

Микробиологические характеристики пелоидов лимана Бурнас, КОЕ/г

Дата	Характеристика пелоида	ОМЧ	БГКП
10.08.2009	Черный маслянистый ил с запахом сероводорода	180 000	Отсутствуют
27.09.2009	Черный маслянистый ил с запахом сероводорода	12 000	Отсутствуют

Примечание. КОЕ — колониеобразующие единицы.

ческих компонент, что важно при использовании пелоидов лимана в лечебных целях [2].

Микробиологические характеристики пелоидов приведены в табл. 2. Эти данные демонстрируют отсутствие БГКП; бактериальная флора представлена сапрофитными бактериями, играющими важную роль в процессе деструкции органических веществ и образования гумуса. Значения ОМЧ подвержены сезонным изменениям, поскольку зависят от температуры среды.

Можно констатировать, что стабильно высокие концентрации ионов  $Mg^{2+}$  в рапе и пелоидах лимана Бурнас на фоне доминирования хлорид-ионов в их ионном составе (определенная аналогия с составом препарата бишофит) позволяют рассматривать минеральные ресурсы лимана в качестве сы-

рья для создания отечественных магнийсодержащих препаратов. Очевидно, что пелоиды — наиболее перспективный объект исследований в указанном направлении. Выбор в качестве потенциального сырьевого источника лимана Бурнас по сравнению, например, с более минерализованным лиманом Куяльник [1] объясняется тем, что акватория последнего испытывает заметную антропогенную нагрузку: в рапе и пелоидах Куяльника обнаруживаются соединения тяжелых металлов, нефтепродукты, детергенты, БГКП [1; 8].

Работа выполнена в рамках договора о научно-техническом сотрудничестве между Одесским национальным медицинским университетом и Одесским филиалом Института биологии южных морей НАН Украины.

1. *Северо-западная часть Черного моря: биология и экология* / под ред. Ю. П. Зайцева, Б. Г. Александрова, Г. Г. Миничевой. — К. : Наукдумка, 2006. — 701 с.

2. *Лечебные грязи (пелоиды) Украины* / под ред. М. В. Лободы, К. Д. Бабова, Т. А. Золотаревой, Е. М. Никепеловой. — Ч. 1. — К. : Куприянова Е. А., 2006. — 320 с.

3. *Городецкий В. В.* Препараты магния в медицинской практике / В. В. Городецкий, О. Б. Талибов. — М. : ИД Медпрактика-М, 2008. — 44 с.

4. *Методы гидрохимических исследований океана* / под ред. О. К. Бордовского. — М. : Наука, 1978. — 270 с.

5. *ГОСТ 17.4.4.02-84.* Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического анализа. — М., 1984.

6. *Методические указания по гигиеническому контролю загрязнения морской среды.* — М. : Министерство здравоохранения СССР, 1981. — 31 с.

7. *ГОСТ 12536-79.* Методы лабораторного определения гранулометрического (зернового) и микроагрегатного состава. — М., 1979.

8. *Адобовский В. В.* Современное состояние и экологические проблемы Куяльницкого лимана / В. В. Адобовский, Г. Н. Шихалева, Н. М. Шурова // *Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа.* — Севастополь, 2002. — Вып. 1 (6). — С. 71–81.

УДК 615.214.22

М. Я. Головенко, І. Ю. Борисюк, З. О. Гіхер,  
А. В. Єгорова, Д. І. Александрова

## АНАЛІЗ БІОФАРМАЦЕВТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ГІДАЗЕПАМУ ІС

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, Одеса,  
ВАТ ІнтерХім, Одеса

Гідазепам має оригінальний спектр фармакологічної активності, поєднуючи виражену анксиолітичну дію зі здатністю оптимізувати навчання й оперантну діяльність при незначних побічних ефектах і низькій токсичності [1]. Поєднання перерахованих властивостей визначає перевагу гідазепаму порівняно з іншими відомими транквілізаторами, для більшості яких характерна седативна та міорелаксанта дія.

Фармакотоксикологічні характеристики гідазепаму були достатньо вивчені, проте біофармацевтичні показники також потребують уваги для вивчення безпечності лікарського засобу (ЛЗ). Саме тому **метою** даної роботи стало визначення основних біофармацевтичних показників гідазепаму (його фізико-хімічних властивостей, насамперед розчинності, вивільнення з лікарської форми, всмоктування зі шлунково-кишко-



вого тракту) і впливу допоміжних речовин на біологічну доступність.

### Матеріали та методи дослідження

З метою прогнозування деяких фізико-хімічних і біофармацевтичних властивостей, метаболізму гідазепаму IC наші розрахунки були проведені з використанням офіційної версії програми ADMET Predictor™ [2]. Таке попереднє використання програми дозволяє виявити можливі ускладнення, пов'язані зі всмоктуванням, розподілом, метаболізмом, екскрецією та токсичністю активного фармацевтичного інгредієнта (субстанції) в організмі людини.

Фізико-хімічний і біофармацевтичний модуль ADMET Predictor™ висвітлює такі питання:

1. Кислотні й основні константи іонізації  $pK_a$ . Використовується точна термодинамічна багатоосновна модель для кількох станів іонізації, що ґрунтується на атомних дескрипторах і нейронних сітках.

2. Ефективна проникність тонкої кишки у людей ( $P_{eff}$ ),  $cm/c \cdot 10^4$  [3]. Модель проникності Simulations Plus прогнозує ефективну проникність порожньої кишки у людей ( $P_{eff}$ ), базуючись на значеннях *in vivo* проникності, визначених у людей, і значеннях *in situ* проникності стінки у щурів ( $P_{app}$ ). Значення *in situ*  $P_{app}$  для щурів конвертували у значення  $P_{eff}$  для людей, використовуючи регресійну залежність.

