АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

1. Связь проблем фармацевтической химии с фармакокинетикой и фармакодинамикой

К концу 50-х — началу 60-х гг. XX в. было обращено внимание на зависимость фармакологической активности от таких физических факторов, как степень измельчения и явление полиморфизма, а также от технологических процессов получения ЛС. Возникло своеобразное противоречие между существовавшими нормами оценки качества и фактическим действием ЛС. Последние по результатам аналитического контроля соответствовали в одинаковой степени требованиям фармакопеи (ФС), но различались по фармакологическому эффекту. Так возникло понятие о терапевтической неэквивалентности ЛС. Оно означает, что одни и те же ЛФ, содержащие одинаковые количества ЛВ, но изготовленные разными способами, оказывают неодинаковый терапевтический эффект. Установить причину такого явления можно только проведением биофармацевтических и фармакокинетических исследований.

Сформулированные к настоящему времени основные принципы установления количественных соотношений между химической структурой и фармакологической активностью можно представить в виде трех основных стадий. Первая — биофармацевтическая — включает исследование исходного биологически активного вещества и создание на его основе готовой лекарственной формы. Вторая стадия — фармакокинетическая — включает исследование таких происходящих в организме кинетических процессов, как всасывание, распределение, связывание с белками, биотрансформация и выведение (экскреция) ЛВ. Эти процессы изучаются в сопоставлении с фармакологическим или токсическим действием этих веществ на организм. Третья стадия — фармакодинамическая — включает исследование взаимодействия ЛВ с рецептором и влияние на регуляторные системы. Только на этой стадии в полной мере проявляется и является специфичной взаимосвязь химической структуры ЛВ и его фармакологического эффекта. Следовательно, биологическая активность лекарств объясняется последовательно происходящими тремя фазами: биофармацевтической, фармакокинетической и фармакодинамической.

Изучение механизма качественных и количественных изменений ЛВ в органах и биологических жидкостях организма входит в задачу фармакокинетики. На фармакокинетику Л В оказывают влияние различные факторы: возрастные, генетические, половые, масса тела, питание, беременность, а также различные патологические процессы, например заболевания печени, почек, сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, эндокринные, инфекционные и другие заболевания.

Проведение фармакокинетических испытаний осуществляется на стыке нескольких наук и требует участия различных специалистов: врача-клинициста, врача-лаборанта, биохимика, провизора-аналитика, микробиолога, а в ряде более сложных случаев также биофизика, математика, программиста.

Исследования в области фармакокинетики проводятся на животных в период предклинических испытаний, во время клинических испытаний, при разработке технологии производства и контроля качества ЛФ, а также продолжаются после внедрения ЛС в медицинскую практику.

Проведение фармакокинетических исследований возможно только на основе применения современных методов биофармацевтического анализа, позволяющих проследить процесс всасывания и распределения ЛВ в органах и тканях. Они включают выяснение влияния различных биофармацевтических факторов на терапевтическую эффективность Л В; изучение их биологической доступности и разработку методов ее определения; создание способов определения ЛВ и их метаболитов в биологических жидкостях. Основным фармакокинетическим параметром является продолжительность достижения и сохранение максимального уровня концентрации лекарственного вещества в крови, а также скорость и характер ее снижения. Это обусловлено наличием корреляции между терапевтическим эффектом и длительностью циркуляции ЛВ в плазме крови.

Выполнение фармакокинетических исследований ведет к накоплению сведений о количественной оценке ряда кинетических параметров у людей. Так, например, имеются многочисленные данные о связывании большинства применяемых в медицине ЛВ с белками плазмы, биодоступности при приеме внутрь, выделении неизмененного ЛВ с мочой (в процентах к дозе), а также о терапевтических концентрациях в плазме крови (мкг/мл) и периоде полувыведения из плазмы крови (в часах) в норме, при почечной и печеночной недостаточности, у людей различного возраста.

Эти данные дают возможность ориентироваться в понимании механизма действия, прогнозирования химической структуры ЛВ, обусловливающей направленное действие. Иначе говоря, результаты фармакокинетических исследований существенно дополняют данные о связи между химической структурой и фармакологической активностью ЛВ.

Эффективность воздействия ЛВ находится в зависимости от путей его введения в организм.

