

Фармакокинетические свойства и биоэквивалентность препаратов метилдопы: результаты открытого рандомизированного двухэтапного перекрестного исследования с однократным приемом

А.Л. Хохлов^{1,2}, Л.Н. Шитов^{1,2}, М. Ryska³, Ю.А. Джурко², V. Kubeš³,
В.Н. Шабров^{1,2}, А.Е. Мирошников¹, Е.В. Корнева⁴, А.В. Демчинская⁴,
А.М. Шитова^{2,5}, А.А. Хохлов¹, И.Е. Шохин⁶, Е.Г. Лилеева¹

¹ГБОУ ВПО “Ярославский государственный медицинский университет” Минздрава РФ, Ярославль,

²ООО “Квинта-Аналитика Ярославль”, Ярославль, ³QUINTA-ANALYTICA s.r.o., Прага, Чешская республика,

⁴АО “Р-Фарм”, Москва, ⁵ГОУ ВПО “Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова” Минобрнауки РФ, Ярославль

⁶ФГБН “Научный центр биомедицинских технологий” ФМБА РФ

Цель. Изучение биоэквивалентности тестируемого (Метилдопа, ЗАО “Р-Фарм”, Россия) и референтного (Допегит®, ОАО “Фармацевтический завод ЭГИС”, Венгрия) препаратов метилдопы.

Материал и методы. В открытое рандомизированное перекрестное исследование с двумя периодами, двумя последовательностями и отмывочным периодом 7 дней были включены 24 здоровых добровольца. Образцы крови брали в течение 24 ч после приема препарата. Предварительно сравнивали кинетику растворения лекарственных форм в 3 средах с количественным определением метилдопы методом УФ-спектрофотометрии. Концентрацию метилдопы в образцах плазмы крови измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Аналитическая методика была валидирована по параметрам, регламентированным действующими рекомендациями. Использовали дейтерированный внутренний стандарт. Учитывая нестабильность метилдопы в плазме крови, была разработана методика стабилизации (внесение аскорбиновой кислоты в плазму крови на этапе отбора образцов в клиническом центре). Для оценки биоэквивалентности рассчитывали 90% доверительные интервалы для параметров AUC, C_{max} и C_{max}/AUC с использованием дисперсионного анализа (ANOVA) логарифмически преобразованных данных.

Результаты. Высвобождение действующего вещества из тестируемого и референтного препаратов было эквивалентным. Разработанная биоаналитическая методика позволяла получить данные, удовлетворяющие всем критериям приемлемости, для концентраций метилдопы в плазме в диапазоне от 0,020 до 3,000 мкг/мл. Значения AUC_{0-t} тестируемого и референтного препаратов составили (среднее±стандартное отклонение) $6,219\pm 3,080$ и $6,385\pm 2,153$ мкг×ч/мл, соответственно, $AUC_{0-\infty}$ — $6,436\pm 3,181$ и $6,529\pm 2,187$ мкг×ч/мл, C_{max} — $1,227\pm 0,601$ и $1,233\pm 0,419$ мкг/мл, C_{max}/AUC_{0-t} — $0,2019\pm 0,0377$ и $0,1978\pm 0,0372$ ч⁻¹. Медианы T_{max} тестируемого и референт-

ного препаратов совпали и были равны 3,00 ч. Ни по одному из параметров фармакокинетики между препаратами не было выявлено статистически значимых различий. Точечные оценки и границы 90% доверительных интервалов для индивидуальных отношений фармакокинетических параметров тестируемого и референтного препаратов составили для AUC_{0-t} — 92,93% (80,69–107,03%), для C_{max} — 94,89% (80,88–111,34%), для C_{max}/AUC_{0-t} — 102,11% (93,95–110,98%), что соответствует допустимым диапазонам границ доверительных интервалов (80,00–125,00%) Коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности для AUC_{0-t} , C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} составили 29,08%, 33,10% и 16,92%, соответственно. Коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности C_{max} превышал 30% и соответствовал уровню высоковариабельных препаратов.

Заключение. Тестируемый и референтный препараты характеризуются высокой степенью сходства показателей фармакокинетики и являются биоэквивалентными.

Ключевые слова. Метилдопа, биоэквивалентность, фармакокинетика, артериальная гипертония.

