А 15.00.01 / Х-984

ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ МХИТАРА ГЕРАЦИ

ХУРШУДЯН КРИСТИНЕ ЛИПАРИТОВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СЛЮНЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ МЕТРОНИДАЗОЛА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук
по специальности 15.00.01 - «Фармацевтика».

ЕРЕВАН-2010

ԵՐԵՎԱՆԻ ՄԽԻԹԱՐ ՀԵՐԱՑՈՒ ԱՆՎԱՆ ՊԵՏԱԿԱՆ ԲԺՇԿԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԽՈՒՐՇՈՒԴՅԱՆ ՔՐԻՍՏԻՆԵ ԼԻՊԱՐԻՏԻ

ԹՔԻ ՕԳՏԱԳՈՐԾՄԱՆ ՀՆԱՐԱՎՈՐՈՒԹՅԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԵՏՐՈՆԻԴԱԶՈԼԻ ԿԵՆՍԱՀԱՄԱՐԺԵՔՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՄԱՆ ՀԱՄԱՐ

ԺԵ.00.01 - «Դեղագիտություն» մասնագիտությամբ
դեղագործական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ-2010

© National Library of Armenia OCR by Portmind

Тема диссертации утверждена в ЕрГМУ им. М.Гераци.

Научный руководитель: доктор биологических наук
А.С. Оганесян

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук
А.В. Топчян

доктор химических наук,
профессор А.Г. Хачатрян

Ведущая организация: Институт тонкой органической химии им. А.Л.Мнджояна научно-технологического центра органической и фармацевтической химии НАН РА

Защита диссертации состоится 9 декабря 2010г. в 14^{00} час, на заседании специализированного совета 026 «Теоретическая медицина» ВАК при ЕрГМУ им. М.Гераци (адрес: РА, 0025 г. Ереван, ул. Корюна 2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ЕрГМУ им. М. Гераци.
Автореферат разослан 9 ноября 2010 г.

Ученый секретарь специализированного совета,
доктор медицинских наук Т.Г.Авакян

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Մ.Հերացու անվան ԵՊԲՀ-ում:

Գիտական ղեկավար՝ կենսաբանական գիտ. դոկտոր
Ա.Ս.Հովհաննիսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ բժշկական գիտ. դոկտոր
Հ.Վ. Թոփչյան

քիմիական գիտ. դոկտոր,
պրոֆեսոր Հ.Գ. Խաչատրյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ օրգանական և դեղագործական քիմիայի գիտատեխնոլոգիական կենտրոնի Ա.Լ. Մնջոյանի անվան նուրբ օրգանական քիմիայի ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2010թ. դեկտեմբերի 9-ին, ժ. 14^{00} -ին Մ.Հերացու անվ. ԵՊԲՀ-ում գործող ԲՈՀ-ի 026 «Տեսական բժշկություն» մասնագիտական խորհրդում (հասցե՝ ՀՀ, ք. Երևան 0025, Կորյունի 2):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Մ.Հերացու անվան ԵՊԲՀ-ի գրադարանում:
Սեղմագիրն առաքված է 2010թ. նոյեմբերի 9-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
բժշկական գիտությունների դոկտոր Տ.Գ.Ավագյան

4414-2010

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одним из актуальных направлений современной фармакологии и фармации является исследование фармакокинетики лекарств на основе регистрации их уровня в слюне. Слюна, как матрица для определения уровня биологически активных соединений, привлекает внимание исследователей уже более 80 лет, а последние 5 лет ознаменовались многочисленными исследованиями биоэквивалентности лекарств на основе регистрации их концентрации в слюне (Hu S. et al., 2006; Król K., Grocholewicz K., 2007; Takatsuji K. et al., 2008; Hu S. et al., 2008; Thomson A.H. et al., 2007; Ryan J. et al., 2009; Park N.J. et al., 2009; Гончаров И.Б. и соав., 2009).

Использование слюны имеет ряд преимуществ: отсутствие риска занесения инфекции в организм, использование относительно малых объёмов биожидкости, возможность многократного отбора проб в течение короткого отрезка времени у большого количества испытуемых, отсутствие необходимости наличия медицинского персонала и лабораторных условий для сбора проб. Применение слюны оказалось особо информативным и полезным при проведении терапевтического мониторинга некоторых лекарств и исследовании их фармакокинетики у амбулаторных пациентов, особенно в детском и пожилом возрасте (Baumann R.J., 2007; Mullangi R. et al., 2009). Однако, несмотря на все перечисленные преимущества, в исследованиях биоэквивалентности слюна используется крайне редко (Оганесян А.С. 2004; Кондратенко С.Н., 2009).

Эффективность применения слюны в исследованиях биоэквивалентности можно существенно повысить, разработав методологию рационального отбора проб слюны и методы интерпретации кинетических параметров, полученных при анализе уровня лекарств в слюне, использование которых даст возможность достаточно полно охарактеризовать скорость и степень всасывания лекарств в организм.

Одним из решений этой проблемы является проведение исследований биоэквивалентности препаратов I группы Системы Биофармацевтической Классификации (СБК) ВОЗ (биовейверов). При оценке биоэквивалентности биовейверов, решающее значение приобретает их эквивалентность по тесту «Растворение». Многочисленные исследования, проведенные за последние годы, доказали высокую информативность данного теста для точного прогноза скорости и степени всасывания биовейверов в организм (Арзамасцев А.П. и соав., 2004; WHO Working document, 2005; Dressman J.B., 2007; Fagerholm U., 2007). Для данного класса препаратов по разности в скоростях высвобождения активного ингредиента из тестируемого воспроизведенного препарата (дженерика) и оригинального (брендового) препарата можно судить об их биоэквивалентности (Abrahamsson B. and Lennernäs H., 2004).

Таким образом, несомненный интерес представляет исследование возможности использования слюны в качестве анализируемой биожидкости для оценки биоэквивалентности препаратов, не эквивалентных по тесту «Растворение», на примере биовейверов. В случае получения достоверных результатов можно будет разработать методические рекомендации по изучению биоэквивалентности препаратов I группы СКБ, ограничившись только регистрацией изменения их концентрации в слюне.

Исследования, проведенные экспертами ВОЗ убедительно доказывают (рабочий документ ВОЗ № QAS/04.109, 2005), что среди биовейверов первой группы СБК метронидазол является одним из первых кандидатов, данные по тесту «Растворение» которого можно использовать для точного прогноза его скорости и степени всасывания в организм (Aungst B.J., 2000; Emami J. et al., 2006).

Метронидазол включен в список эссенциальных лекарств, характеризуется высокой растворимостью и проницаемостью, быстро и полностью всасывается в кровь из желудочно-кишечного тракта. Кроме того, доказано, что не существует риска его пер-

© National Library of Armenia

вичного метаболизма в печени, исключены проявления полиморфизма биотрансформации и резкого изменения профиля всасывания из-за дефицита метаболизирующих ферментов (Lau A.H. et al., 1992). С другой стороны установлено, что концентрация метронидазола после его приема внутрь в слюне и крови примерно одинакова (Kaye C.M. et al, 1980; Van Oosten M.A.C. et al., 1986; Mustofa A., 1991; Aungst B.J., 2000; Pähkla E. et al., 2005; Emami I.J., 2006). На основе имеющихся данных по фармакокинетике метронидазола большинство исследователей рекомендуют использовать слюну для изучения его биоэквивалентности (Kaye C.M. et al., 1980; Van Oosten M.A.C. et al., 1986; Mustofa A., 1991; Emami I.J., 2006). Однако до настоящего времени, такие исследования не проводились.

Таким образом, анализируя имеющиеся данные можно заключить, что на примере использования метронидазола, можно разработать методические рекомендации по изучению биоэквивалентности препаратов I группы СБК, на основе регистрации их концентрации в слюне. Наличие таких разработок позволит более эффективно использовать слюну при изучении биоэквивалентности препаратов I группы СБК, когда необходим отбор большого количества проб у большого количества испытуемых, и существенно повысить эффективность использования слюны для исследования биоэквивалентности.

