

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ И ОТНОСИТЕЛЬНОЙ БИОДОСТУПНОСТИ ПРЕПАРАТА РИЗЭФ-Д 60/30 ТАБЛЕТКИ ДИСПЕРГИРУЕМЫЕ

Ким М.Е., Мурзагулова К.Б.

Фармацевтическая компания «Ромат», Павлодар, e-mail: company@romat.kz

Для расширения номенклатуры специализированных противотуберкулезных лекарственных препаратов для детей фармацевтической компанией «РОМАТ», Казахстан, разработаны диспергируемые таблетки РИЗЭФ-Д рифампицин/изониазид 60/30 мг, на основе молекулярно инкапсулированных действующих веществ с β -циклодекстрином. Для оценки биоэквивалентности оригинальному лекарственному препарату изучена биодоступность разработанного лекарственного препарата производства ТОО «Павлодарский фармацевтический завод» в сравнении с лекарственным препаратом таблетки рифампицин 60/изониазид 30, производства Маклеодс Фармасьютикалс Лтд, Индия. Исследование проведено на кролика-самцах породы Шиншилла. Концентрация препаратов в сыворотке крови определялась методом ВЭЖХ. Фармакокинетические кривые рифампицина показали, что вещество определяется на протяжении 12 часов после однократного введения животным испытуемого препарата и препарата сравнения. Время достижения максимальной концентрации составляло в среднем 2 часа. Средняя максимальная концентрация рифампицина в сыворотке крови тестируемого препарата и препарата сравнения составила 5,7 мкг/мл. Установлено, что рифампицин медленно выводится из организма и через 12 часов после введения препаратов еще обнаруживается в плазме крови кроликов – 1,11 мкг/мл. Относительная биодоступность исследуемого препарата по отношению к препарату сравнения в среднем составила $100,3 \pm 6,04\%$. Таким образом, испытуемый препарат и препарат сравнения имеют идентичные фармакокинетические характеристики.

Ключевые слова: биодоступность, диспергируемые таблетки, изониазид, рифампицин, туберкулез

RESEARCH OF THE PHARMACOKINETICS AND RELATIVE BIOAVAILABILITY OF THE DRUG RIZEF-D 60/30 DISPERSIBLE TABLETS

Kim M.E., Murzagulova K.B.

Pharmaceutical company «Romat», Pavlodar, e-mail: company@romat.kz

Pharmaceutical company «ROMAT», Kazakhstan developed dispersible tablets RIZEF-D rifampicin/isoniazid 60/30 mg, based on molecular encapsulated active substances with β -cyclodextrin to expand the range of specialized TB medicines for children. The bioavailability of developed drug production LLP «Pavlodar Pharmaceutical Plant» in comparison with the drug rifampicin tablets 60/isoniazid 30 production MacLeods Pharmaceuticals Ltd, India was studied to assess the bioequivalence of original drugs. The study was conducted on male rabbits Chinchilla. The concentration of drug in the blood serum was determined by HPLC. Pharmacokinetic rifampicin data showed a substance determination for 12 hours after a single administration to animals of the test and comparing drug. Time The time of onset of maximum concentration averaged 2 hours. The average maximum concentration of rifampicin in the test serum and the drug comparisons was 5,7 $\mu\text{g/ml}$. Rifampicin is slowly excreted from the organism, and 12 hours after drug administration still found in the plasma of the rabbits – 1,11 $\mu\text{g/ml}$. The relative bioavailability of rifampicin an average of $100,3 \pm 6,04\%$. Thus, the test and the reference rifampicin drugs demonstrated comparable pharmacokinetic characteristics.

Keywords: bioavailability, dispersible tablets, rifampicin, isoniazid, tuberculosis

В 90-е годы снова началась эпидемия туберкулеза, и в настоящее время туберкулез представляет угрозу населению планеты не меньше, чем другие инфекционные заболевания. По данным Всемирной организации здравоохранения, жертвами туберкулеза ежегодно становятся около 1,7 миллионов. Происходит быстрое распространение его лекарственно-устойчивой формы [8, 9]. Процент больных туберкулезом детей составляет 12–35% от общего числа. В Казахстане наиболее неблагоприятна в этом отношении Павлодарская область, где отмечается самый высокий уровень заболеваемости детей [3].

