

## ОБЗОР

УДК 615.015.4

©Коллектив авторов

### ИСПЫТАНИЕ “РАСТВОРЕНИЕ” В СРЕДАХ, МОДЕЛИРУЮЩИХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ, КАК СПОСОБ ОЦЕНКИ ПОВЕДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ *IN VIVO*

*Г.В. Раменская<sup>1,2\*</sup>, И.Е. Шохин<sup>1,2</sup>, А.Ю. Савченко<sup>2</sup>, Е.А. Волкова<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>ГОУ ВПО Первый Московский Государственный Медицинский Университет  
имени И.М. Сеченова Минздравсоцразвития России, 119991 Москва,  
ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2; тел.: 8-(495)-691-13-92; e-mail: ramenskaia@mail.ru  
<sup>2</sup>ФГБУ “НЦ ЭСМП” Минздравсоцразвития России

Рассмотрен современный способ моделирования поведения лекарственных средств (ЛС) в условиях *in vivo* – испытанию “Растворение” в биорелевантных средах, имитирующих состав физиологических жидкостей желудочно-кишечного тракта: кишечный сок натощак (FeSSIF) и кишечный сок после еды (FaSSIF). Приведен состав и методики приготовления данных сред растворения. Показано преимущество использования биорелевантных сред растворения в качестве прогностического инструмента высвобождения лекарственных веществ (ЛВ) из ЛС различных классов биофармацевтической классификационной системы (БКС) в данных средах.

**Ключевые слова:** тест “Растворение”, биорелевантные среды, биофармацевтическая классификационная система (БКС), FeSSIF, FaSSIF, биовейвер, абсорбция.

**ВВЕДЕНИЕ.** Одной из важнейших задач биомедицины и биофармации является понимание процесса доставки лекарственного вещества (ЛВ) до органов или клеток-мишеней. Одним из ключевых этапов данного процесса является поведение лекарственной формы (ЛФ) в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). При этом ЛВ проходит через следующие стадии: высвобождение ЛВ из ЛФ, растворение ЛВ в биологических жидкостях ЖКТ и его всасывание через стенку кишечника. Поскольку изучение данных процессов в условиях *in vivo* или *in situ* является трудоемким и дорогостоящим, одной из основных задач в этом направлении является возможность достоверно смоделировать данные процессы в условиях *in vitro*.

#### 1. ИСПЫТАНИЕ “РАСТВОРЕНИЕ”.

На протяжении последних 30 лет испытание “Растворение” применяется как обязательный инструмент контроля качества твердых дозированных лекарственных форм для внутреннего применения – различных таблеток, капсул

\* - адресат для переписки

(а также некоторых других, например, суппозиториях или пластырях) [1]. Испытание “Растворение” предназначено для определения количества ЛВ, которое в условиях, указанных в фармакопейной статье на препарат, за определенный промежуток времени должно высвободиться в среду растворения из твердой дозированной формы [2]. Данное испытание нормируется во всех ведущих фармакопеях [3-5]. В России действует общая фармакопейная статья “Растворение” ОФС 42-0003-04 [2].

Для проведения теста “Растворение” применяются два основных технических принципа - методика “перемешивающего сосуда” (stirred-vessel method) и проточная методика (continuous flow-method). Согласно первому принципу, образец помещается в фиксированный объем жидкости и перемешивается механическим или гидромеханическим способом. Основными приборами, в которых используются данные принципы, являются “вращающаяся корзинка”, “лопастная мешалка”, и некоторые другие. В соответствии со вторым принципом, таблетка помещается в проточную ячейку с системой фильтров, через которую насосом из резервуара прокачивается среда для растворения. Для данной методики предусмотрен аппарат “проточная ячейка” [2].

Условия проведения испытания наиболее приближены к физиологическим параметрам. В качестве сред растворения, согласно ОФС “Растворение”, применяются вода очищенная, а также буферные растворы с различными значениями pH, соответствующими физиологическим средам организма: желудочный сок (0,1 М раствор HCl), сок двенадцатиперстной кишки и тонкого кишечника (буферные растворы с диапазоном pH 4,0–8,0) [2]. Если высвобождение ЛВ из таблетки или капсулы должно происходить в желудке, то данный препарат будет хорошо растворяться в буферном растворе с низким значением pH, например, в растворе 0,1 М растворе HCl [6]. Поскольку ЛВ, входящие в состав препарата, имеют разные физико-химические свойства, для каждого ЛС выбирают среду для растворения с учетом его химической структуры и состава вспомогательных веществ.

