



Особенности проведения теста «Растворение» для суппозиторий вагинальных, содержащих в своем составе натамицин

А. В. Мелешко¹✉, А. М. Волкова¹, В. С. Тюкова^{1, 2}, А. В. Панов^{1, 2}, С. А. Кедик^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет» (ПТУ МИРЭА). 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86

² Акционерное общество «Институт фармацевтических технологий» (АО «ИФТ»), 121353, Россия, г. Москва, Сколковское шоссе, д. 21, офис 1

✉ Контактное лицо: Мелешко Анастасия Владимировна. E-mail: meleshko.anastasia@yandex.ru

ORCID: А. В. Мелешко – <https://orcid.org/0000-0002-1073-5073>;

А. М. Волкова – <https://orcid.org/0000-0003-0890-0540>;

В. С. Тюкова – <https://orcid.org/0000-0001-6622-0581>;

А. В. Панов – <https://orcid.org/0000-0002-1603-143X>;

С. А. Кедик – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>.

Статья поступила: 04.03.2024

Статья принята в печать: 19.12.2024

Статья опубликована: 20.12.2024

Резюме

Введение. Тест «Растворение» для лекарственных средств является одним из ключевых и во многом призван моделировать биодоступность действующего вещества в условиях его применения. Тем не менее существует ряд препаратов, содержащих в своем составе активные фармацевтические ингредиенты, плохо растворимые в стандартных условиях. Однако, поскольку их действие местное, плохая растворимость не сказывается отрицательно на терапевтическом эффекте. В данной работе рассмотрена разработка условий проведения теста «Растворение» в суппозиториях на липофильной основе, содержащих в своем составе натамицин, который является противогрибковым агентом, относящимся к тетраеновым макролидам, плохо растворимым в воде и, как следствие, в стандартных буферных растворах, предназначенных для проведения теста.

Цель. Подобрать оптимальные условия проведения теста «Растворение», при которых можно будет добиться полного высвобождения действующего вещества из суппозитория на липофильной основе на примере суппозитория «Пимафуцин» и «Примацин».

Материалы и методы. Объектами исследования являются суппозитории на липофильной основе, содержащие в своем составе натамицин. Исследование проводилось с использованием тестеров растворения (аппараты «Вращающаяся корзинка» и «Проточная ячейка») и системы ВЭЖХ для контроля количества высвободившегося натамицина.

Результаты и обсуждение. Объекты исследования были проанализированы с помощью теста «Растворение». В работе показана возможность проведения теста с полным высвобождением действующего вещества при добавлении поверхностно-активных веществ и органического растворителя, что допустимо для сред, применяемых для контроля качества согласно Государственной фармакопее XV издания; примеры таких сред можно найти также в базе данных сред растворения FDA.

Заключение. Разработаны условия проведения теста «Растворение» для суппозитория, содержащих в своем составе натамицин.

Ключевые слова: тест «Растворение», натамицин, «Примацин», суппозитории

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

Вклад авторов. С. А. Кедик, В. С. Тюкова и А. В. Панов разработали дизайн эксперимента. А. В. Мелешко, А. М. Волкова и В. С. Тюкова проводили тест «Растворение». А. В. Мелешко разработала методики количественного определения натамицина, участвовала в обработке данных. А. В. Мелешко и А. М. Волкова проводили теоретические расчеты. Все авторы участвовали в написании текста статьи и обсуждении результатов.

Для цитирования: Мелешко А. В., Волкова А. М., Тюкова В. С., Панов А. В., Кедик С. А. Особенности проведения теста «Растворение» для суппозиторий вагинальных, содержащих в своем составе натамицин. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):254–264. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1778>

Development of the "Dissolution" test method for vaginal suppositories Pimafucin®

Anastasiya V. Meleshko¹✉, Aleksandra M. Volkova¹, Viktoriya S. Tyukova^{1,2}, Aleksey V. Panov^{1,2}, Stanislav A. Kedik^{1,2}

¹ MIREA – Russian Technological University. 86, prospekt Vernadskogo, Moscow, 119571, Russia

² Joint Stock Company "Institute of Pharmaceutical Technologies". 21/1, Skolkovskoye highway, Moscow, 121353, Russia

✉ **Corresponding author:** Anastasiya V. Meleshko. **E-mail:** meleshko.anastasia@yandex.ru

ORCID: Anastasiya V. Meleshko – <https://orcid.org/0000-0002-1073-5073>;
Aleksandra M. Volkova – <https://orcid.org/0000-0003-0890-0540>;
Viktoriya S. Tyukova – <https://orcid.org/0000-0001-6622-0581>;
Aleksey V. Panov – <https://orcid.org/0000-0002-1603-143X>;
Stanislav A. Kedik – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>.

Received: 04.03.2024

Accepted: 19.12.2024

Published: 20.12.2024

Abstract

Introduction. «Dissolution test» for drugs is one of the key studies of control and, in many ways, is designed to simulate the bioavailability of the active substance under the conditions of use. However, there are several drugs containing active pharmaceutical substances that are poorly soluble under standard conditions. For this substances action is local, so, they are practically not absorbed in the human body, but showed the necessary therapeutic effect. This work discusses the development of conditions for «Dissolution test» in lipophilic-based suppositories containing natamycin, which is an antifungal agent related to tetraene macrolides, poorly soluble in water and, therefore, in standard buffer solutions intended for this test.

Aim. Choose the conditions for conducting «Dissolution test», under which it will be possible to achieve complete release of the active substance from lipophilic-based suppositories on «Pimafucin» and «Primacin».

Materials and methods. The objects of the study are lipophilic-based suppositories containing natamycin. The study was carried out using dissolution testers (Rotating Basket and Flow Cell apparatus) and an HPLC system to define the amount of natamycin released.

Results and discussion. The research objects were analyzed under «Dissolution test». The work shows the possibility of conducting a test with complete release of the active substance by adding surfactants and an organic solvent, which is acceptable for quality control dissolution medias.

Conclusion. Conditions for «Dissolution test» have been developed for suppositories containing natamycin.