Клин. фармакол. тер., 2016, 25 (4), 30-35.

Метилдопа (3-гидрокси- α -метил-L-тирозин) — это антигипертензивный препарат центрального действия, действие которого опосредуется активным метаболитом α -метилнорадреналином, образующимся после проникновения действующего вещества через гематоэнцефалический барьер. α -Метилнорадреналин стимулирует центральные α_2 -адренорецепторы, вызывая торможение симпатической импульсации и снижение АД. Метилдопа является одним из препаратов выбора для лечения артериальной гипертонии у беременных. Применение метилдопы во время беременности позволяет предупредить развитие сердечно-сосудистых осложнений и улучшить ближайший и отдаленный прогноз для матери и ребенка.

Метилдопа плохо всасывается из желудочно-кишечного тракта; биодоступность при пероральном приеме в

среднем составляет 25% и может варьироваться в широких пределах (от 8 до 62%) [1]. По биофармацевтической классификации (Biopharmaceutics Classification System, BCS) метилдопа относится к классу III, поскольку для данного вещества характерны высокая растворимость и низкая проницаемость (низкая эффективность проникновения через мембраны энтероцитов) [2]. Указанные особенности биофармацевтических свойств метилдопы предъявляют повышенные требования к методологии исследования биоэквивалентности препаратов, содержащих рассматриваемое вещество. Вместе с тем, имеется лишь небольшое количество публикаций, в которых описаны методы измерения концентраций метилдопы в исследованиях сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности [3,4].

Целью исследования было изучение биоэквивалентности тестируемого (Метилдопа, ЗАО «Р-Фарм», Россия) и референтного (Допегит®, ОАО «Фармацевтический завод ЭГИС», Венгрия) препаратов метилдопы.

Материал и методы

Исследование проведено в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (ВМА) и отраженными в национальном стандарте Российской Федерации ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика», а также основными принципами проведения исследований фармакокинетики и биоэквивалентности [5-7].

Сравнительный тест кинетики растворения. Предварительно была сопоставлена кинетика растворения тестируемого и референтного препаратов с целью установления сопоставимости характера высвобождения действующего вещества и выбора соответствующих серий для исследований *in vivo*. Использовали прибор для теста «Растворение» Agilent Technologies 708-DS Dissolution Apparatus (США) и УФ-спектрофотометр ПЭ-5400УФ, ПРОМЭКОЛАБ (Россия). Среды растворения: 0,2% раствор натрия хлорида в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты рН 1,2, ацетатный буферный раствор рН 4,5, фосфатный буферный раствор рН 6,8. Объем среды растворения – 900 мл. Точки взятия проб: 10, 30, 50, 90, 130 мин. Исследование проводили при скорости вращения лопастной мешалки 50 оборотов в минуту и температуре $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Критерии включения и невключения добровольцев в исследование. Исследование биоэквивалентности проводилось в одном клиническом центре на базе Клинической больницы №2 Ярославской области. В исследование были включены 24 здоровых добровольца мужского и женского пола, проживающих в Российской Федерации. Критерии включения: возраст 18-45 лет, индекс массы тела от 18,5 до 30,0 кг/м² при массе тела более 45 кг, способность выполнять требования протокола исследования, в том числе адекватные меры контрацепции. Критерии невключения: отягощенный аллергологический анамнез, гиперчувствительность к метилдопе или другим веществам, входящим в состав препарата, депрессия и/или прием любых антидепрессантов в течение последних 6 месяцев, прием ингибиторов моноаминоксидазы, заболевания сердечно-сосудистой, бронхолегочной, нейроэндокринной, иммунной систем, желудочно-кишечного тракта, печени, почек, крови, острые инфекционные заболевания в течение 4 недель до включения в исследование, прием любых лекарственных

препаратов в течение 2 недель до начала исследования, прием веществ, существенно влияющих на активность микросомальных ферментов печени, гемодинамику и функцию пищеварительной системы за последние 2 месяца, наличие на скрининге отклонений от норм показателей инструментальных и лабораторных методов исследования, потеря более 450 мл крови менее чем за 2 месяца до начала исследования, чрезмерное употребление алкоголя, злоупотребление кофеин-содержащими продуктами, прием пищи и напитков, содержащих грейпфрут, особая диета и образ жизни, курение более 10 сигарет в день, положительные тесты на беременность, алкоголь, наркотические и лекарственные вещества.