3. Ефективна проникність уздовж усього кишечнику людей ( $P_{avg}$ ),  $cm/c \cdot 10^4$ .

4. Проникність у культурі епітеліальних клітин нирок собак (S+MDCK),  $cm/c \cdot 10^7$  [4].

5. Розчинність, яка у воді (S+S<sub>w</sub>, мг/мл) передбачає три моделі: одна ґрунтується на розрахунках штучної нейронної сітки та дві моделі (Meulan — Howard), що відрізняються показниками точок плавлення [5]:

— значення pH розраховане з природної розчинності та констант іонізації з використанням теорії хімічної рівноваги (S+pH);

— внутрішня розчинність розрахована з природної розчинності, природного pH і  $pK_a$  з використанням теорії хімічної рівноваги (S+IS), мг/мл;

— фактор сольової розчинності (S+SF) — співвідношення сольової розчинності і кишкової розчинності; регресійні моделі, що використовують відповідні кишкові розчинності як дескриптори;

— розчинність із використанням специфічного pH (S+Sp), мг/мл, розраховується з факторів кишкової розчинності, сольової розчинності та констант іонізації з використанням теорії хімічної рівноваги.

6. Коефіцієнт розподілу октанол/вода (log P). Використовує дві моделі log P у ADMET Predictor™ — S+log P і M log P. Перша базується на штучних нейронних мережах (ANNE), побу-

дованих за моделями ADMET Modeler™. Майже з 13 000 прикладів сполук обрано "StarList" іонно-коректних експериментальних значень log P [6]. Друга ґрунтується на даних, опублікованих Moriguchi et al. [7]. Вона збережена для порівняльних характеристик сполуки.

7. Коефіцієнт розподілу октанол/вода, log D (тобто оцінка коефіцієнта розподілу октанол-вода при певному pH). Коефіцієнт розподілу октанол/вода визначається зіставленням аналітичних концентрацій у октанолі та водній фазі відповідно [8], тому що включає всі протоновані стани даної сполуки і не залежить від pH. Отже, модель log D набагато складніша, ніж log P. Повний pH профіль може бути отриманий від pH-залежного розподілу протонованих станів у двох розчинниках. Дана S+log D модель є унікальною, тому що всі дифузійні фактори, які залежать від структури, розраховуються за допомогою штучної нейронної сітки (ANNE) з використанням молекулярних дескрипторів. Наша  $pK_a$  модель прогнозує необхідні  $pK_a$  для розрахунку іонізованих фракцій і S+log P забезпечує значення log P. Таким чином, структурно-залежна S+log D модель значно перевершує попередні версії з постійними дифузійними факторами.

8. Молекулярний коефіцієнт дифузії у воді (D),  $cm^2/c \cdot 10^5$ . Програма використовує підхід Hayduk — Laudie [9] для оцінки коефіцієнтів дифузії розведених у воді неелектролітів:

$$D = 13,36h^{-1,4}V^{-0,589},$$

де  $h$  — в'язкість води (cP) при 37 °C;

$V$  — молярний об'єм розчинення при нормальній температурі кипіння,  $cm^3/(г \cdot моль)$ ;

$D$  — бінарний коефіцієнт дифузії при нескінченному розведенні,  $cm^2/c \cdot 10^5$ .

9. Якісна оцінка проникнення крізь гематоенцефалічний бар'єр (S+BBB) класифікує сполуки на два класи (які мають високу або низьку проникність).

10. Процентний вміст ЛЗ, які знаходяться у вільному стані в плазмі крові людини, це 2D модель (S+PrUnbnd), %. Ця модель є штучною нейронною сіткою, що пройшла навчання з використанням експериментальних даних для 331 препарату і була перевірена на наборі, що складався з 55 ліків, які не застосовувалися в процесі навчання.

11. Об'єм розподілу у людей (S+V<sub>d</sub>, л/кг) прогнозується логарифмічною моделлю з 2D і 3D версіями, що базуються на моделі штучної нейронної сітки, які пройшли навчання, з використанням експериментальних даних 740 добре вивчених препаратів. Модель була протестована на 111 препаратах, які не застосовувалися в процесі навчання.

Модуль метаболізму ADMET Predictor™ розраховує:



1) кінетичні константи Міхаеліса — Ментен для реакції гідроксилювання, що каталізуються ферментами цитохрому P450 ( $K_m$ ),  $\mu\text{моль}$ : 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 (п'ять моделей);

2) кінетичні константи максимальної швидкості метаболізму Міхаеліса — Ментен для реакції гідроксилювання, що каталізуються ферментами цитохрому P450 ( $V_{max}$ ),  $\text{нмоль}/(\text{хв}\cdot\text{нмоль})$  ферменту: 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 (п'ять моделей);

3) кишковий кліренс ( $CL_{int}$ ),  $\mu\text{л}/(\text{хв}\cdot\text{мг})$  мікросомальних протеїнів, розрахований із метаболічної активності п'яти ферментів цитохрому P450: 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 (п'ять моделей);

4) загальні інгібуючі властивості відносно чотирьох ферментів цитохрому P450: 1A2, 2C9, 2D6, 3A4 (чотири моделі);

5) специфічні інгібуючі властивості відносно 3A4-залежного метаболізму для мідазоламу та тестостерону (дві моделі);

6) специфічні константи інгібування відносно 3A4-залежного метаболізму для мідазоламу та тестостерону ( $k_i$ ),  $\mu\text{моль}$  (дві моделі).

