https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-146-154
УДК 54.061:54.062:615.322

Check for updates
CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка методики проведения теста «Растворение» для таблеток 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия с пролонгированным высвобождением

Е. В. Флисюк, Ю. М. Коцур*, И. А. Наркевич, И. Е. Смехова, Д. Ю. Ивкин

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

***Контактное лицо:** Коцур Юлия Михайловна. **E-mail:** uliya.kocur@spcpu.ru

ORCID: Е. В. Флисюк – https://orcid.org/0000-0001-8077-2462; Ю. М. Коцур – http://orcid.org/0000-0001-9292-4240; И. А. Наркевич – https://orcid.org/0000-0002-5483-6626; И. Е. Смехова – https://orcid.org/0000-0002-0013-4784; Д. Ю. Ивкин – https://orcid.org/0000-0001-9273-6864.

Статья поступила: 20.10.2021 **Статья принята в печать:** 07.12.2021 **Статья опубликована:** 27.12.2021

Резюме

Введение. Неалкогольная жировая болезнь печени является одним из наиболее часто встречающихся среди взрослого населения хронических заболеваний данного паренхиматозного органа. Поиск и создание поддерживающих препаратов – актуальная задача современной фармации. Синтезированное сотрудниками кафедры органической химии ФГБОУ ВО СПХФУ производное малоновой кислоты, 4,4′-(пропандиамидо)дибензоат натрия, обладающее антистеатозной активностью, является потенциальным средством для терапии заболеваний печени. На основе 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия были получены таблетки с пролонгированным высвобождением. Неотъемлемой частью фармацевтической разработки лекарственного препарата является разработка методики проведения теста «Растворение» и подбор оптимальных условий, что и стало целью настоящего исследования.

Цель. Разработать методику проведения теста «Растворение» для лекарственной формы, таблеток с пролонгированным высвобождением на основе 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия.

Материалы и методы. Объектами исследования являются активный фармацевтический ингредиент 4,4′-(пропандиамидо)дибензоат натрия, а также таблетки с пролонгированным высвобождением на основе данной субстанции. Равновесную биофармацевтическую растворимость определяли методом УФ-спектрофотометрии. Для установления условий проведения теста «Растворение» применяли тестер растворения ERWEKA DT-620 (ERWEKA GmbH, Германия).

Результаты и обсуждение. Определена пригодность методики УФ-спектрофотометрии для количественного определения 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия в растворах. Установленная высокая биофармацевтическая растворимость 4,4′-(пропандиамидо) дибензоата натрия в буферном растворе с pH 6,8, а также в 0,01 М растворе хлористоводородной кислоты с pH 2,6, обусловила выбор указанных сред для проведения теста «Растворение» испытуемой лекарственной формы. Аппарат «Вращающаяся корзинка» (скорость вращения 10 об/мин в среде растворения объемом 1000 мл) был обосновано выбран для проведения теста на основании полученной линейной зависимости скорости высвобождения субстанции от времени, а также лучших результатов испытания к концу эксперимента.

Заключение. Проведено исследование биофармацевтических свойств оригинальной субстанции, обладающей антистеатозной активностью. Установлена ее высокая биофармацевтическая растворимость в средах с pH 2,6 и pH 6,8. Экспериментально обоснованы условия проведения теста «Растворение» для таблеток с пролонгированным высвобождением на основе оригинального 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия.

Ключевые слова: тест «Растворение», высвобождение, таблетки с пролонгированным высвобождением, производное малоновой кислоты, биофармацевтическая растворимость

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Е. В. Флисюк и Ю. М. Коцур спланировали эксперимент. Ю. М. Коцур проводила запланированные исследования. Все авторы участвовали в обработке данных, обсуждении результатов и написании статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Флисюк Е. В., Коцур Ю. М., Наркевич И. А., Смехова И. Е., Ивкин Д. Ю. Разработка методики проведения теста «Растворение» для таблеток 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия с пролонгированным высвобождением. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(4–1):146–154. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-146-154

Development of the "Dissolution" Test Method for Tablets of Sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate with Sustained Release

Elena V. Flisyuk, Julia M. Kotsur*, Igor A. Narkevich, Irina E. Smekhova, Dmitry Yu. Ivkin

[1] Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

***Corresponding author:** Julia M. Kotsur. **E-mail:** uliya.kocur@spcpu.ru

ORCID: Elena V. Flisyuk – https://orcid.org/0000-0001-8077-2462; Julia M. Kotsur – http://orcid.org/0000-0001-9292-4240; Igor A. Narkevich – https://orcid.org/0000-0002-5483-6626; Irina E. Smekhova – https://orcid.org/0000-0002-0013-4784; Dmitry Yu. Ivkin – https://orcid.org/0000-0001-9273-6864.

Received: 20.10.2021 **Revised:** 07.12.2021 **Published:** 27.12.2021

© Флисюк Е. В., Коцур Ю. М., Наркевич И. А., Смехова И. Е., Ивкин Д. Ю., 2021
© Flisyuk E. V., Kotsur Ju. M., Narkevich I. A., Smekhova I. E., Ivkin D. Yu., 2021

Abstract

Introduction. Non-alcoholic fatty liver disease is one of the most common chronic diseases of this parenchymal organ among the adult population. The search and creation of supporting drugs is an urgent task of modern pharmacy. The malonic acid derivative, sodium 4,4'-(propanediamido) dibenzoate, synthesized by the employees of the Department of Organic Chemistry of the SPCPU, has antisteatous activity, is a potential agent for the treatment of liver diseases. Sustained release tablets were prepared based on sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate. An integral part of the pharmaceutical development of a medicinal product is the development of a method for conducting the Dissolution test and the selection of optimal conditions, which became the purpose of this study.

Aim. To develop the "Dissolution" test method for the sustained-release tablets based on sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate.

Materials and methods. The objects of research are the active pharmaceutical ingredient sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate, as well as sustained-release tablets based on this substance. Equilibrium biopharmaceutical solubility was determined by UV-spectrophotometry. To establish the conditions for the "Dissolution" test, an ERWEKA DT-620 dissolution tester (ERWEKA GmbH, Germany) was used.