Отсутствие детских противотуберкулезных лекарственных средств является глобальной проблемой, которая наиболее остро стоит в развивающихся странах. Во всем мире многие лекарственные средства

для детей используются без соответствующих данных об их воздействии на организм ребенка и специального разрешения. Мировой фармацевтический рынок остро нуждается и в качественных, эффективных и безопасных противотуберкулезных лекарственных препаратах в специальных детских лекарственных формах [2].

В рамках решения этой проблемы на базе ООО «РОМАТ», Казахстан, разработан состав и технология детской лекарственной формы противотуберкулезного лекарственного средства РИЗЭФ-Д рифампицин/изониазид 60/30 мг, диспергируемые таблетки на основе молекулярно инкапсулированных действующих веществ с β -циклодекстрином. Очевидным преимуществом этой композиции стала установленная на этапе доклинических

исследований уменьшенная более чем в 20 раз в сравнении с аналогами острая токсичность [3].

Создание любых дженериков предполагает проведение фармакокинетических исследований и оценку биоэквивалентности, являющуюся основным видом медико-биологического контроля дженериков [5].

Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение фармакокинетики и относительной биодоступности лекарственного препарата РИЗЭФ-Д 60/30, таблетки диспергируемые (ТОО «Павлодарский фармацевтический завод», Республика Казахстан) в сравнении с препаратом рифампицин 60/изониазид 30 таблетки диспергируемые (Маклеодс Фармасьютикалс Лтд, Индия).

Материалы и методы исследования

Тестируемый лекарственный препарат производства ТОО «Павлодарский фармацевтический завод», Республика Казахстан, содержит комбинацию двух противотуберкулезных средств – рифампицина 60 мг и изониазида 30 мг.

В качестве препарата сравнения выбран аналог, не зарегистрированный в Республике Казахстан – таблетки рифампицин 60/изониазид 30, производства Маклеодс Фармасьютикалс Лтд, Индия, так как на фармацевтическом рынке Казахстана отсутствует аналог тестируемому лекарственному препарату по лекарственной форме и дозировке.

Исследования проводились на кроликах-самцах породы Шиншилла массой тела – $3,23 \pm 0,39$ кг, полученных из питомника ТОО НПП «Антиген» (г. Алматы).

Животным с помощью зонда внутрь вводили 1 таблетку лекарственного препарата РИЗЭФ-Д 60/30 таблетки диспергируемые или 1 таблетку лекарственного препарата рифампицин 60/изониазид 30 таблетки диспергируемые. Промежуточный период составил 7 дней, по истечении которого указанные лекарственные препараты вводили в обратном порядке.

Образцы крови (около 1,0 мл) отбирали из краевой ушной вены с помощью игл и переносили в цен-

трифужные пробирки, предварительно обработанные гепарином. Взятие образцов крови для последующего определения содержания препарата в плазме крови осуществлялось в дискретные интервалы времени: через 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0 и 24,0 часа после перорального введения препаратов. Образцы крови отстаивались в течение 15 минут в условиях комнатной температуры. После центрифугирования (3000 об/мин в течение 10 минут) отбирали плазму крови, которая хранилась при температуре -30°C в морозильной камере «Premium».

Для количественного определения рифампицина в плазме крови использовали хроматографический метод [4]. Анализ проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1100» с УФ-детектором и компьютером с соответствующим пакетом программ для об-счета хроматограмм. Условия хроматографирования: аналитическая колонка – «Zorbax Bonus-RP», Agilent (150'4,6 мм; 5 мкм); подвижная фаза 0,01 М раствор аммония фосфата двузамещенного – ацетонитрил (50:50), профильтрованная через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм и дегазированная на ультразвуковой бане; скорость потока элюента – 1,0 мл/мин; детектирование при длине волны 215 нм; температура колонки + 35°C .

Для экстракции рифампицина из плазмы крови в экстракционную пробирку, содержащую 1 мл плазмы крови, добавляли 5,0 мл смеси пентан:дихлорметан (1:1), встряхивали на шейкере и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант переносили в выпарительную колбу. Органическую фракцию выпаривали досуха на роторном испарителе в токе азота. Сухой остаток растворяли в 250 мкл подвижной фазы и по 50 мкл аликвоты вводили в петлю инжектора.

