

УДК 577.3

МЕТОД МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ ИНВЕРСИОННОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ ПРИ АНАЛИЗЕ ДЖЕНЕРИКОВ ПРОТИВОГЛАУКОМНОГО ПРЕПАРАТА БЕТОПТИК

© 2019 г. Л.М. Балашова*, **, И.И. Колесниченко***, В.А. Намиот****,
А.Н. Доронин***, Н.А. Бакунина*, Ю.Д. Кузнецова*, **, С.Н. Удальцов*****

*НП Международный научно-практический Центр пролиферации тканей, 119034, Москва, ул. Пречистенка, 29/14

**Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ,
117997, Москва, ул. Островитянова, 1

***Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН,
119071, Москва, Ленинский просп., 31/4

****Институт ядерной физики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, 1

*****Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 2

E-mail: vnamiot@gmail.com

Поступила в редакцию 16.05.2019 г.

После доработки 16.05.2019 г.

Принята к публикации 08.07.2019 г.

Новым электрохимическим методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии изучена возможность определения в слезной жидкости дженериков препарата бетоптик — ксонефа, бетоптана, беталинка ЕС. Измерения проводили на планарном электроде, имеющем трехэлектродную конструкцию. Показано, что этот метод эффективен для определения дженериков. Рассмотрена динамика изменения их концентрации во времени. Показано, что после инстилляций дженериков у больных глаукомой их концентрация в слезной жидкости не меняется в течение 12 ч. Расширен перечень органических веществ, которые можно определять методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии.

Ключевые слова: мультисенсорная инверсионная вольтамперометрия, планарные электроды, дженерики.

DOI: 10.1134/S0006302919060061

Глаукома — одна из наиболее тяжелых форм офтальмопатологии, занимающая лидирующее место после катаракты среди причин слепоты и слабовидения населения Земли. В Российской Федерации в нозологической структуре слепоты и слабовидения доля глаукомы составляет 29%. Распространенность глаукомы среди населения России за последние годы выросла в 2,8 раза [1]. Глаукома занимает первое место в структуре первичной инвалидности по зрению в большинстве регионов Российской Федерации.

Основное действие большинства противоглаукомных препаратов связано со снижением внутриглазного давления. Одним из широко применяемых для снижения внутриглазного давления в качестве монотерапии или в сочетании с другими препаратами является бетоптик (бетаксолол). Его химическое название — (2RS)-3-(2-пропопиламино)-1-[4-[2-(циклопропилметокси)этил]фенок-

си]-пропан-2-ола гидрохлорид, фармакотерапевтическая группа — противоглаукомное средство, селективный бета-1-адреноблокатор. Фармакологическое действие препарата — бетаксолол-селективный бета-1-адреноблокатор без внутренней симпатомиметрической активности, не обладающий мембраностабилизирующим (местноанестезирующим) действием. При местном применении бетаксолол снижает как повышенное, так и нормальное внутриглазное давление вследствие уменьшения продукции внутриглазной жидкости. Наступление гипотензивного эффекта наблюдается через 30 мин после закапывания, а максимальное снижение офтальмотонуса по инструкции по применению препарата наступает примерно через два часа. После однократной инстилляции влияние на офтальмотонус сохраняется в течение 12 часов. Бетаксолол, по сравнению с другими бета-адреноблокаторами, не вызывает снижения кровообра-

ка в зрительном нерве. Он также не вызывает миоза, спазма аккомодации, гемералогии, эффекта «пелены» перед глазами (в отличие от миотиков). Фармокинетика препарата: бетаксолол высоко липофилен, в результате чего хорошо проникает через роговицу в переднюю камеру. Максимальная концентрация в передней камере определяется через 20 мин после инстилляций. При местном применении системная абсорбция низкая, концентрация в плазме ниже порога обнаружения (2 нг/мл). Выведение осуществляется преимущественно через почки.

Популярность бетоптика привела к появлению ряда его дженериков. К достоинствам дженериков можно отнести низкую стоимость (за счет отсутствия затрат на разработку, клинические испытания и лицензионные выплаты), а также уже существующие результаты клинических испытаний и накопленный опыт практического применения лекарственного средства (действующего вещества) в виде оригинального препарата, который дженерик копирует. Несмотря на то что это не оригинальные препараты, к ним также предъявляются свои требования: должно соблюдаться соотношение активных фармацевтических веществ в препарате, их качественный и количественный показатель. Необходимо, чтобы дженерик соответствовал требованиям установленных стандартов. Производиться он должен в условиях надлежащей производственной практики. Дженерик должен быть эквивалентен оригиналу по степени и скорости всасывания. Часто у одного и того же препарата имеется несколько аналогов, но только выпущенные разными фирмами. Поэтому состав, а значит, и эффективность их могут отличаться. К тому же не все производители соблюдают условия по выпуску дженериков [2].