Для дослідження транспорту вздовж шлунково-кишкового тракту використовували програмне забезпечення GastroPlus™ [2]. Розрахунки ґрунтуються на ACAT моделі, що описує процеси вивільнення, розчинення, розпаду в порожнині шлунково-кишкового тракту (якщо це спостерігається), метаболізму, абсорбції/адсорбції при транзиті через відсіки. Кінетичні параметри цих процесів розраховуються системами лінійних і нелінійних рівнянь швидкостей. Вони включають шість показників концентрації ЛЗ (яка не вивільняється, нерозчинна, розчинна, така, що розпалася, метаболізована і така, що всмокталася), 18 відсіків, із них 9 шлунково-кишкового тракту (шлунок, 7 сегментів тонкого кишечника, пряма кишка) і 9 зон ентероцитів, 3 станів матеріалу, що екскретується (який не вивільняється, нерозчинний і розчинний), а також кількості ЛЗ у 3 фармакокінетичних камерах, де відповідні параметри є доступними. Загальна кількість матеріалу, що всмоктався, є сумою інтегрованих показників, у яких враховані процеси абсорбції/ексорбції в кожному відсіку шлунково-кишкового тракту, а також його транзит.

Модель ACAT в GastroPlus моделює швидкість таких змін препарату в розчині та в камері, як функція транзиту розчиненого ЛЗ в камеру з попередньої камери, розчинення твердих частинок, осадження розчиненого препарату, розпад препарату в розчині, всмоктування препарату і витік препарату з камери. Транзит між камерами описується константою швидкості, яка є усередненим показником для кожної камери. Розчинення твердих частинок препарату описує змінена версія рівнянь Нойеса

— Уїтні, а всмоктування з порожнини кишечника описує константа всмоктування.

Моделювання процесів у організмі людей проведено з урахуванням дози препарату (20 мг), що вводили перорально натщесерце й після їди, а також біологічних і фізичних параметрів шлунково-кишкового тракту (табл. 1).

Отримані результати ADMET Predictor™ і GastroPlus™ дозволять перейти до іншого етапу досліджень, який включає дослідження розчинності активної субстанції та кінетики вивільнення гідазепаму з таблеток, що містять допоміжну речовину повідон різних виробників.

Об'єктами дослідження стали таблетки гідазепам IC по 0,02 г, до складу яких входить повідон (Plasdon K-17) виробництва "International Speciality Products (ISP), Inc.", Німеччина, і таблетки гідазепам IC по 0,02 г, до складу яких входить повідон (Kollidon®25) виробництва "BASF SE", Німеччина; виробник — ВАТ «ІнтерХім»; субстанція гідазепаму (порошок), виробник — ВАТ «ІнтерХім».

У роботі використовували спектрофотометр UV-2401PC (Shimadzu); спектральний діапазон вимірювань коливався від 190 до 900 нм, точність:  $\pm 0,003$  А (поглинання), відтворюваність:  $\pm 0,001$  А, рН-метр-мілівольтметр рН-121 (діапазон вимірювань рН від -1 до +14; основна абсолютна похибка вимірювань:  $\pm 5$  мВ).

Кількісне визначення субстанції гідазепаму в тесті «Розчинення» проводимо спектрофотометричним методом стандарту, тому що розчин гідазепаму у 0,01 М розчині хлористоводневої кислоти має характерний максимум поглинання при довжині хвилі (240 $\pm$ 2) нм. «Плацебо» при цій довжині хвилі не заважає визначенню гідазепаму, що дозволяє стверджувати про специфічність запропонованого методу визначення вмісту активної субстанції в препараті гіда-

Таблиця 1

**Біологічні та фізичні параметри шлунково-кишкового тракту людини, що використовуються для розрахунків у GastroPlus™**

Сегмент шлунково-кишкового тракту	Значення рН	Час проходження, год	Довжина, см	Радіус, см
Шлунок	1,3	0,25	28,29	9,67
Дванадцятипала кишка	6	0,26	14,13	1,53
Порожня кишка 1	6,2	0,93	58,4	1,45
Порожня кишка 2	6,4	0,74	58,4	1,29
Клубова кишка 1	6,6	0,58	58,4	1,13
Клубова кишка 2	6,9	0,42	58,4	0,98
Клубова кишка 3	7,4	0,29	58,4	0,82
Сліпа кишка	6,4	4,19	13,19	3,39
Пряма кишка	6,8	12,57	27,65	2,41



зепам ІС. Тест «Розчинення» проводиться послідовно в 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти з рН 1,1; ацетатному буферному розчині з рН 4,5; 0,05 М фосфатному буферному розчині з рН 6,8.

Для проведення тесту «Розчинення» використовували прилад із лопаттю-мішалкою виробництва «ERWEKA», Німеччина, типу DT 706 НН. Об'єм середовища розчинення — 500 мл, температура —  $(37,0 \pm 0,5)$  °С. Швидкість обертання лопаті — 100 об/хв. Час розчинення — 45 хв. Як середовище для розчинення використовували:

- 1) 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої;
- 2) ацетатний буферний розчин рН 4,5;
- 3) фосфатний буферний розчин рН 6,8.

Для виконання тесту брали по 12 таблеток кожної з двох серій препарату (1-ша серія — до складу яких входить повідон Plasdon K-17, 2-га серія — містить повідон Kollidon®25). У циліндричний посуд, який містить 500 мл середовища для розчинення, поміщали 1 таблетку випробуваного препарату. Через певні проміжки часу відбирали 5,0 мл розчину в мірну колбу об'ємом 25,0 мл, доводили до мітки 0,01 М розчином хлористоводневої кислоти і перемішували, фільтрували через мембранний фільтр 0,20 мкм (Minisart RC 15, «Sartorius»).

