

Сравнительное фармакокинетическое изучение препаратов тилорона с помощью разработанной методики ВЭЖХ

Л. М. Красных, А. Ю. Савченко, Г. В. Раменская
ИКФ НЦ ЭСМП, ММА им. Сеченова, г. Москва

При изыскании химиотерапевтических средств для профилактики и лечения вирусных заболеваний большое внимание уделяется веществам, стимулирующим выработку в организме человека эндогенных интерферонов (ИФ). Сравнительно недавно в доступной литературе стали появляться сообщения о клиническом применении нового поколения индукторов интерфероногенеза — низкомолекулярные синтетические соединения на основе флуоренона и акридина. Проведенные клинические испытания препаратов показали, что их противовирусная активность, в целом не только совпадает с ранее известными антивирусными эффектами экзогенных ИФ, но они обладают рядом преимуществ — индуцируют продукцию собственного, эндогенного интерферона, причем всех трех видов [1].

К числу таких препаратов следует отнести Лавомакс® и Амиксин (МНН-тилорон), успешно прошедшего клинические исследования в России и на Украине, подтвердившие его интерферониндуцирующие свойства, высокую антивирусную активность и хорошую переносимость [2].

Тилорон — 2,7-Бис-[2-(диэтиламино) этокси]-9Н-флуорен-9-он — новый отечественный препарат, обладающий противовирусным, иммуномодулирующим действием. Результаты химических и фармакологических исследований приведены в ряде публикаций.

Первые экспериментальные исследования интерферон-индуцирующей активности тилорона относятся к 80-м годам. В опытах на здоровых добровольцах была показана хорошая переносимость [3] и способность тилорона к индукции высоких уровней интерферона у основной массы лиц, а у имеющих исходно низкие уровни сывороточного ИФ отмечалась нормализация этих показателей [4].

С 1994 года тилорон стал использоваться в практике лечения массовых острых и хронических вирусных инфекций (вирусные гепатиты, грипп и другие). Он эффективен против широкого круга вирусных инфекций. К действию тилорона чувствительны гепатно-, герпес-, микровирусы [1]. Тилорон

применяется в комплексной терапии герпеса, инфекционно-аллергических и вирусных энцефаломиелитов (рассеянный склероз, лейкоэнцефалиты, увеэнцефалиты и другие), по лечебной схеме при гепатитах и энтеровирусных инфекциях, а также для профилактики гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций [6]. Хорошо совместим с антибиотиками и средствами традиционного лечения вирусных и бактериальных заболеваний [1].

Тилорон обладает иммуностимулирующим эффектом. Он стимулирует стволовые клетки костного мозга, усиливает антителообразование, уменьшает степень иммунодепрессии, вызванной введением канцерогена, осуществляет коррекцию соотношения Т-супрессоров и Т-хелперов, повышает активность ЕК-клеток [7].

Повышение эффективности и безопасности лекарственной терапии возможно благодаря подробному изучению фармакокинетических и фармакологических показателей. В доступной литературе практически отсутствуют данные по фармакокинетике и количественному определению тилорона в биологических жидкостях [8].

Поэтому целью настоящего исследования явились разработка метода экстракции и количественного определения тилорона в сыворотке крови и сравнительное фармакокинетическое изучение препаратов тилорона после однократного перорального приема.

Основной целью фармакокинетических исследований лекарственных препаратов является повышение эффективности и безопасности их использования в клинической практике. Проблемы фармакокинетики: анализ скорости и интенсивности процессов всасывания, распределения по органам и тканям, направленности и количественной оценки процессов биотрансформации, путей и скорости выведения — в последние годы приобретают решающее значение при создании, испытании и разработке оптимального режима фармакотерапии лекарственными препаратами.

Изучение судьбы лекарственного препарата в живом организме предполагает в первую очередь определение

его содержания в крови. Поэтому, прежде чем приступить к изучению любых фармакокинетических процессов, необходимо выбрать метод количественного определения изучаемого лекарственного вещества в биологических средах. В первую очередь нами была разработана методика количественного определения тилорона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

В последние годы метод ВЭЖХ становится одним из самых распространенных методов анализа лекарственных средств в биологическом материале, в том числе при изучении фармакокинетики. Это объясняется тем, что метод ВЭЖХ имеет ряд преимуществ по сравнению с другими: отсутствие ограничений по термостойкости и летучести анализируемого препарата, возможность работать с водными растворами, возможность собирать разделенные фракции для их последующей идентификации, высокая селективность, точность и чувствительность.

