

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СУБСТАНЦИИ ДАРУНАВИРА ЭТАНОЛАТА

С.А. Золотов

директор по производству и разработкам лекарственных препаратов и активных фармацевтических субстанций,
ООО «АМЕДАРТ» (Москва)

E-mail: duim50@gmail.com

Н.Б. Демина

д. фарм.н., профессор, кафедра фармацевтической технологии, Институт фармации,
ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

E-mail: nbd217@mail.ru

А.С. Золотова

к. фарм.н., руководитель лаборатории технологий лекарственных препаратов,
ООО «Фарм-Синтез Лаб» (Москва)

E-mail: max_in_a@mail.ru

Цель работы – изучение физико-химических свойств дарунавира этанолата для разработки схемы синтеза фармацевтической субстанции и создания отечественной инновационной лекарственной формы. Использованы методы: дифференциальная сканирующая калориметрия, потенциометрическое титрование, высокоэффективная жидкостная хроматография, капиллярный метод определения температуры плавления. Определены: температура плавления, растворимость в водных растворах и органических растворителях, коэффициент распределения, кажущийся коэффициент распределения и константа диссоциации. Установлено, что субстанция плохо растворима в водных растворах в диапазоне pH от 1 до 12, растворима в ряде органических растворителей. Коэффициент распределения в системе растворителей «октанол-1 / фосфатный буферный раствор pH 7,0» составил 292, кажущийся коэффициент распределения в системе растворителей «октанол / 0,1 N раствор хлористоводородной кислоты» – 30,9. Константа диссоциации составила 2,02. Температура плавления – в диапазоне от 74 до 78 °С. Экспериментально показано, что субстанция дарунавира этанолата – липофильная, основным местом ее всасывания при пероральном приеме – кишечник. Для повышения эффективности субстанции перспективно применение технологий, направленных на повышение растворимости в водных средах.

Ключевые слова: дарунавир, растворимость, константа диссоциации, фармацевтическая разработка.

Для цитирования: Золотов С.А., Демина Н.Б., Золотова А.С. Изучение физико-химических свойств субстанции дарунавира этанолата. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(6):30–35.
<https://doi.org/10.29296/25877313-2019-06-05>

Одним из востребованных препаратов в терапии ВИЧ является дарунавир – ингибитор димеризации и каталитической активности протеазы ВИЧ 1-го типа. Препараты дарунавира используются в терапии ВИЧ как индивидуально, так и в комплексе с другими препаратами. По данным [1] дарунавир при приеме вместе с ритонавиром обладает биодоступностью в 82%, как монопродукт – 37%. Несомненно, при разработке инновационной лекарственной формы дарунавира повышение биодоступности субстанции является приоритетной задачей.

Детальное изучение физико-химических свойств активных субстанций, таких как молекулярная масса, липофильность, растворимость в водных средах, органических растворителях, температура плавления, константа ионизации и др., в

настоящее время является неотъемлемым этапом любой фармацевтической разработки [2]. Полученные данные используются как для дальнейших схем синтеза субстанции, так и для обоснования лекарственной формы и условий ее получения, а также «для выявления критических характеристик исходных материалов, влияющих на качество готового продукта» [3]. К сожалению, несмотря на высокую актуальность дарунавира, его физико-химические свойства недостаточно освещены в научных публикациях.

Цель работы – изучение физико-химических свойств дарунавира этанолата (ДЭ) для разработки схемы синтеза фармацевтической субстанции и создания инновационной лекарственной формы для производства на территории Российской Федерации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил дарунавира этанолат Mylan Laboratories Limited (Индия), серия № 22128670.

В работе использовали: искусственный желудочный сок (Gastric fluid, simulated Sigma, G8285), искусственный кишечный сок (Simulated Intestinal Fluid with out Enzyme, Sigma-Aldrich, 53757), растворы хлористоводородной кислоты и буферные растворы, приготовленные в соответствии с ГФ XIV.

Температуру плавления определяли капиллярным методом в соответствии с ОФС.1.2.1.0011.15.