В Институте физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН был разработан один из вариантов электрохимических методов анализа органических веществ — метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии. Этим методом определяется изменение электрохимической активности катионов металлов в растворе в результате их взаимодействия с органическими веществами [3,4]. В раствор 0,05 М KCl вводятся катионы металлов (тест-система), обладающие способностью образовывать комплексные соединения с органическими веществами. Этим металлам соответствуют пики токов растворения на вольтамперограммах. При введении пробы с анализируемым веществом в раствор тест-системы катионы металлов взаимодействуют с органическими соединениями, при этом на инверсионной вольтамперограмме фиксируется их влияние на токи растворения металлов. Эти изменения определяются для каждого из металлов тест-системы или же интегрально

оценивается изменение всей вольтамперограммы. Измерения проводятся на одном индикаторном электроде, что имеет большое преимущество по сравнению с мультисенсорными методами, использующими набор электродов. При решении задачи идентификации органических веществ метод позволяет проводить их определение с помощью предварительно составленной базы данных.

Эффективность метода была показана при определении ряда офтальмологических препаратов — визомитина, бетоптика и ланомакса [5–7]. По калибровочной зависимости определяли концентрацию визомитина в слезной жидкости. Методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии была исследована динамика изменения в слезной жидкости концентрации визомитина во времени и показано, что через два часа его концентрация существенно уменьшилась. Аналогичным образом исследовали возможное изменение концентрации бетоптика в слезной жидкости, было показано, что его концентрация через 12 ч после инстилляций не меняется.

Цель работы — с помощью мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии исследовать фармакинетiku дженериков бетоптика — ксонефа, бетофтана и беталмика ЕС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовали изменение концентрации в слезной жидкости после инстилляций следующих препаратов-дженериков бетоптика — ксонефа (Sentiss Pharma Pvt. Ltd., Индия), бетофтана (ROMPHARM Company, Румыния) и беталмика ЕС (Unimed Pharma, Словацкая Республика). В табл. 1 приведен состав этих препаратов в сравнении с составом оригинального бетоптика (Alcon-Couvreur N.V., Бельгия).

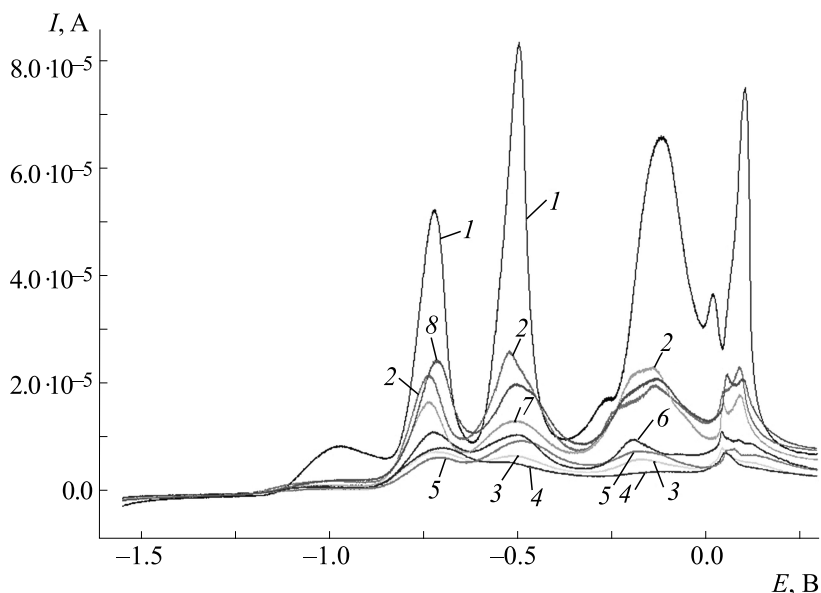
Как видно из табл. 1, препарат бетоптик имеет гораздо более сложный набор вспомогательных веществ, хотя концентрация активного вещества у всех препаратов одинакова (0,5 мг бетаксолола гидрохлорида).

Для проведения испытаний на планарные электроды производства ООО НПП «Автоком» (Москва) наносили 50 мкл тест-системы, состоящей из 0,05 М KCl и набора катионов металлов (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+}) в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М для каждого катиона, затем снимали инверсионную вольтамперограмму при потенциале катодного осаждения металлов $-1,55$ В относительно хлорсеребряного электрода с последующей разверткой в анодную сторону до значения потенциала 0,3 В. Полученная вольтамперограмма являлась фоновой (рис. 1, кривая 1).