Процент извлечения рифампицина из плазмы крови составил в среднем $83,9 \pm 7,5\%$. Количественное определение рифампицина проводили методом абсолютной калибровки. Установлено, что в диапазоне концентраций 5–40 мкг/мл калибровочная кривая линейна. Стандартная кривая рифампицина описывалась уравнением $y = 34,033x - 85,17$ ($R^2 = 0,9997$), где y – площадь хроматографического пика рифампицина; x – концентрация в мкг/мл (рис. 1–3). Минимальная обнаруживаемая концентрация составила 25 нг/мл. Относительная ошибка метода для концентрации 5 мкг/мл не превышала 29,76%.

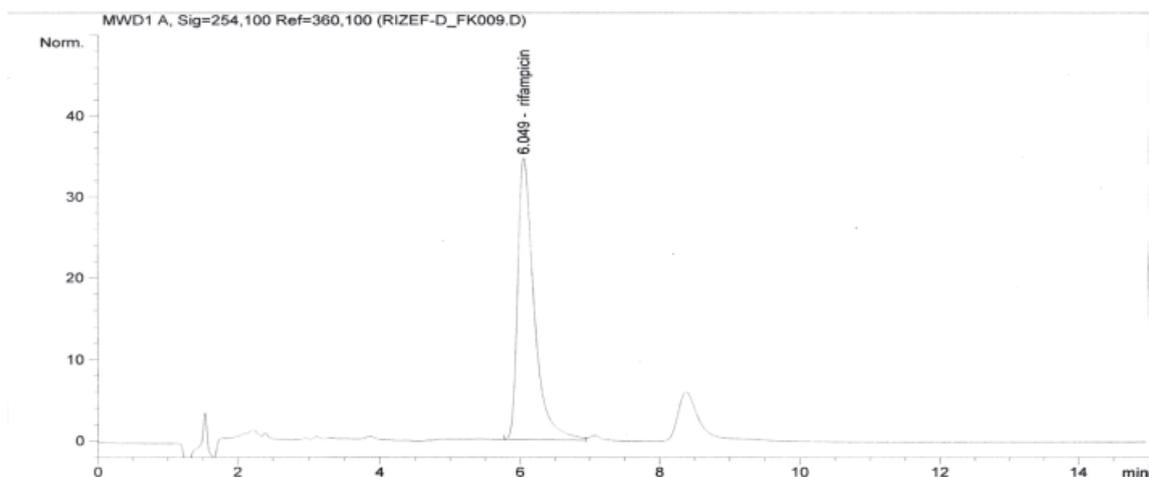


Рис. 1. Хроматограмма стандартного раствора рифампицина 20 мкг/мл

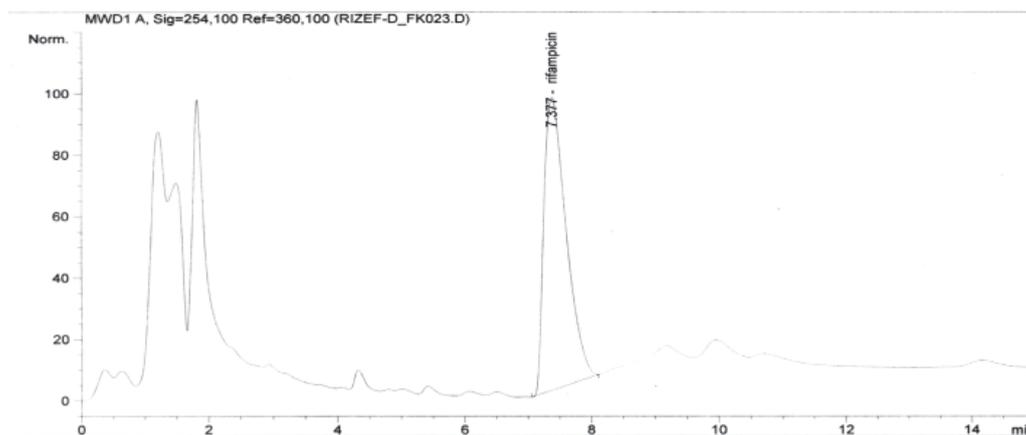


Рис. 2. Хроматограмма стандартного раствора рифампицина в плазме крови *in vitro*