Results and discussion. The suitability of the UV-spectrophotometry method for the quantitative determination of sodium 4,4'-(propanediamido) dibenzoate in solutions was determined. The established high biopharmaceutical solubility of sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate in a buffer solution with a pH of 6,8, as well as in a 0,01 M solution of hydrochloric acid with a pH of 2,6, determined the choice of these media for the "Dissolution" test of the dosage form. The apparatus "Rotating basket" (rotation speed of 100 rpm in a dissolution medium with a volume of 1000 ml) was reasonably chosen for the test on the basis of the obtained linear dependence of the rate of release of the substance on time, as well as the best test results by the end of the experiment.

Conclusion. A study of the biopharmaceutical properties of the original substance with antisteatous activity has been carried out. High biopharmaceutical solubility was established in media with pH 2,6 and pH 6,8. The conditions of the "Dissolution" test for sustained-release tablets based on the original sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate were experimentally substantiated.

Keywords: dissolution test, release, sustained-release tablets, malonic acid derivative, biopharmaceutical solubility

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Elena V. Flisyuk and Julia M. Kotsur developed an experiment. Julia M. Kotsur conducted the planned studies. All authors participated in data processing, text writing and discussion of the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Flisyuk E. V., Kotsur Ju. M., Narkevich I. A., Smekhova I. E., Ivkin D. Yu. Development of the "Dissolution" test method for tablets of sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate with sustained release. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4–1):146–154. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-146-154

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) одним из самых распространенных хронических заболеваний печени среди взрослого населения на сегодняшний день является неалкогольная жировая болезнь печени [1]. Данная патология ассоциируется с кардиометаболическими факторами риска и сопряжено с другими заболеваниями, такими как ожирение, сахарный диабет второго типа, стеатогепатит [2, 3]. В связи с тем, что терапия при данном заболевании зачастую ограничивается лишь занятиями физической культурой и приемом лекарственных средств (ЛС), поддерживающих физическую работоспособность пациента [3] актуальным является разработка лекарственного препарата (ЛП) антистеатозного действия. В качестве таких средств интерес представляют производные малоновой кислоты. Малоновая кислота (МК) принимает участие в обменных процессах живого организма, являясь предшественником в каскадах биосинтеза жирных кислот [2].

Сотрудниками кафедры органической химии нашего Университета под руководством профессора И. П. Яковлева было синтезировано производное МК (4,4'-(пропандиамидо)дибензоат натрия) с выраженным антистеатозным действием [4]. Его разовая доза составляет 60 мг, суточная – 180 мг. Субстанция представляет собой кристаллический порошок белого цвета, без запаха, легкорастворимый в воде. На основе данной активной фармацевтической субстанции (АФС) были получены матричные таблетки с пролонгированным высвобождением, что обеспечивало уменьшение проявления концентрационно зависимых побочных эффектов, увеличение комплаентности пациентов и т. д.

В настоящее время основными средствами разработки и изучения твердых пероральных лекарственных форм (ЛФ) являются тест «Растворение» и тест сравнительной кинетики растворения (ТСКР), что обусловлено зависимостью биодоступности активной фармацевтической субстанции от растворения ЛП [5]. Задачей теста «Растворение» является оценка качества ЛП в заданной ЛФ путем определения количества действующего вещества, которое в описанных нормативным документом условиях, за определенный промежуток времени должно высвобождаться в среду растворения из данной ЛФ [6]. Описанный выше тест используют с целью подтверждения постоянства свойств ЛФ и условий надлежащего производственного процесса. Тест «Растворение» является обяза-

тельной частью испытаний *in vitro* при изучении механизма высвобождения действующего вещества из предлагаемой ЛФ [7]. ТСКР позволяет сравнить эквивалентность профилей растворения исследуемого и референтного препаратов в близких к физиологическим условиям ЖКТ условиях. Проведение теста направлено на оценку правильности технологических решений, увеличение вероятности положительных результатов дальнейших исследований биоэквивалентности, что обусловливает его применение на этапе фармацевтической разработки ЛП [8, 9].

Для корректной разработки теста «Растворение» необходимо установить биофармацевтические свойства ДВ в соответствии с предложенной Amidon с соавт. в 1995 г биофармацевтической классификационной системой (БКС), используемой в настоящее время для прогнозирования биодоступности субстанции, обосновании состава, дизайна и технологии ЛП [10–12]

Целью настоящего исследования явилась разработка методики проведения теста «Растворение» для таблеток на основе 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия с пролонгированным высвобождением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись: оригинальная АФС 4,4′-(пропандиамидо)дибензоат натрия и готовая ЛФ на ее основе – таблетки с пролонгированным высвобождением. Соединение является солью слабой двухосновной кислоты, которая в водных растворах проявляет основные свойства. Отрицательный логарифм константы кислотной диссоциации АФС, определенный путем потенциометрического титрования, составляет 6,2 ± 0,2 [13].

Таблетки на основе 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия содержали суточную дозу вещества. В качестве вспомогательных веществ в составе таблеток использовали гипромеллозу Methocel K4M (Dow, Германия), лактозу SuperTab 30GR (DFE Pharma, Германия) и магния стеарат фармакопейный (Lekko, Россия).

4,4′-(пропандиамидо)дибензоат натрия представляет собой белый легкорастворимый в воде кристаллический порошок без запаха.

Измерительное оборудование: УФ-спектрофотометр СФ2000 (ОКБ Спектр, Россия); весы лабораторные электронные CE-224-C (Sartorius AG, Германия).

Вспомогательное оборудование:

- ✓ Прибор для теста «Растворение» DT620 (ERWEKA GmbH, Германия).
- ✓ Шприцевые фильтры с диаметром пор 0,45 мкм, материал PTFE, AF0-1102-52 (Phenex, Phenomenex).
- ✓ pH-метр PB-11 (Sartorius AG, Германия).
- ✓ Ультразвуковая ванна УЗВ-2,8 (ООО «Сапфир», Россия).
- ✓ Центрифуга MPW-351(MPW Med.Instruments, Польша).
- ✓ Термошейкер TS-100 (BioSan, Латвия).
- ✓ Сушильный шкаф с принудительной конвекцией OF-12G (JeioTech, Южная Корея).