В настоящее время новым направлением применения данного теста стало его использование с целью оценки взаимозаменяемости воспроизведённых ЛС (процедура “биоэвивер”) вместо традиционных сравнительных фармакокинетических исследований (исследований биоэквивалентности), проводимых на здоровых добровольцах [1, 7-9]. Однако для некоторых ЛС испытание “Растворение” в классических фармакопейных буферных растворах не отражает их поведение в условиях *in vivo* с достаточной степенью достоверности и, таким образом, не может применяться для вышеуказанной цели. Для решения данной проблемы были разработаны так называемые биореlevantные среды растворения (biorelevant media), позволяющие моделировать поведение ЛС, их растворение и абсорбцию в ЖКТ [10].

## 2. СОСТАВ БИОРЕЛЕВАНТНЫХ СРЕД.

Биореlevantные среды – это среды растворения, максимально приближенные к внутренним жидкостям человеческого организма (кишечный, желудочный сок) по химическому составу и по физико-химическим свойствам (pH, осмоляльность, буферная ёмкость, поверхностное натяжение). Использование данных сред позволяет наиболее достоверно моделировать поведение ЛС в условиях *in vivo*. Данные среды были разработаны проф. J. Dressman (Institute of Pharmaceutical Technology, Johann Wolfgang Goethe University, Германия); они отражают состав кишечного сока натощак и после еды (fasted state simulation intestinal fluid, FaSSIF и fed state simulation intestinal fluid, FeSSIF). Состав вышеуказанных сред растворения, их физико-химические свойства, а также состав ещё одной биореlevantной среды, имитирующей желудочный сок после еды (fasted state simulation gastric fluid, FaSSGF), приведены в таблице 1 [11].

Таблица 1. Состав и физико-химические свойства биорелевантных сред растворения.

| Компоненты                      | F <sub>2</sub> SSIF | FeSSIF            | F <sub>2</sub> SSGF |
|---------------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| Таурохолат натрия               | 3 мМ                | 15 мМ             | —                   |
| Лецитин                         | 0,75 мМ             | 3,75 мМ           | —                   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 3,9 г               | 8,65 г            | —                   |
| KCl                             | 7,7 г               | 15,2 г            | —                   |
| NaOH                            | до pH 6,5           | до pH 5,0         | —                   |
| Лаурилсульфат натрия            | —                   | —                 | 2,5 г               |
| HCl                             | —                   | —                 | 0,01M - 0,05 M      |
| NaCl                            | —                   | —                 | 2 г                 |
| Вода деминерализованная         | до 1 л              | до 1 л            | до 1 л              |
| <b>Свойства</b>                 |                     |                   |                     |
| pH                              | 6,5                 | 5,0               | —                   |
| осмоляльность                   | 270±10<br>мОсмоль   | 635±10<br>мОсмоль | —                   |

### 3. БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИОННАЯ СИСТЕМА И БИОРЕЛЕВАНТНЫЕ СРЕДЫ.

Понимание процессов, происходящих с ЛС при его попадании в ЖКТ невозможно без учета его свойств согласно Биофармацевтической классификационной системы (БКС), которая подразделяет все ЛВ на 4 класса в соответствии с их растворимостью в водных растворах (биофармацевтической растворимостью) и кишечной проницаемостью (табл. 2) [12].

Таблица 2. Биофармацевтическая классификационная система.

|   |   |
|---|---|
| <b>I класс</b><br>«Высокая» растворимость<br>«Высокая» проницаемость<br>(Парацетамол) | <b>III класс</b><br>«Высокая» растворимость<br>«Низкая» проницаемость<br>(Лозартан) |
| <b>II класс</b><br>«Низкая» растворимость<br>«Высокая» проницаемость<br>(Диклофенак)  | <b>IV класс</b><br>«Низкая» растворимость<br>«Низкая» проницаемость<br>(Фуросемид)  |