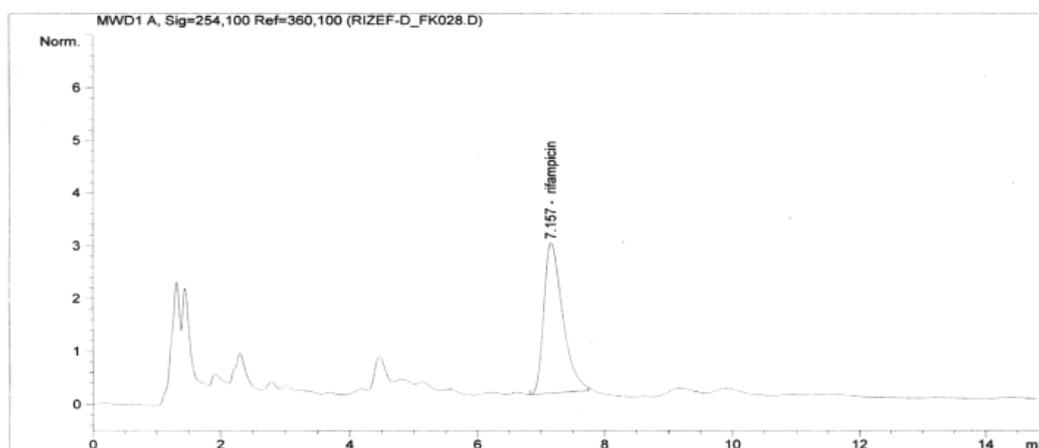


Рис. 3. Хроматограмма плазмы крови кролика через 0,5 ч после введения препарата РИЗЭФ-Д 60/30

Полученные данные предварительно были подвергнуты математической статистической обработке с помощью программы «Excel». Расчет фармакокинетических параметров анализируемых препаратов был проведен с использованием программы «ANOVA».

Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1 представлена хроматограмма стандартного раствора рифампицина с концентрацией 20 мкг/мл, на рис. 2 – хроматограмма плазмы крови кролика *in vitro* с концентрацией 40 мкг/мл, на рис. 3 – хроматограмма плазмы кролика через 0,5 часа после введения препарата РИЗЭФ-Д 60/30. Из хроматограмм видно, что время удерживания пика рифампицина лежит в пределах от 5,8 до 7,4 мин.

С целью оценки биологической доступности исследуемых лекарственных форм были определены концентрации рифампицина в сыворотке крови кроликов при применении препаратов, рассчитаны основные фармакокинетические параметры, позволя-

ющие количественно охарактеризовать относительную биодоступность (f), величины площадей под фармакокинетическими кривыми зависимости «концентрация – время» (AUC_{0-360}), время достижения максимальной концентрации (T_{mgx}) и значения максимальной концентрации (C_{max}) [1, 6, 7].

На рис. 4 представлен усредненный фармакокинетический профиль рифампицина после введения тестируемого и референс-препаратов.

Профили концентраций рифампицина тестируемого и референс-препаратов схожи. Фармакокинетические кривые рифампицина показывают, что исследуемое соединение определяется на протяжении 12 часов после однократного введения животным и испытуемого лекарственного препарата, и препарата сравнения.

В табл. 1 представлены фармакокинетические параметры рифампицина у кроликов после введения исследуемых лекарственных препаратов.

Усредненный фармакокинетический профиль рифампицина

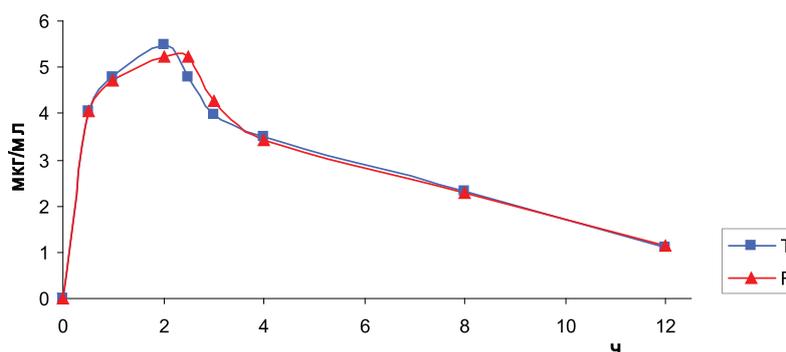


Рис. 4. Усредненный фармакокинетический профиль рифампицина в плазме крови кроликов после однократного перорального введения лекарственных препаратов

Таблица 1

Индивидуальные и средние значения фармакокинетических параметров рифампицина тестируемого (Т) и референтных препаратов (R)