Оптичну густину випробуваного розчину вимірювали відповідно 0,01 М розчину хлористоводневої кислоти на спектрофотометрі в максимумі поглинання при довжині хвилі  $(240 \pm 2)$  нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Паралельно проводили вимірювання оптичної густини розчину РСЗ гідазепаму.

Розчин РСЗ гідазепаму. У мірну колбу об'ємом 250,0 мл поміщають 0,050 г гідазепаму, розчиняють у 50 мл 0,01 М розчину хлористоводневої кислоти при слабкому нагріванні, охолоджують, доводять об'єм розчину до мітки тим же розчинником і перемішують; 2,0 мл отриманого розчину доводять 0,01 М розчином хлористоводневої кислоти до 100,0 мл і перемішують. Термін придатності розчину — 1 доба.

Тест «Розчинення» проводиться послідовно в 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти з рН 1,1; ацетатному буферному розчині з рН 4,5; фосфатному фізіологічному буферному розчині з рН 6,8.

Кількість гідазепаму, який перейшов у розчин із таблетки (у відсотках), розраховували за формулою:

$$X = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 1000 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100}{A_0 \cdot V \cdot b \cdot 250 \cdot 100} = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 200}{A_0 \cdot V \cdot b},$$

де  $A_1$  — оптична густина розчину, що досліджують;  $A_0$  — оптична густина РСЗ гідазепаму;  $m_0$  — наважка РСЗ гідазепаму, г;  $V$  — об'єм фільтрату, що взяли на аналіз, мл;  $b$  — кількість гідазепаму в таблетці, у грамах — 0,02 г.

Кількість гідазепаму, який перейшов у розчин із таблетки в кожній точці пробовідбору ( $X_n$ ) (у відсотках), розраховували за формулою:

$$X_n = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot V_n \cdot 2 \cdot 25 \cdot 2 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot (a - \sum_1^n b_n) \cdot 250 \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100} = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot V_n \cdot P}{A_0 \cdot (a - \sum_1^n b_n) \cdot 25 \cdot 100},$$

де  $n$  — порядковий номер пробовідбору;  $A_1$  — оптична густина розчину, що досліджують;  $A_0$  — оптична густина РСЗ гідазепаму;  $m_0$  — наважка наважки гідазепаму, яку взяли для приготування розчину РСЗ гідазепаму, г;  $a$  — вміст гідазепаму в одній таблетці, у грамах — 0,02 г;  $P$  — вміст гідазепаму в стандартному зразку, який взято для приготування розчину РСЗ, %;  $V_n$  — об'єм розчинника в  $n$  точці пробовідбору, мл;  $b_n$  — зменшення кількості речовини в умовах відбору проб, яке розраховується за формулою:

$$b_n = \frac{a \cdot X_{n-1} \cdot d \cdot 0,01}{V_{n-1}},$$

де  $d$  — об'єм аліквоти, мл — у даному випадку — 5,0 мл.

Умови виконання досліджень наведені в табл. 2.

Таким чином, при розрахунку кількості гідазепаму в кожній точці часового терміну враховано зменшення об'єму розчину й убування речовини при відборі проби.

Значення відносної похибки середнього результату  $\varepsilon$  у відсотках розраховували за формулою:

$$\varepsilon = \frac{\Delta \bar{X}}{\bar{X}},$$

де  $\Delta \bar{X}$  — абсолютна похибка середнього результату;  $\bar{X}$  — середнє значення результату з 12 паралельних вимірювань.

### Результати дослідження та їх обговорення

Результати моделювання з використанням комп'ютерної програми ADMET Predictor™ фізико-хімічних і біофармацевтичних властивостей, дослідження токсичності та можливих шляхів метаболізму гідазепаму за структурною формулою наведені в табл. 3.

Низька розчинність активного інгредієнта гідазепаму у воді (0,00187 мг/мл) і відповідні показники коефіцієнтів розподілу октанол/вода  $\log P$  і  $\log D$  свідчать про високу ліпофільність сполуки. Відмічений високий коефіцієнт дифузії  $(0,76 \cdot 10^5 \text{ см}^2/\text{с})$  і достатньо висока ефективна



Таблиця 2

Умови та процедура розрахунків  
кількісного визначення вмісту гідазепаму

n	Час відбору проб, хв	Об'єм розчинника V <sub>n</sub> , мл	b <sub>n</sub>
1	5	1000	b <sub>1</sub> = 0
2	10	995	b <sub>2</sub> = $\frac{0,02 \cdot X_1 \cdot 5 - 0,01}{1000} = \frac{0,001 \cdot X_1}{1000}$
3	15	990	b <sub>3</sub> = $\frac{0,02 \cdot X_2 \cdot 5 - 0,01}{995} = \frac{0,001 \cdot X_2}{995}$
4	25	985	b <sub>4</sub> = $\frac{0,02 \cdot X_3 \cdot 5 - 0,01}{990} = \frac{0,001 \cdot X_3}{990}$
5	35	980	b <sub>5</sub> = $\frac{0,02 \cdot X_4 \cdot 5 - 0,01}{985} = \frac{0,001 \cdot X_4}{985}$
6	45	975	b <sub>6</sub> = $\frac{0,02 \cdot X_5 \cdot 5 - 0,01}{980} = \frac{0,001 \cdot X_5}{980}$

проникність тонкого кишечника людей (P<sub>eff</sub> = 0,18 · 10<sup>4</sup> см/с) дозволяють припустити, що всмоктування активної біологічної субстанції препарату можливе шляхом пасивної дифузії. Те, що ефективна проникність уздовж усього кишечника людей P<sub>avg</sub> збільшується більше ніж удвічі, доводить наявність можливих транспортерів, які беруть участь при всмоктуванні, та можливість транзиту сполуки уздовж кишечника. Однак при достатньому об'ємі розподілу 0,31 л/кг у людей прогнозується низьке проникнення крізь гематоенцефалічний бар'єр.