Keywords: pimafucin, «Dissolution» test, natamycin, primacin, suppositories

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. Stanislav A. Kedik, Viktoriya S. Tyukova and Aleksey V. Panov developed the design of the experiment. Anastasiya V. Meleshko, Aleksandra M. Volkova and Viktoriya S. Tyukova carried out a dissolution test. Anastasiya V. Meleshko developed methods of natamycin quantitative determination and participated in data processing. Anastasiya V. Meleshko and Aleksandra M. Volkova carried out theoretical calculations. All authors participated in writing the text of the article and discussing the results.

For citation: Meleshko A. V., Volkova A. M., Tyukova V. S., Panov A. V., Kedik S. A. Development of the «Dissolution» test method for vaginal suppositories Pimafucin®. *Drug development & registration*. 2025;14(1):254–264. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1778>

ВВЕДЕНИЕ

Кандидоз вульвы и влагалища не относится к инфекциям, передающимся половым путем, в соответствии с Международной классификацией болезней, тем не менее он является достаточно серьезной проблемой, поскольку встречается по крайней мере

один раз в жизни у 75 % женщин [1], причем у 40–45 % – два и более раза, а у 10–20 % может развиваться вариант кандидоза с осложнениями.

Основным возбудителем кандидозов вульвы и влагалища является *Candida albicans*. Хотя в роде кандиды выделяют более 80 видов дрожжеподобных грибов, не все из них патогенны, а наиболее патоген-

ными являются *C. albicans* [2]. Тем не менее принято не относить кандидоз к заболеваниям, передающимся половым путем, а лечение партнера осуществляется исключительно при наличии соответствующей симптоматики в соответствии с синдромным подходом. Риск рецидивов выше для пациентов с беременностью, диабетом или ВИЧ-инфекцией, также отмечается, что иногда на развитие рецидивирующего течения заболевания могут оказывать влияние антибиотиков и оральные контрацептивы [3, 4].

Для лечения применяют противогрибковые препараты различных групп: производные имидазола (клотримазол), триазольные препараты (флуконазол), полиеновые препараты (натамицин). Натамицин – тетраеновый макролид, в состав которого входит лактонное кольцо из 25 атомов углерода. Показано, что натамицин существует в D-форме, в водных растворах проявляет амфотерные свойства, изоэлектрическая точка находится в районе $pH = 6,5$. Натамицин хорошо растворяется в органических растворителях, таких как ледяная уксусная кислота, метилпирролидон, диметилформамид, диметилсульфоксид, глицерин, пропиленгликоль, хлороформ, этилацетат, метанол и др. Натамицин практически нерастворим в петролейном эфире, гексане, бензоле, растворимость же натамицина в воде весьма ограничена и составляет по разным оценкам от 20 до 50 мг/л¹ [5, 6].

Действие натамицина основано на подавлении роста грибковых клеток за счет специфического связывания с эргостеролом, участвующим в формировании клеточной стенки. Есть данные, что действие натамицина связано с взаимодействием с молекулой эргостерола, которое приводит к изменению конфигурации последнего и тем самым препятствует осуществлению им биологической функции в грибковой клетке. По-видимому, не происходит значительно изменения проницаемости мембраны, как в случае с нистатином. Натамицин отличается по механизму действия от остальных известных полиеновых противогрибковых препаратов, однако механизм его действия на данный момент не изучен [7].

В настоящее время среди вагинальных форм, содержащих натамицин в своем составе и предназначенных для вагинального применения, в государственном реестре лекарственных средств (ГРЛС) зарегистрированы суппозитории различного состава с содержанием действующего вещества 100 мг. Наиболее ранним зарегистрированным в ГРЛС препаратом, содержащим натамицин, является «Пимафуцин», суппозитории вагинальные, 100 мг», производство «ЛЕО Фарма» (регистрационное удостоверение ПN013552/01). Однако в ходе анализа ассортимента лекарственных средств, содержащих в качестве

активного компонента натамицин, выяснилось, что в реестре содержатся сведения только о такой интервагинальной форме, как суппозитории. Представляет интерес создание лекарственного препарата (ЛП), попадающего под определение «гибридный лекарственный препарат». Обращаясь к Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза, можно отметить, что при производстве нового ЛП у производителя есть несколько возможных путей регистрации: как воспроизведенный лекарственный препарат (генерик) или как гибридный лекарственный препарат. При этом, если воспроизведенный лекарственный препарат должен соответствовать оригинальному лекарственному препарату по количественному и качественному составу действующих веществ, иметь ту же лекарственную форму, что и референтный препарат, то гибридный лекарственный препарат может отличаться от оригинального ЛП комбинацией действующих веществ, показаниями к применению, дозировкой, лекарственной формой, путем введения. В качестве одного из этапов оценки биоэквивалентности ЛП используют тест сравнительной кинетики растворения *in vitro* (ТСКР). Для получения достоверных результатов используют профили растворения, полученные, как правило, в трех средах растворения с pH 1,2; 4,5; 6,8. Для того, чтобы тест «Растворение» был корректным, необходимо установить биофармацевтические свойства действующего вещества в соответствии с биофармацевтической системой классификации [8].

Цель настоящего исследования – разработка методики проведения теста «Растворение» для вагинальных суппозиториев Пимафуцин®.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – суппозитории вагинальные на липофильной основе Пимафуцин®, состав приведен в таблице 1.

Для проведения измерений использовалось следующее оборудование и реактивы: лабораторные аналитические весы Pioneer PA214C (OHAUS, США); тестер растворения DFZ II «Проточная ячейка» (ERWEKA GmbH, Германия); тестер растворения ERWEKA DT 820; высокоэффективный жидкостный хроматограф Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенный диодно-матричным детектором; спектрофотометр CF-104; хроматографическая колонка Nucleodur C18 Gravity, 250 × 4,6 мм, 5 мкм, размер пор 100 Å; термостат TS-100 (BioSan, Латвия); центрифуга «Микроспин» FV-2400 (BioSan, Латвия).

