of sildenafil penetration through isolated intestine segments of rats made it possible to calculate the value of P_{eff} ($0,86 \pm 0,2 \cdot 10^{-6}$ SM/s), that corresponds to 42% bioavailability.

Despite the fact that Intagra IC has similar dissolution profiles, as well as Viagra, she can not be registered as a generic-biowaiver as indicator of dissolution and penetration to the fourth class of biopharmaceutical classification system.

Key words: Intagra IC; Viagra; dissolution profiles; bioavailability; biopharmaceutical classification system

Адреса для листування:
 65111, м. Одеса, вул. Дніпропетровська
 дорога, 83, кв. 5

Надійшла до редакції: 01.11.09