Реактивы и материалы:

- ✓ Вода очищенная.
- ✓ Кислота хлористоводородная, ос.ч., срок годности до 07.2020 (АО «ВЕКТОН» , Россия).
- ✓ Кислота лимонная, ИМП, срок годности до 07.2021 (АО «ВЕКТОН» , Россия).
- ✓ Динатрия гидрофосфат. С. A0391772, Cat № 44814, срок годности до 12.2020 (Acros Organics, США).
- ✓ Кислота уксусная ледяная, х.ч., срок годности до 07.2020 (АО «ВЕКТОН» , Россия).
- ✓ Аммоний уксуснокислый, чистый для анализа, срок годности до 11.2021 (АО «ЭКОС-1», Россия).

Приготовление 1 М раствора хлористоводородной кислоты: 87,0 мл хлористоводородной кислоты концентрированной доводят водой до объема 1000,0 мл (1 М раствор).

Приготовление 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты pH 2,6: 10,0 мл полученного 1 М раствора хлористоводородной кислоты доводят водой до объема 1000,0 мл. При необходимости доводят pH до 2,6.

Приготовление 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты: 100,0 мл полученного 1 М раствора хлористоводородной кислоты доводят водой до объема 1000,0 мл. При необходимости доводят pH до 1,2.

Приготовление ацетатного буферного раствора pH 4,5*:* 63,0 г натрия ацетата безводного растворяют в воде, прибавляют 90,0 мл уксусной кислоты разведенной 30 %. Доводят pH до 4,5 потенциометрически уксусной кислотой разведенной 30 % и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Приготовление фосфатного буферного раствора pH 6,8: 77,3 мл 71,5 г/л раствора динатрия гидрофосфата смешивают с 22,7 мл 21 г/л раствора лимонной кислоты.

Приготовление раствора плацебо: в сосуд для растворения с фосфатным буферным раствором с pH 6,8 помещали одну таблетку плацебо массой 180 мг, аналогичную по составу таблетке, содержащей АФС. Через 12 часов отбирали пробу раствора объемом 10,0 мл и фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата. 1,0 мл раствора плацебо помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора соответствующим раствором среды растворения до метки и перемешивали.

Приготовления стандартного раствора 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия: точную навеску АФС с содержанием основного вещества 99,7 % (около 25 мг) помещали в мерную колбу объемом 50 мл, приливали около 30 мл воды очищенной. Колбу размещали в ультразвуковой ванне на 5 мин с полным растворением АФС при температуре 30 °С. После охлаждения раствора до комнатной температуры доводили объем до метки тем же растворителем и тщательно перемешивали (концентрация раствора составила 0,5 мг/мл). 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу 2 класса точности объемом 50 мл, приливали 30 мл воды очищенной с последующим перемешиванием и доведением объема раст-

вора до метки тем же растворителем (концентрация раствора составила 0,01 мг/мл).

Статистическую обработку результатов проводили при помощи пакета Microsoft Office Excel 2010.

На момент проведения исследований все реактивы имели не истекший срок годности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработку методики проведения теста «Растворение» проводили в несколько этапов. На первом определяли пригодность методики УФ-спектрофотометрии для количественного определения 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия. На втором этапе устанавливали равновесную биофармацевтическую растворимость 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия для обоснования выбора сред растворения. На третьем – определяли объем среды растворения и обосновывали выбор аппарата.

Выбор условий для проведения теста «Растворение» был осуществлен на основании биофармацевтических характеристик, а также на основании анализа литературных источников и данных Государственной Фармакопеи РФ (ГФ РФ) XIV издания и Фармакопеи Евразийского экономического союза [7, 14–20].

Разработанные таблетки с пролонгированным выс-вобождением относятся к третьей группе препаратов согласно ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» и ОФС.2.9.3. «Испытание «Растворение» для твердых дозированных лекарственных форм». В соответствии с требованием данных статей, тест «Растворение» для пролонгированных таблеток проводится в условиях, аналогичных условиям теста для ЛФ с обычным высвобождением, однако должно быть указано не менее трех временных интервалов отбора проб [14, 15].

При этом во многих исследованиях тест «Растворение» для пролонгированных ЛФ проводят в две и более стадии с целью имитации прохождения ЛФ через желудок и, при необходимости, прохождения через отделы кишечника [18, 20].

Таким образом, при разработке методики проведения теста «Растворение» для пролонгированных ЛФ, руководствуются биофармацевтическими свойствами АФС, желаемой кинетикой высвобождения, необходимостью определения количества высвободившегося АФС до достижения места действия.

Определение пригодности методики УФ-спектрофотометрии для количественного определения 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия.

Уф-спектрофотометрия является методикой количественного определения, рекомендованной ГФ РФ XIV изд. наряду с хроматографическими методами анализа.

Для определения пригодности данной методики для количественного определения 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия проводили изучение таких характеристик, как специфичность, правильность, линейность и аналитическая область.

Для определения специфичность снимали спектры растворов сред растворения с различными pH (1,2; 2,6; 4,5; 6,8), раствора плацебо, а также спектр раствора стандартного образца 4,4'-(пропандиамидо) дибензоата натрия (рисунки 1, 2). Для каждого раствора проводили не менее трех измерений.