При проведении исследования использовались следующие реактивы: натрия ацетата тригидрат (ч.д.а., Merck KGaA, Германия), цетилтриметиламмония бромид (ос.ч., VWR International, LLC, США), ацетонитрил (HPLC gradient grade, J.T. Baker, США), натрия лаурилсульфат EMPICOL LX/N (х.ч., ООО ТД «ХИММЕД», Рос-

¹ Evaluation of certain food additives and contaminants: fifty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9241209097>. Accessed: 04.03.2024.

сия), хлористоводородная кислота (х.ч., ООО «АЛЬДОСА», Россия), трифторуксусная кислота (HPLC grade, PanReas, США), полисорбат-80 (Acros Organics Bvba, Бельгия), уксусная кислота ледяная (HPLC grade, Sharlau, Германия), калия дигидрофосфат (х.ч., ООО ТД «ХИММЕД», Россия), натрия гидроксид (х.ч., ООО ТД «ХИММЕД», Россия). Субстанция натамицина произведена North China Pharmaceutical Huasheng Co., Ltd. (Китай). В качестве стандартного образца был использован Natamycin USP CRS (кат. номер 1457505) серии R10990, чистота стандартного образца составляет 91,3 %.

Таблица 1. Состав суппозитория Пимафуцин®

Table 1. Composition of suppositories Pimafucin®

№	Компонент Component	Масса на 1 суппозиторий, мг Mass per one suppository, mg	Содержание, % Content, %
1	Натамицин Natamycin	100	3,93
2	Цетиловый спирт Cetyl alcohol	690	27,13
3	Жир твердый Fats	700	27,53
4	Сорбитана триолеат Sorbitan trioleate	460	18,09
5	Полисорбат-80 Polysorbate 80	460	18,09
6	Натрия гидрокарбонат Sodium bicarbonate	69	2,71
7	Адипиновая кислота Adipic acid	64	2,52
8	Итого: In total:	2543	100

Исходя из вагинального способа применения ЛП Пимафуцин®, было принято решение использовать pH среды растворения, близкое по значению к pH влагалища (3,8–6,2) [9]. Для создания такого pH используются различные буферные среды, описанные в базе данных FDA Dissolution Methods: ацетатный, фосфатный, цитратный буферные растворы. В качестве ПАВ добавляются твин-80, твин-20, лаурилсульфат натрия, цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) [10–11].

В качестве среды растворения был выбран ацетатный буферный раствор с 0,5 % масс/об цетилтриметиламмония бромидом, pH = 4,5, поскольку среды растворения с лаурилсульфатом натрия не позволяли добиться нужного высвобождения за 45 мин, что показано в более ранних исследованиях [12–20], а также поскольку именно в данных условиях удавалось получить лучшие значения растворимости натамицина (таблица 2).

Приготовление сред растворения с pH 1,2 (0,1 М раствор хлористоводородной кислоты), 4,5 (натрия ацетатный буферный раствор с pH 4,5), 6,8 [фосфатный буферный раствор с pH 6,8 (4)] описано в Государственной фармакопее РФ XV издания^{1,2}.

Приготовление 1%-го раствора додецилсульфата натрия в 0,1 М хлористоводородной кислоте. 10 г додецилсульфата натрия помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл. Прибавляют около 600 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, перемешивают до растворения и доводят объем раствора 0,1 М хлористоводородной кислотой до метки.

Приготовление 1%-го раствора твина-80, pH 4,5. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 10 г твина-80, прибавляют 600 мл натрия ацетатного буферного раствора с pH 4,5, перемешивают до растворения и доводят объем раствора растворителем до метки.

Приготовление 0,5%-го раствора цетилтетраметиламмония бромида, pH 4,5. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 5 г цетилтетраметиламмония бромида, 6,9 г натрия ацетата тригидрата, прибавляют около 800 мл воды очищенной и перемешивают до растворения навесок. Объем раствора доводят до метки водой очищенной, pH полученного раствора доводят до 4,5 уксусной кислотой ледяной.

Приготовление 30%-го раствора уксусной кислоты. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 50 мл воды, прибавляют 30 г ледяной уксусной кислоты, перемешивают и доводят объем раствора водой до метки.

Приготовление ацетатного буфера. В стакан вместимостью 100 мл помещают 13,8 г ацетата натрия тригидрата, количественно переносят навеску в мерную колбу вместимостью 2000 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки. pH полученного раствора доводят до значения $4,5 \pm 0,05$ 30%-й уксусной кислотой.

Приготовление среды растворения. В стакан вместимостью 100 мл навешивают 10 г ЦТАБ, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 2000 мл, растворяют в ацетатном буфере, перемешивают и доводят объем раствора до метки ацетатным буфером. Полученный буферный раствор фильтруют при помощи установки Millipore через PTFE-фильтры с размером пор 0,45 мкм.

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. Растворение для твердых дозированных лекарственных форм. Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-4/1-4-2/rastvoreniy-dlya-tvyerdykh-dozirovannykh-lekarstvennykh-form/> Ссылка активна на 04.03.2024.

² Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. Буферные растворы. Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-3/bufernnye-rastvory/> Ссылка активна на 04.03.2024.

Таблица 2. Результаты определения биофармацевтической растворимости натамицина

Table 2. Determination of natamycin biopharmaceutical solubility

№	Среда растворения Dissolution media	Концентрация натамицина, мг/мл Natamycin concentration, mg/ml	D/S	Биофармацевтическая растворимость Biopharmaceutical solubility
1	0,1 М хлористоводородная кислота, pH 1,2 0,1 M Hydrochloric acid, pH 1,2	0,078	1282	Низкая Low
2	Натрий-ацетатный буферный раствор, pH 4,5 Sodium acetate buffer solution, pH 4,5	0,031	3225	Низкая Low
3	Фосфатный буферный раствор (4), pH 6,8 Phosphate buffer solution (4) pH 6.8	0,035	2857	Низкая Low
4	1%-го раствора додецилсульфата натрия в 0,1 М хлористоводородной кислоте 1 % Sodium dodecyl sulfate solution in 0,1 M Hydrochloric acid	1,05	95	Высокая High
5	1%-го раствора твина-80, pH 4,5 1 % Tween-80 solution pH 4,5	0,48	208	Высокая High
6	0,5%-го раствора цетилтетраметиламмония бромид, pH 4,5 0,5 % Cetyl tetramethyl ammonium bromide pH 4,5	0,59	169	Высокая High
7	60 : 40 % об. 0,5%-го раствора цетилтетра- метиламмония бромид с pH 4,5 и изопро- пилового спирта 60 : 40 % vol. 0,5 % Cetyl tetramethylammo- nium bromide pH 4,5; Isopropyl alcohol	4,12	24	Высокая High

