

УДК 615.2; 543.23; 311.214

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КИНЕТИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ РАСТВОРЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ СУБСТАНЦИИ ТОПИРАМАТ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ДИФРАКЦИИ СВЕТА

Е.В. Успенская^{1*}, А.А. Кешишян¹, М.В. Никифорова¹, Т.В. Плетенева¹,
А.В. Сыроешкин¹

Резюме. Растворимость – важнейший показатель качества, отражающий физико-химические свойства активных фармацевтических ингредиентов (АФИ). Предшествующая высвобождению АФИ, растворимость является одним из ключевых факторов, влияющих на эффективность и безопасность лекарственного средства. Поэтому направленная разработка новых лекарственных препаратов с заранее заданными свойствами (*drug design*) должна основываться в том числе на данных о растворимости веществ-кандидатов и учитываться при оценке биоэквивалентности дженериковых препаратов брендовым, в том числе при выявлении корреляции *in vitro* – *in vivo*. С учетом того, что фармакопейное регламентирование проведения теста на растворимость АФИ сводится к визуальной оценке и приблизительной растворимости, нами разработана методика кинетической оценки растворения методом лазерной дифракции и проведена статистическая обработка полученных результатов в условиях повторяемости.

Ключевые слова: кинетика растворения, фармацевтическая растворимость, лазерная дифракция, валидация методики.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD OF KINETIC EVALUATION OF MEDICAL SUBSTANCE TOPIRAMAT DISSOLUTION BY LASER DIFFRACTION OF LIGHT METHOD

E.V. Uspenskaya^{1*}, A.A. Keshishian¹, M.V. Nikiforova¹, T.V. Pletneva¹, A.V. Syroeshkin¹

Abstract. Solubility is the most important quality indicator, reflecting the physicochemical properties of active pharmaceutical ingredients (APIs). Prior to the release of API, solubility is one of the key factors affecting the efficacy and safety of drugs. Therefore, the directed development of new drugs with predetermined properties (*drug design*) should be based on solubility of candidate substances and be taken into account when evaluating the bioequivalence of generic drugs branded, including *in vitro* – *in vivo* correlation. Given that the pharmacopeia regulation of the test for the solubility of API is reduced to a visual estimate and approximate solubility, we developed a kinetic dissolution evaluation method by laser diffraction and performed statistical analysis of the results obtained under repeatability conditions.

Keywords: kinetics of dissolution, pharmaceutical solubility, laser diffraction, method validation.

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», медицинский институт, 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8

1 – People Friendship University of Russia, 8, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117556, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: uspenskaya75@mail.ru

Тел.: 8 (495) 434 70 01 (доб. 1926)

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что проявление фармакологического эффекта во многих случаях обусловлено сродством АФИ к клеточным рецепторам, что является важнейшим параметром для отбора лекарственных веществ-кандидатов [1]. Однако другие факторы, такие как растворимость, распределение в несмешивающихся фазах, абсорбционные свойства, характеристики активного и пассивного транспорта *in vivo*, не менее значимы для процессов [2]. Современные исследования включают метод моделирования свойств БАВ – ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism,

Excretion, Toxicity), позволяющий из всего многообразия выделить только те вещества, которые обладают необходимыми физико-химическими и фармакологическими характеристиками [3]. Биодоступность перорально вводимых лекарственных средств зависит от их способности абсорбироваться через желудочно-кишечный тракт. Например, для лекарственных препаратов (ЛП), относящихся к классу II биофармацевтической классификационной системы, процесс абсорбции ограничивается скоростью растворения лекарственного средства в среде желудка [4]. Поэтому повышение скорости растворения таких

препаратов будет способствовать увеличению их биодоступности [5].

К сожалению, данные аспекты берутся во внимание лишь на заключительных стадиях поиска и разработки препаратов. Следствием этого является то, что отобранные кандидаты с наилучшими параметрами сродства к рецепторам при тестировании *in vitro* иногда проявляют широкий спектр нежелательных свойств: низкую растворимость в воде, низкую диффузию через мембраны и др. [6]. Около 75% БАВ не проходят стадию доклинических испытаний (рисунок 1).