Разработка методики количественного определения любого лекарственного препарата из биологического материала методом ВЭЖХ включает в себя: подбор условий хроматографирования, извлечение лекарственного вещества из биологической жидкости, количественный анализ.

Для подбора условий хроматографического разделения важное значение имеет выбор сорбента, типа детектора и условий детектирования, оптимального состава подвижной фазы и скорости ее подачи. Отрабатывая методику хроматографического разделения, следует добиваться выполнения условия, что разделение должно быть достаточно хорошим при минимально допустимых затратах времени.

При выборе типа колонки мы учитывали физико-химические свойства тилорона, а также тот факт, что анализ фармацевтических препаратов методом ВЭЖХ чаще проводится с применением обращеннофазных сорбентов. В нашем исследовании была выбрана обращеннофазная колонка Диасорб 130-С16Т (150×4 мм, 7 мкм), Россия.

При подборе состава элюента мы исходили из соображений наилучшего разделения хроматографических пиков, а также доступности растворителей для анализа, простоты и быстроты приготовления подвижной фазы. Следует отметить, что выбор элюента и оптимизация условий разделения — задача достаточно сложная. Нами исследовались подвижные фазы ацетонитрил/вода с различным соотношением компонентов. Подвижные фазы модифицировались введением фосфатных буферов. При небольшом изменении состава подвижной фазы за счет уменьшения ацетонитрила оптимизировалось по хроматографическим показателям определение тилорона.

Полученный элюент перед анализом фильтровали через фильтр Millipore (0,45) и дегазировали под вакуумом. Разделение проводили при комнатной температуре. Скорость потока подвижной фазы выбирали исходя из времени анализа и давления на хроматографиче-

ской колонке. Оптимальной по указанным параметрам была скорость потока элюента 1 мл/мин.

Детектирование образцов осуществляли на аналитической длине волны 270 нм. Детектирование на этой волне позволяет достичь необходимого предела обнаружения тилорона с хорошей воспроизводимостью результатов.

Для разработки методики количественного определения тилорона методом ВЭЖХ использовалась субстанция предоставленная ОАО «НИЖФАРМ» (Россия), представляющая собой порошок хорошо растворимый в слабых кислотах.

При разработке аналитической методики важная роль отводится процессу пробоподготовки. Для подготовки образцов сыворотки крови более оптимальным является способ с применением жидкостной экстракции с последующим концентрированием пробы. Метод с использованием осаждения белков крови с последующим анализом надосадочной жидкости с помощью ВЭЖХ в нашем случае не применим из-за низкой чувствительности метода и большого количества эндогенных веществ, мешающих определению. Как известно, на полноту извлечения веществ из биологического материала органическими растворителями оказывает влияние ряд факторов: природа исследуемого вещества и экстрагента, кратность экстракции, объем экстрагента, pH среды.

Детальное изучение экстракции тилорона мы провели такими органическими растворителями как хлороформ, гексан, диэтиловый эфир, изопропиловый спирт с различными значениями pH среды. В наших исследованиях влияние на степень экстракции тилорона оказывали pH среды и природа экстрагента. Наилучшая степень экстракции была достигнута хлороформом в нейтральной среде, коэффициент экстракции составил 90 %.

Таким образом, экстракцию проводили следующим образом: к образцу сыворотки крови объемом 1 мл добавляли 5 мл хлороформа, смесь подвергалась энергичному встряхиванию на вибромиксере, центрифугированию в течение 10 мин при 4500 об/мин, затем органический слой переносили в колбы и экстракт упаривали на ротаторном испарителе при 37°C. Сухой остаток растворяли в 150 мкл подвижной фазы и 50 мкл полученного раствора вводили в хроматограф. Анализ проводили на хроматографе «Shimadzu» (Япония).