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение биофармацевтической растворимости

Для определения биофармацевтической растворимости в 3 пробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл помещают навески натамицина 100 мг (точная навеска), прибавляют 1 мл полученной среды растворения. Пробирки помещают в термошейкер на 48 ч при температуре 37 °С и 1400 об/мин. Через сутки определяют содержание натамицина в растворе. Перед проведением хроматографии образцы центрифугируют, отбирают 100 мкл супернатанта и разбавляют в 10 раз раствором подвижной фазы.

Анализ проводят в изократическом режиме (подвижная фаза представляет собой 0,1%-й водный раствор трифторуксусной кислоты с ацетонитрилом в соотношении 60:40 %) со спектрофотометрическим детектированием при длине волны 304 нм, объем ввода – 20 мкл, температура термостата колонок – 25 °С. Стандартные растворы в диапазоне концентраций от 1 до 120 мкг/мл готовили, используя в качестве растворителя подвижную фазу. Типичные хроматограммы представлены на рисунках 1–2.

Биофармацевтическую растворимость определяли в различных средах растворения, кроме классических 0,1 н хлористоводородной кислоты с pH = 1,2; ацетатного буферного раствора с pH = 4,5; фосфатного буферного раствора с pH = 6,8; биофармацевтическую растворимость определяли в средах раство-

рения, содержащих поверхностно-активные вещества (ПАВ) и также изопропиловый спирт. В качестве сред растворения, содержащих ПАВ, были использованы 1%-й раствор додецилсульфата натрия в 0,1 М хлористоводородной кислоте (pH = 1,2); 1%-й раствор твина-80 (pH = 4,5); 0,5%-й раствор цетилтетраметиламмония бромид (pH = 4,5); 60:40 % об. 0,5%-й раствор цетилтетраметиламмония бромид (pH = 4,5) и изопропилового спирта.

При проведении оценки биофармацевтической растворимости натамицина принималась во внимание растворимость натамицина в широком диапазоне pH. Известно, что растворы натамицина являются стабильными в диапазоне pH от 5 до 9, а также что натамицин показывает в водных растворах наибольшую растворимость в диапазоне значений pH от 5 до 6, причем растворимость снижается как с уменьшением, так и с увеличением значения pH водных растворов [18]. Также показано, что значения растворимости натамицина практически не изменяются в диапазоне pH от 4 до 10 для растворов, содержащих 25 % метанола, рост же растворимости при экстремальных значениях pH сопровождается деградацией натамицина [19]. В связи с вышеизложенным авторы не проводили дальнейшие исследования в средах растворения со значением pH выше 6,8.

Отбор проб проводился в нескольких временных точках, а именно 8, 24 и 48 ч. Следует отметить, что оптимальные значения, соответствующие насы-