Рисунок 1. Селекция лекарств-кандидатов на стадии доклинических испытаний

Известно, что фармакопейное регламентирование проведения теста «Растворение» АФИ заключается в визуальной оценке растворимости АФИ и вспомогательных веществ (ВВ) при фиксированной температуре [7, 8]: к навеске растертого в тонкий порошок вещества прибавляют отмеренное количество растворителя и непрерывно встряхивают в течение 10 мин при температуре 20 ± 2 °С. Наблюдение производят после охлаждения раствора до комнатной температуры и энергичного встряхивания в течение 1–2 мин: ЛС считается растворившимся, если при наблюдении в проходящем через пробирку с раствором свете не обнаруживаются его частицы. В итоге обозначения и термины растворимости фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ – описательные, а их значения – приближенные. Например, для малорастворимых веществ навеской 1 г регламентирован объем растворителя 100–1000 мл [9].

Для исследования кинетики растворения АФИ нами применен метод лазерной дифракции на основании регистрации индикатрисы рассеяния, возникающей при взаимодействии электромагнитного излучения с частицами дисперсной фазы и меняющей угловое распределение интенсивности рассеяния по мере уменьшения дисперсности образца (*Low-angle laser light scattering*, LALLS) [10]. Метод LALLS является фармакопейным и предназначен для контроля качества АФИ, вспомогательных веществ и готовых лекарственных средств по показателю «размер частиц и их распределение» [9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Для исследования кинетики растворения в воде был использован образец субстанции-порошка топирамата (*topiramatum*) («Ксиан Бодигард Фармасьютикал Ко., Лтд», Китай, серия 140052016, годен до 09.2018), предназначенный для изготовления нестерильных лекарственных форм. Топирамат – противоэпилептическое лекарственное средство, сульфаматное производное фруктопиранозы (рисунок 2).

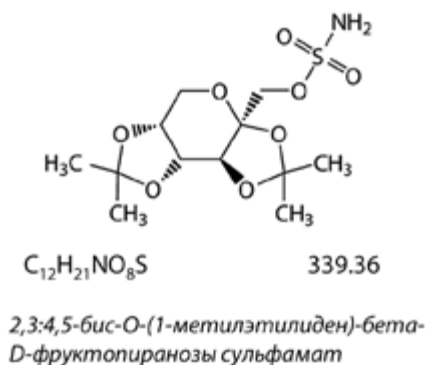


Рисунок 2. Структурная формула топирамата

Топирамат – белый или почти белый кристаллический порошок, легко растворим в метиленхлориде, спирте этиловом 95%, ДМСО и мало растворим в воде; проявляет противосудорожное, нейропротективное, психотропное, нормотимическое действие [11, 12]. Качество субстанции-порошка соответствует требованиям НД 42-14280-06.

Растворитель

Бидистиллированная деионизированная высокоомная вода (удельное электрическое сопротивление – 18 МОм·см при $T=25$ °С) природного изотопного состава, полученная путем очистки пирогенной дистиллированной воды на установке Milli-Q (Millipore, Великобритания), концентрация $^1\text{H}_2^{16}\text{O}$ – 99,74 мол. % ($D/H=141,0 \pm 0,9$ ppm).

Метод лазерной дифракции света

Кинетику растворения АФИ в воде исследовали методом LALLS с использованием лазерного малоуглового измерителя дисперсности MasterSizer 3600 E (Malvern, Великобритания). Методика исследования кинетики растворения АФИ на основании анализа изменения интегрального параметра дисперсности образца *laser obscuration* во времени LALLS-методом разработана сотрудниками кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института РУДН [13, 14]. Метод основан на измерении интенсив-

ности углового рассеяния плоской монохроматической электромагнитной волны (индикатрисы рассеяния) на частицах аэрозоля или взвеси, изменяющейся в зависимости от отношения $\pi d/\lambda$, где λ – длина волны электромагнитного излучения, d – размер частицы.