Дизайн исследования. Выполнено открытое рандомизированное перекрестное двухэтапное исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности. Добровольцы были рандомизированы на две группы в зависимости от последовательности приема препаратов (TR или RT, где T – тестируемый препарат Метилдопа, таблетки по 250 мг, ЗАО «Р-Фарм», Россия; R – референтный препарат Допегит®, таблетки по 250 мг, ОАО «Фармацевтический завод ЭГИС», Венгрия). Добровольцев госпитализировали на 36 часов вечером, накануне приема препарата. Они принимали препараты натощак, запивая 200 мл воды. Добровольцы не принимали какие-либо жидкости, включая воду, в течение 1 ч до и после приема препарата и получали стандартный завтрак через 4 ч, обед – через 6 ч, ужин – через 10 ч после приема препаратов. Во время исследования не допускался прием каких-либо лекарственных препаратов, кроме исследуемых. Из рациона питания были исключены грейпфруты или родственные им цитрусовые, алкоголь, продукты и напитки, содержащие кофеин и/или кантанины, жирная и жареная пища.

Оценка переносимости. На протяжении всего исследования оценивали общее состояние добровольцев, проводили физическое обследование, измерение АД, частоты сердечных сокращений (ЧСС) и температуры тела, общий и биохимический анализы крови, общий анализ мочи, ЭКГ в 12 отведениях, а также регистрировали нежелательные явления.

Взятие образцов. Образцы крови отбирали у каждого добровольца в объеме 6 мл в предварительно маркированные вакуумные центрифужные пробирки, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта. В вену предплечья устанавливали постоянный катетер на 24 ч после приема препарата. После каждого взятия крови катетер промывали 0,5 мл гепаринизированного физиологического раствора (500 МЕ на 100 мл 0,9% раствора натрия хлорида) во избежание тромбирования. Начиная со второго взятия крови, во избежание попадания гепарина в порцию крови, поступающую в вакутейнер, предварительно удаляли из катетера 1 мл крови. Катетер удаляли через 24 часа после приема препарата. Образцы крови отбирали в следующих точках: 0 (до приема препарата), через 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 1 ч 15 мин, 1 ч 30 мин, 1 ч 45 мин, 2 ч, 2 ч 15 мин, 2 ч 30 мин, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 9 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч после приема препарата. После взятия крови пробирки немедленно помещали в ледяную баню и направляли на центрифугирование; время от взятия крови до начала центрифугирования составляло не более 15 минут. Центрифугирование проводили в течение 10 минут при температуре 4°C со скоростью 3000 оборотов в минуту. Плазму объемом 1,0 мл переносили в предварительно подготовленные криопробирки с добавлением стабилизатора – 0,2 мл раствора аскорбиновой кислоты в концентрации 50 мг/мл (сведения о необходимости стабилизации метилдопы представлены в разделе

“Результаты валидации аналитической методики”). Плазму перемешивали со стабилизатором и немедленно замораживали на сухом льду; в дальнейшем замороженные образцы плазмы хранили при температуре не выше -20°C до проведения анализа.

Разработка и валидация биоаналитической методики. Концентрацию метилдопы измеряли методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием жидкостного хроматографа LC-20 (Shimadzu Corporation, Япония) и трехкварцопольного масс-спектрометрического детектора LCMS-8050 (Shimadzu Corporation, Япония). Подготовку проб осуществляли методом осаждения белка раствором внутреннего стандарта (метилдопа-D3) в ацетонитриле с добавлением 1% муравьиной кислоты (к 100 мкл плазмы добавляли 400 мкл раствора внутреннего стандарта) с последующим центрифугированием при скорости 3500 оборотов в минуту. 8 мкл надосадочной жидкости вводили в хроматографическую систему. Условия хроматографирования: предколонка Luna 5u Phenyl-Hexyl, $50 \times 3,0$ мм, Phenomenex, колонка Synergi 4u Fusion – RP 80A, $150 \times 3,0$ мм, Phenomenex, постоянный состав подвижной фазы (метанол, вода ультрачистая, 80 мМ формиат аммония). Детектирование осуществлялось в режиме положительных ионов с использованием сдвоенной системы ионизации DUIS-ESI, сочетающей ионизацию в электроспрее и химическую ионизацию при атмосферном давлении. В качестве внутреннего стандарта использовали дейтерированную метилдопу (метилдопа-D3). Для аналита был выбран MRM-переход $211,95 \rightarrow 138,90$ m/z, для внутреннего стандарта – $214,95 \rightarrow 169,00$ m/z.