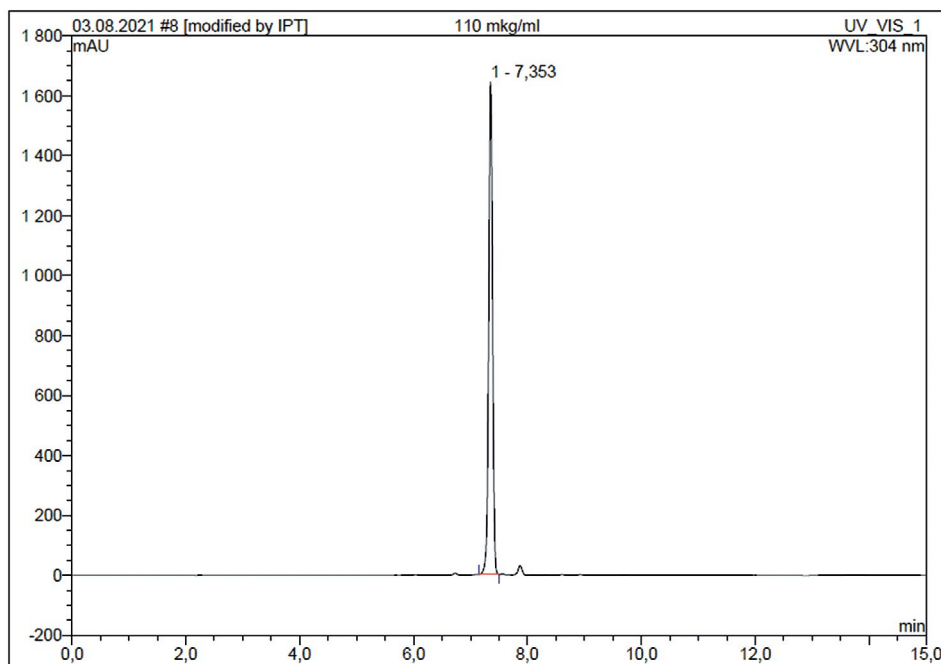


Рисунок 1. Типичная хроматограмма стандартного раствора

Figure 1. Characteristic chromatogram of a standard solution

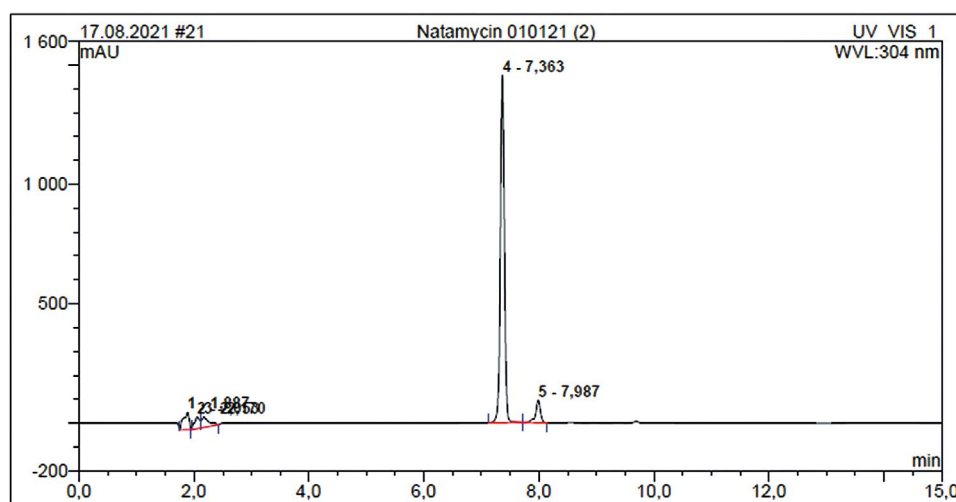


Рисунок 2. Типичная хроматограмма испытуемого раствора

Figure 2. Characteristic chromatogram of a sample solution

щению раствора, получали в точке 24 ч. Отбор проб через 8 ч не давал равновесных значений концентрации, которые наблюдались в точках 24 и 48 ч. Результаты определения биофармацевтической растворимости натамицина представлены в таблице 2 для точки 24 ч. Для классических сред растворения, применяемых в тесте сравнительной кинетики растворения, биофармацевтическая растворимость может быть определена как низкая (дозовое число превы-

шает 250, что соотносится с литературными данными, согласно которым натамицин относится к IV группе лекарственных веществ, то есть обладает низкой растворимостью и низкой проницаемостью [13]). Тем не менее следует отметить, что это не отменяет терапевтической эффективности натамицина, обусловленной прежде всего его местным действием в очагах развития грибковых инфекций. Модификация среды растворения добавлением ПАВ или изопропи-

Таблица 3. Высвобождение натамицина из суппозиториев Пимафуцин® через 180 мин

Table 3. Natamycin dissolution value from Pimafucin® suppositories after 180 minutes

№	1	2	3	4	5	6	Среднее, % Average, %	RSD, %
Высвобождение в проточной ячейке, Q, % Dissolution value in flow cell, Q, %	77,1	78,6	83,9	78,3	80,2	79,4	79,6	3,0
Высвобождение во вращающейся корзинке, Q, % Dissolution value in basket, Q, %	77,3	69,8	71,4	81,3	73,9	78,2	75,3	5,8

лового спирта позволяет увеличить растворимость натамицина и делает эти среды более предпочтительными для разработки методики контроля качества.

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что в растворах, представляющих собой среды растворения, используемые в процессе проведения ТСКР, натамицин не растворяется, его концентрация в точке 24 ч только для среды растворения с pH = 1,2 приближается к концентрации 0,11 мг/мл, которая соответствует 100%-му высвобождению для дозировки 100 мг и объема среды растворения 900 мл. Таким образом, приведенные буферные растворы не позволят достичь цели исследования, а именно добиться полного высвобождения натамицина из готовой лекарственной формы. Также стоит отметить, что стабильность натамицина показана в диапазоне значений pH от 5 до 9 [5]. Действительно, при проведении исследований с 0,1 М раствором соляной кислоты отмечалось наличие большого количества продуктов деградации натамицина, что не позволяет использовать среды растворения с низкими значениями pH раствора.

Подбор условий проведения теста «Растворение» для суппозиториев на липофильной основе, содержащих натамицин

После определения биофармацевтической растворимости был проведен тест «Растворение» в аппарате «Вращающаяся корзинка», который используется для суппозиториев на липофильной основе наряду с аппаратом «Проточная ячейка» согласно базе данных FDA¹ [15, 16].

Условия проведения испытания для аппарата «Проточная ячейка»:

- среда растворения – 0,5 % (м/об) цетилтриметиламмония бромид в 50 мМ растворе ацетата натрия тригидрата (pH 4,5);
- объем среды растворения – 900 мл;
- скорость потока – 32 мл/мин;
- температура – 37 ± 0,5 °C.

¹ FDA dissolution methods database. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/CDER/dissolution/dsp_getallData.cfm. Accessed: 16.08.2023.

Условия проведения испытания для аппарата «Вращающаяся корзинка»:

- среда растворения – 0,5 % (м/об) цетилтриметиламмония бромид в 50 мМ растворе ацетата натрия тригидрата (pH 4,5);
- объем среды растворения – 900 мл;
- скорость вращения – 100 об/мин;
- температура – 37 ± 0,5 °C

Исходя из проведенных ранее экспериментов, отбор проб осуществляли в нескольких временных точках: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 и 180 мин. Поскольку получение профиля высвобождения не является конечной целью данной работы, приведены значения для временных точек, в которых удавалось получить высвобождение свыше 70 % для 6 единиц лекарственного препарата, данное значение ниже указанного в фармакопее значения 75 %, что связано с низкой растворимостью натамицина. При выборе среды растворения стремились к тому, чтобы подобное значение можно было получить через 45 мин.

Высвобождение Q (%) по 6 единицам лекарственной формы через 180 мин составило от 70 до 78 % для каждой единицы, подробные результаты представлены в таблице 3.

Из полученных результатов следует, что возможность в данной среде растворения получить значения высвобождения для каждой единицы составляла не менее 70 % для 6 единиц лекарственной формы, причем среднее значение составило 75 %, тем не менее такие значения высвобождения наблюдались лишь через 180 мин, что говорит о невозможности использования данной среды и условий в качестве методики контроля качества для показателя «Растворение» суппозиториев Пимафуцин®. Поскольку не было выявлено значимых различий в высвобождении с использованием аппаратов «Проточная ячейка» и «Вращающаяся корзинка», дальнейшие исследования проводились с использованием «Вращающейся корзинки».