Методика кинетической оценки растворения

Навеску топирамата для исследования растворения во времени подбирали исходя из фармакопейной растворимости: для малорастворимых субстанций массой 1 г необходим объем растворителя от 100 до 1000 мл. Для измерений в емкостной кювете объемом 3 мл были взяты точные навески АФИ $m=0,0150$ г. Навеску порошка субстанции помещали в кювету с магнитной мешалкой измерительного блока ParticleSizer 3600 E (Malvern, Великобритания) и добавляли объем растворителя 3 мл, отмеренный с помощью автоматической пипетки емкостью 500–5000 мкл. [Оценка гранулометрии методом оптической микроскопии проведена в предыдущей работе, опубликованной в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», № 1(18), февраль 2017.] За начало измерения принимали момент добавления воды в кювету; измерения продолжали с интервалом в 10–20 с до полного растворения порошка субстанции. Момент окончания измерения фиксировался нами по прекращению изменения во времени величины измеряемого параметра «лазерное светозатемнение» (*laser obscuration*), который характеризует потерю интенсивности света при введении дисперсного образца в измерительную ячейку в результате процессов отражения, поглощения, дифракции. Математически лазерное светозатемнение выражается формулой:

$$Obscuration = 1 - \frac{I}{I_0} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где I – интенсивность света, измеренная детектором в присутствии образца в ячейке, I_0 – интенсивность света, измеренная детектором при отсутствии образца.

Предварительно производили измерение лазерного затемнения фона, в качестве которого служила среда растворения (вода MilliQ). Температура, при которой проводили измерения, $T=21 \pm 1$ °C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика растворения

Обнаружена экспоненциальная зависимость величины лазерного затемнения от процесса растворения порошка субстанции в воде (рисунок 3).

Кинетика растворения типирамата в воде представляет собой двустадийный процесс: резкое умень-

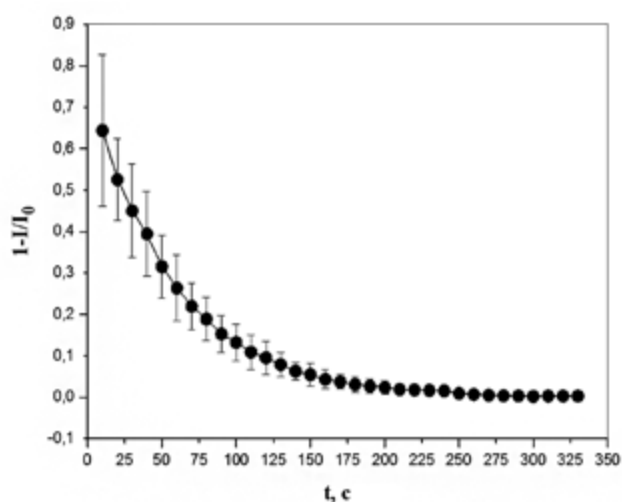


Рисунок 3. Кинетика растворения топирамата в воде ($n=5$, $P=0,95$)

шение регистрируемого параметра при растворении порошка испытуемой субстанции от начала растворения (первая стадия) сменяется постепенным снижением величины *laser obscuration* до выхода на плато (вторая стадия), что фиксировалось нами как полное растворение субстанции (рисунок 3). Первая стадия является скоростью-определяющей.

Если считать, что изменением концентрации одного из реагентов – растворителя в процессе растворения можно пренебречь, тогда общий порядок кинетического уравнения равен единице, а реакция, протекающая в таких условиях, – псевдопервого порядка [15]:

$$V = -\frac{dC}{dt} = kC. \quad (2)$$

Интегрируя выражение в пределах $C=C_0$ при $t=0$:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{C_0}{C}, \quad (3)$$

$$C = C_0 e^{-kt}. \quad (4)$$

Уравнение (4) доказывает экспоненциальное уменьшение во времени концентрации одного из реагентов, а применительно к методике, основанной на методе лазерной дифракции света, – уменьшение *лазерного затемнения*, зависящего от дисперсности среды. Уравнение (4) можно линеаризовать, прологарифмировав обе части:

$$\ln C = \ln C_0 - kt, \quad (5)$$

и использовать для количественной оценки растворимости топирамата, представив результаты экспоненциальных кривых в координатах:

$$x = \ln(1 - I/I_0), y = t. \quad (6)$$

Получено уравнение вида:

$$y = a + bx. \quad (7)$$

Константу скорости реакции определяем по коэффициенту b уравнения прямой как тангенс угла наклона к оси абсцисс (рисунок 4, таблица 1):