№ п/п	t_{max} , ч		C_{max} , мкг/мл		$AUC_{0 \rightarrow t}$, мкг/мл·ч		$C_{max}/AUC_{0 \rightarrow t}$, ч ⁻¹	
	T	R	T	R	T	R	T	R
1	2,50	2,50	5,94	5,69	36,31	35,16	0,14	0,16
2	2,00	2,00	6,06	5,79	36,06	34,13	0,17	0,17
3	2,00	1,00	5,19	5,36	35,11	33,54	0,15	0,16
4	2,00	2,50	5,79	6,17	36,82	35,90	0,16	0,17
5	2,50	2,50	5,84	5,65	33,66	38,13	0,17	0,15
6	2,00	2,00	5,74	5,88	33,68	34,82	0,17	0,17
\bar{x}	2,17	2,08	5,76	5,76	35,27	35,28	0,16	0,16
SD	0,24	0,53	0,28	0,25	1,24	1,48	0,01	0,01
$S\bar{x}$	0,10	0,22	0,11	0,10	0,51	0,60	0,00	0,00
$C.V. \%$	10,88	25,61	4,78	4,26	3,52	4,19	7,22	4,56

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров (табл. 2) рифампицина показал, что изучаемый лекарственный препарат быстро поступает в системный кровоток из желудочно-кишечного тракта. Значения скорости всасывания ($C_{max}/AUC_{0 \rightarrow t}$) для лекарственных препаратов РИЗЭФ-Д 60/30 (Т) и рифампицин 60/изониазид 30 (R) статистически достоверно не различаются и составляют в среднем $0,16 \pm 0,01$ ч⁻¹, а индивидуальный разброс значений незначительный — $C.V.$ составил 4,56–7,22%. Время достижения максимальной концентрации (T_{max}) составило в среднем для Т — $2,17 \pm 0,24$ и для R — $2,08 \pm 0,53$ ч. Разность между значениями T_{max} для тестируемого и референтных препаратов в среднем составляет 0,09 ч. Приведенные данные свидетельствуют, что по времени достижения максимальной концентрации (T_{max}) между изучаемыми лекарственными препаратами достоверных различий также не обнаружено.

Средняя максимальная концентрация рифампицина, определяемая в плазме

крова кроликов (C_{max}), практически не отличается и для тестируемого препарата составила $5,76 \pm 0,28$ мкг/мл и для препарата сравнения — $5,76 \pm 0,25$ мкг/мл. Затем рифампицин медленно выводится из организма и через 12 часов после введения препаратов еще обнаруживается в плазме крови кроликов — $1,11 \pm 0,25$ мкг/мл (для Т) и $1,14 \pm 0,32$ мкг/мл (для R).

Индивидуальный анализ основного параметра, характеризующего степень всасывания действующего вещества из лекарственной формы — площадь под фармакокинетической кривой ($AUC_{0 \rightarrow t}$) указывает, что между изучаемыми препаратами статистически достоверных различий не обнаружено. Среднее значение $AUC_{0 \rightarrow t}$ для препарата Т составило $35,27 \pm 1,24$ и для R — $35,28 \pm 1,48$ мкг/мл·ч.

При анализе индивидуальных фармакокинетических кривых, было установлено, что у кролика № 3 наблюдалась небольшая разница в фармакокинетических профилях для Т и R препаратов — пик концентрации у тестируемого препарата 2 ч, а

у препарата сравнения – 1 ч. По-видимому, эти отклонения от общей картины обусловлены индивидуальными физиологическими особенностями животного.

Доверительные интервалы для логарифмически преобразованных значений AUC составляют от 3,52 до 3,61, а для логарифмически преобразованных значений C_{\max} – от 1,60 до 1,80 и не выходят за допустимые границы [5, 7].

Относительная биологическая доступность (f) рифампицина (табл. 2), определяемая отношением индивидуальных значений AUC_{0-t} тестируемого препарата по отношению к референс-препарату, у всех животных находится в диапазоне 88,38–105,65%, среднее значение составляет – $100,3 \pm 6,04\%$. Следует отметить, что имел место незначительный разброс индивидуальных значений относительной биодоступности, коэффициент вариации (C.V.) составил 6,03%.

Таблица 2
Индивидуальные значения относительной биодоступности (AUC_t/AUC_R) рифампицина тестируемого (Т) и референс-препаратов (R)

№ п/п	Рифампицин
	AUC _t /AUC _R
1	103,27
2	105,65
3	104,78
4	102,56
5	88,38
6	96,73
x	100,30
SD	6,04
$S\bar{x}$	2,47
C.V. %	6,03

Заключение

Установлено, что после однократно введения лекарственного препарата РИЗЭФ-Д 60/30 таблетки диспергируемые (ТОО «Павлодарский фармацевтический завод», Республика Казахстан) кроликам препарат быстро достигает системного кровотока. Уровни максимальных концентраций рифампицина в плазме крови животных после перорального введения лекарственных препаратов РИЗЭФ-Д 60/30 и рифампицин 60/изониазид 30 сопоставимы.