Цель и задачи исследования. Цель настоящего исследования – выявление наиболее эффективных методов использования слюны для исследования биоэквивалентности биовейверов на примере метронидазола.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи:

1. Провести контроль качества таблеток метронидазола, имеющих различное качество и количество вспомогательных веществ, согласно требованиям фармакопеи США (USP XXVI).
2. Осуществить сравнительный анализ профилей растворения исследуемых препаратов согласно требованиям ВОЗ.
3. Оптимизировать условия проведения теста «Растворение» для экспресс-анализа таблеток метронидазола и быстрого выявления фармацевтически не эквивалентных таблеток.
4. Разработать и валидировать метод определения метронидазола в слюне.
5. Провести сравнительный анализ изменения концентрации метронидазола в слюне и крови после приема таблеток метронидазола.
6. Исследовать фармакокинетику препаратов метронидазола, отличающихся по тесту «Растворение», на основе регистрации его концентрации в слюне.
7. Разработать оптимальную схему использования слюны для исследования биоэквивалентности биовейверов первой группы.

Научная новизна работы.

1. Исследована биоэквивалентность метронидазола на основе регистрации его концентрации в слюне.
2. Разработан и валидирован новый чувствительный и воспроизводимый метод определения метронидазола в слюне.
3. Оптимизированы условия проведения экспресс теста «Растворение» для таблеток метронидазола.
4. Установлено, что при использовании слюны для исследования биоэквивалентности биовейверов первой группы, хорошо проникающих в слюну, определяющим является стабильность соотношения концентрации активного ингредиента в слюне и крови.

Научно-практическая ценность работы.

1. Даны рекомендации по использованию разработанного метода теста «Растворение» для изучения влияния вспомогательных веществ на растворимость таблеток метронидазола.
2. Разработанный экспресс-метод для контроля качества таблеток метронидазола по тесту «Растворение» внедрен в работу лаборатории контроля качества ООО «Арпимед».
3. На примере исследования метронидазола разработана и апробирована модель, которая может быть использована для оценки биоэквивалентности препаратов I группы СБК, на основе регистрации их концентрации в слюне.

Внедрение результатов исследований. Полученные данные использованы в работе Экспертно-аналитической лаборатории Научного центра экспертизы лекарств и медицинских технологий МЗ РА. Разработанный экспресс-метод для контроля качества таблеток метронидазола по тесту «Растворение» внедрен в работу лаборатории контроля качества ООО «Арпимед» (Акт о внедрении от 31.03.2010).

Апробация материалов диссертации. Результаты работы докладывались на заседаниях Научного общества фармации и фармакологии (2008-2010). Ученого Совета Научного центра экспертизы лекарств и медицинских технологий МЗ РА (2005-2008). Ученного Совета Экспертного Центра МЮ РА (2009-2010). Международной Конференции «Сотрудничество РЭНЦ в Химии, Биологии и Медицине», Агверан, 21-24 сентября, 2008 и IV Международной Конференции «Современные аспекты реабилитации в медицине», Агверан, 22-24 сентября, 2009.

Публикация работ. По теме диссертации опубликовано 9 работ.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста, включая 24 рисунка и 36 таблиц, состоит из введения, и 3 глав: обзора литературы, описания методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 173 источника.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы следующие покрытые и не покрытые оболочкой таблетки метронидазола:

1. ***«Клион»***, Гедеон Рихтер А.О., Будапешт–Венгрия (состав: 250 мг метронидазол и 7 вспомогательных веществ);

2. ***«Метронидазол-Санавита»***, Санавита Верне, Германия (состав: 250 мг метронидазол и 5 вспомогательных веществ);

3. ***«Метронидазол-НОВА»***, Индустриа Фармасютика НОВА Аргентина, Милан, Италия (состав: 250 мг метронидазол и вспомогательные вещества);

4. ***«Клонт»***, Медохемие ООО, Лимасол, Кипр (состав: 250 мг метронидазол и вспомогательные вещества);

5. ***«Метронидазол-Арпимед»***, ООО «Арпимед», Армения (состав: 250 мг метронидазол и 4 вспомогательных веществ);

6. ***«Метронидазол-Фармстандарт»***, ОАО "Фармстандарт-Лексредства", г. Курск, Россия (состав: 250 мг метронидазол и 3 вспомогательных веществ);

7. ***«Трихопол»***, "POLPHARMA" S.A., Старогард, Польша (состав: 250 мг метронидазол и 3 вспомогательных веществ);

8. ***«Метронидазол Никомед»***, «Никомед Дания А/С», Дания (состав: 500 мг метронидазол и 7 вспомогательных веществ);

© National Library of Armenia

9. *«Флагил 500»*, "Aventis Pharma S.A.", İstambul, Турция (состав: 500 мг метронидазол и вспомогательные вещества);
10. *«Флагил 250»*, Рон-Пуленик Рорер, Париж, Франция (состав: 250 мг метронидазол и 5 вспомогательных веществ);
11. *«Флазол Форт»*, Асия Фармасютикал Индастриз, Сирия (состав: 500 мг метронидазол и 5 вспомогательных веществ);
12. *«Юник Метрогил 200»*, "Юник Фармасьютикал Лабораториз", Индия (состав: 200 мг метронидазол и 14 вспомогательных веществ).

Основные аналитические приборы. 1) Аппарат определения растворения твердых лекарственных форм «ERWEKA DT-6» (Германия). 2) Спектрофотометр «Beckman DU640i UV/VIS Spectrophotometer», BECKMAN (США). 3) Высокоэффективный жидкостной хроматограф «Waters 480», Waters (США). 4) Газовый хроматограф «Кристалл 2000М», Хроматек (Россия).

Стандарты и реактивы. В работе использованы реактивы производства фирмы «Sigma Aldrich» (США) и «Carl Roth» (Германия). В качестве стандарта метронидазола использовался «Метронидазол рабочий стандарт, № 3600, Polpharma» (Польша).

Количественное определение метронидазола по USP XXVI. Количественное определение метронидазола проводили по USP XXVI. Хроматографирование проводили в следующих условиях: *мобильная фаза*: смесь вода:метанол (80:20); *колонка:* SUPELCOSIL™ ABZ+PLUS – 5 µm (25 см x 4,6 mm ID); *детектор:* Waters 480 Tunable Absorbance Detector, 254-нм; *насос:* Waters 626 Pump; *скорость потока:* 1 мл/мин.

Условия проведения теста «ццццццццццц». Согласно рекомендациям ВОЗ (WHO working document QAS/04.062, 2004) для препаратов 1-ой группы СБК изучение профилей растворения проводилось в трех нижеприведенных системах:
1) Среда растворения: 500 мл искусственный желудочный сок с pH 1,2; аппарат: вращающиеся лопасти; скорость вращения лопастей: 75 об/мин; температура среды: 37,1°С.
2) Среда растворения: 500 мл ацетатный буфер с pH 4,5; аппарат: вращающиеся лопасти; скорость вращения лопастей: 75 об/мин; температура среды растворения: 37,1°С.
3) Среда растворения: 500 мл фосфатный буфер с pH 6,8; аппарат: вращающиеся лопасти; скорость вращения лопастей: 75 об/мин; температура среды: 37,1°С.

В процессе проведения теста «Растворение» анализировали по 12 таблеток одной серии каждого производителя. Помещали по одной таблетке в среду растворения, пробы для анализа (10 мл из среды растворения) отбирали через 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 и 120 мин после начала эксперимента и фильтровали. Для фильтрования аликвот, отобранных из среды растворения, использовали фильтр MN 640d. Определение содержания метронидазола, высвободившегося в среду растворения, проводилось методом УФ-спектрофотометрии. Оптическая плотность метронидазола измерялась при длине волны 274±2 нм в среде растворения искусственный желудочный сок и при длине волны 320±2 нм в ацетатном и фосфатном буферах. Измерения проводили в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см по сравнению со средой растворения, используемой в качестве раствора сравнения.