Исходя из биофармацевтических свойств ЛВ каждого класса БКС, следует отметить, что именно для субстанций II класса проведение испытания «Растворение» в условиях *in vitro* наиболее объективно отражает их абсорбцию *in vivo*, поскольку лимитирующей стадией попадания таких веществ в системный кровоток являются процессы их высвобождения из ЛФ и растворения в физиологических средах в ЖКТ. Очевидно, что именно для субстанций II класса БКС наиболее вероятно установление корреляции *in vitro-in vivo* (IVIVC) [13]. В то же время, разработка биорелевантных методик испытания «Растворение» для таких ЛВ может вызвать ряд трудностей, связанных с их низкой растворимостью. Применение проточной методики, подразумевающей использование больших объемов сред растворения, не всегда обеспечивает хорошую воспроизводимость результатов испытания и требует использования дорогостоящего оборудования [14].

## ТЕСТ “РАСТВОРЕНИЕ” В БИОРЕЛЕВАНТНЫХ СИСТЕМАХ

Проведённые J. Dressman исследования наглядно показали преимущество использования биорелевантных сред для малорастворимых, липофильных ЛВ. Была изучена кинетика растворения на аппарате “Лопастная мешалка” нескольких модельных ЛС, содержащих действующие вещества с различными биофармацевтическими свойствами: парацетамола (неионизируемое ЛВ с высокой растворимостью, I класс БКС), метопролола (ЛВ слабоосновного характера с высокой растворимостью I класс БКС), даназола (неионизируемое липофильное малорастворимое ЛВ, II класс БКС), мефенаминовой кислоты (малорастворимое ЛВ слабокислого характера, II класс БКС) и кетоконазола (малорастворимое ЛВ слабоосновного характера, II класс БКС) в следующих средах растворения: воде, FaSSIF, FeSSIF, средах, имитирующих желудочный и кишечный сок, приготовленные согласно Фармакопее США (USP 23-NF 18) (Simulated Intestinal Fluid sine pancreatin SIF<sub>sp</sub>, Simulated Gastric Fluid with/without pepsin SGF/SGF<sub>sp</sub>) и молоке [15]. Результаты исследования показали, что применение биорелевантных сред для ЛС, содержащих действующее вещество I класса БКС неоправдано – их профили растворения не различались существенно для изученных сред и, таким образом, для изучения их кинетики растворения достаточно применения фармакопейных сред. Для малорастворимых, липофильных ЛВ II класса БКС, а также для малорастворимых слабых кислот применение буферных растворов не обеспечивает их высвобождение из лекарственной формы, в то время как биорелевантные среды позволяют получить профили растворения, которые могут отражать их поведение *in vivo*. Для подобных ЛВ принципиально их поведение в кишечнике натошак, т.е. использование FaSSIF в исследованиях является принципиальным. Для малорастворимых веществ слабоосновного характера важно поведение как в желудке, так и в кишечнике натошак, т.е. исследования должны проводиться в средах SGF<sub>sp</sub> и FaSSIF. Изучение их растворения отдельно в FaSSIF и FeSSIF могут позволить разработать объективный режим дозирования таких ЛС – до еды или после еды. Типичный пример профиля растворения для малорастворимого, липофильного ЛВ II класса БКС в биорелевантной среде растворения FaSSIF и классическом буферном растворе с таким же значением pH приведён на рисунке 1.