У модулі метаболізму ADMET Predictor™ розраховані основні кінетичні характеристики ефективності ферментів — K<sub>m</sub> і V<sub>max</sub>, якщо метаболізм активної сполуки проходить за реакцією гідроксилювання. K<sub>m</sub> характеризує спорідненість даного ферменту до субстрату (потенційного ЛЗ) і є постійною величиною, що не залежить від концентрації ферменту. Що менше K<sub>m</sub>, то більша спорідненість ферменту до даного субстрату і то вища початкова швидкість реакції та, навпаки, що більше K<sub>m</sub>, то менша початкова швидкість реакції і то менша спорідненість ферменту до субстрату. Отже, найвища початкова швидкість реакції та більша спорідненість до субстрату спостерігаються для ізоформи CYP 2D6, а навпаки — для ізоформи CYP 1A2 (тобто менша початкова швидкість реакції та менша спорідненість до субстрату). Показник V<sub>max</sub> характеризує каталітичну активність ферменту, а кишковий кліренс CL<sub>int</sub> є мірою активності ферменту і не

Таблиця 3

Прогноз властивостей гідазепаму  
програмою ADMET Predictor™

Фізико-хімічний і біофармацевтичний модуль		
pK <sub>a</sub>	кислотні	основні
	22,62	9,01; -1,63; -8,15
P <sub>eff</sub> , см/с · 10 <sup>4</sup>	0,18	
P <sub>avg</sub> , см/с · 10 <sup>4</sup>	0,39	
S+MDCK, см/с · 10 <sup>7</sup>	22,44	
S+S <sub>w</sub> , мг/мл	0,00187	
S+pH	8,55	
S+IS, мг/мл	0,000486	
S+SF	6380	
S+Sp, мг/мл	0,0201	
S+log P	-9,92	
M log P	1,68	
S+log D	-11,53	
D, см <sup>2</sup> /с · 10 <sup>5</sup>	0,76	
S+BBB	низьке	
S+PrUnbnd, %	0,09	
S+V <sub>d</sub> , л/кг	0,31	
Модуль метаболізму		
K <sub>m</sub> , μмоль	CYP 1A2	80,5
	CYP 2C9	9,8
	CYP 2C19	22,7
	CYP 2D6	0,289
	CYP 3A4	0,765
V <sub>max</sub> , нмоль/(хв · нмоль ферменту)	CYP 1A2	641
	CYP 2C9	0,0181
	CYP 2C19	344
	CYP 2D6	0,0291
	CYP 3A4	0,0075
CL <sub>int</sub> , μл/(хв · мг мікросомальних протеїнів)	CYP 1A2	413,913
	CYP 2C9	0,135
	CYP 2C19	212,394
	CYP 2D6	0,805
	CYP 3A4	1,089
Загальні інгібуючі властивості	CYP 1A2	інгібує
	CYP 2C9	інгібує
	CYP 2D6	не інгібує
	CYP 3A4	не інгібує
Специфічні інгібуючі властивості CYP 3A4	мідазолам	не інгібує
	тестостерон	інгібує
k <sub>i</sub> , μмоль	мідазолам	3,447
	тестостерон	6,884

залежить від інших фізіологічних факторів (це фактор пропорційності між швидкістю метаболізму та концентрацією субстрату ЛЗ в місці ферментування). Звідси, враховуючи розраховані показники, згідно з проведеним моделюванням ADMET Predictor™, найбільш активною є ізоформа CYP 1A2. Проте, як було показано раніше [10], в експерименті на основі інгібіторного аналізу основними ізоформами,



**Параметри розчинення,  
всмоктування та транспорту  
вздовж шлунково-кишкового тракту**

Показник	Натще-серце	Після їди
Число дози ( $D_0$ )	0,08	
Число всмоктування ( $A_n$ )	2,002	
Число розчинення ( $D_n$ )	34,655	
Біодоступність прогноз, %	91,114	99,69
Вміст у дванадцятипалій кишці, %	8,3	23,4
Вміст у порожній кишці, % (1-й відсік)	23,9	39,4
Вміст у порожній кишці, % (2-й відсік)	16,3	18,2
Вміст у клубовій кишці, % (1-й відсік)	11,4	8,8
Вміст у клубовій кишці, % (2-й відсік)	7,7	4,3
Вміст у клубовій кишці, % (3-й відсік)	5,3	2,2
Вміст у сліпій кишці, %	6,9	1,9
Вміст у прямій кишці, %	11,4	1,4
Константа швидкості переходу з відсіку дванадцятипалої кишки до порожньої кишки	0,18148	0,194564
Константа швидкості переходу з відсіку порожньої кишки до клубової кишки	1,0944	2,75789
Константа швидкості переходу з відсіку клубової кишки до сліпої кишки	0,0734	0,01376
Константа швидкості переходу з відсіку сліпої кишки до прямої кишки	0,31836	0,03537