Добровольцы. На проведение исследования фармакокинетики метронидазола было получено разрешение Этического комитета МЗ РА и Научного центра экспертизы лекарств и медицинских технологий МЗ РА (№0306002809). Исследования проводили у 12 здоровых добровольцев обоего пола (6 мужчин и 6 женщин), давшие письменное информированное согласие на участие в исследованиях и соответствующие критериям включения/исключения, описанным в Протоколе исследования. В Индивидуальных регистрационных формах фиксировался состояние здоровья добровольцев, последовательность приемов препаратов, а препараты – в виде кодов: «Клион», рандомизировались

в группу «А», «Флагил 250» – в группу «В», «Метрогил» – в группу «С». Средний возраст добровольцев составлял 35,58±14 г, рост 173±7 см, вес 65,1±10 кг, индекс массы тела 22±3 м/кг^2. Добровольцы, принимали 1 таблетку метронидазола натощак. Питание добровольцев и отбор проб проводился в одинаковых условиях. При одном приеме препарата из каждого добровольца отбиралось 9-10 проб в течение 24 часов. В процессе исследования проводился постоянный контроль состояния здорового добровольца. Перерыв между приемами исследуемых препаратов составлял 14 дней.

Отбор и хранение образцов слюны. Слюну отбирали до начала приема (0 час) и через 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8 и 24 часов после приема препаратов, используя метод, предложенный Международной ассоциацией стоматологов (FDI, 1992). Отобранную слюну (1-2 мл) фильтровали, и полученные фильтраты содержались в холодильнике при температуре -20°С, до момента проведения анализов. После перемешивания к смеси добавлялось 2,0 мл метанола, смесь интенсивно встряхивалась в течение 1 мин и центрифугировалась при 1500 об/мин в течение 5 мин для осаждения белков.

Отбор и хранение образцов крови. Кровь (6-8 мл) отбиралась в стандартные гепаринизированные пробирки на 10 мл из локтевой вены опытным, официально допущенным к проведению исследования врачами антидопинговой службы. Отбор крови проводили с помощью специальных вакуумных игл (вакутайнеров) до начала приема (0 час) и 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8 и 24 часов после приема препарата. Отобранному образцу крови присваивался идентичный с пробами слюны код в соответствии с Индивидуальной регистрационной формой. Отобранный образец крови сразу же подвергался центрифугированию при 2000 об/мин в течение 15 мин для отделения плазмы, и образцы плазмы помещались в холодильник, где содержались при температуре –20°С до момента проведения анализов.

Метод количественного определения метронидазола в слюне и крови.

Схема анализа образцов слюны. К 0,2 мл слюны добавлялось 0,1 мл метанола (контрольный образец) или 0,1 мл смеси стандарта метронидазола и метилстеарата (внутренний стандарт, 0,1 мг/мл) в метаноле. После перемешивания к смеси добавлялось 2,0 мл метанола, смесь интенсивно встряхивалась в течение 1 мин и центрифугировалась при 1500 об/мин в течение 5 мин для осаждения белков. Безбелковый супернатант отделялся и упаривался до суха на роторном испарителе при температуре 50°С, остаток растворялся в 100 мкл уксусного ангидрида и выдерживался при температуре 70°С в течение 20 мин, после чего из полученной смеси отбирали 1 мкл и вводили в хроматограф.

Схема анализа образцов плазмы крови. К 0,5 мл плазмы крови добавлялось 0,4 мл метанола (контрольный образец) или смеси стандарта метронидазола и метилстеарата (внутренний стандарт, 0,1 мкг/мл) в метаноле. Смесь перемешивалась и центрифугировалась при 2000 об/мин в течение 5 мин для освобождения от белков. Полученный супернатант анализировали как слюну (см. выше).

Условия проведения хроматографического анализа. Хроматографическое определение метронидазола проводилось в следующих условиях: *детектор* – пламенно-ионизационный, *колонка* – кварцевая капиллярная – DB-5 (30м×0,25мкм×0,25мкм), *газноситель* – азот, *скорость потока* – 40 мл/мин, *деление потока* – 1:20, *температура испарителя* – 250°С, *температура детектора* – 280°С, *температура колонки* меняется от 100 до 280°С со скоростью 10 °С/мин, объем вводимой пробы – 1 мкл, время анализа – 20 минут.

Валидация методов. В соответствии с требованиями ICH Q2B CPMP/ICH/281/95, методики количественного определения метронидазола в процессе испытания по тесту «Растворение» были валидированы по следующим валидационным характеристикам: *специфичность, линейность, правильность и точность, повторяемость в течение одно-*

© National Library of Armenia

го дня и в разные дни. Валидацию метода определения метронидазола в биожидкостях выполняли в соответствии с требованиями FDA по следующим характеристикам: *специфичность, селективность, линейность и диапазон, точность и правильность, стабильность, фактор разбавления и степень извлечения* (Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, FDA, 2001).

Расчет фармакокинетических параметров. Расчет фармакокинетических параметров исследуемых препаратов был проведен с помощью известной фармакокинетической программы Kinetica 4.4.1 (Termo Electron Corporation, 2004). Использовали следующие фармакокинетические параметры: C_{max} - максимальная концентрация препарата в плазме крови, (мкг/мл); t_{max} - время достижения максимальной концентрации в плазме крови, (час); AUC_{0-t} - площадь под фармакокинетической кривой в диапазоне от 0 до последней экспериментальной точки на кривой, (мкг · час/мл); $AUC_{0-\infty}$ - площадь под фармакокинетической кривой $=AUC_{0-t}+C_t/Kel$, где C_t последняя зарегистрированная концентрация, (мкг · час/мл); K_{el} - константа скорости элиминации на линейной части кривой, ($час^{-1}$); $t_{½}$ - период полувыведенияе $= \ln_2/ K_{el}$ (час).

Статистический анализ: Статистический анализ выполнен при помощи программ Statistic for Windows 6.0 и Microsoft Excel 2003. Рассчитывался 95% доверительный интервал и вариация (ANOVA) для отношения средних геометрических значений зависимых от концентрации параметров с использованием логарифмических преобразования значений $AUC_{0-\infty}$, AUC_{0-t} и C_{max}. Для сравнения параметров t_{max} и $t_{1/2}$, использовали непараметрические статистические методы (Wilcocxon test).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Количественное содержание метронидазола в исследуемых таблетках. Количественное определение метронидазола проводили по USP XXVI (табл. 1).

Таблица 1.

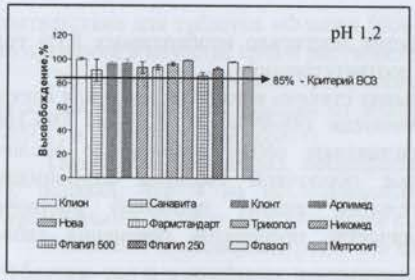
Количественное содержание метронидазола в исследуемых таблетках, n=20.

Препарат	Содержание метронидазола, мг/таблетка
Клион	250,32 ± 0,42
Флагил 250	246,83 ± 0,38
Метрогил	205,63 ± 0,42

Результаты исследования скорости высвобождения метронидазола из таблеток. Результаты исследования растворения таблеток метронидазола представлены на рисунках 1 и 2.

Как видно из графиков, при использовании в качестве среды растворения раствор ИЖС с pH 1,2, для всех испытуемых препаратов было зарегистрировано высвобождение более 85% метронидазола за 15 мин, что полностью соответствовало требованиям ВОЗ. Соответствие требованиям практически любой из Фармакопей и НТД производителей отмечалось и через 45 мин после начала теста «Растворение». При использовании среды растворения ацетатный буфер с pH 4,5 и фосфатный буфер с pH 6,8 были выявлены значительные различия в полученных результатах.

Так, в отличие от остальных исследуемых препаратов, процент высвобождения метронидазола из таблеток «Санавита», «Нова», «Флагил 500» и «Метрогил» в данных средах растворения через 15 мин после начала теста был ниже 85%.



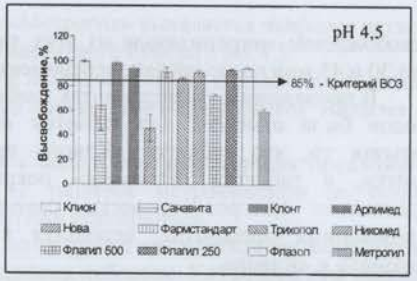


Рисунок 1. Сравнение высвобождения метронидазола в среде растворения ИЖС с pH 1,2 и в среде растворения ацетатный буфер с pH 4,5, через 15 мин после начала теста «Растворение» из испытуемых таблеток, n=12.