Процесс поступления лекарственного вещества из места введения в кровь обозначают термином «всасывание». Этот процесс происходит при всех путях введения ЛС, за исключением внутривенного и внутриартериального. Всасывание зависит от пути введения и растворимости ЛВ, а также от кровотока в месте введения. При прохождении через слизистые оболочки всасывание определяется растворимостью в липидах, рН среды в желудке и в кишечнике, ионизацией, активностью их транспорта, скоростью абсорбции в различных отделах желудочно-кишечного тракта. Значительным превращениям подвергаются ЛВ под влиянием ферментов желудочно-кишечного тракта и печени, вызывающих образование различных метаболитов. На скорость и полноту всасывания ЛВ оказывают влияние моторика желудочно-кишечного тракта, объем и состав пищи, интервал времени между едой и приемом ЛС, воздействие пищи на секрецию желудочного сока, объем жидкости, принимаемой вместе с ЛС.

Попав в системный кровоток, ЛВ распределяется по тканям организма. Этот процесс носит название распределения. Он зависит от множества различных факторов, наиболее важными из которых являются растворимость в липидах, степень связывания с белками плазмы крови, интенсивность кровотока. Растворимые в липидах ЛВ быстро распространяются по всему организму. Многие ЛВ в силу большого физико-химического сродства к белкам плазмы крови (особенно к альбумину) связываются ими (иногда на 90%) и ограничивают их концентрацию в тканях в месте действия. Образовавшиеся комплексы с белком лишены фармакологической активности. Наибольшая интенсивность системного кровотока наблюдается в тех органах и тканях, которые активно перфузируются кровью, — в сердце, печени, почках. Значительно медленнее насыщаются ЛВ мышцы, слизистые оболочки, кожа, жировая ткань. Для достижения терапевтической концентрации в этих тканях необходимо нередко несколько часов. Важным фактором, определяющим распределение ЛВ, является также скорость его диффузии в различные ткани.

Таким образом, всасывание и распределение лекарственного вещества зависят не только от путей введения, но и от многих других факторов, обусловленных как физико-химическими свойствами Л В, так и физиологическими процессами, происходящими в организме.

2. Фармакокинетические параметры

Количественно характеризуют процессы, происходящие с ЛВ в организме, основные фармакокинетические параметры, которые отражают связь между концентрацией ЛВ в биологических жидкостях и его фармакологическим действием.

Константа скорости всасывания — параметр, отражающий скорость поступления (ч, мин) ЛВ из места введения в системный кровоток. Используют этот параметр при всех путях введения, кроме внутривенного и внутриартериального.

Константа скорости элиминации (ч, мин-1) характеризует скорость удаления (элиминации) ЛВ из организма путем экскреции или биотрансформации.

Константа скорости экскреции характеризует скорость выделения ЛВ (ч-1, мин-1) с мочой, слюной, калом, молоком или другими экскретами.

Важным фактором, влияющим на терапевтический эффект, является содержание Л В в организме. Оно зависит от продолжительности выведения или элиминации из организма. Показателем элиминации является клиренс (мл/мин). Общий клиренс — это объем плазмы или крови, из которого за единицу времени ЛВ выводится почками, печенью, легкими или биотрансформируется в организме. Параметр, определяющий скорость очищения организма от лекарственного вещества почками, носит название почечный клиренс, а другими путями — внепочечный клиренс. Клиренс в клинической практике используют для расчета терапевтической или поддерживающей дозы ЛВ в крови.

Объем распределения лекарственного вещества — это гипотетический объем жидкостей организма, который необходим для равномерного распределения всего количества ЛВ в той же концентрации, в которой он содержится в плазме крови. Этот показатель находится в зависимости от пола, возраста, общей массы жиров в организме больного. Распределение ЛВ зависит от таких его физико-химических свойств, как растворимость в воде и в липидах, молекулярная масса, полярность, уровень ионизации. Объем распределения используют для расчета дозы ЛВ, необходимой для достижения нужной концентрации его в крови.

О выведении ЛВ из организма судят по периоду пол у вы веден ия, или полуэлиминации. Под ним понимают время, в течение которого происходит снижение на 50% концентрации ЛВ по сравнению с введенным количеством. За один период полуэлиминации из организма выводится 50%, за два периода — 75%, за три периода — 90% ЛВ.

Равновесная концентрация — это состояние, при котором количества вводимого и адсорбирующегося ЛВ равны между собой. Поэтому при равновесной концентрации содержание ЛВ в организме колеблется между максимальными и минимальными его значениями. Это соответствует оптимальному проявлению клинического эффекта.

Период полуабсорбции (полувсасывания) — время (ч, мин), необходимое для всасывания ЛВ из места введения (кроме внутрисосудистого) в системный кровоток половины введенной дозы.