Валидация выполнена в соответствии с руководством ЕМА “Guideline on bioanalytical method validation” (2011) по следующим параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения, правильность и прецизионность, эффект матрицы, степень извлечения, эффект переноса предыдущей пробы, тест на допустимость разведения, стабильность.

Оценка фармакокинетических параметров и статистический анализ. Вычисление фармакокинетических параметров и статистический анализ выполняли с помощью статистических пакетов Rv. 3.2.1, модуль Bear (Lee, Hsin-yaandLee, Yung-jin (2014), Data Analysis Tool for Average Bioequivalence and Bioavailability R package version 2.6.4) и StatSoft STATISTICA v.12. Рассчитывали следующие фармакокинетические параметры: C_{\max} – максимальное измеренное значение концентрации лекарственного средства (ЛС) в плазме крови; T_{\max} – время достижения максимальной концентрации ЛС в плазме крови; AUC_{0-t} – площадь под фармакокинетической кривой “концентрация-время” от нуля до последнего отбора крови, при котором концентрация препарата равна или выше нижнего предела количественного определения; $AUC_{0-\infty}$ – площадь под фармакокинетической кривой от нуля до бесконечности; $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$; C_{\max}/AUC – относительная скорость всасывания; λz – константа скорости терминальной элиминации; $T_{1/2}$ – период полувыведения ЛС; MRT – среднее время удержания ЛС в крови (среднее резидентное время). Предполагали лог-нормальное распределение параметров AUC, C_{\max} и C_{\max}/AUC и нормальное распределение остальных параметров за исключением T_{\max} . При лог-нормальном распределении средние значения параметров фармакокинетики исследуемого и референтного препарата сравнивают с помощью мультипликативной модели, а доверительные интервалы строятся для отношений соответствующих средних значений. После логарифмического преобразования эти показатели анализируются с помощью дисперсионного анализа (ANOVA; параметрический метод). Дисперсионный анализ применяли для про-

верки гипотез о статистической значимости вклада различных факторов (различия между препаратами, различия между испытуемыми, последовательность приема препаратов, этапы исследования) в наблюдаемую вариабельность. Полученная с помощью дисперсионного анализа оценка остаточной вариации используется при расчете доверительного интервала для отношения средних значений соответствующего параметра. Процедура статистического сравнения состоит в вычислении параметрических двусторонних 90% доверительных интервалов для отношений соответствующих средних значений для исследуемого препарата и препарата сравнения. Препараты считают биоэквивалентными, если границы оцененного доверительного интервала для AUC_{0-t} , C_{\max} и C_{\max}/AUC_{0-t} находятся в пределах 80,00–125,00%.

Результаты

Сравнительный тест кинетики растворения. Кинетика растворения исследуемых лекарственных средств была признана эквивалентной в среде 0,2% раствора натрия хлорида в 0.1 М растворе хлористоводородной кислоты pH 1.2 и ацетатного буферного раствора pH 4.5 на основании расчета факторов сходимости, значения которых составили 66,01 и 58,36 соответственно. В среде фосфатного буферного раствора pH 6.8 данные не учитывали в связи с частичной деградацией метилдопы (визуально проявляется изменением цвета раствора).