Для суппозиториев на липофильной основе могут применять в качестве сред растворения составы, содержащие органические растворители, как правило, изопропиловый спирт. Органические растворители, как и поверхностно-активные вещества, призваны повысить растворимость действующего

вещества в среде растворения и увеличить наблюдаемые значения высвобождения, что особенно важно для веществ, относящихся ко II и IV классам БКС, в том числе и для натамицина [10, 11, 13, 15]. Это подтверждается авторами, в частности, при исследовании биофармацевтической растворимости натамицина. Известно, что добавка органического растворителя является крайней мерой и применяется только в случае, когда невозможно достичь требуемых значений высвобождения никакими другими способами. Тем не менее накопленные экспериментальные данные по растворению суппозиторий в разных средах, не содержащих органические растворители, показали, что не удается достичь полного высвобождения менее чем за 120–180 мин, варьируя значения pH, буферную емкость и содержание поверхностно-активных веществ. Все вышеперечисленное говорит в пользу того, что добавление органического растворителя может быть возможным вариантом. В базе FDA также представлены среды растворения, в которых в качестве органического растворителя используется изопропиловый спирт, причем его содержание составляет 40 об. %. Безусловно, данное содержание органического компонента является достаточно высоким, тем не менее в такой концентрации он используется для таблеток атовакуона (II класс по системе БКС) [17], поэтому именно оно было выбрано для дальнейших исследований.

В результате были предложены следующие условия растворения:

- среда растворения – 0,5 % (м/об) цетилтриметиламмония бромид в 50 мМ растворе ацетата натрия тригидрата (pH 4,5) и изопропиловый спирт в объемном соотношении 60:40 % об.;
- объем среды растворения – 900 мл;
- прибор – вращающаяся корзинка;
- скорость вращения – 100 об/мин;
- температура – $37 \pm 0,5$ °C.

Приготовление среды растворения. В стакан вместимостью 100 мл навешивают 10 г ЦТАБ, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 2000 мл, растворяют в ацетатном буфере, перемешивают и доводят объем раствора до метки ацетатным буфером. Смешивают 1200 мл полученного раствора и 800 мл изопропилового спирта. Полученный буферный раствор фильтруют при помощи установки Millipore через PTFE-фильтры с размером пор 0,45 мкм.

Результаты растворения по 6 суппозиториям через 150 мин представлены в таблице 4.

Полученные результаты говорят о том, что в данных условиях высвобождение натамицина происходит лишь спустя значительный промежуток времени, а условия растворения не являются подходящими для стандартных требований теста «Растворение».

Как видно из полученных результатов, для высвобождения натамицина из суппозитория требуется не менее 150 мин, что не отвечает стандартным условиям проведения теста «Растворение». Такие результаты могут отчасти объясняться свойствами самой субстанции, так как натамицин плохо растворим в воде и буферных средах. Также, по-видимому, недостаточное высвобождение объясняется свойствами самой основы суппозитория, так как для всех сред растворения и в любом из аппаратов не удавалось добиться полного растворения основы, не оказывала значительного влияния также и смена среды растворения (рисунок 3). При анализе оставшегося, нерастворившегося фрагмента суппозитория в нем обнаруживалось количество натамицина, пропорциональное не перешедшей в раствор части. Поскольку не удалось подобрать адекватные условия растворения для данного препарата, было при-



Рисунок 3. Суппозиторий «Пимафуцин» после 24 часов растворения со сменой среды растворения

Figure 3. «Pimafucin» suppository after 24 hour dissolution with media changing

Таблица 4. Высвобождение натамицина из суппозитория Пимафуцин® в среде растворения с добавлением изопропилового спирта

Table 4. Natamycin dissolution value from Pimafucin® suppositories in dissolution media with isopropyl alcohol

№	1	2	3	4	5	6	Среднее, % Average, %	RSD, %
Высвобождение, Q, % Dissolution value, Q, %	66,6	65,3	70,8	69,1	77,2	81,2	71,8	6,7

нято решение проанализировать другой препарат, отличающийся по составу от исходных суппозиториях Пимафуцин®, но содержащий то же количество активного фармацевтического ингредиента.

В настоящее время на рынке зарегистрирован ряд препаратов, содержащих натамицин, в форме суппозиториях. Как представитель препаратов, зарегистрированных в соответствии с нормами ЕАЭС, может рассматриваться «Примацин», производство ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», регистрационное удостоверение ЛП-№(002651)-(РГ-RU). Состав данных суппозиториях представлен в таблице 5. Из таблицы видно, что они отличаются не только по составу, но и по количеству вспомогательных веществ: при той же дозировке натамицина 100 мг суппозиторий весит 1500 мг, в отличие от «Пимафуцина», масса которого составляет 2543 мг.

Таблица 5. Состав суппозиториях «Примацин»

Table 5. Composition of suppositories "Primacin"

№	Компонент Component	Масса на 1 суппозиторий, мг Mass per one suppository, mg	Содержание, % Content, %
1	Натамицин Natamycin	100,00	6,67
2	Макрогола глицерилгидрок- систеарат Macrogol glycerol hydroxyste- arate	75,00	5,00
3	Кремния диоксид коллоидный Colloidal silica	20,00	1,33
4	Жир твердый (витепсол (марки Н 15, W 35), Суппосир® (марки NA 15, NAS 50)) Fats (Witepsol (H 15, W 35), Suppocire® (NA 15, NAS 50))	1305,00	87,00
5	Итого: In total:	1500	100

Для суппозиториях «Примацин» было изучено растворение в стандартных средах, используемых при проведении теста сравнительной кинетики растворения, а именно в 0,1 М растворе соляной кислоты, натрий-ацетатном буферном растворе с pH 4,5, фосфатном буферном растворе (4) с pH 6,8. Результаты растворения представлены в таблице 6.

Представленные в таблице 6 результаты позволяют сделать вывод о необходимости по меньшей мере добавления ПАВ в среду растворения, также может потребоваться добавка органического растворителя. Сравнивая результаты для разных значений pH, можно сделать вывод, что его изменение относительно буферного раствора с pH 4,5 как в большую, так и в меньшую сторону не оказывает значительного влияния на высвобождение, тем не менее отклонение pH в сторону как сильно кислых, так и слабо щелочных, щелочных растворов может увеличивать деградацию натамицина, поэтому в дальнейших экспериментах использовались среды с pH 4,5.