Период полураспределения (ч, мин) — условный параметр, характеризующий распределение ЛВ между центральной камерой (плазма крови) и периферической камерой (органы, ткани).

Площадь под фармакокинетической кривой — площадь фигуры, ограниченной на графике фармакокинетической кривой и осями координат, одна из которых обозначает концентрацию ЛВ в плазме крови (мкг/мл), а другая — время после введения ЛВ (мин).

2.1 Основы фармакодинамики

Разнообразные изменения, которые происходят в организме под влиянием Л В, называются фармакодинамикой.

Первичная фармакологическая реакция сопровождается процессом переноса протонов и электронов с одного вещества на другое. Это осуществляется за счет различных типов химических связей. Наиболее часто встречается ванн-дер-ваальсов тип связи. Такие связи возникают между двумя функциональными группами, одна из которых входит в состав молекулы ЛВ, а другая — в биологическую молекулу. Ван-дер-ваальсовы связи возникают в тех случаях, когда молекулы находятся на близком расстоянии друг от друга, не превышающем 0,2 нм, а энергия связи составляет 0,836-4,18 кДж/моль.

Наиболее важное значение в действии ЛВ имеют водородные связи (-ОН...О-) с энергией-8,4-21 кДж/моль. Водородная связь появляется только в том случае, если атом, участвующий в ее образовании, располагается на расстоянии не более 0,3 нм. Атом водорода может связывать атомы серы, кислорода, азота, галогенов.

Между ионами, имеющими разноименные заряды, возникают ионные связи. Возможности для их образования в организме практически безграничны ввиду наличия большого количества ионов в биологических средах. Энергия ионных связей составляет -21-42 кДж/моль, но длительность их существования в организме очень непродолжительна и не превышает 10~5 с.

Немалую роль в фармакологических реакциях играет ион-дипольная связь, имеющая энергию порядка -8,4-21 кДж/моль. Такая связь ориентирует молекулы ЛВ относительно соответствующей функциональной группы фермента или рецептора. Возможны также диполь-дипольные связи, участвующие в фиксации ЛВ на функциональной группе рецептора. Их энергия равна -4,2-12,5 кДж/моль.

Наиболее прочной является ковалентная связь. Она образуется между двумя атомами за счет общей пары электронов и имеет энергию 42-627 кДж/моль.

Таким образом, основой первичного взаимодействия между Л В и тканями организма является процесс, сопровождающийся образованием ван-дер-ваальсовых, водородных, ионных, дипольных связей. Предполагается, что ЛВ притягивается рецептором, затем происходит ориентация его молекулы и, наконец, фиксация молекулы на рецепторном поле. Следовательно, специфический ответ клетки органа или организма в целом происходит после адсорбции ЛВ на рецепторе.

Биофармацевтические и фармакокинетические исследования позволяют решить ряд практических задач, например дать рекомендации по изменению физических или химических свойств Л В для повышения их фармакологической активности; обосновать оптимальный выбор биофармацевтических факторов при производстве тех или иных ЛФ. Практическое значение имеют и такие рекомендации, как уточнение показаний и противопоказаний, установление рациональных терапевтических доз и периодичности их приема в течение суток, определение оптимальных путей введения ЛС в организм, разработка научно обоснованных схем лечения тех или иных заболеваний.

3. Понятие о биофармацевтических факторах

ЛС представляют собой сложные химические системы, которые вступают в определенные взаимодействия с биологическими системами организма. На этот процесс существенно влияют самые различные факторы, известные под названием биофармацевтических факторов. Наиболее существенными из них являются полиморфизм, степень дисперсности, физические и химические свойства вспомогательных веществ, используемых при изготовлении лекарственных форм.

Фармакологическое действие кристаллических веществ зависит от образования полиморфных форм. Полиморфизм — способность вещества одной и той же химической структуры кристаллизоваться в различных формах, т. е. изменять свою сингонию в зависимости от термодинамических условий. Одно и то же вещество при соответствующих условиях может образовывать несколько полиморфных структур, отличающихся друг от друга физическими и физико-химическими свойствами. Они могут отличаться по плотности, удельной теплоемкости, проводимости, оптическим и другим константам. Установить наличие таких модификаций можно по растворимости, температуре плавления, а также с помощью физико-химических методов (ИК-, ЯМР-спектроскопия).

