

УДК 615.07

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТАБЛЕТОК ЛЕВОФЛОКСАЦИНА ОРИГИНАЛЬНОГО И ВОСПРОИЗВЕДЕННОГО ПРЕПАРАТОВ

В.П. Жердев¹, А.А. Литвин¹, Г.Б. Колыванов¹, Е.В. Блынская¹, М.К. Седова¹,
К.В. Алексеев¹, С.Э. Кондаков²

(¹ФГБУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН; ²кафедра химической кинетики химического факультета МГУ; e-mail: eaureus@mail.ru)

Проведена сравнительная оценка фармакокинетического исследования таблеток дженерика левофлоксацина (500 мг), изготовленных в ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН, и оригинального препарата содержащего левофлоксацин (500 мг), таблеток «Таваник», производства «Санофи Винтроп Индустрия» (Франция). Предел количественного определения составил 25 нг/мл. Рассчитаны фармакокинетические параметры сравниваемых препаратов. Определена относительная биодоступность воспроизведенного препарата (108,6±25,6%).

Ключевые слова: левофлоксацин, фармакокинетика, высокоэффективная жидкостная хроматография, относительная биодоступность, биоэквивалентность.

Инфекции дыхательных путей по частоте возникновения занимают первое место среди инфекционных заболеваний человека. Рост устойчивости основных возбудителей внебольничных инфекций дыхательных путей, прежде всего пневмонии, к существующим антибактериальным препаратам вызвал интерес к новым антимикробным средствам, характеризующимся меньшим уровнем резистентности бактерий, в частности к фторхинолонам [1]. В конце прошлого века на фармацевтическом рынке появился синтетический антибактериальный препарат широкого спектра действия из группы фторхинолонов – Таваник[®], содержащий в качестве активного вещества левофлоксацин (левовращающий изомер офлоксацина) (рис. 1), выпущенный на рынок компанией Санофи-Винтроп Индустрия (Франция).

Левофлоксацин активен в отношении большинства штаммов микроорганизмов как *in vitro*, так и *in vivo* и обладает повышенной активностью в отношении пневмококков, улучшенной фармакокинетикой (эффективен при назначении 1 раз в сутки) и практически 100%-й биодоступностью при пероральном приеме. В настоящее время наряду с β-лактамами антибиотиками и макролидами фторхинолоны относятся к числу наиболее широко используемых средств для борьбы с инфекционными процессами дыхательных путей [2].

Таким образом, фторхинолоны и, в частности левофлоксацин, рассматриваются как серьезная альтернатива высокоактивным парентеральным антибиоти-

кам широкого спектра действия. Поэтому разработка и создание отечественных препаратов – дженериков левофлоксацина, характеризующихся оптимальными значениями фармакокинетических параметров и относительной биодоступности являются важной задачей фармацевтической технологии. Для того чтобы оценить качество/идентичность воспроизведенного препарата (дженерика), а также для изучения новых транспортных форм препаратов [3] требуется определение фармакокинетических параметров регламентированными физико-химическими методами и протоколами [4] в сравнении с препаратом-инноватором.

Цель выполненного исследования – сравнение в эксперименте *in vivo* на кроликах фармакокинетики, относительной биодоступности и биоэквивалентности готовой лекарственной формы таблеток левофлоксацина (500 мг), разработанных в ФГБУ

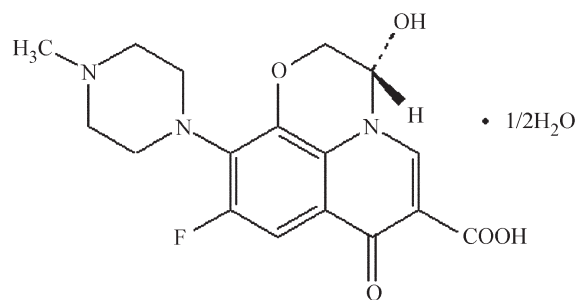


Рис. 1. Левофлоксацин – (-) – (S)-9-фтор-2,3-дигидро-3-метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-7-оксо-7Н-пиродо[1,2,3-de]1,4-бензоксазин-6-карбоновая кислота гемигидрат

«НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН (тест-препарат) и оригинального препарата Таваник[®], содержащего в каждой таблетке 500 мг левофлоксацина («Санофи Винтроп Индустрия», Франция).