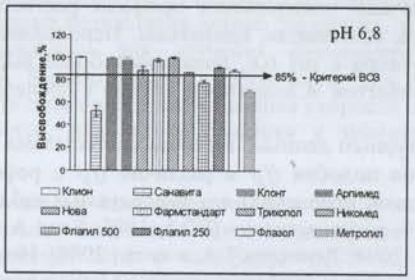


Рисунок 2. Сравнение высвобождения метронидазола в среде растворения фосфатный буфер с pH 6,8, через 15 мин после начала теста «Растворение» из испытуемых таблеток, n=12.

Таблица 2.

Сравнение высвобождения метронидазола из испытуемых таблеток через 15 мин после начала теста «Растворение», n=12.

Среда растворения	Высвобождение, % (n=12)											
	Клион	Санавита	Клонт	Арпимед	Нова	Фармстандарт	Трихопол	Никомед	Флагил 500	Флагил 250	Флазол	Метрогил
pH 1,2	**100,21**	90,79	96,55	97,01	93,18	93,47	96,19	**99,43**	86,43	92,25	97,77	94,08
pH 4,5	**99,84**	***64,01***	99,06	94,24	***45,66***	91,29	85,76	**97,07**	***72,13***	92,90	94,11	***59,54***
pH 6,8	**100,28**	***52,03***	99,20	97,58	88,43	97,56	99,73	**96,52**	***77,39***	90,78	87,86	***69,50***

Из таблицы 2 видно, что как при использовании в качестве среды растворения ацетатного буфера с pH 4,5, так и при использовании фосфатного буфера с pH 6,8 отмечены статистически достоверные различия между испытуемыми препаратами: в среде растворения ацетатного буфера с pH 4,5 наименьшая степень высвобождения отмечается из таблеток «Нова» – 45,66±13%, далее «Метрогил» – 59±11%, «Санавита» – 64,01±15% и «Флагил 500» – 72,13±4,5 %, а в среде растворения фосфатного буфера с pH 6,8 наименьшая степень высвобождения метронидазола отмечается из таблеток «Санавита» – 52,03±4,7%, далее «Метрогил» – 69,50±7,3% и «Флагил 500» – 77,39±7,1%.

© National Library of Armenia

Высвобождение метронидазола из этих таблеток достигало необходимых 85% только через 30 и 45 мин после начала эксперимента соответственно.

В проведенных экспериментах наибольшая степень высвобождения для всех трех методов была отмечена для таблеток «Никомед» (98-99%) и «Клион» (99-100%). Учитывая то, что таблетки «Клион» представляют собой непокрытые оболочкой таблетки, а таблетки «Никомед» покрытые оболочкой таблетки метронидазола, представляло интерес провести сравнительный анализ профилей растворения исследованных препаратов, используя в качестве препаратов сравнения таблетки «Никомед» и «Клион».

Сравнительная оценка профилей растворения исследуемых препаратов при использования различных сред растворения. Установлено, что при использовании ИЖС с pH 1,2, скорость высвобождения метронидазола из непокрытых таблеток «Санавита» и «Нова» несколько ниже, чем из других исследованных таблеток. Однако через 15 мин после начала эксперимента профили растворения всех исследуемых образцов, кроме таблеток «Санавита», одинаковы. Использование ацетатного буфера с pH 4,5 и фосфатного буфера с pH 6,8, показывает более выраженное несоответствие профилей растворения таблеток «Санавита» и «Нова» к препарату сравнения «Клион» и другим препаратам.

Согласно литературным данным, в случае соответствия референтному препарату величины коэффициентов подобия *(f_2)* и различия *(f_1)* с референтным препаратом (в данном случае с препаратом сравнения) для исследуемых таблеток должны быть выше 50% и не превышать 15% соответственно (FDA, 1995; Sood A. and Panchagnula R, 1999; Арзамасцев А.П. и соав., 2004; Денисова Т.А. и соав., 2008). Несоответствие для таблеток «Санавита» и «Нова» выявляется наиболее четко при использовании ацетатного буфера с pH 4,5. При использовании данного метода, в отличие от других методов несоответствие характеризуется как величиной коэффициента подобия, так и значением коэффициента различия.

Результаты исследования позволили установить, что при использовании pH 1,2 профили растворения всех исследуемых покрытых оболочкой таблеток практически не отличаются, за исключением препарата «Метрогил». Однако таблетки «Метрогил» все же обеспечивали высвобождение более 85% метронидазола за 30 мин, что соответствовало требованиям к биовейверам. При использовании в качестве среды растворения ацетатного буфера с pH 4,5 и фосфатного буфера с pH 6,8 профили растворения всех покрытых таблеток были идентичны, кроме препаратов «Флагил 500» и «Метрогил». Профили растворения этих препаратов отличались от препарата сравнения («Никомед») и других препаратов, особенно в первые 30 мин после начала теста.

Как и в случае непокрытых оболочкой таблеток, несоответствие для покрытых оболочкой таблеток «Флагил 500» и «Метрогил» выявляется наиболее четко при использовании ацетатного буфера с pH 4,5. При использовании данного метода, в отличие от других методов, несоответствие характеризуется как величиной коэффициента подобия, так и значением коэффициента различия. Коэффициенты подобия таблеток «Флагил 500» и «Метрогил» к препарату сравнения «Никомед» при pH 4,5 составляют 27,02% и 34,22 % соответственно. Аналогичная картина наблюдается и при использовании фосфатного буфера с pH 6,8, однако несоответствие таблеток «Флагил 500» и «Метрогил» в этом случае менее выражено. Значение f_2 для таблеток «Флагил 500» составляло 42,06%, а таблеток «Метрогил» 42,26% соответственно.

Полученные данные подтверждены также результатами расчета дополнительного параметра - коэффициент различия с референтным препаратом, которые показали

несоответствие для таблеток «Флагил 500» и «Метрогил» выявляется наиболее четко при использовании в качестве среды растворения ацетатного буфера с pH 4,5.

Статистический анализ, проведенный с помощью t-теста, показал наличие статистически достоверных отклонений от критерия соответствия для таблеток «Флагил 500» ($P<0,001$) и «Метрогил» ($P<0,001$).

Таким образом, анализ, проведенный с использованием методик предложенных ВОЗ, показал, что 4 из исследованных 12 таблеток метронидазола не являются эквивалентными по тесту «Растворение» с другими препаратами.

Выявлены достоверные различия как по скорости высвобождения метронидазола из таблеток, так и в профилях растворения данных таблеток. Коэффициенты подобия и различия этих препаратов достоверно отличаются от необходимого критерия, причем при использовании следующего метода: *среда растворения:* 500 мл ацетатного буфера с pH 4,5; *аппарат*: вращающиеся лопасти, *скорость вращения лопастей*: 75 об/мин, *температура среды растворения*: 37,1°C, эти различия наиболее выражены.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что использование данного метода является оптимальным для изучения фармацевтической эквивалентности таблеток метронидазола. Можно также предположить, что наличие большого числа вспомогательных веществ повышает риск изменения скорости и степени высвобождения метронидазола из таблеток, что может привести к значительному изменению его биоэквивалентности.

Сравнительный анализ изменения концентрации метронидазола в слюне и плазме крови. Сравнительный анализ изменения концентрации метронидазола в слюне и крови добровольцев показал, что в интервале 0,5-8 час соотношение уровней метронидазола в слюне и крови добровольцев практически одинаково и составляет 0,96±0,07 (рис. 3). В то же время, через 24 часа величина соотношение концентрации метронидазола в слюне и крови достоверно ниже, чем в интервале 0,5-8 час и составляет 0,836±0,035 (P=0,0002).