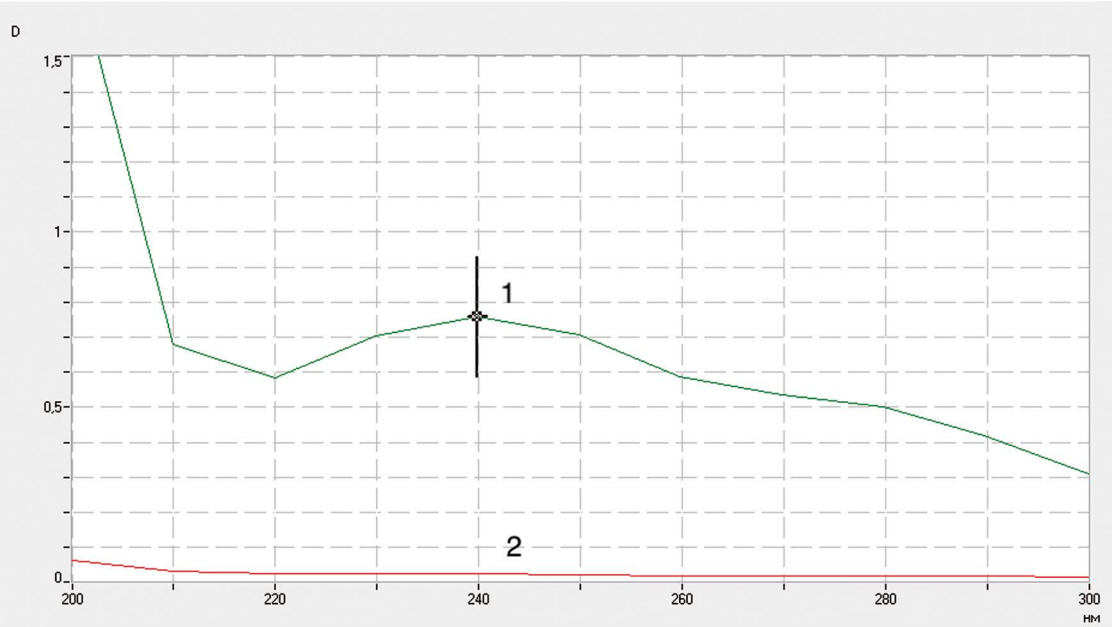

Рисунок 1. Зависимость оптической плотности (D) растворов от длины волны (нм):
1 – раствора стандартного образца 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия; 2 – раствора плацебо

Figure 1. The dependence of the optical density (D) of solutions on the wavelength (nm):
1 – a solution of a standard sample 4,4 '- sodium (propanediamido)dibenzoate; 2 – placebo solution

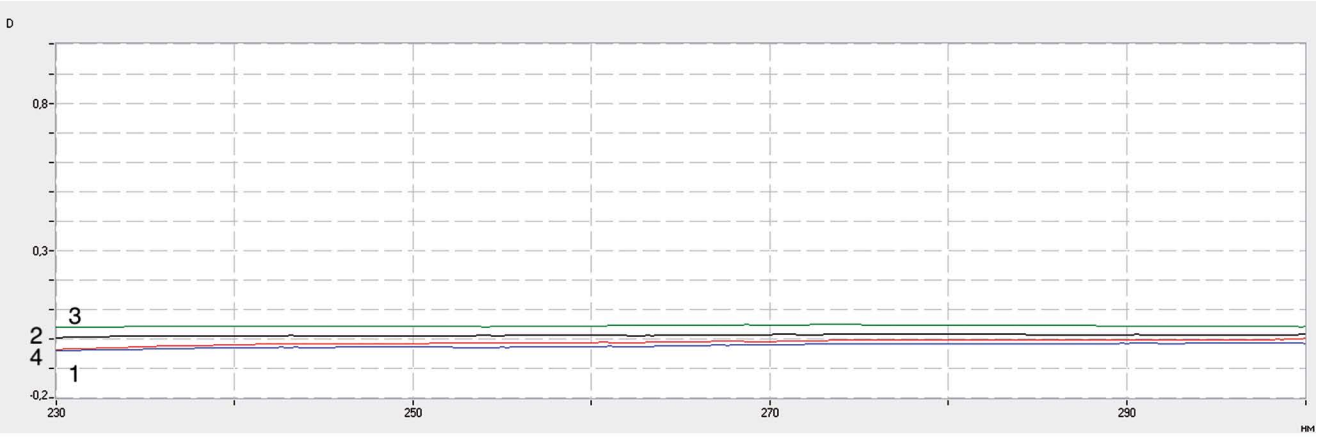

Рисунок 2. Зависимость оптической плотности (D) растворов от длины волны (нм):

1 – 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты с pH 1,2; 2 – 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты с pH 2,6; 3 – ацетатного буферного раствора с pH 4,5; 4 – фосфатного буферного раствора с pH 6,8

Figure 2. The dependence of the optical density (D) of solutions on the wavelength (nm):

1 – 0,1 M hydrochloric acid solution with pH 1,2; 2 – 0,01 M hydrochloric acid solution with pH 2,6; 3 – acetate buffer solution with pH 4,5; 4 – phosphate buffer solution with a pH of 6,8

Линейность определяли путем измерения оптической плотности серии модельных растворов с содержанием 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия в диапазоне концентраций от 0,002 до 0,012 мг/мл (рисунок 3).

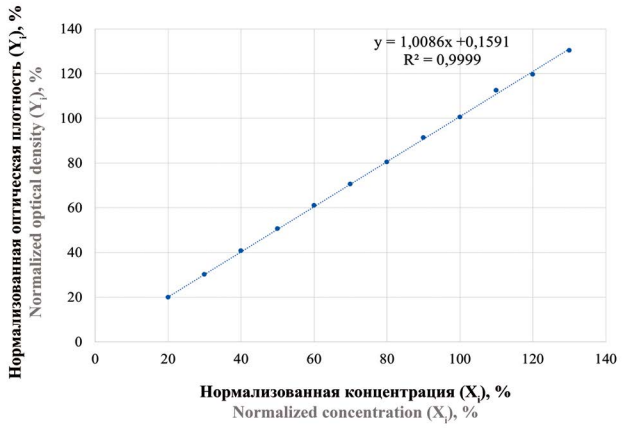

Рисунок 3. График зависимости оптической плотности от концентрации 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия в растворах в нормализованных координатах

Figure 3. Graph of the dependence of optical density on the concentration of 4,4'-sodium(propanediamido)dibenzoate in the solutions in normalized coordinates

Установлено, что данный метод является специфичным и линейным, следовательно, позволяет определить концентрацию АФС в растворах.

Определение биофармацевтической растворимости.

Анализ параметров проведения теста «Растворения» приведенных в базе данных FDA показал, что для определения высвобождения азотсодержащих ароматических соединений из таблеток применяют 0,01 М раствор кислоты хлористоводородной с различными значениями pH [21]. Проведенный ранее эксперимент по определению отрицательного логарифма константы кислотной диссоциации путем потенциометрического титрования показал, что при титровании АФС 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты наблюдается выраженный скачок в диапазоне pH 3,5–5,5, в связи с этим интерес представляло определение биофармацевтической растворимости в диапазоне pH от 1,2 до 3,5, исходя из этого в качестве сред растворения были выбраны 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2 и 0,01 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 2,6.

В качестве сред, пригодных для имитации условий кишечника были выбраны ацетатный буферный раствор с pH 4,5, а также фосфатный буферный раствор с pH 6,8. Данные среды наиболее часто применяются для изучения растворения пролонгированных ЛФ, кроме того, рекомендованы при проведении ТСКР для воспроизведенных препаратов [6].