Материалы и методы

В работе использовали хроматограф «Beckman-Coulter» (США), состоящий из изократической помпы «Programmable Module-127», УФ-детектора «Programmable Module-166» и компьютера с пакетом программ для обсчета хроматограмм «Амперсенд» версия 1.5 (Россия), колонка Synergi 4 μ MAX-RP (250 \times 4,6 мм; 4 мкм; «Phenomenex», США), оснащенная универсальной предколонкой SpheroGuard C₁₈, 4,0 \times 3,0 мм; («Phenomenex», США). Подвижную фазу готовили следующим образом: к 800 мл деионизированной воды прибавляли 2,4 мл триэтиламина, рН раствора доводили до 3,4 концентрированной фосфорной кислотой (около 1,2 мл). К полученной смеси прибавляли 200 мл ацетонитрила. Скорость потока подвижной фазы в экспериментах составляла 1,0 мл/мин. Детектирование осуществлялось при длине волны 295 нм. Хроматографирование проводили при комнатной температуре (20–22 $^{\circ}$ С). Перед хроматографированием подвижную фазу фильтровали и дегазировали на ультразвуковой бане. Объем вводимой пробы составлял 100 мкл.

В качестве реактивов использовали ацетонитрил (для хроматографии), триэтиламин, кислоту фосфорную концентрированную («ч.д.а.»), метанол, очищенную и деионизованную воду.

Для приготовления растворов стандартных образцов использовали субстанцию левофлоксацина (серия IOS-019.09.10, производства ФГБУН «Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского» Уральского отделения Российской академии наук (ИОС УрО РАН, Екатеринбург), синтезированную по оригинальной технологии. Матричные растворы левофлоксацина с концентрацией 100 мкг/мл готовили растворением в воде, рН которой доводили до 3,4 фосфорной кислотой. Из этих растворов готовили растворы рабочих стандартных образцов на подвижной фазе. Физико-химические свойства и содержание действующего начала левофлоксацина в препаратах эквивалентны.

Фармакокинетические исследования проводили на восьми кроликах-самцах массой тела 3,34 \pm 0,18 кг, полученных из питомника «Столбовая» (Московская обл.). До начала исследования лабораторных животных для адаптации содержали 14 дней в индивидуальных клетках. Во время этого периода у них каждый день контролировали клиническое состояние путем визуального осмотра. Кроликов содержали в

контролируемых условиях окружающей среды (18–26 $^{\circ}$ С и относительной влажности воздуха 30–70%). В комнатах содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения. В экспериментальную группу отбирали кроликов без признаков отклонений внешнего вида, случайным образом, так, чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения более чем на 10%. За 12 ч до начала эксперимента животных лишали корма. В случайном порядке им с помощью зонда внутрь вводили половину таблетки тест-препарата или половину таблетки препарата сравнения. Исследуемые препараты вводили кроликам согласно плану рандомизации – каждый кролик попеременно получал изучаемый препарат и препарат сравнения через 10 дней.

Образцы крови (1,0 мл) отбирали из краевой ушной вены с помощью игл и переносили в конические полиэтиленовые пробирки (предварительно обработанные гепарином). Взятие образцов крови для последующего определения содержания препарата в плазме крови осуществлялось в дискретные интервалы времени: через 0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0 и 24,0 ч. Для получения плазмы образцы крови центрифугировали (3000 об/мин в течение 10 мин). Плазма хранилась при температуре –24 $^{\circ}$ С. Для определения процента извлечения левофлоксацина из плазмы крови был проделан специальный эксперимент. В полиэтиленовую пробирку, которая содержала 0,9 мл плазмы, полученной от кролика, добавляли 0,1 мл одного из стандартных растворов левофлоксацина (500,0, 2500,0 и 5000,0 нг/мл), тщательно перемешивали и инкубировали при 37 $^{\circ}$ С в течение 1 ч. Затем в эту же пробирку добавляли 2,0 мл метанола. Тщательно перемешивали и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость переносили в колбу и упаривали в потоке воздуха при 60 $^{\circ}$ С. Сухой остаток растворяли в подвижной фазе (0,3–1,0 мл). При этом было установлено, что процент извлечения левофлоксацина из плазмы крови в среднем составляет 90,6 \pm 1,9%.

При изучении фармакокинетики к предварительно размороженным образцам плазмы крови кроликов 0,5–1,0 мл прибавляли двойной объем метанола. Далее работа с плазмой проводилась как описано выше. После упаривания при 60 $^{\circ}$ С сухой остаток растворяли в 0,2 мл подвижной фазы. Определение концентрации левофлоксацина в плазме крови кроликов проводили методом ВЭЖХ по модифицированной методике [4].