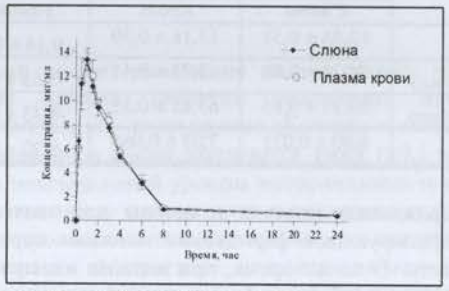


Рисунок 3. Сравнительный анализ изменения концентрации метронидазола в слюне и крови добровольцев.

Как видно из таблицы 3 фармакокинетические параметры метронидазола, полученные после анализа изменения его концентрации в слюне и крови, примерно одинаковы. Вместе с тем необходимо отметить, что скорость выведения метронидазола из слюны несколько выше, чем из крови, независимо от продолжительности отбора проб. Однако при отборе проб в интервале 0,5-8 час разница в величинах $t_{1/2}$ составляет -0,056±0,11 час, тогда как при использовании интервала 0,5-24 часа она существенно больше и равна -0,221±0,07 час (табл. 3).

© National Library of Armenia

Статистический анализ фармакокинетических параметров метронидазола полученных после анализа изменения его концентрации в слюне и крови, в интервале 0-24 часа показал, что в величинах основных фармакокинетических параметров метронидазола, за исключением C_{max} наблюдаются статистически достоверные различия.

Таблица 3.

Фармакокинетические параметры метронидазола, полученные после анализа изменения его концентрации в слюне и крови в интервале 0-8 час и 0-24 часа после приема препарата «Клион», (n=3). Средние значения ± SD.

Параметры	Интервал: 0-8 час		Интервал: 0-24 час	
	Слюна	Кровь	Слюна	Кровь
C_{max} (мкг /мл)	13,328±0,927	13,183±0,684	13,328±0,927	13,183±0,684
t_{max} (час)	1,000±0,000	1,000±0,000	1,000±0,000	1,000±0,000
AUC_{0-t}, (мкг · час/мл)	49,046±1,536	51,168±1,109	60,101±1,462	63,731±0,772
$AUC_{0-\infty}$, (мкг · час/мл)	51,804±1,532	54,221±1,184	63,374±1,474	67,828±0,561
$t_{½}$, (час)	6,970±0,170	7,026±0,114	6,800 ± 0,021	7,030 ± 0,065

Статистический анализ фармакокинетических параметров метронидазола, полученных после анализа изменения его концентрации в слюне и крови, в интервале 0,5-24 часа после приема препарата Клион, приведен в таблице 4.

Таблица 4.

Статистический анализ фармакокинетических параметров метронидазола полученных после анализа изменения его концентрации в слюне и крови в интервале 0,5-24 часа после приема препарата «Клион».

Параметры	Средние значения		Средняя для разницы	*t*	*P*
	Слюна	Кровь			
C_{max} (мкг /мл)	13,33 ± 0,53	13,18 ± 0,39	0,14 ± 0,66	0,2	0,837
AUC_{0-t}, (мкг · час/мл)	60,10 ± 0,80	63,73 ± 0,41	-3,63 ± 0,95	3,8	0,019
$AUC_{0-\infty}$, (мкг · час/мл)	63,37 ± 0,85	67,83 ± 0,33	-4,45 ± 0,91	4,9	0,008
$t_{½}$, (час)	6,80 ± 0,021	7,03 ± 0,065	-0,22 ± 0,07	3,2	0,032

Наиболее выраженные отличия отмечены для значения $AUC_{0-\infty}$, (P=0,081), которое является профилирующим фармакокинетическим параметром при исследованиях биоэквивалентности. В то же время, при анализе изменения его концентрации в слюне и крови в интервале 0,5-8 часов фармакокинетические параметры метронидазола статистически не отличаются (табл. 5).

Полученные результаты коррелируют с литературными данными. Так, в исследованиях Van Oosten M.A.C. и соав. (1986) было обнаружено, что после приема внутрь 750 мг метронидазола, наибольшая разница в концентрациях метронидазола в слюне и крови регистрировалась через 24 час и составляла 15% (соотношение слюна/кровь 0,85), тогда как в интервале 0-12 час она не превышала 10% (Van Oosten M.A.C. и соав., 1986).

Таблица 5.

Статистический анализ фармакокинетических параметров метронидазола полученных после анализа изменения его концентрации в слюне и крови в интервале 0,5-8 час после приема препарата «Клион».

Параметры	Средние значения		Средняя для разницы	*t*	*P*
	Слюна	Кровь			
C_{max} (мкг /мл)	13,33 ± 0,53	13,18 ± 0,39	0,145 ± 0,66	0,2	0,837
AUC_{0-t}, (мкг · час/мл)	49,05 ± 0,88	51,17 ± 0,64	-2,12 ± 1,09	1,9	0,120
$AUC_{0-\infty}$, (мкг · час/мл)	51,80 ± 0,88	54,22 ± 0,68	-2,42 ± 1,11	2	0,090
$t_{½}$, (час)	6,970 ± 0,098	7,03 ± 0,06	-0,056 ± 0,11	0,4	0,660

Учитывая то, что при использовании интервала 0,5-8 час, разница между значениями $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} составляет 6%, что удовлетворяет требованиям по изучению биоэквивалентности (не более 20%), можно заключить, что использование данного интервала необходимо и достаточно для получения достоверных результатов при исследовании биоэквивалентности метронидазола. Отбор проб на протяжении 24 час, хотя и является более правильным при использовании крови, однако не представляется приемлемым для слюны, так как в этом случае концентрация в слюне не будет правильно отображать уровень метронидазола в крови.

Таким образом, можно заключить, что для исследований фармакокинетики метронидазола более точным будет изучение изменения концентрации препарата в слюне в интервале 0-8 час, когда соотношение его уровней в слюне и крови практически не изменяется.

Исходя из полученных результатов, дальнейшее исследование возможности использования слюны для исследования биоэквивалентности метронидазола проводилось на основе регистрации его концентрации в слюне в интервале 0,5-8 час после приема препарата.

Сравнительный анализ изменения концентрации метронидазола в слюне добровольцев после приема таблеток различных производителей. Анализ полученных данных показал, что после приема «Клиона» и «Флагила 250» максимальная концентрация метронидазола в слюне достигается через 1±0,1 час, а «Метрогила» через 1,7±0,4 час. При этом максимальный уровень метронидазола после приема «Метрогила» почти на 30% ниже, чем после приема других исследованных таблеток. Выраженные различия в кинетике метронидазола отмечаются так же в интервале 2-4 час после приема препаратов. В случае приема «Метрогила», концентрация метронидазола с течение 2 час (от 2 до 4 час), снижается на 44%, а для «Клиона» и «Флагила 250» на 55%. Период полувыведения метронидазола после приема «Метрогила», так же несколько больше по сравнению с другими препаратами, однако различия статистически не достоверны (рис. 4, табл. 6).

Результаты анализа показали, что соотношение значений максимальных концентраций метронидазола (C_{max}), его общего содержания в крови (AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$) при приеме таблеток «Клион» и «Флагил 250» составляет 98%, что указывает на биоэквивалентность «Клиона» и «Флагила 250». Разница в величинах времени достижения максимальной концентрации (t_{max}) и периода полувыведения ($t_{½}$) составляет 4,5% и 0,5% соответственно, что соответствует критериям биоэквивалентности (не более 20%).

© National Library of Armenia

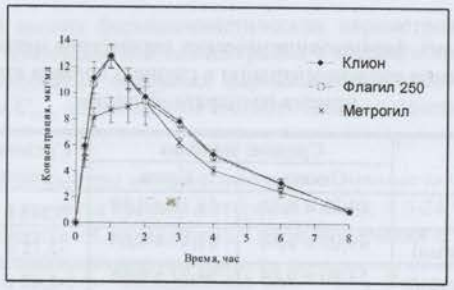


Рисунок 4. Изменение концентрации метронидазола в слюне после приема таблеток «Клион», «Флагил 250» и «Метрогил».

Таблица 6.

Сравнительный анализ фармакокинетических параметров метронидазола после приема таблеток «Клион», «Флагил 250» и «Метрогил» (n=12). Средние значения ± SD.