що каталізують окиснення гідазепаму, є СYP 3A4 та СYP 2C19, які активно беруть участь як у N<sup>1</sup>-деалкілуванні, так і у С<sup>3</sup>-гідроксилюванні. Через те, що показник  $k_i$  практично є концентрацією конкуруючого ліганду, з'єднаного з половиною доступних рецепторів у рівноважному стані системи, то що нижчий даний показник, то більшою є його спорідненість до рецептора. Відмітимо, що  $k_i$  характеризує силу взаємодії (у тому числі час, протягом якого рецептор зайнятий лігандом), але не характеризує модальність (полярність) цієї сили (інгібування або активація рецептора). З цією метою спочатку прогнозовано специфічні властивості відносно 3A4-залежного метаболізму для мідазоламу та тестостерону, де показано гальмівний вплив тестостерону, а потім розраховано їх константи. Низькі значення  $k_i$  для мідазоламу та тестостерону свідчать про їх більшу спорідненість до рецептора.

Для обговорення даних, отриманих програмою GastroPlus™, що наведені в табл. 4, нами використані такі три теоретичні міркування.

1. Показник  $D_0$  свідчить про можливість розчинення припустимої дози препарату у людей в наявному об'ємі, що є найбільш критичним у зазначеному процесі. Якщо  $D_0$  збільшується від 0 до 1, то «середовище для розчинення» поступово насичується, а більше 1 — середовище є повністю насиченим ЛЗ, який знаходиться на поверхні.

2. Число всмоктування ( $A_n$ ) становить сумарну кількість ЛЗ, яка проникає через бар'єр. Знову ж таки доступний об'єм розчинення ЛЗ є одним із найважливіших параметрів для інших не пероральних шляхів введення. Однак якщо спостерігається висока константа швидкості всмоктування і тривалість (довгий час) перебування в шлунково-кишковому тракті, то значна кількість препарату транспортується в системний кровообіг. У тому разі, коли швидкість всмоктування менша, ніж транзит ( $A_n < 1$ ), препарат буде переміщуватися вздовж шлунково-кишкового тракту, доки повністю не перейде до системного кровообігу.

3. Для твердої оральної форми ЛЗ системної дії можна використовувати значення  $D_n$  для оцінки того, чи може розчинитися препарат у доступні часові терміни (що відповідає часу перебування в системі). Невідомим параметром при цьому є коефіцієнт дифузії ЛЗ, який може бути розрахований із даних проникності, що можна знайти в літературі. Високі значення  $D_n$  (тобто більше 10) свідчать про те, що час перебування є досить тривалим для ліків, тому розчинність і швидкість розчинення не є критичним параметром.

З метою прогнозування біодоступності препаратів нами проведено порівняльну харак-

теристику параметрів  $D_0$ ,  $A_n$  та  $D_n$  із зазначеним показником. Вважається, якщо  $D_0 < 0,1$ , то критерій всмоктування є високим. Для показника  $A_n$  аналогічна закономірність має такий вигляд:  $A_n < 0,1 \cdot \text{АНД}$  — високий ступінь проникнення. У даному випадку розрахунки необхідно вести зі значення 250 (об'єм рідини для розчинення, який задається в програмі GastroPlus™ для розрахунків), що і становить АНД. У всіх випадках спостерігається кореляція  $A_n$  із високим ступенем проникнення.

Як уже зазначалося, високі значення  $D_0 > 10$  свідчать про тривалість перебування препарату в шлунково-кишковому тракті, тому ступінь і швидкість розчинення його активного фармацевтичного інгредієнта не є критичним параметром.

Отже, отримані результати свідчать про можливість використання зазначених підходів для визначення біофармацевтичних параметрів гідазепаму. Треба відмітити, що, згідно



з розрахованими показниками вмісту у відповідних відділах шлунково-кишкового тракту і константами швидкості переходу з одного відсіку до іншого, можна припустити необхідність вживання препарату після їжі.

Враховуючи фізико-хімічні та біофармацевтичні властивості гідазепаму (низька розчинність, висока ліпофільність), можна перейти до наступного кроку експериментального дослідження розчинності як самої субстанції, так і кінетики її вивільнення з таблетованої лікарської форми.

Відомо три основних випадки стосовно розчинності діючої речовини препарату.

1. Лікарський засіб вважається дуже швидкокорозчинним, якщо не менше 85 % від вказаного у маркуванні активного інгредієнта переходить у розчин за 15 хв при використанні приладу з лопаттю (50 або 75 об/хв) або з кошиком (100 об/хв) у кожному з досліджуваних середовищ (рН 1,2; 4,5; 6,8) об'ємом 900 мл або менше.

2. Лікарський засіб є швидкокорозчинним, якщо не менше 85 % переходить у розчин за 30 хв в умовах, які зазначені в позиції 1.

3. Усі інші препарати належать до категорії з повільним розчиненням.

З цією метою нами було попередньо проведено встановлення рівноважної розчинності активного фармацевтичного інгредієнта (субстанції) виробництва фірми ВАТ «ІнтерХім», у трьох буферних розчинах у діапазоні рН 1,2–6,8 (рекомендовані значення рН 1,1; 4,5 і 6,8) при температурі (37±1) °С.

У результаті дослідження було відмічено зміну характеру спектра та зсуву довжини хвилі максимуму спектра РСЗ гідазепаму залежно від середовища розчинення: для 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти — 241 нм; ацетатного буферного розчину рН 4,5 (USP 24) —

231 нм; 0,05 М фосфатного буферного розчину рН 6,8 (USP 24) — 231 нм. Спектри поглинання РСЗ гідазепаму, отриманого з наважки 0,050 г у відповідних буферних системах, наведені на рис. 1.