На рисунке 1 представлены типичные ВЭЖХ-хроматограммы тилорона в сыворотке крови в описанных условиях.

Как видно из рисунка 1 хроматографический пик тилорона хорошо отделяется от пиков эндогенных веществ сыворотки крови.

Основой для количественного определения (метод абсолютной калибровки) тилорона в сыворотке крови служили калибровочные зависимости, для построения которых были проанализированы образцы сыворотки крови с различной концентрацией определяемого вещества. При регрессионном анализе выявлена

линейная зависимость между концентрацией тилорона в интервале 10-250 нг/мл. Коэффициент корреляции составил $r^2=0,98$.

Воспроизводимость метода шести повторов каждой исследованной концентрации находилась в пределах 90-110 %, а коэффициент вариации при не превышал 10 %.

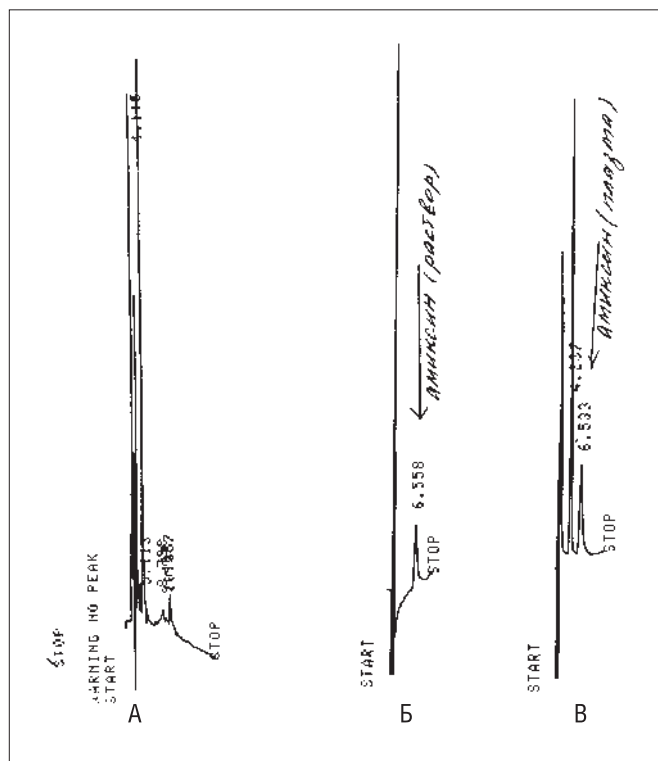
Разработанная методика была применена для изучения сравнительной фармакокинетики препаратов тилорона — Лавомакс® (ОАО «НИЖФАРМ», Россия) и Амиксин® (ОАО «Дальхимфарм», Россия), представляющие собой таблетки, покрытые оболочкой, содержащие 125 мг тилорона.

В фармакокинетическое исследование было включено 18 здоровых добровольцев (7 мужчин и 11 женщин) в возрасте 18-44 лет, массой тела 50-81 кг, ростом 160-182 см, без патологий желудочно-кишечного тракта, печени, почек, сердечно-сосудистой системы (предварительно проведённые клинико-лабораторные и инструментальные исследования не выявили наличия каких-либо заболеваний). В течение 14 дней до начала проведения испытания добровольцы не принимали никаких лекарственных препаратов. В целом дизайн исследования соответствовал требованиям «Методических указаний...» [9], а само исследование было одобрено Комитетом по этике при федеральном органе контроля качества лекарственных средств. Препараты давали натощак однократно внутрь по две таблетки (250 мг). Отбор проб крови проводили через катетер до приёма препарата и через 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10 и 24 часа после приёма препарата. После образования кровяного сгустка, образцы крови центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин и отделённую сыворотку хранили до анализа замороженной при температуре -35°C .

Анализ проб проводили по разработанной нами методике. Значения усреднённых концентраций тилорона в сыворотке крови добровольцев после однократного приёма изучаемых препаратов представлены на рисунке 2.

Рис. 1.

Образцы хроматограмм проб сыворотки крови добровольцев



Примечание:

- А – проба «чистой» сыворотки крови до введения препарата
- Б – стандартный образец тилорона
- В – проба сыворотки крови спустя 1 ч после приема препарата.