Результаты валидации аналитической методики. Нижний предел количественного определения метилдопы в плазме составил 0,020 мкг/мл. Наблюдалась линейная зависимость отношения отклика аналита к отклику внутреннего стандарта от концентрации аналита в целевом диапазоне концентраций от 0,020 до 3,000 мкг/мл плазмы. При предварительных испытаниях стабильности аналита в плазме крови была выявлена значимая деградация метилдопы. Для предотвращения изменения концентрации метилдопы после отбора образцов в плазму добавляли аскорбиновую кислоту в качестве стабилизатора с антиоксидантными свойствами. Добавление к 1 мл плазмы 0,2 мл раствора аскорбиновой кислоты в концентрации 50 мг/мл позволило полностью стабилизировать содержание метилдопы в условиях хранения и проведения аналитических процедур. Все валидационные тесты были выполнены на плазме с добавлением стабилизатора. Разработанная методика имеет высокую селективность: на хроматограммах бланковой плазмы (6 образцов из независимых источников, включая гемолизованную и гиперлипидемическую плазму) отсутствовали пики с временем удерживания, характерным для аналита и внутреннего стандарта. В тестах на правильность и прецизионность были использованы образцы контроля качества (QC) в концентрациях 0,020 (LLOQ), 0,060 (L), 0,300, 1,200 (M), 2,400 (H) и 3,000 (ULOQ) мкг/мл. Все полученные результаты удовлетворяли критериям приемлемости (прецизионность на уровне $CV \leq 20,00\%$ и правильность 80,00–120,00% для LLOQ; прецизионность на уровне $CV \leq 15,00\%$ и правильность 85,00–115,00% для других концентраций). Степень извлечения аналита составила 63,49% и 62,40% при низкой и высокой концентрациях,

ТАБЛИЦА 1. Результаты сравнения фармакокинетических параметров тестируемого и референтного препаратов (M±SD)

Параметры	T	R	p*
C _{max} , мкг/мл	1,227±0,601	1,233±0,419	0,952
AUC ₀₋₁ , мкг×ч/мл	6,219±3,080	6,385±2,153	0,740
AUC ₀₋₂₄ , мкг×ч/мл	6,436±3,181	6,529±2,187	0,997
C _{max} /AUC ₀₋₁ , ч ⁻¹	0,2019±0,0377	0,1978 ±0,0372	0,663
λz, ч ⁻¹	0,22943±0,10984	0,20651±0,10709	0,127
T _{1/2} , ч	3,89±2,13	4,45±2,37	0,056
MRT, ч	4,97±0,77	4,98±0,76	1,000
T _{max}	3,00	3,00	0,467**

Примечание: *t-критерий для связанных выборок, ** критерий знаковых рангов Уилкоксона

соответственно. Использование дейтерированного внутреннего стандарта позволило нивелировать влияние компонентов биологической матрицы на эффективность ионизации аналита: нормализованный матричный фактор (NMF) составил 1.010 и 1.018 при низкой и высокой концентрациях, соответственно, а коэффициенты вариации NMF – 0,40% и 1,24%, что удовлетворяет критерию приемлемости (CV≤15,00%). Была продемонстрирована стабильность аналита (средняя концентрация в диапазоне 85,00–115,00% номинального значения) в растворах (не менее 17 дней при температуре 2–8°C), образцах плазмы, стабилизированных аскорбиновой кислотой, как описано выше (не менее 24 ч при комнатной температуре, не менее 29 дней в замороженном состоянии при температуре не выше –20°C, а также после 3 циклов замораживания – таяния с интервалом не менее 12 ч), в цельной крови (20 минут на ледяной бане с последующим хранением в течение 40 минут при комнатной температуре), в подготовленных образцах в пробоотборнике (не менее 48 ч).

Характеристика исследуемой популяции. В популяцию анализа фармакокинетики были включены 24 здоровых добровольца (средний возраст – 25,8±7,1 лет, рост – 171,5±9,4 см, масса тела – 68,1±10,5 кг, индекс массы тела 23,3±2,8 кг/м²), в том числе 13 женщин и 11 мужчин европейской расы.

Оценка переносимости. Переносимость препаратов была удовлетворительной. Большинство нежелательных явлений были вызваны фармакодинамическими эффектами исследуемых препаратов и описаны в инструкции по медицинскому применению. Регистрация нежелательных явлений выполнялась в строгом соответствии с международными рекомендациями [8,9]. Частота и спектр нежелательных явлений были сопоставимыми после приема исследуемого препарата и препарата сравнения. В ходе исследования было отмечено 23 нежелательных явления, 22 из которых были связаны с отклонением от нормальных значений АД и ЧСС. После приема препарата Метилдопа зарегистрировали 12 нежелательных явлений, после приема препарата Допегит® – 11. Определенная связь нежелательных явлений с приемом препарата Метилдопа была установлена в 63,6% случаев, препарата Допегит® – в 75,0%.