Степень дисперсности оказывает большое влияние на процесс всасывания и терапевтическую активность. Как правило, последняя возрастаете уменьшением размера диспергированных частиц ЛВ. Уменьшение в 30 раз (по сравнению с принятым ГФ) размера частиц кислоты ацетилсалициловой усиливает вдвое ее действие на организм. Если подвергнуть очень тонкому измельчению сульфаниламидные препараты, некоторые препараты гормонов, то адекватная терапевтическая активность при их применении достигается вдвое меньшими дозами. В некоторых случаях, например при применении производных нитрофурана, ЛВ следует назначать в виде крупных кристаллов, чтобы уменьшить раздражающее действие на слизистые желудочно-кишечного тракта.

Биофармацевтические исследования очень важны для оценки роли физических и химических свойств вспомогательных веществ, используемых для приготовления ЛФ. Вспомогательные вещества далеко не индифферентны в химическом и фармакологическом отношении. Они могут снижать фармакологическую активность ЛВ, повышать ее и даже изменять характер фармакологического действия под влиянием различных физических и химических процессов.

4. Способы установления биологической доступности лекарственных средств

Биологическая доступность — это степень всасывания JIB из места введения в системный кровоток и скорость, с которой этот процесс происходит. Такое понятие признано ВОЗ.

Терапевтический эффект зависит от того, какая часть введенного JIB попадет в системный кровоток и затем будет доставлена в те ткани или органы, в которых осуществляется его специфическое действие. Этот показатель характеризует биологическую доступность. При внутривенном введении она равна 100%, при всех других способах применения — всегда ниже 100%. Это вызвано тем, что, прежде чем попасть в кровоток, JIB должно пройти целый ряд биологических мембран клеток слизистой желудка, печени, мышц и т.д.

На биодоступность оказывают влияние биофармацевтические факторы, в частности лекарственная форма, пути ее введения, индивидуальные особенности организма человека, физиологическое и патологическое состояние желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, печени, почек и др.

Биодоступность изучают путем сравнительного исследования изменений концентраций JIB в плазме крови или в моче после введения испытуемой и стандартной ЛФ. Поскольку внутривенное введение обеспечивает 100%-ную биодоступность, можно установить абсолютную биодоступность, т.е. долю всосавшегося в организм ЛВ, введенного различными путями, по отношению к его количеству после внутривенного введения. Значительно чаще определяют относительную биодоступность, которая отражает сравнительную оценку всасывания одного и того же ЛВ из испытуемой и стандартной ЛФ. Определение ведут по содержанию ЛВ в крови или в моче после однократного или многоразового введения.

Терапевтическая неэквивалентность ЛВ (ЛФ), изготовленных по различным технологиям (или различными фирмами), зависит от различной их биодоступности. В связи с этим существует понятие биоэквивалентности лекарственных веществ. Биоэквивалентность устанавливают по таким трем параметрам, как максимум концентрации ЛВ в крови, время достижения максимальной концентрации и площадь под кривой изменения концентрации ЛВ в плазме или сыворотке крови, измеренная во времени. Биоэквивалентными называют такие ЛВ, которые обеспечивают одинаковую концентрацию в крови и тканях организма. Нередки случаи, когда аналогичные ЛВ биологически неэквивалентны, так как имеют различную биодоступность. Поэтому при оценке биоэквивалентности следует учитывать важнейшие параметры биодоступности ЛВ. Иными словами, оптимизация лекарственной формы должна осуществляться с точки зрения обеспечения максимально возможной для данного ЛВ степени биодоступности.

Биологическую доступность ЛС можно установить тремя различными путями: методами in vitro с помощью приборов; методами in vivo на животных или у здоровых людей-добровольцев. Установление биологической доступности методами in vitro основано на корреляционной зависимости между скоростью всасывания и скоростью растворения ЛВ. Поэтому для растворимых веществ метод определения скорости растворения служит основным методом определения эффективности высвобождения ЛВ из ЛФ.

Принцип действия созданных для этого многочисленных приборов заключается в механическом разрушении ЛФ и диффузии ЛВ в воду или другую растворяющую среду, имитирующую биологическую жидкость. По мере высвобождения или после полного высвобождения ЛВ растворяющую жидкость удаляют из прибора. Полученные пробы подвергают анализу, используя химические или физико-химические методы. Аналитический контроль — важнейший этап испытания. Лекарственная форма признается соответствующей требованиям скорости высвобождения, если в течение установленного интервала времени из нее переходит в растворяющую жидкость оптимальное количество ЛВ. Следует отметить, что изучение кинетики высвобождения лекарственного вещества in vitro в модельных условиях не может заменить исследования in vivo. Вызвано это различием в механизмах протекающих процессов. Так, при всасывании in vivo вслед за стадией растворения ЛВ следует стадия проникновения через стенки желудка и кишечника. В то же время в условиях in vitro моделируется лишь стадия растворения.