Параметры	«Клион»	«Флагил 250»	«Метрогил»
C_{max}, мкг /мл	12,884 ± 0,839	12,706 ± 0,864	10,177± 0,818
t_{max}, час	0,958 ± 0,144	1,000 ± 0,000	1,708 ± 0,450
AUC_{0-t}, мкг · час/мл	48,636 ± 1,375	47,735 ±- 2,007	38,778 ± 2,075
$AUC_{0-\infty}$, мкг · час/мл	51,272 ± 1,390	50,594 ± 2,355	41,146 ± 2,350
$t_{½}$, час	6,903 ± 0,162	6,970 ± 0,157	7,046 ± 0,246

Наряду с этим, величины C_{max}, AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ метронидазола при приеме таблеток «Метрогил» составляют всего 55-60% от аналогичных значений, полученных как для «Клиона», так и для «Флагила 250». При приеме «Метрогила» отмечено так же резкое увеличение времени достижения максимальной концентрации метронидазола по сравнению с его t_{max} поле приема «Клиона» и «Флагила 250» на 78,26 % и 70,83 % соответственно. Наряду с этим, величины $t_{½}$ метронидазола после приема исследуемых препаратов статистически не различаются, составляя примерно 6-7 часов.

С учетом того, что содержание активного ингредиента в исследуемых таблетках отличается (табл. 1), полученные значения фармакокинетических параметров зависящих от дозы, необходимо было корректировать по содержанию метронидазола. Скорректированные соотношения профилирующих фармакокинетических параметров метронидазола приведены в таблице 7.

Как видно из таблицы 7, скорректированная величина соотношения основных фармакокинетических параметров метронидазола после введения таблеток «Клион», «Флагил 250» и «Метрогил» составляет 60-70%, что меньше нижнего предела критического предела биоэквивалентности (80%). В то же время таблетки «Клион», «Флагил 250» являются биоэквивалентными.

Таким образом, можно заключить, что таблетки «Метрогил» не являются биоэквивалентными по отношению к таблеткам «Клион» и «Флагил 250».

Сравнительный анализ результатов полученных при проведении теста «Растворение» и исследовании фармакокинетики метронидазола. Согласно рекомендациям FDA и ВОЗ биовейверы первой группы системы биофармацевтической классификации должны при проведении теста «Растворение» обеспечивать высвобождение более 85% активного ингредиента за 15 мин при pH среды растворения 1,2, 4,5 и

6,8 (Cheng C.L. et al., 2004; WHO technical report series, 2006). При выполнении данного условия референтный препарат и препарат-дженерик считаются фармацевтически эквивалентными и это дает основание сделать прогноз об их биоэквивалентности.

Таблица 7.

Скорректированные соотношения профилирующих фармакокинетических параметров метронидазола.

Параметры	**«Флагил»**	**«Клион»**	***Критическое значение***
Содержание активного вещества	246,8 мг	250,3 мг	-
Разница, мг	-3,5 мг		-
Скорректированное соотношение C_{max}	100,029		***80%-120%***
Скорректированное соотношение AUC_{0-t}	99,532		***80%-120%***
Скорректированное соотношение $AUC_{0-\infty}$	100,059		***80%-120%***
Параметры	**«Метрогил»**	**«Клион»**	***Критическое значение***
Содержание активного вещества	205,6 мг	250,3 мг	-
Разница, мг	-44,67		-
Скорректированное соотношение C_{max}	69,25%		***80%-120%***
Скорректированное соотношение AUC_{0-t}	69,84%		***80%-120%***
Скорректированное соотношение $AUC_{0-\infty}$	70,31%		***80%-120%***
Параметры	**«Метрогил»**	**«Флагил»**	***Критическое значение***
Содержание активного вещества	205,6 мг	246,8 мг	-
Разница, мг	-41,17		-
Скорректированное соотношение C_{max}	69,23%		***80%-120%***
Скорректированное соотношение AUC_{0-t}	70,21%		***80%-120%***
Скорректированное соотношение $AUC_{0-\infty}$	70,30%		***80%-120%***

В случае наличия приемлемой корреляции между скоростью высвобождения метронидазола из таблеток через 15 мин после начала теста «Растворение» и величиной его биоэквивалентности, с использованием слюны, можно заключить, что разработанная в ходе работы модель использования слюны может послужить основой для разработки аналогичных моделей и для других биовейверов. Сравнительный анализ результатов полученных при проведении теста «Растворение» и исследовании фармакокинетики метронидазола с использованием слюны приведен в таблице 8. Из таблицы видно, что величина биоэквивалентности пропорционально изменяется с изменением скорости высвобождения метронидазола из таблеток. Наиболее высокая корреляция (r=0,97) отмечена между скоростью высвобождения метронидазола из таблеток через 15 мин после начала теста «Растворение» для среды растворения с pH 4,5 и величиной его биоэквивалентности с использованием слюны. Для среды растворения с pH 6,8 коэффициент корреляции несколько ниже и составляет 0,734.

Интересно отметить тот факт, что использование в качестве среды ИЖС (pH 1,2) оказалось самой малоинформативной для прогноза биоэквивалентности метронидазола. В данной среде, из всех исследуемых таблеток, при проведении теста «Растворение» в течение 15 мин высвобождалось более 85% метронидазола, в то время как скорость и степень всасывания метронидазола при использовании таблеток «Метрогила» была на 30% ниже, чем для остальных препаратов (табл. 7).

Таки образом, полученные в ходе работы результаты позволяют сделать заключение, о том, что использование слюны позволяет получить достоверную информацию о биоэквивалентности метронидазола.

© National Library of Armenia

Таблица 8.

Сравнительный анализ результатов полученных при проведении теста «Растворение» и исследовании фармакокинетики метронидазола с использованием слюны.

Препарат	Высвобождение за 15 мин,%		Биоэквивалентность,%
	pH 4,5	pH 6,8	Слюна
«Клион»	99,838 ± 0,830	100,278 ± 0,500	100
«Флагил»	92,904 ± 3,151	90,775 ± 2,659	99
«Метрогил»	59,535 ± 7,268	69,495 ± 5,894	70

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основе рекомендаций ВОЗ для препаратов первой группы СКБ разработаны и валидированы оптимальные условия проведения теста «Растворение» для таблеток метронидазола.

Проведенный сравнительный анализ профилей растворения 12-ти таблеток метронидазола, отличающихся количественным и качественным составом вспомогательных веществ выявил 4 не эквивалентных по тесту «Растворение» препарата. Данные препараты не обеспечивали требуемое высвобождение метронидазола 85% за 15 минут и резко отличались по профилю растворения от остальных препаратов.

Установлено, что наиболее выраженные различия наблюдаются при использовании следующей методики 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°С.

Таким образом, было показано, что использование данного метода является оптимальным для изучения фармацевтической эквивалентности таблеток метронидазола. Можно также предположить, что наличие большого числа вспомогательных веществ повышает риск изменения скорости и степени высвобождения метронидазола из таблеток, что может привести к значительному изменению его биоэквивалентности.

В случае использования данной методики уже через 15 мин заметны достоверные различия между исследуемыми таблетками, причем в сравнении с другими методами, рекомендуемыми ВОЗ для метронидазола, как для препарата первой группы СБК при pH 4,5 эти различия наиболее выражены.

Разработан новый газ-хроматографический метод определения метронидазола в плазме крови и слюне. Метод по всем валидационным параметрам соответствуют требованиям, предъявляемым для биоаналитических методов, используемых при изучении фармакокинетики, биодоступности и биоэквивалентности лекарств. Сравнивая разработанный метод с уже имеющимся, необходимо отметить, что метод отличается использованием очень малых объемов органических растворителей (примерно 3 мл), что выгодно отличает его от методов ВЭЖХ.

С помощью разработанного метода проведен сравнительный анализ фармакокинетики метронидазола в слюне и крови добровольцев.

Сравнительный анализ изменения концентрации метронидазола в слюне и крови добровольцев показал, что в интервале 0,5-8 час соотношение концентрации метронидазола в слюне и крови добровольцев практически одинаково и составляет 0,958±0,067, что близко к литературным данным 0,87-1,03. В то же время, через 24 часа величина соотношения слюна/кровь достоверно ниже, чем в интервале 0,5-8 час и составляет 0,836±0,035.