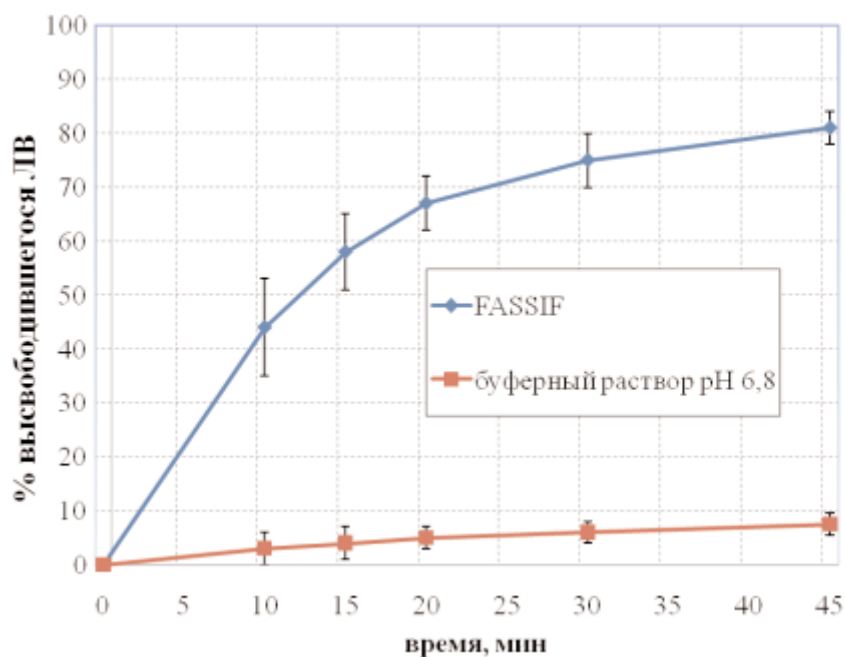


Рисунок 1.

Профили растворения малорастворимого, липофильного ЛВ II класса БКС в классическом буферном растворе и FaSSIF.

Другое исследование проф. J. Dressman наглядно показало возможность установления *in vitro-in vivo* корреляции на примере малорастворимого ЛВ слабоосновного характера – глибенкламида – в биорелевантных средах. Для среды FaSSIF была установлена надёжная (коэффициент корреляции  $r^2 = 0,999$ ) IVIVC уровня А (наиболее высокий уровень корреляции) результатов испытания “Растворение” с данными фармакокинетических исследований на здоровых добровольцах, в то время как при применении фармакопейной среды растворения (SIF) подобной корреляции не наблюдалось [16].

В дальнейших работах [17-20] было наглядно продемонстрировано преимущество использования биорелевантных сред для предсказания поведения *in vivo* малорастворимых веществ слабоосновного характера, а также липофильных веществ. Экспериментальные данные, полученные в данных исследованиях стали основой для последующих разработок в области прогнозирования растворения и абсорбции различных классов БКС препаратов для внутреннего применения.

#### 4. РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ БИОРЕЛЕВАНТНЫХ СРЕД.

Компоненты биорелевантных сред можно разделить на 3 группы, каждая из которых обеспечивает её основные физико-химические характеристики, моделирующие физиологические среды ЖКТ: регуляторы pH и буферной ёмкости (натрия гидроксид и калия дигидрофосфат), регуляторы ионной силы и осмотического давления (гидроксид натрия, дигидрофосфат калия и хлорид калия), а также поверхностно-активные вещества (ПАВ) – лецитин и таурохолат натрия. Связь растворимости субстанций с ионной силой раствора очевидна, однако было установлено, что соотношение ионных пропорций ( $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ ) не влияет на профили растворения препаратов, что было установлено при изучении кинетики растворения ЛВ в фармакопейных буферных растворах: фосфатном буфере pH 6,8 и SIF (USP 26-NF 21) [21].

Ключевым моментом в понимании особенностей кинетики растворения является осознание роли предложенных в составе среды лецитина и соли желчной кислоты – таурохолата натрия. Присутствующие в кишечном соке человека желчные кислоты эмульгируют ряд соединений, повышая их проницаемость для стенки кишечника за счёт образования мицеллярного раствора липидов в водной среде. Таким образом, в тонком кишечнике достигается максимальная абсорбция липофильных веществ, которая не будет отражена *in vitro* при использовании одних лишь фармакопейных буферных растворов. Amidon с соавт. в ряде исследований показали существенное влияние ПАВ на растворимость малорастворимых субстанций в условиях, моделирующих физиологические. На примере двух слабых кислот II класса БКС (кетопрофена и пироксикама) было установлено, что наибольший вклад в их растворимость ПАВ вносят при слабокислых и близких к нейтральным значениям pH: так, для кетопрофена прибавление к среде растворения 1,0% лаурилсульфата натрия повышало его растворимость в 17 раз при pH 4,0; в 3 раза при pH 6,0 и только в 1,25 раза при pH 6,8 [22, 23].

Подобный значительный вклад ПАВ может позволить пересмотреть критерии “высокой” растворимости (максимальная дозировка ЛВ должна полностью растворяться в 250 мл среды) для малорастворимых и липофильных ЛВ: в настоящее время растворимость согласно БКС определяют методом встряхивания в термостатируемой колбе в диапазоне pH 1,2–6,8 (обычно 1,2, 4,5, 6,8) при использовании фармакопейных буферных растворов [9]. Применение биорелевантных сред будет давать более высокие значения показателя “растворимость” и, таким образом, позволит классифицировать некоторые субстанции из I класса БКС во второй.