Как видно из представленных данных значения концентрации тилорона статистически достоверно не различались для каждого момента времени.

Следует отметить, что после приёма препаратов имеет место значительная межиндивидуальная вариация кинетических кривых во всех точках отбора крови (коэффициент вариации от 26 до 70 %).

Таблица 1.

Фармакокинетические параметры тилорона после приема 250 мг

Параметры	C_{\max} , нг/мл	T_{\max} , час	AUC_{0-t} , нг×ч/мл	C_{\max}/AUC_{0-t}
Лавомакс®				
Mean	95,4	2,8	777,2	0,129
GMean	90,8	2,7	723,5	0,126
SD	30,5	0,7	311,6	0,032
Median	91,7	3,0	731,4	0,124
L-95%	80,2	2,4	622,3	0,113
Uр-95%	162,8	3,1	932,2	0,145
Амиксин®				
Mean	94,9	2,6	765,9	0,130
GMean	91,5	2,5	721,1	0,127
SD	26,1	0,5	268,5	0,033
Median	92,9	3,0	764,6	0,119
L-95%	81,9	2,3	632,4	0,114
Uр-95%	107,9	2,8	899,4	0,147

Примечание: GMean – среднее геометрическое значение

Фармакокинетические параметры тилорона после приема изучаемых препаратов, необходимые для оценки их биоэквивалентности (C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t} , C_{max}/AUC_{0-t}) приведены в таблице 1.

Исследование фармакокинетики Лавомакса® показало, что максимальная концентрация тилорона в крови достигается в среднем через $2,8 \pm 0,7$ часа и составляет $95,4 \pm 30,5$ нг/мл. Препарат достаточно долго удерживается в организме, среднее время удерживания MRT составляет $12,5 \pm 1,7$ часа.

Значения всех фармакокинетических параметров после приема изучаемых препаратов статистически достоверно не различались. При расчете параметров биоэквивалентности двух препаратов было получено, что среднее значение относительной биодоступности (f) препарата Лавомакс® по отношению к препарату Амиксин® составляет $1,01 \pm 0,13$. Среднее значение отношений максимальных концентраций (f') составляет $1,00 \pm 0,14$.

Дисперсионный анализ значений AUC_{0-t} , C_{max} , C_{max}/AUC_{0-t} , проведенный после их логарифмического преобразования не выявил статистически значимых различий между препаратами.