Для данных суппозиториях удалось добиться высвобождения за меньшее время, был проведен тест «Растворение» для 6 единиц лекарственной формы в средах растворения, представленных выше, а именно в среде 0,5 % (м/об) цетилтриметиламмония бромида в 50 мМ растворе ацетата натрия тригидрата (pH 4,5) и 60 : 40 % об. 0,5 % (м/об) цетилтриметиламмония бромида в 50 мМ растворе ацетата натрия тригидрата (pH 4,5) и изопропилового спирта. В качестве аппарата растворения использовалась вращающаяся корзинка, скорость – 100 об/мин. Объем среды составлял 900 мл, а температура среды растворения – 37 °С. Результаты растворения представлены в таблице 7.

Исходя из полученных результатов, можно говорить о полном растворении натамицина в среде с добавлением изопропилового спирта: среднее значение превышает 85 %, что является стандартным требованием Фармакопеи РФ. Также для всех двенадцати единиц лекарственной формы высвобождение составило не менее 85 %, что говорит о применимости данных условий для теста «Растворение».

Таблица 6. Результаты растворения суппозиториях «Примацин» в средах растворения, использующихся при проведении ТСРР

Table 6. Dissolution test results for "Primacin" in media used in CDKT

№	Среда растворения Dissolution media	начение высвобождения в различных временных точках, Q, % Dissolution value in time, Q, %					
		5 мин 5 min	15 мин 15 min	30 мин 30 min	45 мин 45 min	60 мин 60 min	90 мин 90 min
1	0,1 М хлористоводородная кислота, pH 1,2 0,1 M Hydrochloric acid, pH 1,2	9,3	20,3	22,6	24,4	28,2	31,0
2	Натрий-ацетатный буферный раствор, pH 4,5 Sodium acetate buffer solution, pH 4,5	2,7	9,1	17,5	21,2	22,8	26,2
3	Фосфатный буферный раствор (4), pH 6,8 Phosphate buffer solution (4) pH 6.8	3,2	10,1	17,9	25,7	27,6	29,9

Таблица 7. Высвобождение натамицина из суппозитория «Примацин» через 45 мин в различных средах растворения

Table 7. Natamycin dissolution value from "Primacin" suppositories in different dissolution medias after 45 minutes

№	1	2	3	4	5	6	Среднее, % Average, %	RSD, %
Высвобождение, %, в среде без добавления изопропилового спирта Dissolution value, Q, % in media without isopropyl alcohol	78,6	82,4	80,4	81,9	82,4	78,9	80,8	2,1
Высвобождение, %, в среде с добавлением изопропилового спирта Dissolution value, Q, % in media with isopropyl alcohol	97,1	94,5	93,8	99,8	95,7	96,7	96,3	2,2

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной экспериментальной работы были подобраны условия проведения теста «Растворение» для суппозитория на липофильной основе, содержащих в своем составе натамицин. Главной сложностью при подборе среды растворения для лекарственных форм с данной активной фармацевтической субстанцией является ее низкая растворимость в воде и буферных средах, о чем и говорит отнесение натамицина к IV классу соединений согласно биофармацевтической классификации. Для увеличения растворимости данной субстанции в среде растворения и получения полного высвобождения действующего вещества ($Q \geq 70\%$) за 45 мин в данной работе использовалось поверхностно-активное вещество (цетилтриметиламмония бромид) и органический растворитель (изопропиловый спирт).

Было показано, что полное высвобождение действующего вещества из суппозитория «Пимафуцин» недостижимо по причине крайне низкой растворимости основы и отсутствия диффузии действующего вещества в среду растворения.

Суппозитории «Примацин» имеют отличный от «Пимафуцина» состав, а соотношение вспомогательных веществ и активной фармацевтической субстанции позволяет ей полностью высвобождаться.

Таким образом, были подобраны условия проведения теста «Растворение» для суппозитория вагинальных, содержащих в своем составе натамицин, позволяющие добиться полного высвобождения действующего вещества из суппозиторной основы для препарата «Примацин».

ЛИТЕРАТУРА

1. de Cássia Orlandi Sardi J., Silva D.R., Anibal P.C., Carvalho Moraes de Campos Baldin J.J., Rodrigues Ramalho S., Rosalen P.L., Rodrigues Macedo M.L., Francisco Holfing J. Vulvovaginal Candidiasis: Epidemiology and Risk Factors, Pathogenesis, Resistance, and New Therapeutic Options. *Current Fungal Infection Reports*. 2021;15:32–40. DOI: 10.1007/s12281-021-00415-9.

2. Адашкевич В. П. Заболевания, передаваемые половым путем. Витебск: Издательство Витебского медицинского института,; 1997. 310 с.

3. Инфекции, передаваемые половым путем и иные инфекции репродуктивного тракта. Руководство по основам медицинской практики. Всемирная организация здравоохранения; 2004. 196 с.

4. Foessleitner P., Petricevic L., Boerger I., Steiner I., Kiss H., Rieger A., Touzeau-Roemer V., Farr A. HIV infection as a risk factor for vaginal dysbiosis, bacterial vaginosis, and candidosis in pregnancy: A matched case-control study. *Birth*. 2021;48:139–146. DOI: 10.1111/birt.12526.

5. Brik H. Natamycin. In: Florey K., editor. *Analytical Profiles of Drug Substances*. New York: Academic Press; 1981. P. 513–561.

6. Houssam M. A., Selim Sh. M., Zayed M. S. Natamycin Antibiotic Produced By *Streptomyces* sp.: Fermentation, Purification And Biological Activities. *Journal of American Science*. 2012;8(2):469–475.

7. Te Welscher Y. M., ten Napel H. H., Balagué M. M., Souza C. M., Riezman H., de Kruijff B., Breukink E. Natamycin Blocks Fungal Growth by Binding Specifically to Ergosterol without Permeabilizing the Membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(10):6393–6401. DOI: 10.1074/jbc.M707821200.