Биологическая доступность методами in vivo устанавливается на лабораторных животных (кроликах, собаках и др.). При этом либо определяют содержание ЛВ (метаболитов) в крови, либо устанавливают скорость их выведения с мочой через определенные промежутки времени. Важнейший этап этих испытаний — количественный анализ. Он усложняется по сравнению с методами in vitro, поскольку приходится анализировать сложную смесь, включающую не только ЛВ или их метаболиты, но и различные соединения, входящие в состав биологических жидкостей.

Для характеристики биодоступности широко применяют способ, основанный на оценке максимальной концентрации ЛВ в крови после введения внутрь изучаемой ЛФ. Такой способ является весьма приблизительным, так как биодоступность зависит не только от степени и скорости всасывания, но и от распределения и элиминации ЛВ в организме.

Для определения биологической доступности у здоровых людей подбирают группы добровольцев определенного возраста и соответствующим образом их готовят: стандартизируются диета, количество выпитой воды, физическая активность, исключается прием других лекарств, возможность стрессовых состояний и т.д. Сущность испытаний заключается в установлении скорости выведения ЛВ с мочой через определенные промежутки времени после введения ЛС. Концентрацию ЛВ или их метаболитов устанавливают с помощью методик биофармацевтического анализа.

Таким образом, одним из основных этапов любого исследования биологической доступности ЛС является использование биофармацевтического анализа для определения концентрации ЛВ (метаболита) в биологических жидкостях.

5. Особенности биофармацевтического анализа

Биофармацевтический анализ — новое перспективное направление фармацевтической химии. Задачей биофармацевтического анализа является разработка способов выделения, очистки, идентификации и количественного определения ЛВ и их метаболитов в таких биологических жидкостях, как моча, слюна, кровь, плазма или сыворотка крови и др. Только на основе применения таких методик можно выполнять биофармацевтические исследования, т.е. изучать вопросы всасывания, транспорта и выведения ЛВ, его биологическую доступность, процессы метаболизма. Все это позволяет предупреждать возможное токсическое воздействие ЛС, разрабатывать оптимальные режимы фармакотерапии и контролировать процесс лечения. Особенно важно определять в биологических жидкостях концентрацию ЛВ, когда они наряду с терапевтическим эффектом проявляют токсичность. Необходимо также контролировать содержание ЛВ в биологических жидкостях больных, страдающих желудочно-кишечными заболеваниями и заболеваниями печени и почек. При таких заболеваниях изменяются процессы всасывания, нарушаются метаболические процессы, замедляется выведение ЛВ из организма.

Биологические жидкости — очень сложные объекты для выполнения анализа. Они представляют собой многокомпонентные смеси, включающие большое число неорганических и органических соединений различной химической структуры: микроэлементы, аминокислоты, полипептиды, белки, ферменты и др. Их концентрация колеблется от 10 мг/мл до нескольких нанограммов. Даже в такой относительно простой физиологической жидкости, как моча, идентифицировано несколько сотен органических соединений. Всякий биологический объект — очень динамичная система. Ее состояние и химический состав зависят от индивидуальных особенностей организма, воздействия факторов внешней среды (состав пищи, физическая и психическая нагрузка и т.д.). Все это еще в большей степени усложняет выполнение биофармацевтического анализа, так как на фоне столь большого количества сложных по химическому строению органических веществ нужно определять нередко очень малые концентрации ЛВ. Вводимые в биологические жидкости ЛВ в процессе биологической трансформации образуют метаболиты, количество которых нередко исчисляется несколькими десятками. Выделение этих веществ из сложных смесей, разделение на индивидуальные компоненты и установление химического состава — задача необычайно трудная.

Таким образом, можно выделить следующие особенности биофармацевтического анализа:

* 1. Объекты исследования представляют собой многокомпонентные смеси соединений.
	2. Количества определяемых веществ, как правило, исчисляются микрограммами и даже нанограммами.
	3. Исследуемые ЛВ и их метаболиты находятся в среде, состоящей из большого числа природных соединений (белков, ферментов и др.).
	4. Условия выделения, очистки и анализа исследуемых веществ зависят от вида биологической жидкости, подвергаемой

исследованию.