Количественное определение левофлоксацина проводили методом абсолютной калибровки. В этих условиях время удерживания исследуемого вещества составило 4,7 мин. На хроматограммах, полученных

в разных условиях, отсутствуют дополнительные пики совместно осаждаемых веществ. Это позволяет сделать вывод, что возможные коэкстрактивные вещества не мешают определению препарата.

Калибровочные кривые строили по результатам хроматографирования не менее семи стандартов левофлоксацина в подвижной фазе: 50,0; 100,0; 250,0; 500,0; 1000,0; 2500,0 и 5000,0 нг/мл. Их готовили разбавлением матричного раствора подвижной фазой. Диапазон калибровки составлял 50,0–5000,0 нг/мл, а предел количественного определения – 25,0 нг/мл.

Установлено, что в диапазоне изучаемых концентраций усредненная калибровочная кривая линейна и описывается уравнением: $S = 0,5092 \times C$, ($r = 0,9998$), где S – площадь хроматографического пика; C – концентрация левофлоксацина (нг/мл). Относительная ошибка определения левофлоксацина для концентрации 50,0 нг/мл составила 4,65%. Проведена статистическая обработка полученных данных по регламентированной методике [5]. Параметры, представленные в табл. 1–3, указаны в виде средней арифметической величины (\bar{x}), соответствующих им стандартных отклонений (SD) и коэффициентов вариации (CV%). Достоверность различий оценивали с помощью t -критерия Стьюдента при $P \leq 0,05$.

Для описания фармакокинетики левофлоксацина были рассчитаны следующие параметры: AUC_{0-t} (мкг/мл×ч) – площадь под фармакокинетической кривой, рассчитывается от момента введения до последней точки отбора проб); $AUC_{0-\infty}$ (мкг/мл×ч) – площадь под фармакокинетической кривой, рассчитывается от момента введения до бесконечности; $t_{\text{макс}}$ (ч) – время достижения максимальной концентрации препарата в плазме крови; $C_{\text{макс}}$ (мкг/мл) – максимальная концентрация левофлоксацина в плазме крови; $C_{\text{макс}}/AUC_{0-\infty}$ (ч⁻¹) – параметр, характеризующий скорость всасывания препарата в системный кровоток; MRT (ч) – среднее время удерживания левофлоксацина в организме; $K_{\text{эл}}$ (ч⁻¹) – константа элиминации (параметр, характеризующий скорость выведения препарата из организма); $t_{1/2\text{эл}}$ (ч) – время, в течение которого концентрация препарата в плазме крови снижается вдвое; F – относительная биодоступность.

Оценка относительной биологической доступности проводилась по формуле:

$$F = \frac{AUC_t \times D_s}{AUC_s \times D_t} \times 100,$$

где AUC_t – площадь под фармакокинетической кривой таблеток тест-препарата; AUC_s – площадь под фармакокинетической кривой после введения табле-

ток препарата сравнения; D_t – доза таблеток тест-препарата (250 мг); D_s – доза таблеток препарата сравнения (250 мг).

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлены усредненные фармакокинетические кривые тест-препарата в плазме крови кроликов после однократного перорального введения животным таблеток в дозе 250 мг и препарата сравнения в той же дозе.

В табл. 1, 2 представлены фармакокинетические параметры левофлоксацина в плазме крови кроликов после введения таблеток тест-препарата и препарата сравнения. Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров, приведенных в табл. 1, 2, показал, что изучаемое соединение всасывается из желудочно-кишечного тракта при введении его в виде тест-препарата (со скоростью $0,167 \pm 0,061$ ч⁻¹) и препарата сравнения (со скоростью $0,182 \pm 0,066$ ч⁻¹). При этом достоверных различий между сравниваемыми параметрами не выявлено. Время достижения максимальной концентрации ($t_{\text{макс}}$) для таблеток левофлоксацина наступало через $1,56 \pm 0,82$ ч, а для референс-препарата – через $1,0 \pm 0,46$ ч, т.е. достоверные различия также не выявлены.

Аналогичная ситуация наблюдалась и при оценке параметра, характеризующего продолжительность выведения препарата из организма. Величина $t_{1/2\text{эл}}$ составила $5,05 \pm 1,42$ ч для таблеток тест-препарата и $5,15 \pm 1,42$ ч для таблеток препарата сравнения.