Далее фильтровальной бумагой с поверхности электрода удаляли тест-систему. Затем для изуче-

Таблица 1. Состав оригинального препарата «Бетоптик» и его дженериков лозы

№	Препарат	Основной состав 1 мл препарата
1	Бетоптик (Бельгия)	<i>Активные вещества:</i> бетаксолола гидрохлорид — 5 мг <i>Вспомогательные вещества:</i> бензалкония хлорид — 0,1 мг, полистиренсульфониевая кислота — 2,5 мг, карбомер 974Р — 4,5 мг, борная кислота — 4,0 мг, маннитол — 45,0 мг, динатрия эдетат — 0,1мг, N-лаурилсаркозин — 0,3 мг, натрия гидрохлорид, вода очищенная — до 1,0 мл
2	Ксонеф (Индия)	<i>Активные вещества:</i> бетаксолола гидрохлорид — 5 мг <i>Вспомогательные вещества:</i> бензалкония хлорид — 0,1 мг, гипромеллоза — 2,0 мг, натрия гидрохлорид — 8,0мг, натрия гидроксид — 0,5 мг, динатрия эдетат — 1,0 мг, вода очищенная — до 1,0 мл
3	Бетофган (Румыния)	<i>Активные вещества:</i> бетаксолола гидрохлорид — 5 мг <i>Вспомогательные вещества:</i> натрия гидрофосфата додекагидрат, натрия дигидрофосфата моногидрит, натрия хлорид, динатрия эдатат дигидрат, бензалкония хлорид, вода очищенная
4	Беталмик ЕС (Словацкая Республика)	<i>Активные вещества:</i> бетаксолола гидрохлорид — 5 мг <i>Вспомогательные вещества:</i> натрия хлорид, динатрия эдатат, бензалкония хлорид, натрия гидроксид, вода очищенная

**Рис. 1.** Инверсионные вольтамперограммы тест-системы с бетофганом в различных концентрациях: 1 — тест-система; 2 — слезная жидкость здоровых людей; 3 — $4 \cdot 10^{-3}$ % бетофтана; 4 — $3 \cdot 10^{-3}$ % бетофтана; 5 — $2 \cdot 10^{-3}$ % бетофтана; 6 — $1 \cdot 10^{-3}$ % бетофтана; 7 — $0,5 \cdot 10^{-3}$ % бетофтана; 8 — $0,1 \cdot 10^{-3}$ % бетофтана.

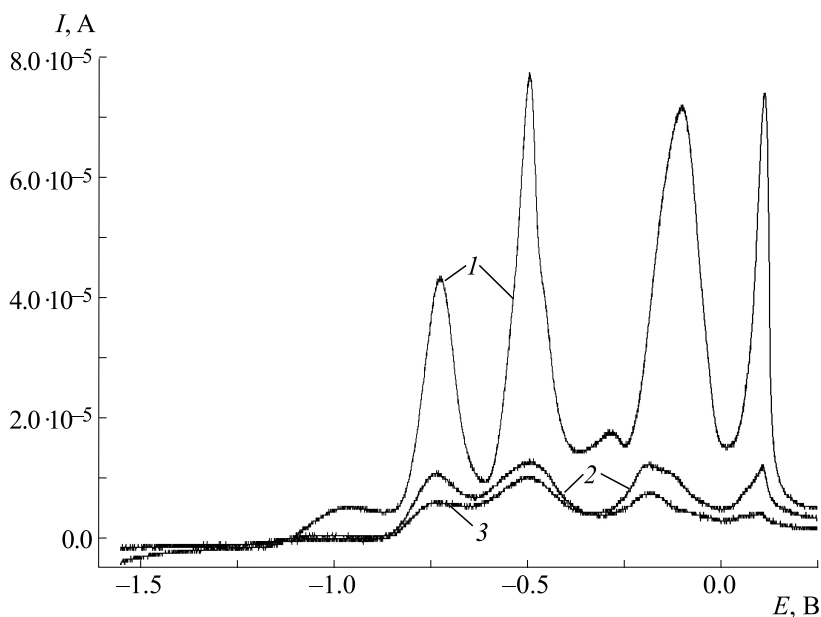


Рис. 2. Инверсионные вольтамперограммы, показывающие влияние слезной жидкости и бетофтана на тест-систему: 1 – тест-система, 2 – слезная жидкость, 3 – слезная жидкость после инстилляций бетофтана.

ния влияния дженериков на тест-систему на электрод помещали 50 мкл свежего раствора тест-системы и диск из пористого материала (фильтровальной бумаги) с нанесенным на него препаратом дженерика в необходимой концентрации и снова снимали инверсионную вольтамперограмму.