Достоверных различий в скорости всасывания (C_{\max}/AUC) рифампицина после введения исследуемых препаратов экспериментальным животным не выявлено.

Время наступления максимальной концентрации рифампицина в плазме крови составило для препарата РИЗЭФ-Д 60/30

$2,17 \pm 0,24$ ч и для препарата рифампицин 60/изониазид 30 – $2,08 \pm 0,53$ ч.

Относительная биодоступность препарата РИЗЭФ-Д 60/30 таблетки диспергируемые (ТОО «Павлодарский фармацевтический завод», Республика Казахстан) по отношению к препарату рифампицин 60/изониазид 30 таблетки диспергируемые (Маклеодс Фармасьютикалс Лтд, Индия) в среднем составила 100,3%, что свидетельствует об очевидной перспективности использования данной лекарственной композиции в разработанной лекарственной форме.

Список литературы

1. Белоусов Ю.Б., Гуревич К.Г. Клиническая фармакокинетика. – М.: Литтерра, 2005. – 288 с.
2. Жансарина Г.Х., Мазина И.Ж., Калелова Р.Р. Безопасные и эффективные лекарства детям // Фармация Казахстана. – 2010. – № 6. – С. 8–10.
3. Ким М.В. Разработка новых технологий детских форм противотуберкулезных препаратов: автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук – РК. – Караганда, 2010. – 28 с.
4. Коломиец Л.Н., Волков А.А., Якубов Э.С. Хроматография на благо России. – М: Граница, 2007. – 688 с.
5. Проведение надлежащих исследований биоэквивалентности лекарственных средств в Республике Казахстан: методические указания. – Астана, РК, 2007. – 48 с.
6. Холодов Ю., Яковлев В. Клиническая фармакокинетика – М.: Медицина, 1986. – 464 с.
7. Marzo A. Pharmacokinetic analysis, bioavailability and operating guidelines // J. Pharm. Pharmacol. – 1997. – Vol. 49. – P. 1259.
8. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): WHO global report on surveillance and response. – Switzerland, Geneva, 2010. – P. 1–71.
9. Shelley E. Haydel. Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: A Sign of the Times and an Impetus for Antimicrobial Discovery // Pharmaceuticals. – 2010. – № 3. – P. 2268–2290.

References

1. Belousov J.B., Gurevich K.G. Clinicheskaya farmakokinetika. M.: Litterra, 2005, 288 p.
2. Zhansarina G.H., Mazinova I.Z., Kalelova R.R. Bezopasnye i effektivnye lekarstva detyam. Pharmacya Khazakhstan, 2010, no. 6, pp. 8–10.
3. Kim M.E. Rasrabotka novykh technology detskikh form protivotuberculesnykh preparatov: Author. dis. cand. farmac. nauk. Khazakhstan, Karaganda, 2010, 28 p.
4. Kolomic L.N., Volkov A.A., Yakubov E.S. Khromatografiya na blago Rossii. M.: Granica, 2007, pp. 688.
5. Provedenie nadlejhaschich issledovani lekarstv v Respublike Khazakhstan: metodiceskie ukazanya. Astana, Kazakhstan, 2007, 48 p.
6. Kholodov U., Yakovlev V. Klinicheskaya farmakokinetika. M., Medicina, 1986, 464 p.
7. Marzo A. Pharmacokinetic analysis, bioavailability and operating guidelines // J. Pharm. Pharmacol., 1997, Vol. 49, pp. 1259.
8. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): WHO global report on surveillance and response. Switzerland, Geneva, 2010, pp. 1–71.
9. Shelley E. Haydel. Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: A Sign of the Times and an Impetus for Antimicrobial Discovery // Pharmaceuticals. 2010. no. 3. pp. 2268–2290.

Рецензенты:

Степанова Э.Ф., д.фарм.н., профессор кафедры технологии лекарств, Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ, г. Пятигорск;

Компанцев Д.В., д.фарм.н., доцент, зав. кафедрой технологии лекарств, Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ, г. Пятигорск.

Работа поступила в редакцию 30.06.2014.