При дослідженні кінетики вивільнення активного фармацевтичного інгредієнта з двох серій таблеток оптичну густину досліджуваного розчину визначали спектрофотометричним методом при відповідній довжині хвилі для кожного з буферних розчинів і розраховували кількісний вміст із урахуванням зменшення об'єму розчину й убуванням речовини при відборі проби.

На рис. 2 (а–в) наведені криві вивільнення гідазепаму з таблеток по 0,02 г двох серій, що містять допоміжну речовину — повідон різних виробників — у різних буферних системах.

Як видно з рис. 2, а, речовина досить швидко переходить у 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти з рН 1,1, уже через 5 хв дослідження вивільнюється більше ніж 93 % з таблеток, до складу яких входить повідон (Plasdon K-17), а через 10 хв дослідження вивільнюється вся доза. Треба відмітити, що швидкість вивільнення гідазепаму з таблеток, до складу яких входить повідон (Kollidon®25), значно вища, на 5-ту хвилину вивільнюється практично весь фармацевтично активний інгредієнт. В ацетатному буферному розчині з рН 4,5 (див. рис. 2, б) на 5-ту годину дослідження з лікарської форми, яка містить Plasdon K-17, вивільнюється 82 % гідазепаму, а протягом 45 хв — 97 %. Вивільнення гідазепаму з таблеток 2-ї серії значно вище: так, уже на 5-ту хвилину вивільнюється 97 % субстанції.

Вивільнення субстанції з двох досліджуваних лікарських форм при розчиненні в фосфатному фізіологічному буферному розчині з рН

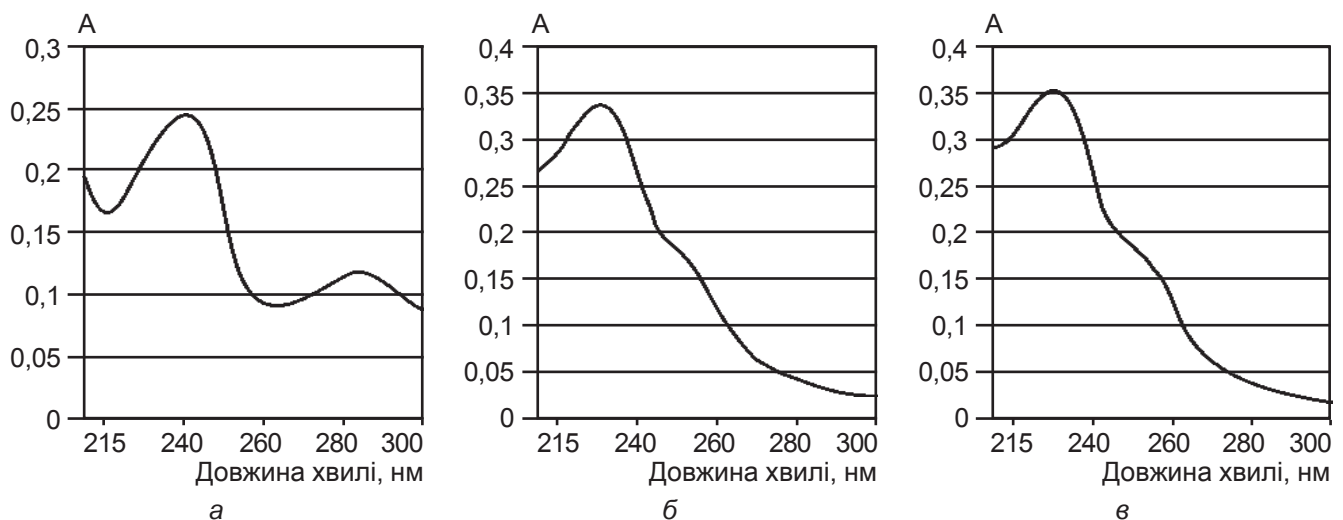


Рис. 1. Спектр поглинання РСЗ в 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти (а); ацетатному буферному розчині рН 4,5 (б); 0,05 М фосфатному буферному розчині рН 6,8 (в)