Термические свойства образцов ДЭ изучали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на приборе Q20PTA Instruments (США). Измерения проводили в атмосфере воздуха при скорости нагрева 10 °С/мин. Температура нагревания – до 160 °С. Подготовка пробы: точную навеску ДЭ от 2 до 8 мг помещали в платиновый тигель, закрывали крышкой без отверстия и прессовали. Второй тигель оставался пустым. Константу диссоциации pK_a определяли на титраторе ExcellenceT5 Mettler Toledo при 25 °С методом потенциометрического титрования $2,5 \cdot 10^{-4}$ M водного раствора ДЭ $1 \cdot 10^{-6}$ M раствором NaOH.

Растворимость оценивали по концентрации насыщенного раствора, который получали растворением избытка субстанции в растворителе при 20 °С, в течение 24 ч при перемешивании на маг-

нитной мешалке при скорости перемешивания 100 об/мин. Пробу пропускали через тefлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Концентрацию ДЭ в растворе определяли методом ВЭЖХ [4], используя стандарт ДЭ от компании Mylan Laboratories Limited.

При определении коэффициентов распределения в микропробирки типа Эппендорф вносили по 3 мл насыщенного раствора ДЭ в октаноле-1, добавляли по 3 мл насыщенного раствора ДЭ в фосфатном буфере pH 7,0, или в 0,01 N растворе хлористоводородной кислоты, или в 0,1 N растворе хлористоводородной кислоты. Пробирки перемешивали при комнатной температуре в течение 90 мин при скорости 300 колебаний в минуту на смесителе Вортекс, после чего пробы центрифугировали в течение 20 мин при скорости 13000 об/мин.

Концентрацию ДЭ в октаноле-1 определяли методом нормально фазовой ВЭЖХ на приборе MALDI-7090 Shimadzu (Япония). Условия анализа: колонка Luna NH₂ 250×4,6 мм, подвижная фаза хлороформ/метанол 60/40, давление – 140 бар, скорость потока – 0,7 мл/мин, молекулярная масса для детектирования – 593 а.е.м., время анализа – 12 мин, время выхода пика ДЭ между четвертой и пятой минутами анализа. Концентрацию дарунавира в водной фазе определяли согласно методике [4].

Обработка и систематизация результатов осуществлена с применением современных математических методов и программного обеспечения Microsoft Office Excel 2016 в среде MS Windows 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дарунавира этанолат – белый с кремовым оттенком порошок, его формула приведена на рис. 1.

Температура плавления. Определенная капиллярным методом по ОФС.1.2.1.0011.15. температура плавления ДЭ находится в диапазоне 74–78 °С. Результаты ДСК подтвердили эти данные (рис. 2), температура начала процесса эндотермического перехода – 72 °С, окончания – 80,5 °С, минимум эндотермического пика наблюдается при температуре 78,19 °С. Оказалось, что температура плавления ДЭ соответствует температуре кипения этилового спирта. Поэтому использование в ходе технологической переработки субстанции циклов плавление-кристаллизация может привести к изменению структуры молекулы, которое, в свою очередь, может повлечь изменение других свойств – биодоступности, стабильности, растворимости и др.