Помимо теоретического значения, которое имеют исследования в области биофармацевтического анализа для изучения вновь создаваемых ЛВ, несомненна и практическая роль этой отрасли знаний.

Следовательно, биофармацевтический анализ представляет собой своеобразный инструмент, необходимый для проведения не только биофармацевтических, но и фармакокинетических исследований.

6. Метаболизм и его роль в механизме действия лекарственных веществ

Метаболизму (биотрансформации) подвергаются все вещества, в том числе и лекарственные, независимо от путей введения их в организм. Образовавшиеся продукты превращения называются метаболитами.

Метаболизм — это комплекс происходящих в организме физико-химических и биохимических процессов, способствующих превращению в более полярные водорастворимые компоненты, которые легче выводятся из организма. Изучение метаболизма позволяет установить механизм действия ЛВ, фармакологическую активность или токсичность метаболитов, скорость их накопления или выведения из организма и другие явления биотрансформации.

Принято разделять лекарственные вещества на свойственные организму и чужеродные ему. Свойственные организму вещества, такие как гормоны, витамины, аминокислоты, сахара, жирные кислоты, нуклеозиды, полинуклеотиды, метаболизируются специфическими ферментными системами, обеспечивающими функцию организма.

Большинство синтетических органических и неорганических соединений, а также природные вещества растительного происхождения являются чужеродными организму. Их называют также ксенобиотиками. Они метаболизируются главным образом в микросомах клеток с участием различных неспецифических ферментов (оксидаз, трансфераз и др.). Ксенобиотики, растворимые в липидах, медленнее выводятся из организма и медленнее метаболизируются, а поэтому накапливаются в нем. Металлы (ртуть, мышьяк, свинец, серебро и др.) образуют с белком прочную ковалентную связь и также накапливаются в организме. Ксенобиотики, принятые перорально, последовательно метаболизируются вначале в слизистых оболочках желудочно-кишечного тракта, а затем в печени, куда поступают после всасывания.

Метаболиты лекарственных веществ могут быть фармакологически активными, а также совершенно неактивными в фармакологическом отношении.

Более высокая активность метаболитов по сравнению с их предшественниками — лекарственными веществами — обусловлена такими факторами, как превращение более полярной молекулы в менее полярную (это приводит к увеличению ее липофильности и облегчению транспорта через биомембраны), усиление внутрипеченочной циркуляции, изменение скорости выведения вещества из организма, перераспределение метаболитов между органами и тканями.

Значительно реже метаболизм приводит к образованию токсических для организма веществ. Так, например, токсичность метилового спирта обусловлена происходящим в организме окислением его молекулы до формальдегида и муравьиной кислоты.

Таким образом, в организме могут происходить как процессы синтеза, так и разрушения (деградации) молекул ЛВ. При синтезе образуются более сложные молекулы новых соединений, менее токсичные для организма и более полярные, что улучшает их растворимость в воде и ускоряет выведение из организма. Такой процесс носит название конъюгации, а продукты синтеза — конъюгатов.

Процесс превращения ЛВ в метаболиты происходит по-разному. Одни практически полностью превращаются в метаболиты, другие — только на несколько процентов от введенной дозы. Из одного лекарственного вещества может образоваться несколько метаболитов, иногда десятки. Образовавшиеся метаболиты либо выводятся из организма, либо подвергаются дальнейшим превращениям.

В соответствии с современными представлениями метаболические процессы условно делят на две фазы. В первой фазе в результате процессов окисления, восстановления или гидролиза изменяется молекула ЛВ с образованием функциональных групп, имеющих активные атомы водорода (оксигруппы, карбоксигруппа, первичные и вторичные аминогруппы и др.). Во второй фазе происходит процесс конъюгации образовавшихся функциональных групп с высокополярными кислотными остатками глюкуроновой, серной кислот, некоторыми аминокислотами и др. В результате этого процесса гидрофильность молекул метаболитов возрастает настолько, что они легко выводятся с мочой. Не все ЛВ метаболизируются по указанной двухфазной системе. Некоторые из них образуют конъюгаты, минуя первую фазу, другие после первой фазы выводятся почками без последующей конъюгации.

На биотрансформацию ЛВ влияют пол, возраст, условия жизни, характер питания, заболевания и т.д. Кроме влияния различных заболеваний, возможны также индивидуальная вариабельность кинетики метаболизма, индукция и угнетение метаболизирующих ферментов. Все это свидетельствует о том, что биотрансформация ЛВ является чрезвычайно сложным процессом, зависящим от многих экзогенных и эндогенных факторов.