$$k = -\operatorname{tg} \alpha, \quad (8)$$

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{-d(\ln(I/I_0))}{dt}.$$

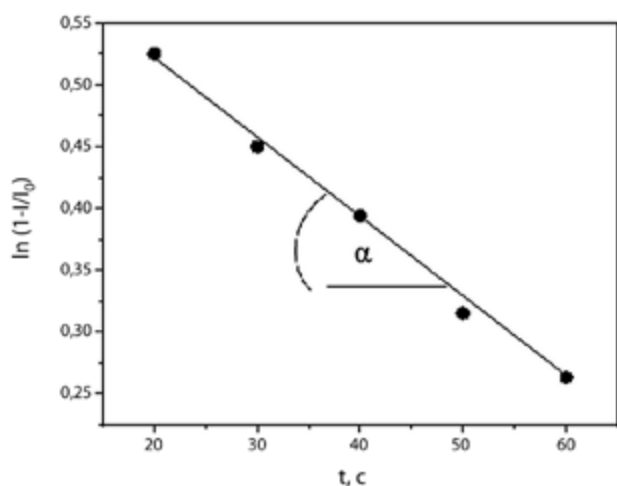


Рисунок 4. Кинетика растворения топирамата в воде в полулогарифмических шкалах ($n=5$, $P=0,95$)

Таблица 1.

Константа скорости растворения топирамата в воде

Номер серии	$(\bar{k} \pm SD), c^{-1}$
140052016	$(1,70 \pm 0,088) \cdot 10^{-2}$

Валидация методики

Нами проведена следующая последовательность обработки результатов прямых измерений в условиях повторяемости (таблица 2) [16].

Таблица 2.

Аналитические характеристики метода

Метрологический параметр	Формула для расчета
Среднее значение определяемой величины, $\bar{x}$	$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + x_4 + \dots}{n}$
Стандартное отклонение, S	$S = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2 + \dots}{n-1}}$
Полуширина доверительного интервала	$\Delta \bar{x} = \frac{t_{pr} \cdot S}{\sqrt{n}}$
Относительная (процентная) ошибка среднего результата, $\bar{\varepsilon}$	$\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta \bar{x}}{\bar{x}} \cdot 100\%$

Повторяемость методики определяли в условиях, при которых пять независимых результатов измерений получали одним методом, в одной лаборатории, одним лаборантом-исследователем, с использованием одного лазерного измерителя дисперсности, в пределах короткого промежутка времени (таблица 3).

Таблица 3.

Результаты оценки повторяемости методики (при $n=5$, $f=4$)

$\bar{k} \cdot 10^2, c^{-1}$	$SD \cdot 10^2$	$P, \%$	$t_{p,f}$	$\Delta \bar{k} \cdot 10^2, c^{-1}$	$(\bar{k} \pm \Delta \bar{k}) \cdot 10^2, c^{-1}$	$\bar{\varepsilon}, \%$
1,70	0,088	95	2,78	0,11	$1,70 \pm 0,11$	6,3

Статистическая обработка показала достоверность полученных результатов при доверительной вероятности 95%: вычисленные значения величины стандартного отклонения SD ($0,088 \cdot 10^{-2}$) и относительного доверительного интервала среднего значения ($0,11 \cdot 10^{-2}$) показали относительную ошибку среднего при вычислении константы скорости растворения методом лазерной дифракции света 6%, что доказывает прецизионность разработанной методики в условиях повторяемости с применением физико-химического метода анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты исследования кинетики растворения лекарственных субстанций в воде с применением фармакопейного метода лазерной дифракции показали значительные его преимущества в оценке качества АФИ в сравнении с фармакопейным тестом «Растворимость»: метод даёт возможность объективной оценки растворимости АФИ на основании изменения интегральных характеристик дисперсности во времени и позволяет осуществить количественную оценку растворимости с расчётом константы скорости k (c^{-1}). Возможность получения количественных характеристик растворения и проведение валидации делает данную методику пригодной для контроля качества, стандартизации ЛС и позволит использовать её в дополнение к уже существующему фармакопейному тесту «Растворимость».