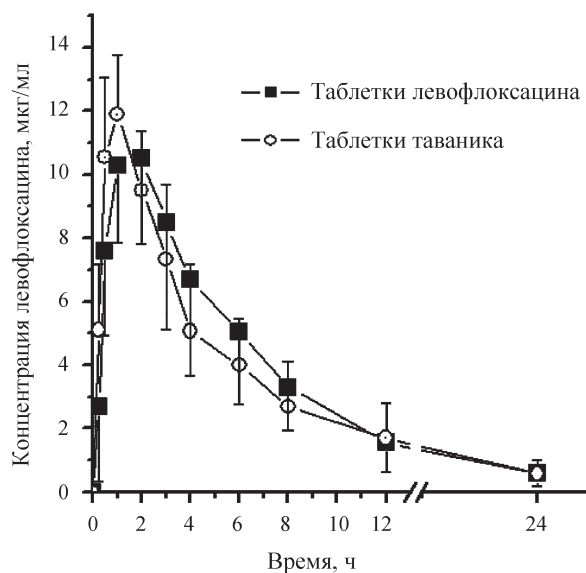


Рис. 2. Усредненные фармакокинетические профили левофлоксацина в плазме крови кроликов после однократного перорального введения таблеток левофлоксацина (250 мг) и таблеток Таваник® (250 мг) ($n = 8$; $\bar{x} \pm SD$)

Т а б л и ц а 1

Фармакокинетические параметры левофлоксацина в плазме крови кроликов после однократного введения таблеток тест-препарата в дозе 250 мг

Номер опыта	Фармакокинетические параметры							
	AUC_{0-t} , мкг/мл·ч	$AUC_{0-\infty}$, мкг/мл·ч	t_{\max} , ч	C_{\max} , мкг/мл	$C_{\max}/AUC_{0-\infty}$, ч ⁻¹	$K_{\text{эл}}$, ч ⁻¹	$t_{1/2\text{эл}}$, ч	MRT, ч
1	42,94	44,12	1,0	12,4	0,281	0,1497	4,63	5,7
2	40,88	49,23	2,0	11,6	0,236	0,2072	3,34	4,66
3	82,45	85,25	3,0	12,4	0,145	0,1489	4,66	6,78
4	96,81	98,78	2,0	14,3	0,145	0,1674	4,13	6,13
5	58,95	59,92	0,5	9,6	0,160	0,1724	4,02	5,52
6	93,25	101,56	1,0	13,7	0,135	0,1052	6,59	9,23
7	95,16	100,39	2,0	14,1	0,140	0,1266	5,48	7,63
8	91,9	103,54	1,0	9,7	0,094	0,0916	7,57	10,87
\bar{x}	75,29	80,35	1,56	12,23	0,167	0,1461	5,05	7,07
SD	23,92	25,22	0,82	1,84	0,061	0,0377	1,42	2,09
CV, %	31,77	31,38	52,55	15,06	36,37	25,77	28,06	29,53

Т а б л и ц а 2

Фармакокинетические параметры левофлоксацина в плазме крови кроликов после однократного введения таблеток препарата сравнения в дозе 250 мг

Номер опыта	Фармакокинетические параметры							
	AUC_{0-t} , мкг/мл·ч	$AUC_{0-\infty}$, мкг/мл·ч	t_{\max} , ч	C_{\max} , мкг/мл	$C_{\max}/AUC_{0-\infty}$, ч ⁻¹	$K_{\text{эл}}$, ч ⁻¹	$t_{1/2\text{эл}}$, ч	MRT, ч
1	58,25	58,64	0,5	11,4	0,194	0,2096	3,31	4,66
2	42,94	44,31	1,0	12,4	0,280	0,1406	4,93	5,82
3	94,18	100,63	2,0	11,1	0,110	0,1152	6,02	8,68
4	110,64	121,20	0,5	15,3	0,126	0,1024	6,77	9,66
5	49,70	50,37	1,0	14	0,278	0,1789	3,87	4,59
6	66,11	70,76	1,0	9,8	0,138	0,1146	6,05	8,50
7	72,65	73,88	1,0	13,4	0,181	0,1727	4,01	5,33
8	79,31	87,87	1,0	13,2	0,150	0,0985	7,04	9,70
	71,72	75,96	1,00	12,58	0,182	0,1416	5,25	7,12
SD	22,69	26,15	0,46	1,77	0,066	0,0411	1,42	2,23
CV, %	31,64	34,42	46,29	14,04	35,95	29,01	26,99	31,32

Т а б л и ц а 3

Относительная биодоступность таблеток левофлоксацина в сравнении с таблетками Таваник®

Значение $AUC_{0-\infty}$, мкг/мл·ч для таблеток левофлоксацина		F
Таваник®		
44,12	58,64	0,752
49,23	44,31	1,111
85,25	100,63	0,847
98,78	121,2	0,815
59,92	50,37	1,190
101,56	70,76	1,435
100,39	73,88	1,359
103,54	87,87	1,178
—	\bar{x}	1,086
—	SD	0,256
—	CV%	23,56

Средняя максимальная концентрация левофлоксацина (C_{\max}), определяемая в плазме крови кроликов, составила $12,27 \pm 1,84$ мкг/мл для таблеток тест-препарата и $12,28 \pm 1,77$ мкг/мл для препарата сравнения.