Анализ образцов плазмы. Аналитическая часть исследу-

ования была выполнена в течение 15 дней после завершения клинической части. По результатам валидации была доказана стабильность метилдопы в течение указанного периода времени. Образцы плазмы анализировали в виде 24 серий, включавших бланковый образец, 9 калибровочных образцов, 6 образцов контроля качества (низкой, средней и высокой концентрации в двух повторах) и образцы от одного добровольца с обоих этапов. Результаты всех аналитических серий удовлетворяли критериям приемлемости. Для оценки воспроизводимости и стабильности аналитической методики на реальных образцах было выполнено повторное исследование ранее проанализированных образцов (Incurred Sample Reanalysis, ISR-тест). Всего на повторное исследование было отобрано 96 образцов, что составляет 11,1% от общего их количества. Результаты показали воспроизводимость аналитической методики на уровне 100%.

Оценка фармакокинетических параметров и статистический анализ. Результаты оценки фармакокинетических параметров тестируемого и референтного препаратов позволяют констатировать высокую степень их сходства (табл. 1). Ни по одному параметру не было выявлено статистически значимых различий (p>0,05 во всех случаях). Усредненные профили фармакокинетических кривых, представленные на рис. 1, демонстри-

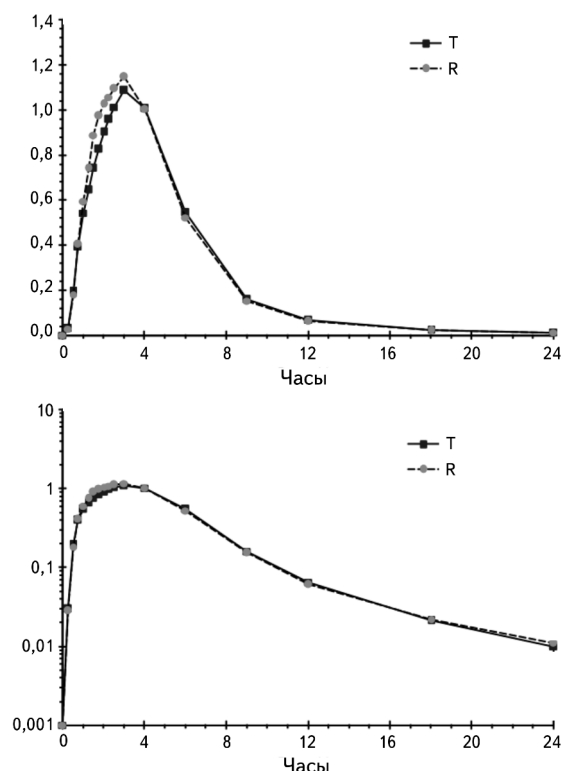


Рис. 1. Усредненные фармакокинетические профили концентрации метилдопы в плазме крови добровольцев (M±SD) после однократного приема тестируемого (Т) препарата Метилдопа и референтного (R) препарата Допегит® в линейных и полулогарифмических координатах

ТАБЛИЦА 2. 90% доверительные интервалы отношения средних значений (%) фармакокинетических параметров, характеризующих биодоступность метилдопы

Параметр	Отношение средних значений, %	90% доверительные интервалы	Биоэквивалентность	Коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности, %
AUC_{0-t}	92,93	80,69-107,03	ДА	29,08
C_{max}	94,89	80,88-111,34	ДА	33,10
C_{max}/AUC_{0-t}	102,11	93,95-110,98	ДА	16,92

руют близкие значения концентраций метилдопы при приеме тестируемого и референтного препаратов.

Результаты дисперсионного анализа показали, что единственным фактором, который вносил значимый вклад в вариабельность параметров AUC_{0-t} и C_{max} , являются испытуемые (соответствующие значения p были равны 0,002 и 0,027). Вклад остальных факторов (препарат, этап, последовательность) оказался статистически незначимым ($p > 0,05$).

Границы 90% доверительных интервалов для всех фармакокинетических параметров, характеризующих биодоступность метилдопы, соответствовали нормативным требованиям, что позволяет констатировать биоэквивалентность сравниваемых препаратов (табл. 2).