Фармакокинетические параметры метронидазола, полученные после анализа изменения его концентрации в слюне и крови примерно одинаковы. Вместе с тем необходимо отметить, что скорость выведения метронидазола из слюны несколько выше, чем из крови, независимо от продолжительности отбора проб. При отборе проб в интервале 0,5-8 час разница в величинах $t_{½}$, в слюне и крови существенно меньше и составляет -0,056±0,11, тогда как при использовании интервала 0,5-24 часа она равна -0,221± 0,07.

Установлено, что при использовании интервала 0,5-24 часа в величинах основных фармакокинетических параметров метронидазола, за исключением значения C_{max} наблюдаются статистически достоверные различия. Наиболее выраженные различия отмечены для значения $AUC_{0-\infty}$ (P=0,081), которое является профилирующим фармакокинетическим параметром при исследованиях биоэквивалентности.

В то же время при анализе изменения концентрации метронидазола в слюне и крови в интервале 0,5-8 часов фармакокинетические параметры статистически не отличаются.

Учитывая то, что при использовании интервала 0,5-8 час, величина интерполируемого участка фармакокинетической кривой препарата составляет примерно 6%, что удовлетворяет требованиям по изучению биоэквивалентности (не более 20%), можно заключить, что использование данного интервала достаточно для получения достоверных результатов при исследовании биоэквивалентности метронидазола. Отбор проб на протяжении 24 час, хотя и является более правильным при изучении фармакокинетики метронидазола в крови, однако не представляется приемлемым для слюны, так как в этом случае концентрация в слюне не будет правильно отображать уровень метронидазола в крови.

Таким образом, установлено, что оптимальной моделью использования слюны для исследований фармакокинетики и биоэквивалентности метронидазола является изучение изменения концентрации препарата в слюне в интервале 0,5-8 час, когда соотношение уровне в слюне и крови практически не изменяется.

В результате испытаний на фармацевтическую эквивалентность с использованием теста «Растворение» для исследований биоэквивалентности метронидазола были отобраны три препарата метронидазола. Высвобождение метронидазола из выбранных препаратов, через 15 мин после начала теста «Растворение» с использованием среды растворения с pH 4,5 составляло для «Клиона» –100%, «Флагила 250» – 90% и «Метрогила» – 60% соответственно. Фактически, исходя из рекомендаций ВОЗ для препаратов первой группы СБК, можно было прогнозировать, что таблетки «Метрогила» могут оказаться не биоэквивалентным по отношению к двум другим препаратам.

Результаты фармакокинетических исследований показали, что после приема «Клиона» и «Флагила 250» максимальная концентрация метронидазола в слюне достигается через 1 час, а «Метрогила» через 1,7 час. При этом максимальный уровень метронидазола после приема «Метрогила» почти на 30% ниже, чем после приема двух других исследованных таблеток. Выраженные различия в кинетике метронидазола отмечаются так же интервале 2-4 час после приема препаратов. В случае приема «Метрогила» концентрация метронидазола в течение 2 часов (от 2 до 4 час) снижается на 44%, а для «Клиона» и «Флагила 250» на 55%. Период полувыведения метронидазола после приема «Метрогила» так же несколько больше по сравнению с другими препаратами, однако различия статистически не достоверны.

Результаты статистического анализа показали, что соотношение значений максимальных концентраций метронидазола (C_{max}) и его общего содержания в крови (AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$) при приеме таблеток «Клион» и «Флагил 250» составляет 98%, что указывает на биоэквивалентность «Клиона» и «Флагила 250». Разница в величинах времени дости-

© National Library of Armenia

жения максимальной концентрации (t_{max}) и периода полувыведения ($t_{½}$) составляет 4,5% и 0,5% соответственно, что соответствует критериям биоэквивалентности (не более 20%).

Наряду с этим, величины C_{max}, AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ метронидазола при приеме таблеток «Метрогил» составляют всего 55-60% от аналогичных значений полученных как для «Клиона», так и для «Флагила 250». При приеме «Метрогила» отмечено так же резкое увеличение времени достижения максимальной концентрации по сравнению с t_{max} метронидазола поле приема «Клиона» и «Флагила 250» на 78,26% и 70,83% соответственно. Наряду с этим, величины $t_{½}$ метронидазола после приема исследуемых препаратов статистически не различаются, составляя примерно 6-7 часов.

Корректировка величины соотношения фармакокинетических параметров зависящих от дозы, по содержанию метронидазола в исследуемых таблетках показала, что величина соотношения основных фармакокинетических параметров метронидазола после введения таблеток «Метрогил», «Клион» и «Флагил 250» составляет:

- для таблеток «Клион» и «Флагил 250» 99-100%, что соответствует критериям биоэквивалентности – 80%-120%.
- для таблеток «Метрогил» и «Клион» 69-70%, что меньше нижнего критического предела биоэквивалентности – 80%.
- для таблеток «Метрогил» и «Флагил 250» 69-70%, что меньше нижнего критического предела биоэквивалентности – 80%.

Таким образом, можно заключить, что исследования, проведенные с помощью регистрации концентрации метронидазола в слюне показали, что таблетки «Метрогил» не являются биоэквивалентными по отношению к таблеткам «Клион» и «Флагил 250», что подтвердило прогноз сделанный на основе исследования теста «Растворение».

При этом было так же установлено, что величина биоэквивалентности пропорционально изменяется с изменением скорости высвобождения метронидазола из таблеток. Наиболее высокая корреляция (r = 0,97) между скоростью высвобождения метронидазола из таблеток через 15 мин после начала теста «Растворение» и величиной его биоэквивалентности отмечена для среды растворения с pH 4,5. Для среды растворения с pH 6,8 коэффициент корреляции несколько ниже и составляет 0,734. Интересно отметить тот факт, что использование в качестве среды искусственного желудочного сока (pH 1,2) оказалось самой малоинформативной для прогноза биоэквивалентности метронидазола. В данной среде, из всех исследуемых таблеток, при проведении теста «Растворение» в течение 15 мин высвобождалось более 85% метронидазола, в то время как было установлено, что скорость и степень всасывания метронидазола в системный кровоток при приеме таблеток «Метрогил» была на 30% ниже, чем для остальных препаратов.

Таки образом, полученные в ходе работы результаты позволяют сделать заключение, о том, что использование слюны позволяет получить достоверную информацию о биоэквивалентности метронидазола.

Обобщая полученные в ходе исследования данные о возможности использования слюны для исследования биоэквивалентности метронидазола, можно предложить следующую модель использования слюны для исследования биоэквивалентности биовейверов первой группы, хорошо проникающих в слюну:

Сравнительный анализ изменения концентрации активного ингредиента в слюне и крови, включающий в себя исследование колебаний соотношения концентрации активного ингредиента в слюне и крови. Межиндивидуальная вариабельность соотношения слюна/кровь не должна превышать 25%.

Выбор длительности и временного интервала отбора проб слюны для исследования фармакокинетики. Это наиболее важный этап исследования, так как он резко отличается от

требований, предъявляемым к исследованиям фармакокинетики по крови. Если в последнем случае оптимальным является продолжительность регистрации уровня активного ингредиента в крови в течение временного интервала равного 4-7 периодам полувыведения исследуемого вещества, то при использовании слюны приоритетным является стабильность соотношения концентрации активного ингредиента в слюне и крови. Можно предположить, что оптимальным будет выбор такого временного интервала отбора проб слюны, когда соотношения слюна/кровь в каждой временной точке отбора проб статистически достоверно не отличается и разница между $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} не превышает 20%.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что наиболее выраженные различия в скорости высвобождения метронидазола из таблеток наблюдаются при использовании в качестве среды растворения 500 мл ацетатного буфера с pH 4,5, аппарата вращающиеся лопасти и скорости вращения лопастей: 75 об/мин.

2. Установлено, что при приеме таблеток метронидазола, отличающихся по профилям растворения при pH 4,5, его профилирующие фармакокинетические параметры (AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$) составляют всего 55-60% от референтных препаратов, что меньше нижнего критического предела биоэквивалентности 80-120%.