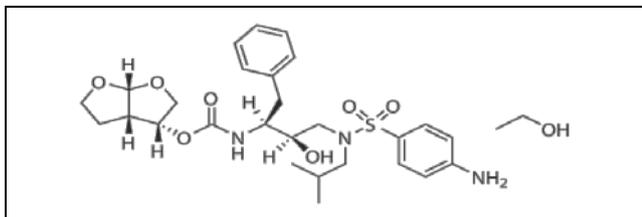


Рис. 1. Структурная формула молекулы ДЭ

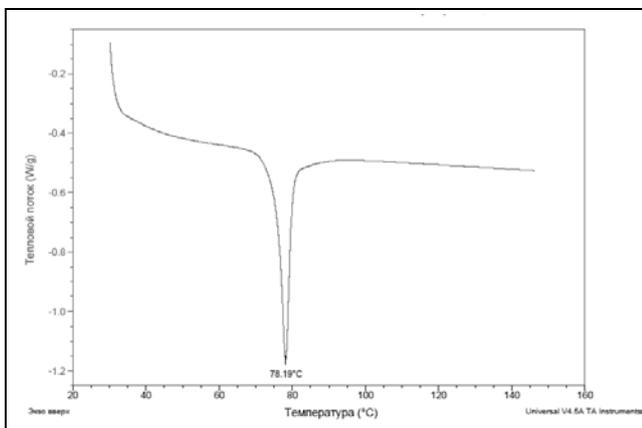


Рис. 2. ДСК-кривая образца ДЭ

Таблица 1. Растворимость ДЭ в водных средах с рН от 1.0 до 12.0

Растворитель	Растворимость в г/100 мл	рН раствора	Интерпретация растворимости по ГФ
Вода	0,015	7,6	Очень малорастворим
0,1 Н НСl	0,096	1,1	Очень малорастворим
0,08 Н НСl	0,082	1,2	Очень малорастворим
0,01 Н НСl	0,025	2,0	Очень малорастворим
Цитратный буферный раствор	0,013	5,0	Очень малорастворим
Фосфатный буферный раствор	0,015	7,0	Очень малорастворим
Фосфатный буферный раствор	0,016	9,0	Очень малорастворим
Фосфатный буферный раствор	0,014	12,0	Очень малорастворим
Искусственный желудочный сок	0,083	1,1	Очень малорастворим
Искусственный кишечный сок	0,016	7,4	Очень малорастворим

Таблица 2. Растворимость ДЭ в органических растворителях

Растворитель	Растворимость г/100 мл раствора	Интерпретация растворимости по ГФ
Метанол	3,0	Малорастворим
Этанол	0,35	Малорастворим
Пропанол-2	0,092	Очень малорастворим
Дихлорметан	32	Легко растворим
Пропанон-2	23	Легко растворим
Этилацетат	13	Легко растворим
1,1-Оксибисэтан	0,10	Умеренно растворим
Гексан	< 0,001	Практически не растворим
Октанол-1	4,38	Малорастворим
Метилбензол	0,30	Умеренно растворим
N,N-Диметилформамид	> 50	Очень легко растворим
Тетрагидрофуран	27	Легко растворим
4-Метил-2-пентанон	13	Легко растворим
Пропиленгликоль	1,4	Малорастворим
Полиэтиленгликоль 400	20	Легко растворим
Сульфинилбисметан	43	Легко растворим
Бутанон-2	20	Легко растворим
Ацетонитрил	35	Легко растворим
1-Метокси-2-пропанол	15	Легко растворим
N,N-Диметилацетамид	> 50	Очень легко растворим

Растворимость. Это одна из важнейших характеристик фармацевтической субстанции, которая, как известно, непосредственно связана с биодоступностью и особенно актуальна для субстанций II/IV класса по Биофармацевтической классификационной системе (БКС) [5]. В табл. 1 представлены усредненные результаты изучения растворимости субстанции ДЭ в водных средах с широким диапазоном pH.

Результаты табл. 1 свидетельствуют о том, что ДЭ, очень малорастворим в водных растворах. Растворимость соединения незначительно повышается со снижением pH, но тем не менее вещество остается очень малорастворимым в водных растворах в диапазоне pH от 1 до 12. Полученные данные согласуются с [6], где утверждается что ДЭ относится ко II классу БКС, а, следовательно, обладает низкой растворимостью в физиологических средах, что может быть одной из причин низкой биодоступности субстанции.

Усредненные результаты определения растворимости ДЭ в органические растворителях приведена в табл. 2.

Результаты табл. 2 показывают, что растворимость ДЭ в органических растворителях различная. Так субстанция практически не растворима в гексане, очень малорастворима в пропаноле-2, малорастворима в часто используемых в фармацевтической технологии этиловом спирте, пропиленгликоле. В то же время в большинстве органических растворителей ДЭ легко растворим.

Липофильность фармацевтической субстанции имеет принципиальное значение, так как во многом определяет поведение молекулы в организме, его абсорбцию и фармакокинетику.

Усредненные результаты определения коэффициента распределения P и кажущегося коэффициента распределения R, установленные в системах «октанол-1/водный раствор» представлены в табл. 3.

Таблица 3. Коэффициент распределения P и кажущийся коэффициент распределения R ДЭ в системе растворителей «октанол-1/водный раствор»

Водный раствор в системе растворителей	Коэффициенты P/ R	LogP/ R	pH раствора
Фосфатный буферный раствор	P 292	2,47	7,0
0,01 Н HCl	R 149	2,17	2,0
0,08 Н HCl	R 53,4	1,72	1,2
0,1 Н HCl	R 30,9	1,49	1,1

Результаты табл. 3 согласуются с данными по растворимости, приведенными в табл. 1 и 2. Дарунавира этанолат является липофильным веществом с относительно высоким коэффициентом распределения (K_p) – 292. Кажущийся K_p , отражающий поведение молекулы в относительно ионизированной форме, ниже и составил 30,9 в 0,1 Н растворе хлористоводородной кислоты. При разбавлении водного раствора до 0,01 Н концентрации R увеличился до 149.