Исследование механизма процессов метаболизма — проблема, которая входит в круг задач различных областей химических, биологических, фармацевтических наук, в том числе фармацевтической химии.

7. Сравнительная оценка методов, используемых в биофармацевтическом анализе

Большое значение имеет выбор метода проведения биофармацевтического анализа при фармакокинетических исследованиях. Избранный метод должен иметь высокую чувствительность, возможность работы с малыми объемами проб, большую специфичность и избирательность, отличаться быстротой выполнения анализа, простотой подготовки анализируемых проб, несложностью обслуживания аналитического прибора, надежностью и воспроизводимостью метода, его универсальностью (пригодностью для анализа различных ЛВ), малой трудоемкостью, большой производительность«) и возможностью автоматизации процесса анализа.

Избранный для этой цели метод должен быть настолько чувствительным, чтобы он позволял достоверно и точно определять в 10 раз меньшее количество, чем среднее количество вещества, всасывающееся после приема однократной дозы. Вместе с тем метод должен быть достаточно специфичным, чтобы определять неизменившуюся часть ЛВ в присутствии его метаболитов и эндогенных соединений.

Требованиям, предъявляемым к биофармацевтическому анализу, отвечают только чувствительные физико-химические методы.

Процесс выполнения биофармацевтического анализа включает несколько последовательно выполняемых стадий: экстракцию из биологической жидкости, разделение, идентификацию и количественное определение ЛВ или его метаболитов.

Перед экстракцией необходимо осадить белки (сульфатом аммония, раствором трихлоруксусной или хлорной кислоты). Для осаждения белков используют обычно пробу, содержащую около 0,2 мл сыворотки крови, к которой добавляют 0,5 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин. При этом достигается полное осаждение сывороточных белков. Надосадочную жидкость декантируют и экстрагируют из нее испытуемые вещества.

Процессы экстракции анализируемых лекарственных веществ и их метаболитов из биологических объектов осуществляют с помощью таких органических растворителей, как диэтиловый эфир, хлороформ, бензол, дихлорэтан, дихлорметан, я-гексан, изопропилхлорид, я-гептан, метиленхлорид, этилацетат, ацетон. Нередко сочетают в экстрагенте два из указанных растворителей. Такой способ называютдвухфазным экстрагированием. Наилучшая полнота разделения достигается, если последовательно извлекают из биологической жидкости ЛВ или его метаболиты несколькими растворителями, например эфиром, этилацетатом, хлороформом, ацетоном, водой. Экстракцию проводят в присутствии кислот, щелочей или буферных растворов, создавая рН среды, оптимальное для извлечения ЛВ или его метаболита.

Вещества, содержащиеся в полученных экстрактах (реэкстрактах), определяют фотометрическим, спектрофотометрическим или флуориметрическим методом.

Весьма перспективен чувствительный экстракционно-фотометрический метод, основанный на экстракции ЛВ из биологической жидкости с последующим взаимодействием с кислотными или основными красителями (бромтимоло- вым синим, метиловым оранжевым, бромкрезоловым зеленым и др.). Образующиеся окрашенные продукты (ионные ассоциаты) нередко специфичны для ЛВ и количественно экстрагируются органическим растворителем (хлороформом, бензолом, дихлорэтаном).

Наиболее часто в биофармацевтическом анализе используютспектрофотометрию в УФ- и видимой областях спектра. Этот метод отличается простотой выполнения и достаточной точностью, не требует большого количества операций при подготовке к анализу испытуемого образца. Сравнительно невысокая чувствительность спектрофотометрических методик (от 1 мкг/мл до 1 мг/мл) ограничивает применение данного метода для тех групп ЛВ, суточная доза которых составляет около 1 г.

Чувствительность флуориметрического анализа — около 0,0! мкг/мл. По сравнению с УФ-спектрофотометрией она выше в 10-100 раз. Поэтому с помощью флуориметрических методик можно подвергать биофармацевтическому анализу ЛВ, суточные дозы которых составляют несколько миллиграммов. Особенно высокой чувствительностью отличаются спектрофлуориметрические определения. Однако следует учитывать, что в биологических жидкостях организма нередко содержатся вещества, обладающие флуоресценцией. Флуоресцировать могут и метаболиты ЛВ.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) широко применяется в биофармацевтическом анализе ввиду высокой разрешающей способности и чувствительности. Повысить разрешающую способность ТСХ можно, используя метод двумерной хроматографии. Метод ТСХ позволяет обнаруживать до 0,025 мг ЛВ. Выполнение анализа занимает от 30 мин до 2 ч. ТСХ отличается простотой выполнения, однако при анализе сложных смесей, содержащих большое число компонентов, этот метод не всегда позволяет достигнуть нужного эффекта. Более перспективно использование ТСХ в сочетании с такими методами, как планиметрия и денситометрия. Биофармацевтический анализ методом ТСХ чаще всего сочетают с УФ-спектрофотометрией и флуоресцентным методом (хроматоспектрофотометрия, хроматофлуоресценция).