8. Демина Н. Б. Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):56–60.

9. Owen D. H., Katz D. F. A vaginal fluid simulant. *Contraception*. 1999;59:91–95. DOI: 10.1016/S0010-7824(99)00010-4.

10. Joiga H., Mehta T., Patel M. Evaluation of dissolution media containing a novel synthetic surfactant by in vitro testing of BCS Class II Drugs. *Dissolution Technologies*. 2009;3(16):14–19. DOI: 10.14227/DT160309P14.

11. Incecayir T. The effects of surfactants on the solubility and dissolution profiles of a poorly water-soluble basic drug, carvedilol. *Pharmacize*. 2015;70(12):784–790 DOI: 10.1691/ph.2015.5081.

12. Usta D. Y., Incecayir T. Modeling of in vitro dissolution profiles of carvedilol immediate-release tablets in different dissolution media. *AAPS PharmSciTech*. 2022;23:201. DOI: 10.1208/s12249-022-02355-0.

13. Velpandian T., Nirmal J., Sharma H.P., Sharma S., Sharma N., Halder N. Novel water soluble sterile natamycin formulation (Natasol) for fungal keratitis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;163:105857. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.105857.
14. Дружининская О.В., Смахова И.Е. Среда растворения, применяемые в разработке и контроле качества лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(3):144–150.
15. Orlova T. V., Nesterova A. V., Ogneschikova N. D. The investigation of nonsteroid anti-inflammatory suppositories by dissolution test. Materials of the international conference "Process Management and scientific development". 2021. P. 104–108.
16. Palmeri A. Suppository dissolution testing: apparatus design and release of aspirin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1981;2(7):247–259 DOI: 10.3109/03639048109057715.
17. Kathpalia H., Juvekar S., Shidhaye S. Design and in vitro evaluation of atovaquone nanosuspension prepared by pH based and anti-solvent based precipitation method. *Colloids and Interface Science Communications*. 2019;29:26–32. DOI: 10.1016/j.colcom.2019.01.002.
18. Fang S., Peng X., Liang X., Shen J., Wang J., Chen J., Meng Y. Enhancing water solubility and stability of natamycin by molecular encapsulation in methyl- β -cyclodextrin and its mechanisms by molecular dynamics simulations. *Food Biophysics*. 2020;15:188–195. DOI: 10.1007/s11483-019-09620-z.
19. Zeng X., Danquah M.K., Jing K., Woo M.W., Chen X.D., Xie Y., Lu Y. Solubility properties and diffusional extraction behavior of natamycin from *Streptomyces gilvosporeus* biomass. *Biotechnology Progress*. 2013;29:109–115. DOI: 10.1002/btpr.1659.
6. Houssam M.A., Selim Sh.M., Zayed M.S. Natamycin Antibiotic Produced By *Streptomyces* sp.: Fermentation, Purification And Biological Activities. *Journal of American Science*. 2012;8(2):469–475.
7. Te Welscher Y.M., ten Napel H.H., Balagué M.M., Souza C.M., Riezman H., de Kruijff B., Breukink E. Natamycin Blocks Fungal Growth by Binding Specifically to Ergosterol without Permeabilizing the Membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(10):6393–6401. DOI: 10.1074/jbc.M707821200.
8. Demina N.B. Biopharmaceutical classification system as a tool for the development of drug formulations and their designs. *Drug development & registration*. 2017;(2):56–60. (In Russ.)
9. Owen D.H., Katz D.F. A vaginal fluid simulant. *Contraception*. 1999;59:91–95. DOI: 10.1016/S0010-7824(99)00010-4.
10. Joiga H., Mehta T., Patel M. Evaluation of dissolution media containing a novel synthetic surfactant by in vitro testing of BCS Class II Drugs. *Dissolution Technologies*. 2009;3(16):14–19. DOI: 10.14227/DT160309P14.
11. Incecayir T. The effects of surfactants on the solubility and dissolution profiles of a poorly water-soluble basic drug, carvedilol. *Pharmacize*. 2015;70(12):784–790 DOI: 10.1691/ph.2015.5081.
12. Usta D.Y., Incecayir T. Modeling of in vitro dissolution profiles of carvedilol immediate-release tablets in different dissolution media. *AAPS PharmSciTech*. 2022;23:201. DOI: 10.1208/s12249-022-02355-0.
13. Velpandian T., Nirmal J., Sharma H.P., Sharma S., Sharma N., Halder N. Novel water soluble sterile natamycin formulation (Natasol) for fungal keratitis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;163:105857. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.105857.
14. Дружининская О.В., Смахова И.Е. Dissolution media used in development and quality control of drugs. *Drug development & registration*. 2017;(3):144–150. (In Russ.)
15. Orlova T. V., Nesterova A. V., Ogneschikova N. D. The investigation of nonsteroid anti-inflammatory suppositories by dissolution test. Materials of the international conference "Process Management and scientific development". 2021. P. 104–108.
16. Palmeri A. Suppository dissolution testing: apparatus design and release of aspirin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1981;2(7):247–259 DOI: 10.3109/03639048109057715.
17. Kathpalia H., Juvekar S., Shidhaye S. Design and in vitro evaluation of atovaquone nanosuspension prepared by pH based and anti-solvent based precipitation method. *Colloids and Interface Science Communications*. 2019;29:26–32. DOI: 10.1016/j.colcom.2019.01.002.
18. Fang S., Peng X., Liang X., Shen J., Wang J., Chen J., Meng Y. Enhancing water solubility and stability of natamycin by molecular encapsulation in methyl- β -cyclodextrin and its mechanisms by molecular dynamics simulations. *Food Biophysics*. 2020;15:188–195. DOI: 10.1007/s11483-019-09620-z.
19. Zeng X., Danquah M.K., Jing K., Woo M.W., Chen X.D., Xie Y., Lu Y. Solubility properties and diffusional extraction behavior of natamycin from *Streptomyces gilvosporeus* biomass. *Biotechnology Progress*. 2013;29:109–115. DOI: 10.1002/btpr.1659.

REFERENCES