Константа диссоциации (pK_a). Знание этой характеристики в каждом случае помогает понять ионную форму, которую молекула будет принимать в диапазоне значений pH. Это особенно важно при пероральном приеме лекарственного средства, когда состояние ионизации будет влиять на скорость абсорбции в том или ином участке желудочно-кишечного тракта. Значение pK_a активной субстанции связано с ее липофильностью, раство-

римостью, проницаемостью, что, в свою очередь, напрямую влияет на фармакокинетические характеристики, такие как абсорбция, распределение, метаболизм и выведение. Поэтому измерение pK_a фармацевтических субстанций регламентируется FDA [7].

Константа диссоциации ДЭ, установленная в ходе потенциометрического титрования, составляет 2,02. Рассчитанная согласно [8] по величине pK_a степень ионизации ДЭ, являющегося слабым основанием, в среде со значением pH 1,2 превысила 90%, а в среде с pH 4,8 составила 0,25%. Таким образом, основным местом всасывания субстанции при пероральном приеме будет кишечник.

ВЫВОДЫ

Субстанция ДЭ – липофильная, плохо растворима в водных растворах, растворима в большинстве органических растворителей. Высоко-

температурные условия технологической переработки субстанции могут быть связаны с изменением ее свойств и будут нуждаться в тщательном обосновании. Для повышения эффективности субстанции перспективно применение технологий, направленных на повышение ее растворимости в водных средах.

ЛИТЕРАТУРА

1. EMA/669488/2014 Corr. 1 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Assessment report Rezolsta International non-proprietary name: darunavir/ cobicistat Procedure No. EMEA/H/C/002819/0000 September 2014.
2. ICH Q8(R2). PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT // Current Step 4 version.- August 2009.
3. *Dr. Fei Mao, Qingya Kong, Wei Ni, Xiang Xu, Dazheng Ling, Zhengyu Lu, Prof. Jian Li.* Melting Point Distribution Analysis of Globally Approved and Discontinued Drugs: A Research for Improving the Chance of Success of Drug Design and Discovery // Chemistry Open. 2016 Aug; 5(4): 357–368.
4. *Reddy B.V., Jyothi G., Reddy B.S., Raman N.V., Reddy K.S., Rambabu C.* Stability-indicating HPLC method for the determination of darunavir ethanolate // 2013 May-Jun; 51(5):471–476.
5. *Демина Н.Б.* Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 2. С. 12–17.
6. *Chaves Ruela Correa J., D'Arcy D.M., dos Reis C.H., Nunes Salgado S.H.R.* Darunavir: A Critical review of its properties, use and drug interactions // Pharmacology. 2012; 90:102–109.
7. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 N 78 (ред. от 14.06.2018) «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Приложение № 14 с. 10
8. *Альберт А.* Избирательная токсичность. Физико-химические основы терапии / Пер. с англ. В 2 томах. Т. 2. М.: Медицина, 1989. 432 с.

Поступила 24 апреля 2019 г.

THE STUDY OF THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF THE SUBSTANCE DARUNAVIR ETHANOLATE

© Authors, 2019

S.A. Zolotov

Director for the Production and Development of Drugs and Active Pharmaceutical Substances LLC «AMEDART» (Moscow)

E-mail: duim50@gmail.com

N.B. Demina

Dr.Sc. (Pharm.), Professor, Department of Pharmaceutical Technology Institute of Pharmacy, Sechenov First Moscow State Medical University

E-mail: nbd217@mail.ru

A.S. Zolotova

Ph.D. (Pharm.), Head of the Laboratory of Drug Technology LLC «Farm-Sintez Lab» (Moscow)

E-mail: max_in_a@mail.ru

The aim of the work was to study the physicochemical properties of darunavir ethanolate for the development of a scheme for the synthesis of a pharmaceutical substance and the creation of a domestic innovative dosage form. The following methods were used: differential scanning calorimetry, potentiometric titration, highly efficient liquid chromatography, capillary method for determining the melting point. The following parameters were determined: melting point, solubility in aqueous solutions and organic solvents, distribution coefficient, apparent distribution coefficient and dissociation constant.