Например, растворимость кетопрофена в FeSSIF в 3 раз превышает таковую в буферном растворе с таким же значением pH (5,0), ибупрофена – в 5 раз, напроксена – в 20 раз [24]. Это позволит сделать их потенциальными кандидатами для проведения процедуры “биоверификации”, которая, согласно большинству



нормативных документов, допустима для I класса БКС (документы Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) и Росздравнадзора РФ также допускают её для некоторых субстанций II и III класса, Европейского Медицинского Агентства (ЕМА) – III-го [1, 7-9].

### 5. ОСОБЕННОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ БИОРЕЛЕВАНТНЫХ СРЕД.

У описанных биорелевантных сред имеется 2 недостатка: первый заключается в сроке хранения приготовленных растворов, который составляет не более 48 ч, при этом ряд исследователей рекомендует изготавливать среды непосредственно перед испытаниями, что, в свою очередь, несколько усложняет сам экспериментальный процесс [10]. Второй заключается в высокой стоимости компонентов сред - стоимость таурохолата натрия составляет порядка 30 евро за 1 г [25]. Первый недостаток возможно устранить путём усовершенствования методики приготовления данных сред, - например, приготовлением концентратов ПАВ, которые могут храниться в течение около 3 недель, с их последующим разбавлением холостыми буферными растворами [10]. Также в продаже имеются заготовки – стандартизованные порошкообразные смеси таурохолата натрия и лецитина, позволяющие упростить процесс их приготовления. Кроме того, использование данных стандартизованных порошков позволяет минимизировать непостоянство состава сред при их регулярном изготовлении вручную [26].

При разработке биорелевантных сред проф. Dressman в первую очередь пыталась максимально приблизить их к реальным физиологическим жидкостям, что и предопределило использование натрия таурохолата и лецитина в качестве эмульгаторов. В тоже время в ряде исследований, позволяющих понять роль данных компонентов в процессе высвобождения ЛВ из ЛФ и его растворения, было показано, что замена натрия таурохолата на другие эмульгаторы, например на соли 24-фосфорножелчных кислот (24-PBS) (см. рис. 2) со сходными свойствами не влияет на профили растворения модельных соединений [27, 28]. Таким образом, разработка биорелевантных сред со свойствами, аналогичными оригинальным, но содержащие более доступные ПАВ является актуальной задачей биофармации и молекулярной фармации.

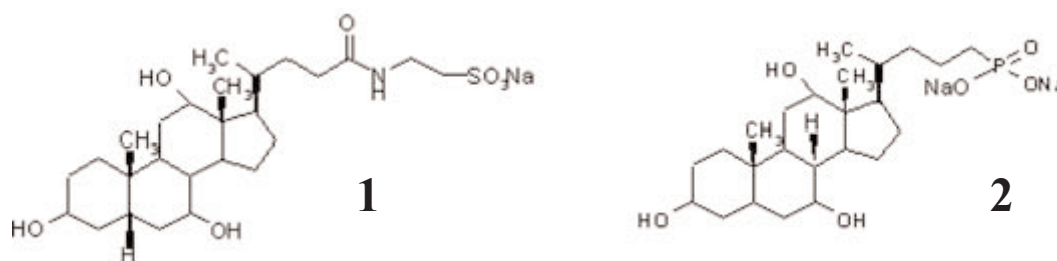


Рисунок 2.