Обсуждение

Как было отмечено выше, метилдопа является одним из лекарственных веществ, предъявляющих особые требования к методологии фармакокинетического исследования. Это связано с особенностями физико-химических и биофармацевтических свойств метилдопы. Наличие в молекуле ЛС двух фенольных гидроксильных групп делает ее неустойчивой в отношении окислительных процессов. Низкая биодоступность, связанная с плохой проницаемостью мембран энтероцитов для молекул метилдопы, является одним из факторов, усложняющих создание воспроизведенных препаратов, характеризующихся фармакокинетической эквивалентностью по отношению к оригинальному препарату. Выполненное исследование демонстрирует важное значение организационных аспектов исследования биоэквивалентности, а именно взаимосвязь клинического и биоаналитического этапов: методика стабилизации метилдопы в образцах плазмы была разработана и валидирована на предварительном этапе и в дальнейшем успешно применена при отборе проб в ходе клинической части исследования.

Публикации, посвященные изучению фармакокинетики метилдопы, достаточно малочисленны. Значения фармакокинетических параметров метилдопы, полученные в выполненном исследовании, близки к таковым препарата Допегит®, установленным в исследовании К. Рóна и соавт. [10]. В то же время Н. Valizadeh и соавт. при изучении аналогичной дозировки метилдопы наблюдали более низкие показатели C_{max} и AUC и более высокие значения $T_{1/2}$ [11]. Отмеченные различия могут быть связаны с различиями характеристик лекарственных форм, принимаемых добровольцами, особенностями испытуемых и биоаналитической методологии.

Также следует отметить различия показателей интрасубъектной вариабельности фармакокинетических параметров метилдопы в нашем исследовании и работах других авторов. Настоящее исследование демонстрирует достаточно высокий уровень интрасубъектной вариабельности основных фармакокинетических параметров метилдопы: коэффициенты вариации составили 33,01%, 29,08% и 16,92% для AUC_{0-t} , C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} , соответственно; коэффициент вариации для C_{max} превышал 30% и соответствовал уровню высоковариабельного ЛС. Н. Valizadeh и соавт. показали более низкую интрасубъектную вариабельность метилдопы (15,37% и 12,54% для C_{max} и AUC_{0-t} , соответственно) [11], в то время как в исследовании К. Рóна и соавт. интраиндивидуальная вариабельность была существенно выше (40,06% и 34,85% для C_{max} и AUC_{0-t} , соответственно) [10]. При этом следует отметить, что интрасубъектная вариабельность в нашем исследовании не была связана с препаратами и применяемой биоаналитической методологией. Об этом свидетельствуют результаты процедуры ANOVA, показавшие, что единственным фактором, вносящим значимый вклад в наблюдаемую вариабельность параметров AUC_{0-t} и C_{max} , являются испытуемые, в то время как вклад других факторов (препарат, этап и последовательность) оказался статистически незначимым ($p > 0,05$). Точность, воспроизводимость и стабильность результатов аналитической методики были показаны на этапе валидации и при выполнении ISR-теста.

Заключение

Тестируемый препарат Метилдопа (таблетки по 250 мг, ЗАО «Р-Фарм», Россия) и референтный препарат Допегит® (таблетки по 250 мг, ОАО «Фармацевтический завод ЭГИС», Венгрия) характеризуются высокой степенью сходства показателей фармакокинетики и являются биоэквивалентными. Представленные результаты демонстрирует успешное решение методологических проблем, связанных с особенностями свойств метилдопы. Разработанные подходы могут также успешно применяться при исследовании других лекарственных средств, имеющих подобные физико-химические и биофармацевтические характеристики.