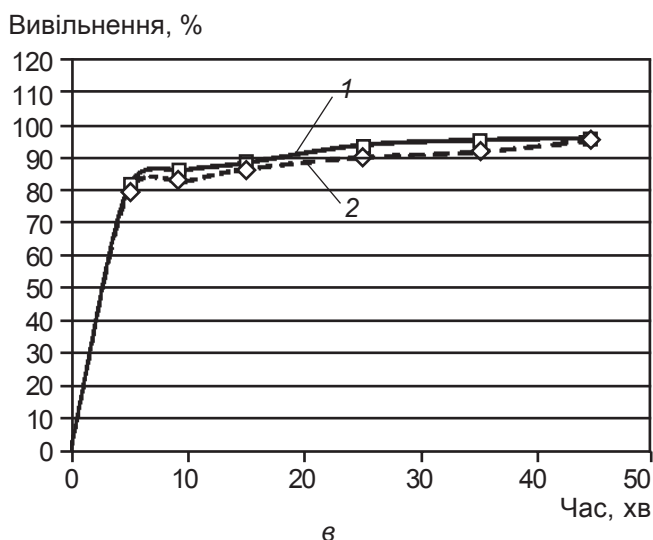
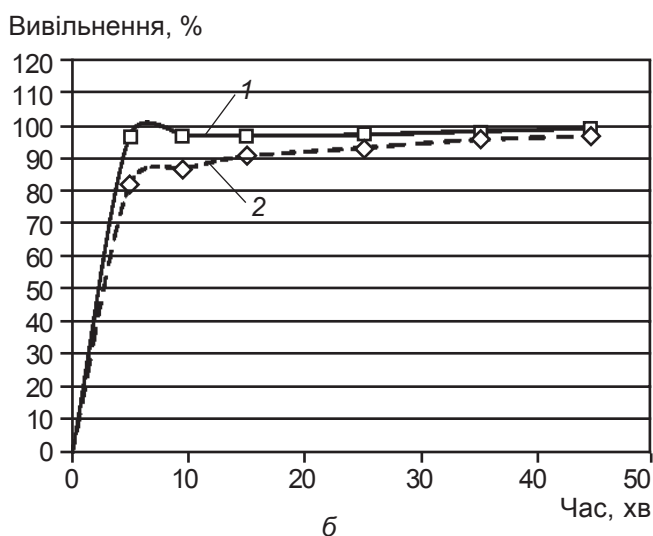
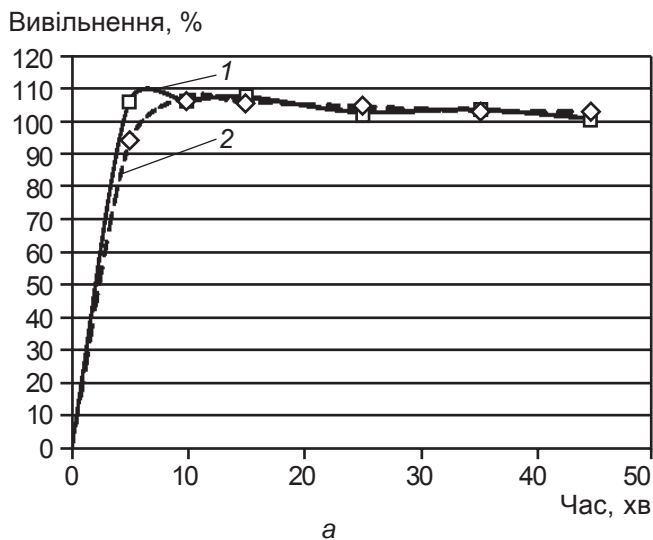


Рис. 2. Профілі розчинення гідазепаму в препараті гідазепам ІС, таблетки по 0,02 г, двох серій (1-ша містить Plasdon К-17 і 2-га — Kollidon®25), що досліджуються при розчиненні в 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти (а); ацетатному буферному розчині рН 4,5 (б); 0,05 М фосфатному буферному розчині рН 6,8 (в)

6,8 показано на рис. 2, в. Для двох серій препаратів спостерігається практично однакова картина: так, на 5-ту хвилину досліду вивільнюється приблизно 80 % активного фармацевтичного інгредієнта, а протягом 45 хв — приблизно 96 %.

Треба відмітити, що спостерігаються достатньо високі показники вивільнення гідазепаму, що зумовлено включенням до складу таблетованої лікарської форми допоміжних речовин, які покращують розчинність субстанції. Результати дослідження профілів розчинності препарату гідазепам ІС по 0,02 г, до складу яких входить повідон (Plasdon К-17) виробництва "International Speciality Products (ISP), Inc." (Німеччина), та гідазепам ІС по 0,02 г, до складу яких входить повідон (Kollidon®25) виробництва "BASF SE" (Німеччина), підтверджують відсутність змін у їх профілях розчинення. Вивільнення більше ніж 85 % гідазепаму за 15 хв у всіх серіях, які досліджуються, свідчить про подібність профілів розчинення та не потребує розрахунку фактора подібності  $f_2$ . Отже, загальні вимоги «не менше 70 % за 45 хв», очевидно, будуть завжди виконуватися, незважаючи на використання допоміжної речовини повідон двох різних виробників.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Гидазепам / С. А. Андронати, Т. А. Воронина, Н. Я. Головенко [и др.]. — К. : Наук. думка, 1992. — 195 с.
2. Simulations Plus, Inc., [www.simulationsplus.com](http://www.simulationsplus.com).
3. Lennernas H. Human Intestinal Permeability / H. Lennernas // J. Pharm. Sci. — 1998. — Vol. 87. — P. 403–410.
4. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells: a tool for membrane permeability screening / J. D. Irvine, L. Takahashi, K. Lockhart [et al.] // J. Pharm. Sci. — 1999. — Vol. 88. — P. 28–33.
5. Meylan W. M. Improved method for estimating water solubility from octanol/water partition coefficient / W. M. Meylan, P. H. Howard, R. S. Boethling // Env. Tox. and Chem. — 1996. — Vol. 15. — P. 100–106.
6. Exploring QSAR: hydrophobic, electronic and steric constraints / C. Hansch, A. Leo, D. Hoekman, S. Hammett // ACS Publications. — Washington : DC, 1995.
7. Simple method of calculating octanol/water partition coefficient / I. Moriguchi, S. Hirano, Q. Liu [et al.] // Chem. Pharm. Bull. — 1992. — Vol. 40. — P. 127–130.
8. Lipophilicity profiles of ampholytes / A. Pagliara, P.-A. Carrupt, G. Caron [et al.] // Chem. Rev. — 1997. — Vol. 97. — P. 3385–3340.
9. Hayduk W. Prediction of diffusion coefficients for nonelectrolytes in dilute aqueous solutions / W. Hayduk, H. Laudie // American institute of chemical engineers J. — 1994. — Vol. 20. — P. 611.
10. Преподобна К. В. Механізми метаболізму та елімінації гідазепаму в організмі щурів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук / К. В. Преподобна. — Одеса, 2008. — 18 с.