3. Показано, что скорость всасывания и максимальный уровень метронидазола в слюне после приема таблетки метронидазола, которые не обеспечивали требуемое высвобождение 85% метронидазола за 15 мин в среде растворения с pH 4,5, на 30% ниже, чем у остальных препаратов метронидазола.

4. Оптимальным временным интервалом изучения изменений концентрации метронидазола в слюне для характеристики фармакокинетики и биоэквивалентности препарата является 0-8 часов, когда соотношение уровней метронидазола в слюне и крови практически не изменяется.

5. На примере метронидазола установлено что, при использовании слюны для исследования биоэквивалентности биовейверов, хорошо проникающих в слюну, определяющим является стабильность соотношения концентрации активного ингредиента в слюне и крови.

© National Library of Armenia

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Хуршудян К.Л., Оганесян А.С. Сравнительный анализ фармакокинетики метронидазола в крови и слюне. // Новый Армянский Медицинский Журнал. –2010. – Том IV. –№1. – С. 75–76.
2. Хуршудян К.Л., Оганесян А.С. Исследование фармакокинетики метронидазола в крови и слюне. // Медицинская наука Армении. –2010. –Том L. –№1. –С. 81–89.
3. Хуршудян К.Л., Оганесян А.С., Мелконян М.А. Разработка и валидация количественного определения метронидазола в слюне методом газовой хроматографии //IV Международная Конференция. Современные аспекты реабилитации в медицине. Ереван-Агверан, 22-24 сентября. –2009. –С. 286–288.
4. Хуршудян К.Л. Исследование фармакокинетики метронидазола на основе регистрации его концентрации в слюне. // ВЕСТНИК МАНЭБ. –2009. –Том 14. –№4(2). –С. 79–83.
5. Хуршудян К.Л. Использование теста на растворение для прогноза всасывания таблеток метронидазола. // Матералы Международной конференции Сотрудничество РЭНЦ в Химии, Биологии и Медицине. Агверан, Армения, 21-24 сентября. –2008. – С. 47.
6. Хуршудян К.Л., Оганесян А.С. Использование теста на растворение для прогноза всасывания таблеток метронидазола. // Медицинская наука Армении. – 2008. –Том XLVIII. –№2. – С. 43–51.
7. Хуршудян К.Л. Исследование возможности использования метода "Теста на растворение" для выявления некачественных, не покрытых оболочкой таблеток метронидазола. // ВЕСТНИК МАНЭБ. –2008. –Том 13. –№4(1). – С. 70–74.
8. Хуршудян К.Л., Оганесян А.С. Пострегистрационный контроль таблеток метронидазола с использованием теста на растворение. // ВЕСТНИК МАНЭБ. – 2006. –Том 11. –№ 8. –С. 123–131.
9. Оганесян А.С., Хуршудян К.Л. Исследование возможности использования "Теста на растворимость" для выявления некачественных препаратов на примере анализа таблеток метронидазола. // ВЕСТНИК МАНЭБ. –2005. –Том 10. –№ 5(2). –С. 132–136.

ԽՈՒՐՇՈՒԴՅԱՆ ՔՐԻՍՏԻՆԵ ԼԻՊԱՐԻՏԻ
ԹՔԻ ՕԳՏԱԳՈՐԾՄԱՆ ՀՆԱՐԱՎՈՐՈՒԹՅԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԵՏՐՈՆԻԴԱԶՈԼԻ ԿԵՆՍԱՀԱՄԱՐԺԵՔՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՄԱՆ ՀԱՄԱՐ
ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հետազոտության նպատակն է մետրոնիդազոլի օրինակի հիման վրա բացահայտել բիովեյվերների կենսահամարժեքության հետազոտության համար թքի օգտագործման արդյունավետ մեթոդները:

Սահմանված նպատակի համապատասխան լուծվել են հետևյալ խնդիրները. համապատասխան ամերիկյան դեղագրքի իրականացվել է մետրոնիդազոլի դեղահատերի որակի ստուգում, որոնք տարբերվում էին օժանդակ նյութերի կազմով և որակով, ԱՀԿ-ի պահանջներին համապատասխան իրականացվել է հետազոտվող դեղերի լուծելիության պրոֆիլների համեմատական վերլուծություն, մետրոնիդազոլի դեղահատերի համար օպտիմալացվել են լուծելիության թեստի իրականացման պայմանները՝ էքսպրես-վերլուծության և դեղաբանորեն ոչ համարժեք դեղահատերի բացահայտման համար, մշակվել և վալիդացվել է թքի մեջ մետրոնիդազոլի որոշման մեթոդ, իրականացվել է թքի և արյան մեջ մետրոնիդազոլի խտության փոփոխության համեմատական վերլուծություն, հետազոտվել է լուծելիության թեստով ոչ համարժեք դեղերի դեղակինետիկան՝ գրանցելով թքի մեջ մետրոնիդազոլի խտությունը, առաջին խմբի բիովեյվերների կենսահամարժեքության հետազոտության համար մշակվել է թքի օգտագործման օպտիմալ սխեմա:

Ամփոփելով մետրոնիդազոլի հետազոտության ընթացքում ստացված արդյունքները և մետրոնիդազոլի կենսահամարժեքության հետազոտության համար թքի օգտագործման հնարավորության եզրակացությունները, առաջին խմբի բիովեյվերների, որոնք լավ ներթափանցում են թքի մեջ, կենսահամարժեքության հետազոտության համար կարելի է առաջարկել թքի օգտագործման հետևյալ մոդելը. *արյան և թքի մեջ ակտիվ բաղադրատարրի խտության փոփոխության համեմատական վերլուծություն,* որը իր մեջ ներառում է թքի և արյան մեջ ակտիվ բաղադրատարրի խտության հարաբերության տատանման հետազոտությունը: Եթե արյան դեպքում օպտիմալ է հանդիսանում արյան մեջ ակտիվ բաղադրատարրի խտության գրանցման տևականությունը ժամանակային միջակայքի ընթացքում, որը հավասար է հետազոտվող նյութի կիսադուրսբերման 4-7 փուլերի, ապա թքի կիրառման դեպքում առաջնային է հանդիսանում թքի և արյան մեջ ակտիվ բաղադրատարրի խտության հարաբերության կայունությունը:

Այսպիսով, հետազոտության ընթացքում հաստատվել է, որ դեղահատերից մետրոնիդազոլի դուրս բերման արագության առավել արտահայտված տարբերությունները դիտարկվում են լուծելիության թեստի իրականացման հետևյալ մեթոդի օգտագործման ժամանակ. լուծելիության միջավայր՝ 500 մլ ացետատային բուֆերի լուծույթ pH 4,5, սարքավորում՝ պտտվող թիակ, թիակի պտտման արագություն՝ 75 պտ./ր: Պարզվել է, որ մետրոնիդազոլի պրոֆիլավորող դեղակինետիկ պարամետրերը pH 4,5-ի պայմաններում լուծելիության պրոֆիլով տարբերվող դեղահատերի ընդունման ժամանակ, կազմում են ընդամենը 55-60% ռեֆերենտ դեղի համեմատ: Ցույց է տրվել, որ մետրոնիդազոլի այն դեղահատերի ընդունումից հետո, որոնք pH 4,5 լուծելիության միջավայրի պայմաններում լուծելիության թեստը սկսելուց 15 րոպե անց դեղահատերից մետրոնիդազոլի պահանջվող 85% դուրս բերումը չեն ապահովում, մետրոնիդազոլի առավելագույն խտությունը ցածր է 30%-ից, քան մետրոնիդազոլի մյուս դեղերի մոտ: Մետրոնիդազոլի դեղակինետիկայի և կենսահամարժեքության հետազոտության համար թքի օգտագործման օպտիմալ մոդել հանդիսանում է թքի մեջ նրա խտության փոփոխության ուսումնասիրումը 0-8 ժամ ընկած ժամանակահատվածում, երբ թքի և արյան մեջ մետրոնիդազոլի խտության հարաբերությունը գործնականորեն չի փոփոխվում:

© National Library of Armenia

15.05.2014

© National Library of Armenia

© National Library of Armenia