Определение биофармацевтической растворимости 4,4'-(пропандиамидо) дибензоата натрия проводили по установлению равновесной растворимости в средах с различными значениями pH (1,2; 2,6; 4,5; 6,8) по методикам, аналогичным описанным ранее в литературе [22].

Термошейкер использовали в приготовлении испытуемых растворов. В микропробирки фактического объема 2 мл с 1 мл среды растворения внутри помещали по 0,1 г АФИ. Микропробирки помещались в термошейкер с регулируемым термостатированием при 37 °C и скоростью взбалтывания, равной 1400 об/мин [22].

Растворение проводили в течение суток. Испытание проводили в трех повторностях для каждой среды растворения (буферные растворы с pH 1,2; 2,6; 4,5; 6,8). Через 24 часа центрифугировали пробы. Отбирали по 100 мкл надосадочной жидкости и помещали в пробирки объёмом 10 мл, добавляли 9,9 мл соответствующей среды растворения, проводили тщательное перемешивание. Аликвоту полученного раствора объемом 1 мл переносили в пробирки вместимостью 10 мл и добавляли 9 мл соответствующей среды растворения (испытуемые растворы).

Методом УФ-спектрофотометрии при максимуме поглощения субстанции 238 ± 2 нм в кювете кварцевого стекла с толщиной поглощающего слоя 10 мм проводили в полученных растворах количественное определение АФС. В качестве раствора сравнения использовалась соответствующая среда растворения. Примеры УФ-спектров полученных растворов представлены на рисунке 4.

Значения биофармацевтической растворимости АФС рассчитывались по формуле (1) [22]:

$$S = \frac{D_i \cdot C_{st} \cdot V \cdot P}{D_{st} \cdot 100}, \quad (1)$$

где S – биофармацевтическая растворимость, мг/мл; D_i – оптическая плотность испытуемого раствора; D_{st} – оптическая плотность стандартного раствора; V – разведение испытуемого раствора; P – содержание основного вещества в АФИ, взятом для приготовления стандартного раствора, %; C_{st} – концентрация стандартного раствора, мг/мл.

Для каждого значения растворимости во всех буферных растворах определяли отношение дозы к растворимости по формуле (2):

$$\frac{D}{S} = \frac{D_{max}}{S}, \quad (2)$$

где $\frac{D}{S}$ – отношение дозы к растворимости, мл; D_{max} – максимальная дозировка ЛС, мг.

Так как исследуемый препарат ранее не был зарегистрирован на территории РФ, за максимальную принимали дозировку субстанции в таблетках с немедленным высвобождением, которая составляла 60 мг. Результаты представлены в таблице 1.

При отношении дозы к растворимости менее 250 мл растворимость субстанции считали «высокой» [22]. Таким образом, в средах с pH 1,2; 2,6 и 6,8 наблюдается «высокая» биофармацевтическая растворимость исследуемой субстанции. При этом, в среде с pH 6,8 наблюдается наиболее высокая биофармацевтическая растворимость, вследствие этого данная среда была выбрана для проведения теста «Растворение».

В физиологических условиях таблетки с пролонгированным высвобождениям до достижения места действия проходят через желудок. Для определения степени высвобождения в среде желудка необходимо было выбрать соответствующую среду растворения.

Среди исследованных сред с pH 1,2 и 2,6 наибольшей биофармацевтической растворимостью АФС обладает в среде 0,01 М хлористоводородной кислоты с pH 2,6.

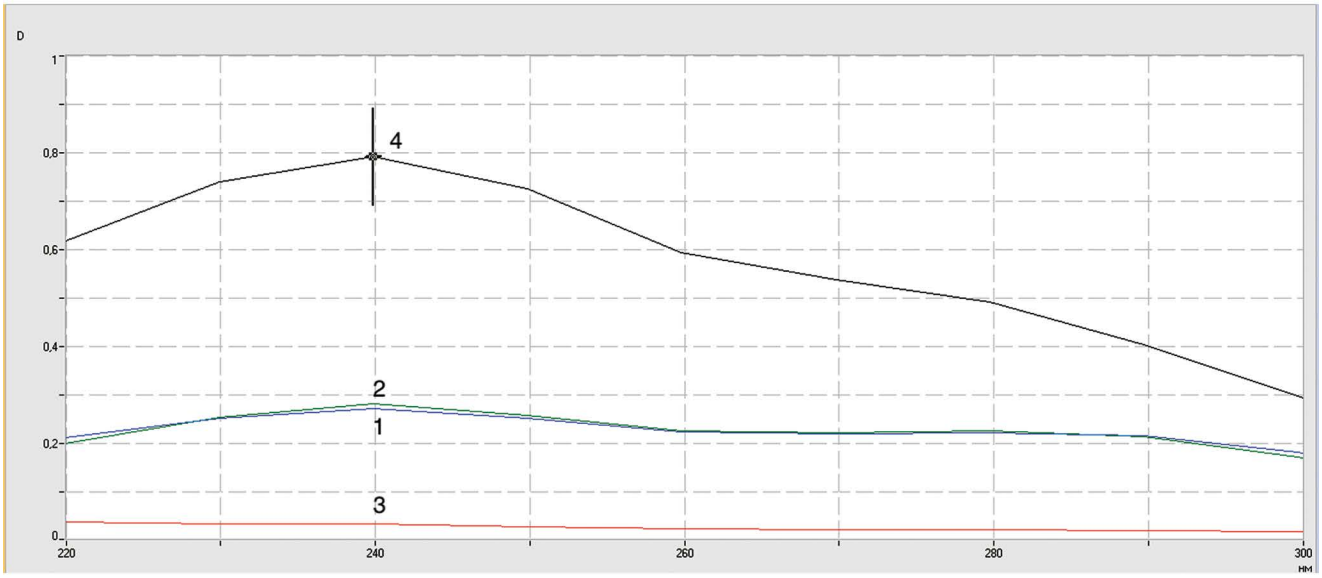

Рисунок 4. Зависимость оптической плотности (D) растворов 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия от длины волны (нм):

1 – в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты pH 1,2; 2 – в 0,01 М растворе хлористоводородной кислоты pH 2,6; 3 – в ацетатном буферном растворе pH 4,5; 4 – в фосфатном буферном растворе pH 6,8