1. Myhre E, Rugstad HE, Hansen T. Clinical pharmacokinetics of methylidopa. Clin Pharmacokinet 1982; 3: 221-33.
2. Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for the WHO Model List of Essential Medicines immediate release, solid oral dosage forms. WHO 2005.
3. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Pharmaceutical Press 2011; 4: 2471.
4. Oliveira CH, Barrientos-Astigarraga RE, Sucupira M, Graudenz GS, Muscará MN, De NG. Quantification of methylidopa in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry application to a bioequivalence study. J Chromatogr Anal Technol Biomed Life Sci 2002; 2:

- 341-8.
5. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA 2011.
 6. Khokhlov AL, Lileeva EG, Sinitina OA, Speshilova SA, Demarina SM, Shitov LN. The problems of undertaking bioanalytical part of bioequivalence studies of medicines in Russia. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 2014; 1: 37-43.
 7. Shader R. Pharmacokinetics: The View From Clinical Therapeutics. *Clinical Therapeutics* 2015; 2: 268-9.
 8. Khokhlov AL, Yavorski AN, Ignatiev VS, Sinitina OA, Stepanov IO, Voronina EA, Melnikova YuE. Culture of safe drug therapy. Yaroslavl 2011; 156.
 9. Levy R, Pillai L, Burnett B, Khokhlov A, Kopenkin S, Bart B, Ermolova T, Mazurov V, Kantemirova R, Bell M, Caldron P. Efficacy and safety of flavocoxid compared with naproxen in subjects with osteoarthritis of the knee – a subset analysis. *Advances in Therapy* 2010; 12: 953-962.
 10. Róna K, Ary K, Renczes G, Gachályi B, Grézal GY, Drabant S, Klebovich I. Comparative bioavailability of alpha-methyl dopa normal and film tablet formulations after single oral administration in healthy volunteers. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2001; 26: 25-30.
 11. Valizadeh H, Nemati M, Hallaj-Nezhadi S, Ansarin M, Zakeri-Milani P. Single dose bioequivalence study of an alpha-methyl dopa tablet formulations using a modified HPLC method. *Arzneimittelforschung* 2010; 10: 607-611.
 12. Moreno-Arza I, Ochoa D, Román M, Cabaleiro T, Abad-Santos F. Utility of pilot studies for prediction of bioequivalence ratio and intrasubject variability. *Clinical Therapeutics* 2015; 8: 149.

The pharmacokinetic properties and bioequivalence of methyl dopa formulations: results of an open-label, randomized, two-period, crossover, single-dose study

A.L. Khokhlov, L.N. Shitov, M. Ryska, Y.A. Dzhurko, V. Kubeš, V.N. Shabrov, A.E. Miroshnikov, E.V. Korneva, A.V. Demchinskaya, A.M. Shitova, A.A. Khokhlov, I.E. Shokhin, E.G. Lileeva

Aim. Comparative assessment of the pharmacokinetic properties and bioequivalence (BE) of two methyl dopa formulations.

Material and methods. BE of Methyl dopa (250 mg tablets, R-Pharm CJSC, Russia – investigational medicinal product) and Dopegyt® (250 mg tablets, EGIS Pharma-

ceuticals PLC, Hungary – reference product) were studied in 24 healthy volunteers (13 women and 11 men, caucasian) in an open-label, randomized, crossover, two-period, two-sequence trial with 7-day washout period. A comparative dissolution test was carried out in advance in 3 media, including quantitative determination of methyl dopa by UV spectrophotometry. The release patterns of the active ingredient from the test and reference products were equivalent. Methyl dopa concentrations in plasma were measured by validated method of high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry, using the deuterated internal standard. The validation method yields data meeting all acceptance criteria for the plasma methyl dopa concentration range of 0.020 – 3.000 µg/mL. Stabilization of plasma samples was developed and involved addition of ascorbic acid to the plasma during the sampling procedure at the study site. The BE assessment involved calculation of 90 % confidence intervals for AUC, C_{max} , and C_{max}/AUC using analysis of variance (ANOVA) of log-transformed data within a range of 80.00 – 125.00 %.

Results. No statistically significant differences were observed between the two drugs. The point estimates and 90% confidence interval limits were as follows: AUC_{0-t} – 92.93% (80.69 – 107.03 %), C_{max} – 94.89% (80.88 – 111.34 %), C_{max}/AUC_{0-t} – 102.11% (93.95 – 110.98 %), corresponding to the acceptable ranges (80.00 – 125.00 %).

Conclusion. The test and reference drug products are characterized by a high degree of pharmacokinetic similarity and therefore are bioequivalent.

Keywords. *Methyl dopa, bioequivalence, pharmacokinetics, arterial hypertension.*

Clin. Pharmacol. Ther., 2016, 25 (4), 30-35.