Структурные формулы таурохолата натрия (1) и 24-PBS (2).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, важность разработки биорелевантных сред растворения для моделирования процессов высвобождения, растворения и всасывания субстанций в ЖКТ очевидна. Их применение позволяет более точно прогнозировать биодоступность ЛС для внутреннего применения при разработке технологии и состава вспомогательных веществ ЛС и в контроле качества уже готового продукта, а также в вопросах взаимозаменяемости воспроизведенных ЛС.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Proposal to waive *in vivo* bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms (2006) Technical Report Series, No 937, 40<sup>th</sup> Report, Annex 7 of WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland.
2. Государственный стандарт качества лекарственных средств. (2004) Общая фармакопейная статья 42-0003-04 "Растворение".
3. US Pharmacopeia and National Formulary USP 33–NF 28 (2010) Rockville, MD, USA: The United Pharmacopoeial Convention.
4. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд., доп, вып. 1. Общие методы анализа (1987) МЗ СССР. Медицина, М.
5. European Pharmacopoeia 6<sup>th</sup> ed. (2007) Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines, Council of Europe.
6. Давыдова К.С., Кулинич Ю.И., Шохин И.Е. (2010) Ремедиум, **5**, 42.
7. Guidance on the Investigation of Bioequivalence (2010) European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP).
8. Guidances for industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System (2001) US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
9. Методические рекомендации для разработчиков и производителей лекарственных средств по оценке эквивалентности *in vitro* генерических лекарственных средств согласно процедуре "биоэвейвер". Утв. Роздравнадзором (2010). Ремедиум, М.
10. Marques M. (2004) Dissolution Technol., **11**(2), 16.
11. Dressman J., Kramer J. (2005) Pharmaceutical Dissolution Testing, Boca Raton: Taylor & Francis.
12. Amidon G.L., Lennerlas H., Shah V.P., Crison J.R. (1995) Pharm. Res., **12**, 413–420.
13. Головенко Н.Я., Борисюк Ю.И. (2008) Биомед. химия, **54**, 392–407.
14. Hanson R., Gray V. (2004) Handbook on dissolution testing, 3rd ed. Dissolution Technologies, Inc., Hockessin, DE.
15. Löbenberg R., Krämer J., Shah V.P., Amidon G.L., Dressman J. (2000) Pharm. Res., **17**(4), 439–444.
16. Galia E., Nicolaides E., Hörter D., Löbenberg R., Reppas C., Dressman J. (1998) Pharm. Res., **15**(5), 698–705.
17. Dressman J., Reppas C. (2000) Eur. J. Pharm. Sci., **11**(Suppl. 2), 73–80.
18. Kostewicz E., Brauns U., Becker R., Dressman J. (2002) Pharm. Res., **19**, 345–349.
19. Nicolaides E., Hempenstall J., Reppas C. (2000) Dissolution Technol., **7**(1), 8–11.
20. Nicolaides E., Symillides M., Dressman J., Reppas C. (2001) Pharm. Res., **18**, 380–388.
21. Stippler E., Kopp S., Dressman J. (2004) Dissolution Technol., **11**(2), 6–10.
22. Sheng J., Kasim N.A., Chandrasekharan R., Amidon G.L. (2006) Eur. J. Pharm. Sci., **29**, 306–314.
23. Jinno J., Oh D.-M., Crison J.R., Amidon G.L. (2000) J. Pharm. Sci., **89**, 268–274.
24. Yazdani M., Briggs K., Jankovsky C., Hawi A. (2004) Pharm. Res., **21**, 293–299.
25. <http://www.sigmaaldrich.com>
26. Kloefer B., van Hoogevest P., Moloney R. (2010) Dissolution Technol., **17**(3), 6–13.
27. Jogia H., Mehta T., Patel M. (2009) Dissolution Technol., **16**(3), 14–19.
28. Zoeller T., Klein S. (2007) Dissolution Technol., **14**(4), 8–14.

Поступила: 01. 02. 2011.

THE DISSOLUTION TEST IN BIORELEVANT MEDIA AS A PROGNOSTIC TOOL  
FOR MODELING OF DRUG BEHAVIOR *IN VIVO*

*G.V. Ramenskaya<sup>1,2</sup>, I.E. Shohin<sup>1,2</sup>, A.Y. Savchenko<sup>2</sup>, E.A. Volkova<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia; tel.: 8-(495)-691-13-92;  
e-mail: ramenskaia@mail.ru

<sup>2</sup>Scientific Center for Expertise of Medical Products, Moscow, Russia

The review deals with the modern tool for modeling of drug behavior *in vivo*, – the dissolution test in biorelevant media, imitating gastrointestinal fluids. The formulations and preparation methods of fasted state simulation intestinal fluid, FaSSIF and fed state simulation intestinal fluid, FeSSIF, are defined. In addition, the dissolution characteristics of APIs from different BCS classes in biorelevant media are described. Possible applications of biorelevant media in regulatory practice and science are also shown.

**Key words:** dissolution test, biorelevant media, biopharmaceutical classification system (BCS), FeSSIF, FaSSIF, biowaiver, absorption.