Очень перспективно использование в биофармацевтическом анализе масс-спектрометрии. Метод отличается высокой разрешающей способностью, в десятки раз превышающей другие методы. Известны различные варианты масс- спектрометрии. Один из них основан на применении масс-спектрометрии с низкой энергией ионизирующих электронов после предварительного выделения фракции биологической жидкости экстракцией или бумажной хроматографией.

Газожидкостная хроматография (ГЖХ) ввиду высокой чувствительности, хорошей воспроизводимости и точности стоит на одном из первых мест среди физико-химических методов, используемых для анализа ЛВ и их метаболитов в биологических жидкостях. Он позволяет определить микрограммовые и нанограммовые количества этих веществ. До выполнения анализа методом ГЖХ необходимо предварительно осуществлять многократную экстракцию (чаще эфиром, хлороформом или этилацетатом) и реэкстракцию ЛВ или его метаболитов.

Очищенный экстракт концентрируют и упаривают досуха (если нужно, в токе сухого азота). Остаток подвергают ГЖХ анализу в выбранных оптимальных условиях с внутренним стандартом и использованием газа-носителя-азота при температуре испарителя 245°С, детектора 305°С. Иногда экстрагируемые вещества превращают вначале в производные, а затем выполняют их ГЖХ-анализ. Относительная погрешность метода ± (8-15)% при содержании 10-25 нг/мл ЛВ в биологической пробе.

Высокоэффективная или высокоскоростная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) отличается от ГЖХ тем, что позволяет испытывать соединения, обладающие термической неустойчивостью и молекулярной массой более 400. Для этих соединений исключается фаза перевода в летучие производные. По сравнению с ТСХ метод ВЭЖХ требует меньших затрат времени на выполнение анализа. Это обусловило широкое внедрение метода в практику биофармацевтического анализа. В последние годы созданы системы для ВЭЖХ, позволяющие из 0,5 мл мочи в одну стадию без предварительной экстракции получить до 150 пиков индивидуальных веществ.

Особенно хорошие результаты в биофармацевтическом анализе были достигнуты при комбинированном применении газожидкостного хроматографа и масс-спектрометра в одном приборе (хромато-масс-спектрометрия). На основе такого сочетания был создан принципиально новый метод анализа трудноразделяемых смесей — масс-фрагментография. Суть метода заключается в том, что масс-спектрометр используется как высокочувствительный детектор к газовому хроматографу. Основное достоинство масс-фрагментографии — чрезвычайно большая чувствительность, достигающая нескольких пикограммов (1 пг= 10-12 г). Это в 1000-10 000 раз выше, чему ГЖХ. Высокая специфичность позволяет анализировать неразделенные компоненты этих смесей, а высокая чувствительность дает возможность определять метаболиты ЛВ, применяемых в очень малых терапевтических дозах.

Большие возможности в биофармацевтическом анализе открывает применение радиоактивных изотопов. В последние голы стали применять стабильные изотопы, абсолютно безвредные для живого организма в количествах, необходимых для эксперимента. Стабильные изотопы можно долго хранить, так как они в отличие от радиоактивных изотопов не распадаются. Радиохимические методы отличаются высокой чувствительностью и в сочетании с хроматографией дают возможность выявить все вещества с радиоактивной меткой. Использование меченых молекул позволяет установить распределение и локализацию введенного JIB и метаболитов во всех системах организма с большой специфичностью и чувствительностью. В результате можно получить четкое представление о процессе транспорта и выведения из организма этих веществ.

Для определения малых концентраций ЛВ и их метаболитов в биологических жидкостях (крови, моче, тканях), а также для изучения метаболизма и проведения фармакокинетических исследований применяют иммунохимические методы. Они основаны на высокочувствительной и специфичной реакции антител с гаптенами (соответствующими низкомолекулярными биологически активными соединениями) и на способности гаптена, содержащего специально введенную метку, конкурировать за активный центр антитела.