Figure 4. The dependence of the optical density (D) of sodium 4,4′-(propandiamido)dibenzoate solutions on the wavelength (nm):

1 – in 0,1 M hydrochloric acid solution pH 1,2; 2 – in 0,01 M hydrochloric acid solution pH 2,6; 3 – in acetate buffer solution pH 4,5; 4 – in phosphate buffer solution pH 6,8

Таблица 1. Результаты определения биофармацевтической растворимости 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия

Table 1. The results of the determination of biopharmaceutical dissolution sodium 4,4′-(propandiamido)dibenzoate

Среда растворения Dissolution media	Оптическая плотность испытуемого раствора Optical density of the test solution	Количество растворившегося АФИ, мг/мл The amount of dissolved API, mg/ml	Среднее значение, мг/мл ($n = 3$, $P = 95$ %) Average value, mg / ml ($n = 3$, $P = 95$ %)	D/S, мл D/S, ml
Буферный раствор с pH 1,2 Buffer solution pH 1,2	0,2695	0,241	0,241 ± 0,006 RSD = 0,0027	244,8
	0,2731	0,244		241,6
	0,2678	0,239		246,4
Буферный раствор с pH 2,6 Buffer solution pH 2,6	0,2790	0,249	0,250 ± 0,003 RSD = 0,0012	236,5
	0,2815	0,251		234,4
	0,2802	0,250		235,5
Буферный раствор с pH 4,5 Buffer solution pH 4,5	0,0083	0,007	0,0087 ± 0,0028 RSD = 0,0013	7949,6
	0,0106	0,009		6224,7
	0,0104	0,009		6344,4
Буферный раствор с pH 6,8 Buffer solution pH 6,8	0,7909	0,706	0,706 ± 0,009 RSD = 0,0042	83,4
	0,7860	0,702		83,9
	0,7942	0,709		83,1

Для значений биофармацевтической растворимости в средах с pH 1,2 и с pH 2,6 была проведена проверка достоверности отличий при помощи пакета Microsoft Office Excel 2010 путем определения t-критерия Стьюдента для двух независимых выборок. При уровне значимости $a = 0{,}05$ значение t-критерия составило 4,68, критическое значение t-критерия Стьюдента – 2,776. Таким образом, между значениями биофармацевтической растворимости в средах с pH 1,2 и с pH 2,6 существуют достоверные отличия.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что для проведения теста «Растворение» для таблеток с модифицированным высвобождением на основе 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия будет рационально использовать следующие среды растворения: в первые два часа – 0,01 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 2,6 – для имитации прохождения ЛП через желудок, со 2 по 12 час – буферный раствор с pH 6,8.

Определение объема среды растворения и типа аппарата.

Согласно рекомендациям ГФ РФ XIV изд. (ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм») объем среды не должен быть менее 500 мл. При этом, Фармакопеей Евразийского экономического союза не предъявляются требования к объему среды при проведении теста «Растворение» для ЛФ первой и третьей групп [14, 15].

В связи с этим, для растворения исследуемых таблеток были выбраны объемы 500 мл и 1000 мл.

В качестве аппаратов использовали «Вращающуюся корзинку» и «Лопастную мешалку» с рекомендуемыми скоростями вращения, равными 100 об/мин и 50 об/мин, соответственно [14,15]. Испытание проводили при температуре среды растворения (37±0,5) °С в течение 12 часов: в первые два часа – в 0,01 М растворе кислоты хлористоводородной, последующие 10 часов – в буферном растворе с pH 6,8. Среды растворения деаэрировали в соответствии с методикой, изложенной в ОФС.1.4.2.0014.15 [14].

Изучали высвобождение субстанции из модельных таблеток с модифицированным высвобождением, с дозировкой 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия равной 180 мг. В состав таблеток входили гипромеллоза Methocel K4M (Dow, Германия), лактоза SuperTab 30GR (DFE Pharma, Германия) и магния стеарат фармакопейный (Lekko, Россия).

В каждый из сосудов тестера помещали по одной испытуемой таблетке (в центральную часть дна сосуда – при использовании аппарата «Лопастная мешалка» или внутрь корзинки аппарата «Вращающаяся корзинка»). По истечении 2 часов проводили полную замену среды растворения.

Пробы по 10,0 мл отбирали через 2, 4, 6, 8, 10 и 12 часов от начала эксперимента, объем среды растворения восполняли. Из каждой отобранной пробы брали аликвоту 1,0 мл в мерную колбу вместимостью 100 мл 2 класса точности и доводили раствор до метки соответствующей средой растворения (испытуемый раствор).

Количество вещества, перешедшего в среду растворения, определяли методом УФ-спектрофотометрии при максимуме поглощения 238 ± 2 нм в кювете кварцевого стекла с толщиной поглощающего слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали соответствующую среду растворения. Количество высвободившегося вещества (X, %) рассчитывали по формуле 3:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot V \cdot N \cdot 100}{A_0 \cdot L}, \qquad (3)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность стандартного раствора; a_0 – навеска вещества в стандартном растворе, г; N – коэффициент, учитывающий разведение; V – объем среды растворения, мл; P – содержание основного вещества в АФИ, использованном для приготовления

стандартного раствора, %; *L* – заявленное содержание вещества в таблетке, г.

Результаты испытания в средах разного объема представлены на рисунках 5 и 6.

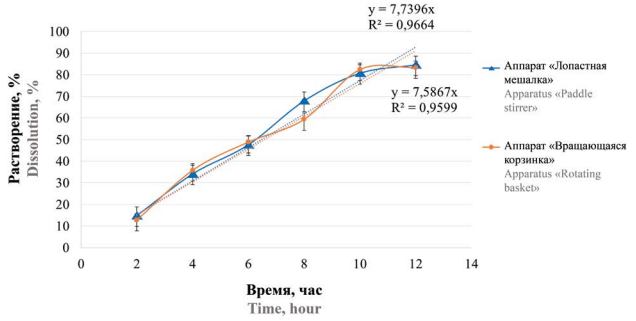

Рисунок 5. Профили растворения 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия из таблеток с пролонгированным высвобождением в среде объемом 500 мл

Figure 5. Dissolution profiles of sodium 4,4′-(propanediamido) dibenzoate from prolonged release tablets in medium volume of 500 ml