Поскольку вклад экстраполированной части фармакокинетической кривой (разность между значениями $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t}) изучаемых препаратов в среднем составляла менее 7%, для дальнейших расчетов использовали величину $AUC_{0-\infty}$. Среднее значение этого параметра для тест-препарата и препарата сравнения составляла соответственно $80,35 \pm 25,22$ и $75,96 \pm 26,15$ мкг/мл·ч.

Относительная биологическая доступность (F) левофлоксацина, определяемая отношением индивидуальных значений $AUC_{0-\infty}$ с учетом вводимых

доз для таблеток тест-препарата по отношению к таблеткам препарата сравнения, составила в среднем $108,6 \pm 25,6\%$. (табл. 3). В то же время сравнение полученных выборок значений $AUC_{0-\infty}$ двух изучаемых препаратов статистически значимых различий между ними не выявило.

Таким образом, проведенное *in vivo* исследование сравнительной фармакокинетики и относительной биодоступности двух таблетированных форм на основе одного действующего начала (левофлоксацина) показало, что процессы его всасывания и выведения при применении исследуемых лекарственных форм одинаковы, что позволяет сделать вывод об эквивалентности отечественных таблеток левофлоксацина таблеткам оригинального препарата Таваник®.

тельной биодоступности двух таблетированных форм на основе одного действующего начала (левофлоксацина) показало, что процессы его всасывания и выведения при применении исследуемых лекарственных форм одинаковы, что позволяет сделать вывод об эквивалентности отечественных таблеток левофлоксацина таблеткам оригинального препарата Таваник®.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гучев И.А., Мелехина Е.В., Юденич О.В. // Consilium Medicum. 2010. 12. № 3. С. 42.
2. Падейская Е.Н. // Инфекции и антимикробная терапия. 2001. 3. № 1. С. 45.
3. Блынская Е.В., Алексеев К.В., Кондаков С.Э., Аляутдин Р.Н., Балабаньян В.Ю. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2011. 52. № 2. С. 154.
4. Destage C.J., Pakiz C.B., Larsen C. et al. // J. Antimicrob. Chemother. 2001. 47. P. 611.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М., 2012.

Поступила в редакцию 20.02.13

PHARMACOKINETIC STUDIES OF ORIGINAL AND GENERIC LEVOFLOXACIN TABLETS

V.P. Zherdev A.A. Litvin, G.B. Kolyvanov, E.V. Blynskaya, M.K. Sedova, K.V. Alekseev, S.E. Kondakov

(State Foundation Zakusov Institute of Pharmacology Russian Academy of Medical Sciences; Department of Chemistry Lomonosov Moscow State University)

A comparative pharmacokinetic study of generic levofloxacin tablets (500 mg) produced in FSBI "Institute of Pharmacology them. V.V. Zakusov "RAMS, and the original drug containing levofloxacin (500 mg) tablets Tavanic®, Sanofi Winthrop Industry, France. The comparative evaluation of pharmacokinetic parameters, determine the relative bioavailability of a generic, which was $108,6 \pm 25,6\%$.

Key words: Levofloxacin, pharmacokinetics, high performance liquid chromatography, relative bioavailability.

Сведения об авторах: Жердев Владимир Павлович – зав. лабораторией фармакокинетики НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН, профессор, докт. мед. наук (zherdevpharm@mail.ru); Литвин Александр Алексеевич – вед. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН, докт. биол. наук (litbiopharm@yandex.ru); Кольванов Геннадий Алексеевич – вед. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН, докт. биол. наук; Блынская Евгения Викторовна – ст. науч. сотр. лаборатории готовых лекарственных форм НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН, канд. фарм. наук (eaugeus@mail.ru); Седова Мария Константиновна – соискатель НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН (mawyli@mail.ru); Алексеев Константин Викторович – зав. лабораторией готовых лекарственных форм опытно-технологического отдела НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН, докт. фарм. наук; Кондаков Сергей Эмильевич – вед. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ, докт. фарм. наук (kse@excite.chem.msu.ru).