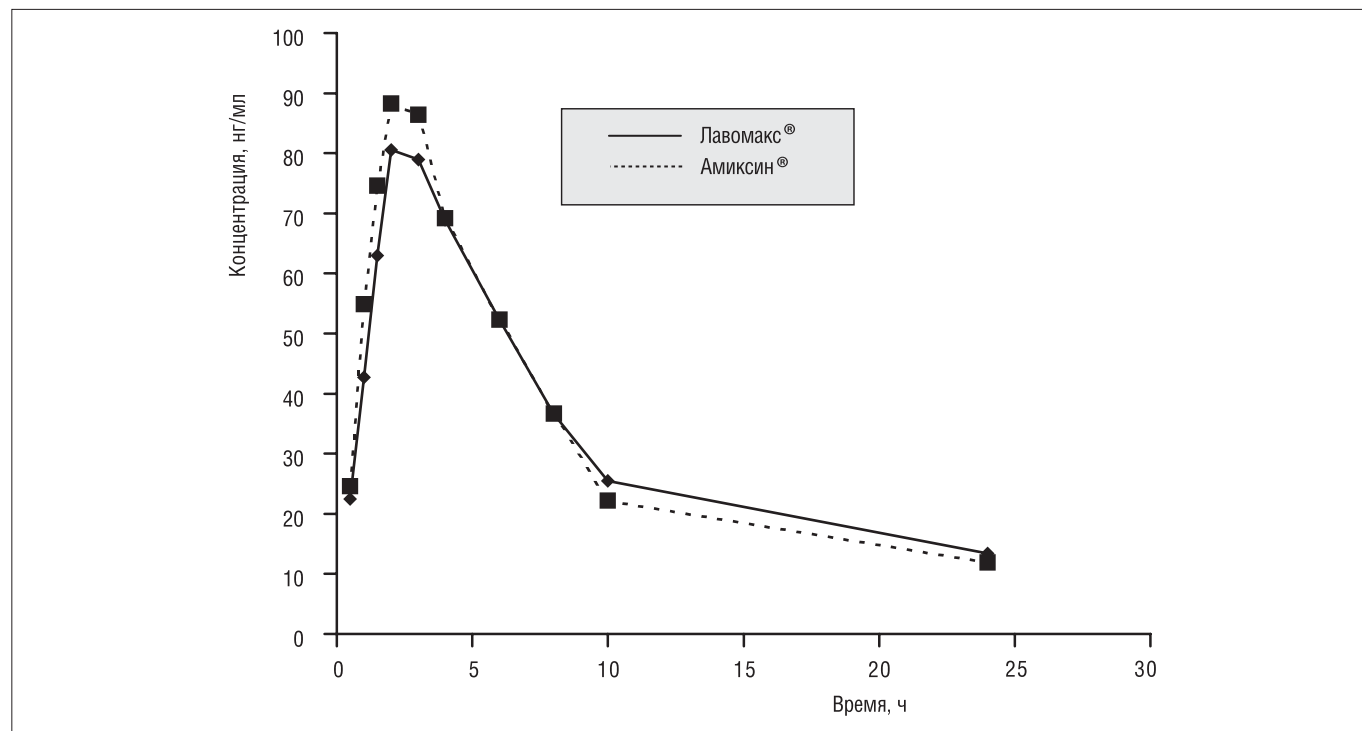
Таким образом, не выявлено статистически достоверных различий в процессе всасывания (как по полноте, так и по скорости) тилорона после приема препаратов Лавомакс® и Амиксин®.

Из результатов настоящего исследования сравнительной фармакокинетики двух препаратов очевидно, что препарат ЛАВОМАКС® производства ОАО «НИЖФАРМ», Россия является биоэквивалентным препарату АМИКСИН® производства ОАО «Дальхимфарм», Россия по полноте и скорости всасывания.

Таким образом, нами разработана эффективная методика количественного определения тилорона. Методика характеризуется воспроизводимостью и низким пределом обнаружения (10 нг/м). С помощью разработанной ВЭЖХ методики доказана биоэквивалентность препаратов Лавомакс® и Амиксин®.

Рис. 2.

Динамика усредненных концентраций тилорона в сыворотке крови добровольцев после однократного приема в дозе 250 мг



ЛИТЕРАТУРА

1. Еришов Ф.И. Антивирусные препараты. М: Медицина 1998; 205.
2. Литвинова Л.А., Ляхов С.А., Андронати С.А. и др. Биологическая активность липосомальной формы амиксина. Хим фарм журнал 2000; 34: 12: 35-37.
3. Чижов Н.П., Смоленская Т.Т., Бойченко П.И. и др. Клинические исследования переносимости и интерферониндуцирующей активности амиксина. Вопр Вирологии 1990; 5: 411-414.
4. Karpov A.V., Zholobak N.H. Production of type I interferons in the body exposed to yeast RNA-tilorone molecular complexes. Voпр Virusol 1996; 41: 1: 13-16.
5. Турьянов Н.Х., Алленов М.Н., Селькова Е.П. и др. Применение Амиксина для лечения острого вирусного гепатита В. Московский мед журн 1998; 1: 38-39.
6. Селькова Е.П., Турьянов М.Х., Мягких И.В. и др. Неспецифическая профилактика гриппа и ОРЗ амиксином. Московский мед журн 1999; 3: 56-58.
7. Algarra I. Effect of *in vivo* activation of NK cells by a tilorone analogue On the survival of mice injected in with different experimental murine tumours. Clin Exp Immunol 1996; 103: 499-505.
8. Карпинчик В.А., Мальцев Г.В., Сумрий С.К. Синтез амиксина - ³H₂ и разработка методов его извлечения из биологических субстратов. Хим фарм журнал 2002; 36: 8: 47-49.
9. Проведение качественных исследований биоэквивалентности лекарственных средств. Методические указания МЗ и СР РФ. М.: 2004.