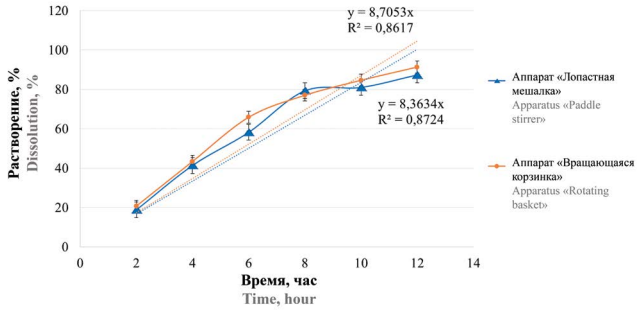

Рисунок 6. Профили растворения 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия из таблеток с пролонгированным высвобождением в среде объемом 1000 мл

Figure 6. Dissolution profiles of sodium 4,4′-(propanediamido) dibenzoate from prolonged release tablets in medium volume of 1000 ml

При разработке пролонгированных ЛФ наиболее предпочтительной кинетикой высвобождения является кинетика нулевого порядка. Такая скорость позволяет поддерживать постоянную концентрацию АФС в плазме, и, как следствие, оптимизировать терапевтическое действие и минимизировать побочные эффекты [23–25].

Линейная зависимость скорости высвобождения субстанции от времени для обоих аппаратов наиболее выражена в среде объемом 500 мл. Однако в среде объемом 1000 мл наблюдается более полное высвобождение 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия. Так, при проведении испытания в аппарате «Вращающаяся корзинка» через 12 часов из таблеток высвобождается более 90 % вещества, тогда как в аппарате «Лопастная мешалка» – около 87 %.

Таким образом, наилучшие показатели высвобождения при проведении теста были достигнуты с применением «вращающейся корзинки» со скоростью вращения, равной 100 об/мин и среды растворения объемом 1000 мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование биофармацевтических свойств оригинальной субстанции, обладающей антистеатозной активностью. Установлена ее высокая биофармацевтическая растворимость в средах с pH 2,6 и pH 6,8. Экспериментально обоснованы условия проведения теста «Растворение» для таблеток с пролонгированным высвобождением на основе оригинального 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глобальный доклад по диабету [Global report on diabetes]. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2018. 88 с.
2. O'Neill S., O'Driscoll L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obesity Reviews*. 2015;16(1):1–12. DOI: 10.1111/obr.12229.
3. Сяоян Ч., Киргизова О. Ю. Метаболический синдром: некоторые итоги и перспективы решения проблемы. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2016;1(5):187–194.
4. Радько С. В. Оценка влияния 4,4″-(пропандиамидо)дибензоата натрия на физическую работоспособность мышей к экспериментальным стеатозом печени. Сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации». 2017 8–9 ноября. Санкт-Петербург: СПХФУ; 2017. С. 29–32.
5. Гребенкин Д. Ю., Станишевский Я. М., Шохин И. Е., Малашенко Е. А. Ретроспектива развития науки о растворении твердых дозированных лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;4(17):158–166.
6. Гребенкин Д. Ю., Станишевский Я. М., Шохин И. Е. Современные подходы к проведению сравнительного теста кинетики растворении. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;1(14):166–171.
7. Мустафин Р. И., Ситенкова (Буховец) А. В., Фотаки Н. Особенности проведения предиктивного теста «Растворение». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;1(18):156–162.
8. Смехова И. Е., Перова Ю. М. Кондратьева И. А., Родыгина А. Н., Турецкова Н. Н. Тест «Растворение» и современные подходы к оценке эквивалентности лекарственных препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2013;1(2):50–61.
9. Демина Н. Б. Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):56–60.
10. Amidon G. L., Lennerns H., Shah V. P. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutics Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. *Journal of* Pharmaceutical *Research*. 1995;12:413–420.
11. Michele G. I., Humberto G. F. Intrinsic dissolution as a tool for evaluating drug solubility in accordance with the biopharmaceutics classification system. *Dissolution Technologies*. 2011;3:6–15. DOI: 10.14227/DT180311P6.
12. Dressman J. B., Vertzoni M., Goumas K., Reppas C. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59:591–602. DOI: 10.1016/j.addr.2007.05.009.
13. Алексеева Г. М., Апраксин В. Ф., Генералова Ю. Э. Изучение кислотно-основных свойств, разработка и валидация методики количественного определения оригинальной фармацевтической субстанции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(1):66–71. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-66-71.
14. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php. Ссылка активна на 28.10.2021.

15. Фармакопея Евразийского экономического союза. Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01426917/err_13082020_100. Ссылка активна на 28.10.2021.
16. Garbacz G., Klein S. Dissolution testing of oral modified-release dosage forms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;(64):944–968. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01477.x.
17. Walker R., Mwila C. Development and assessment of a USP Apparatus 3 dissolution test method for sustained-release nevirapine matrix tablets. *Dissolution Technologies*. 2016:22–30. DOI: 10.14227/DT230316P22.
18. Li J., Yang L., Ferguson S. M., Hudson T. J., Watanabe S., Katsuma M., Fix J. A. In vitro evaluation of dissolution behavior for a colon-specific drug delivery system (CODES™) in multi-pH media using United States Pharmacopoeia Apparatus II and III. *AAPS PharmSciTech*. 2002;3(4):1–9. DOI: 10.1208/pt030433.
19. Kumawat S., Sharma D. M., Rathore S. D., Agarwal M. Review on sustaines release technology. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Science Archive.* 2019;7(6):29–38.
20. Milind J. A., Keyur S. P., Deppa R. P., Zil P. P., Jayanti V. B. Formulation and evaluation of sustained-release pellets of lornoxicam. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(4):221–227. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.11(5).2135-46.
21. FDA dissolution methods database. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm. Accessed: 28.10.2021.
22. Шамаль Л. Л., Ярушок Т. А., Шохин И. Е., Раменская Г. В. Изучение равновесной биофармацевтической растворимости субстанций ЛС, применяемых при лечении онкологических заболеваний. *Ремедиум*. 2014;(11):73–76.
23. Cerea M., Maroni A, Palugan L., Moutaharrik S., Melocchi A., Zema L., Foppoli A., Gazzaniga A. Oral hydrophilic matrices having non-uniform drug distribution for zero-order release: a literature review. *Journal of Controlled Release.* 2020;325:72–83. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.06.033.
24. Maroni A., Zema L., Cerea M., Foppoli A., Palugan L., Gazzaniga A. Erodible drug delivery systems for time-controlled release into the gastrointestinal tract. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2015:1–7. DOI: 10.1016/j.jddst.2015.10.001.
25. Zhao Y.-N., Xu X., Wen N., Song R., Meng Q., Guan Y., Cheng S., Cao D., Dong Y., Qie J., Liu K., Zhang Y. A drug carrier for sustained zero-order release of peptide therapeutics. *Scientific Reports.* 2017;7:5524 . DOI: 10.1038/s41598-017-05898-6.