ЛИТЕРАТУРА

1. C.J. Craven. A model to explain specific cellular communications and cellular harmony: a hypothesis of coupled cells and interactive coupling molecules // Theor Biol Med Model. 2014. V. 11. P. 40-47. doi: 10.1186/1742-4682-11-40.
2. О.Д. Казанчева, А.С. Герасименко. Методология поиска новых биологически активных фармакологических веществ с рецепторной активностью // International journal of applied and fundamental research. 2016. № 8. P. 522–525.
3. E.J. Miller, E. Jecs, V.M. Truax, B.M. Katzman, Y.A. Tahirovic, R.J. Wilson, K.M. Kuo, M.B. Kim, H.H. Nguyen, M.T. Saindane, H. Zhao, T. Wang, C.S. Sum, M.E. Cvijic, G.M. Schroeder, L.J. Wilson, D.C. Liotta. Discovery of Tetrahydroisoquinoline-Containing CXCR4 Antagonists with Improved *in Vitro* ADMET Proper-

- ties // J Med Chem. 2018. V. 61. №(3). P. 946–979. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01420.
4. Е.Р. Бригас, Е.В. Успенская, В.В. Писарев. Изучение сравнительной кинетики растворения антигипертензивных лекарственных средств II класса биофармацевтической классификационной системы в соответствии с процедурой «биовейвер» // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 4(17). С. 152–158.
5. S.V. Dorozhkin. Dissolution mechanism of calcium apatites in acids: A review of literature // World J Methodol. 2012. V. 2(1). P. 1–17.
6. G.L. Perlovich, T.V. Volkova, A.N. Manin, A. Bauer-Brandl. Influence of Position and Size of Substituents on the Mechanism of Partitioning: A Thermodynamic Study on Acetaminophens, Hydroxybenzoic Acids, and Parabens // AAPS PharmSciTech. 2008. V. 1. P. 205–216.
7. Е.В. Анфимова, Е.В. Успенская, Т.В. Плетенева, А.В. Сыроешкин. Исследование кинетики растворимости лекарственных субстанций методом лазерной дифракции в водных растворах с различным изотопным составом по водороду // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 1(18). С. 150–155.
8. S. Huang, C. Mao, R.O. Williams, C.Y. Yang. Solubility Advantage (and Disadvantage) of Pharmaceutical Amorphous Solid Dispersions // J Pharm Sci. 2016. V. 105. № 12. P. 3549–3561. doi: 10.1016/j.xphs.2016.08.017.
9. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. / МЗ РФ. – М. 2015. 1470 с.
10. H.N. Chapman, C. Coleman. Diffraction before destruction // B Biol Sci. 2014. № 17. P. 369–1647.
11. V. Prince, K.C. Bowling. Topiramate in the treatment of cocaine use disorder // Am J Health Syst Pharm. 2018. V. 75. № 1. P. 13–22. doi: 10.2146/ajhp160542.
12. E. Bruno, A. Nicoletti, G. Quattrocchi, R. Allegra, G. Filippini, C. Colosimo, M. Zappia. Topiramate for essential tremor // Cochrane Database Syst Rev. 2017. V. 4. doi: 10.1002/14651858.CD009683.pub2.
13. Н. Уварова, У. Борисова. Исследование растворимости субстанции бендазола гидрохлорида методом лазерной дифракции // НПЖ «Фармация». Сборник материалов V Юбилейной Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего – СПб.: СПХФА, 2015. С. 510–513.
14. U. Borisova, N. Uvarova. Study of solubility kinetics for pharmaceutical substances by laser diffraction method // VI International Scientific Conference «SCIENCE4HEALTH 2015». Materials of the conference: PFUR, Moscow. С. 32–33.
15. S. Zhao, G. Huang, S. Mu, C. An, X. Chen. Immobilization of phenanthrene onto gemini surfactant modified sepiolite at solid/aqueous interface: Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies // Science of the Total Environment. 2017. V. 598. P. 619–627.
16. R.M. Khusainova, Z.V. Shilova. Selection of Appropriate Statistical Methods for Research Results Processing // Mathematics Education. 2016. V. 11. № 1. P. 303–315.



MultiCheck 6



EasyCheck

ПЕРЕДОВЫЕ ТЕСТЕРЫ ПРОЧНОСТИ ТАБЛЕТОК