It is established that the substance is poorly soluble in aqueous solutions in the pH range from 1 to 12, soluble in a number of organic solvents. The distribution coefficient in the solvent system octanol 1 / phosphate buffer solution pH 7.0 was 292, the apparent distribution coefficient in the solvent system octanol / 0.1 N hydrochloric acid solution – 30.9. The dissociation constant was 2.02, the melting point is in the range from 74 to 78 °C. The obtained results were processed using Microsoft Office Excel 2016 software in MS Windows 7 environment.

It was experimentally shown that the substance of darunavir ethanolate is lipophilic, the main site of its absorption by oral administration will be the intestine. To increase the effectiveness of the substance, the application of technologies aimed at increasing the solubility in aqueous media is promising.

The article presents the results of the study of the physicochemical properties of the substance darunavir ethanolate antiretroviral action.

Key words: *darunavir, solubility, dissociation constant, pharmaceutical development.*

For citation: Zolotov S.A., Demina N.B., Zolotova A.S. The study of the physico-chemical properties of the substance darunavir ethanolate. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(6):30–35. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-06-05>

REFERENCES

1. EMA/669488/2014 Corr. 1 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Assessment report Rezolsta International non-proprietary name: darunavir/ cobicistat Procedure No. EMEA/H/C/002819/0000 September 2014.
2. ICH Q8(R2). PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT // Current Step 4 version.- August 2009.
3. Dr. Fei Mao, Qingya Kong, Wei Ni, Xiang Xu, Dazheng Ling, Zhengyu Lu, Prof. Jian Li. Melting Point Distribution Analysis of Globally Approved and Discontinued Drugs: A Research for Improving the Chance of Success of Drug Design and Discovery // Chemistry Open. 2016 Aug; 5(4): 357–368.
4. Reddy B.V., Jyothi G., Reddy B.S., Raman N.V., Reddy K.S., Rambabu C. Stability-indicating HPLC method for the determination of darunavir ethanolate // 2013 May-Jun; 51(5):471–476.
5. Demina N.B. Biofarmaceuticheskaya klassifikatsionnaya sistema kak instrument razrabotki dizajna i tekhnologii lekarstvennoj formy // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. 2017. № 2. S. 12–17.
6. Chaves Ruela Correa J., D'Arcy D.M., dos Reis C.H., Nunes Salgado S.H.R. Darunavir: A Critical review of its properties, use and drug interactions // Pharmacology. 2012; 90:102–109.
7. Reshenie Soveta Evrazijskoj ekonomicheskoy komissii ot 03.11.2016 N 78 (red. ot 14.06.2018) «O Pravilakh registratsii i kspertizy lekarstvennykh sredstv dlya mediczinskogo primeneniya». Prilozhenie №14 s. 10
8. Al`bert A. Izbiratel`naya toksichnost`. Fiziko-khimicheskie osnovy terapii / Per. s angl. V 2 tomakh. T. 2. M.: Mediczina, 1989. 432 s.

Читайте в следующих номерах

Н.А. Поляков, В.И. Осипов, В.А. Быков

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОСНОВНЫХ КЛАССОВ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КОРНЯХ И КОРНЕВИЩАХ *POTENTILLA ALBA*, *POTENTILLA RECTA* И *POTENTILLA ANSERINA*

Ф.М. Хазиева, И.Н. Коротких, В.И. Осипов

СОСТАВ ЭФИРНОГО МАСЛА СОРТОВ ДУШИЦЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*ORIGANUM VULGARE* L.) ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИЛАР

Т.В. Антипова, В.П. Желифонова, А.Г. Козловский

МЕТАБОЛОМИКА ГРИБОВ РОДА *PENICILLIUM*

**А.А. Лигачёва, Я.Е. Решетов, Е.Ю. Авдеева, М.Г. Данилец,
Е.С. Трофимова, Е.Ю. Шерстобоев, М.В. Белоусов**

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ НА СОСТАВ ПОЛИСАХАРИДОВ *SAUSSUREA CONTROVERSA* DC. И ИХ НО-СТИМУЛИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