REFERENCES

1. *Global'nyj doklad po diabetu* [Global report on diabetes]. Geneva; World Health Organization. 2018. 88 p. (In Russ.)
2. O'Neill S., O'Driscoll L. Metabolic syndrome: A closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obesity Reviews*. 2015;16(1):1–12. DOI: 10.1111/obr.12229.
3. Xiaoyan Ch., Kirgizova O. Yu. Metabolic syndrome: some results and prospects for solving the problem. *Bulletin VSNTS SB RAMS*. 2016;1(5):187-194. (In Russ.).
4. Radko S. V. *Ocenka vlijanija 4,4"-(propandiamido)dibenzoata natrija na fizicheskuju rabotosposobnost' myshej k jeksperimental'nym steatozom pecheni Sbornik materialov V Vserossijskoj nauchno-prakticheskoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem «Innovacii v zdorov'e nacii»* [Evaluation of the effect of 4.4"-(propanediamido) sodium dibenzoate on the physical performance of mice with experimental liver steatosis. Collection of materials of the V All-Russian scientific-practical conference with international participation "Innovations in the health of the nation"]. *Sbornik materialov V Vserossijskoj nauchno-prakticheskoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem «Innovacii v zdorov'e nacii»*; 2017 Nov 8–9; St. Petersburg: SPKhFU; 2017. P. 29–32 (In Russ.)
5. Grebenkin D. Yu., Stanishevsky Ya. M., Shokhin I. E., Malashenko E. A. A retrospective of the development of the science of dissolution of solid dosage forms. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016;4(17):158–166. (In Russ.)
6. Grebenkin D. Yu., Stanishevsky Ya. M., Shokhin I. E. Modern approaches to the comparative dissolution kinetics test. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development and registration*. 2016;1(14):166–171. (In Russ.)
7. Mustafin R. I., Sitenkova (Bukhovets) A. V., Fotaki N. Features of the predictive test "Dissolution". *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;1(18):156–162. (In Russ.)
8. Smekhova I. E., Perova Yu. M. Kondratyeva I. A., Rodygina A. N., Turetskova N. N. Dissolution test and modern approaches to assessing the equivalence of drugs. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2013;1(2):50–61. (In Russ.)
9. Demina N. B. Biopharmaceutical classification system as a tool for the development of design and technology of a dosage form. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;(2):56–60. (In Russ.)
10. Amidon G. L., Lennerns H., Shah V. P. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutics Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. *Journal of* Pharmaceutical *Research*. 1995;12:413–420.
11. Michele G. I., Humberto G. F. Intrinsic dissolution as a tool for evaluating drug solubility in accordance with the biopharmaceutics classification system. *Dissolution Technologies*. 2011;3:6–15. DOI: 10.14227/DT180311P6.
12. Dressman J. B., Vertzoni M., Goumas K., Reppas C. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59:591–602. DOI: 10.1016/j.addr.2007.05.009.
13. Alekseeva G. M., Apraksin V. F., Generalova Yu. E. Study of acid-base properties, development and validation of a method for quantitative determination of an original pharmaceutical substance. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2019;8(1):66–71. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-66-71.
14. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izdaniya*. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV Edition]. Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php. Accessed: 28.10.2021. (In Russ.)
15. *Farmakopeja Evrazijskogo jekonomicheskogo sojuza* [Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union]. Available at: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01426917/err_13082020_100. Accessed: 28.10.2021.
16. Garbacz G., Klein S. Dissolution testing of oral modified-release dosage forms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;(64):944–968. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01477.x.
17. Walker R., Mwila C. Development and assessment of a USP Apparatus 3 dissolution test method for sustained-release nevirapine matrix tablets. *Dissolution Technologies*. 2016:22–30. DOI: 10.14227/DT230316P22.
18. Li J., Yang L., Ferguson S. M., Hudson T. J., Watanabe S., Katsuma M., Fix J. A. In vitro evaluation of dissolution behavior for a colon-specific drug delivery system (CODES™) in multi-pH media using United States Pharmacopoeia Apparatus II and III. *AAPS PharmSciTech*. 2002;3(4):1–9. DOI: 10.1208/pt030433.
19. Kumawat S., Sharma D. M., Rathore S. D., Agarwal M. Review on sustaines release technology. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Science Archive.* 2019;7(6):29–38.
20. Milind J. A., Keyur S. P., Deppa R. P., Zil P. P., Jayanti V. B. Formulation and evaluation of sustained-release pellets of lornoxicam. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(4):221–227. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.11(5).2135-46.
21. FDA dissolution methods database. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm. Accessed: 28.10.2021.
22. Shamal L. L., Yarushok T. A., Shokhin I. E., Ramenskaya G. V. Study of the equilibrium biopharmaceutical solubility of drug substances used in the treatment of oncological diseases. *Remedium.* 2014;(11):73-76. (In Russ.)
23. Cerea M., Maroni A, Palugan L., Moutaharrik S., Melocchi A., Zema L., Foppoli A., Gazzaniga A. Oral hydrophilic matrices having non-uniform drug distribution for zero-order release: a literature review. *Journal of Controlled Release.* 2020;325:72–83. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.06.033.
24. Maroni A., Zema L., Cerea M., Foppoli A., Palugan L., Gazzaniga A. Erodible drug delivery systems for time-controlled release into the gastrointestinal tract. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2015:1–7. DOI: 10.1016/j.jddst.2015.10.001.
25. Zhao Y.-N., Xu X., Wen N., Song R., Meng Q., Guan Y., Cheng S., Cao D., Dong Y., Qie J., Liu K., Zhang Y. A drug carrier for sustained zero-order release of peptide therapeutics. *Scientific Reports.* 2017;7:5524 . DOI: 10.1038/s41598-017-05898-6.