Для изучения влияния на тест-систему слезной жидкости в конъюнктивальный мешок глаза помещали диск диаметром 8 мм из предварительно обработанного пористого материала (фильтровальной бумаги, которую предварительно тщательно промывали в спирте и дистиллированной воде и сушили при температуре 80°C в течение трех часов). Затем на электрод вновь наносили 50 мкл тест-системы и помещали бумажный диск со слезной жидкостью, извлеченный из конъюнктивного мешка. Инверсионную вольтамперограмму слезной жидкости снимали при тех же условиях, что и фоновую.

При изучении влияния дженериков на слезную жидкость после их инстилляций раствор дженерика вносили в конъюнктивальный мешок глаза и туда же помещали диск из фильтровальной бумаги. Через определенное время бумажный диск извлекали из конъюнктивного мешка и помещали на электрод с нанесенной на него тест-системой. Измерения проводили через 30 мин, 1 ч и далее через каждый час в течение 12 ч после инстилляций препарата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние бетофтана в разной концентрации на тест-систему. На рис. 1 представлены инверсионные вольтамперограммы, снятые при воздействии на тест-систему препарата бетофтана в различных концентрациях.

Видно, что с увеличением концентрации препарата уменьшаются токи свинца – от 19 мкА до 12 мкА ($\varphi = -0,53$ В) и кадмия – от 20 мкА до 11 мкА ($\varphi = -0,75$ В). При этом токи цинка, кобальта и ртути практически не изменяются.

Аналогичное влияние на тест-систему продемонстрировали и другие дженерики с тем же содержанием активного вещества (бетаксолола гидрохлорид, 5 мг) – ксонеф и беталмик ЕС.

Таким образом, показано, что метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии может быть использован при определении концентрации дженериков в тест-системе.

Влияние слезной жидкости здоровых людей на тест-систему. После регистрации вышеуказанным методом фоновой инверсионной вольтамперограммы (рис. 2, кривая 1) в тех же условиях снимали вольтамперограмму слезной жидкости. На рис. 2 (кривая 2) показана соответствующая усредненная вольтамперограмма слезной жидкости, полученная от десяти здоровых людей. Индивидуальный разброс вольтамперограмм составлял 12%.

Содержание бетофтана в слезной жидкости после инстилляций в зависимости от времени. Бетофтан по 1 капле вносили в конъюнктивальный ме-

Таблица 2. Влияние на тест-систему слезной жидкости после инстилляций бетоптика и его дженериков с одинаковой концентрацией активного вещества

Слезная жидкость	Пики токов растворения металлов, мкА					
	Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Здоровые люди	1,6	14,6	14,0	13,2	13,0	12,8
Больные глаукомой после инстилляций бетоптика	1,6	11,2	12,4	10,0	5,6	4,6
Больные глаукомой после инстилляций бетофтана	2	10	13	7,1	6,1	5,5
Больные глаукомой после инстилляций ксонефа	2	9,5	11,5	10,4	5,0	4,2
Больные глаукомой после инстилляций беталмика ЕС	2	11	12	9,5	6,0	5

Примечание. Вольтамперограммы слезной жидкости были измерены через 12 ч после инстилляций препаратов.

шок глаза и туда же помещали диск диаметром 8 мм из фильтровальной бумаги. Через заданное время бумажный диск извлекали из конъюнктивального мешка и помещали на электрод с нанесенной на него тест-системой. Измерения проводили через 30 мин, 1 ч и далее через каждый час в течение 12 ч после инстилляций препарата. Оказалось, что при времени воздействия бетофтана от 30 мин до 12 ч токи растворения металлов не изменяются. Соответствующая вольтамперограмма представлена на рис. 2 (кривая 3).

Из приведенных результатов измерений следует, что концентрация бетофтана в слезной жидкости в течение 12 ч не меняется. Следовательно, препарат достаточно устойчив во времени и через 12 ч после инстилляций продолжает оказывать действие на слезную жидкость, а также на роговицу глаза.

Аналогичным образом была изучена концентрация ксонефа и беталмика ЕС в слезной жидкости в зависимости от времени после инстилляций. В табл. 2 показано влияние на тест-систему бетоптика и трех его дженериков с одинаковой концентрацией активного вещества (бетаксолола гидрохлорид, 5 мг) через 12 ч после инстилляций.

Одинаковое влияние на тест-систему дженериков с одинаковой концентрацией активного вещества указывает на то, что на тест-систему в основном влияет именно бетаксолол, а не совокупность входящих в состав препаратов вспомогательных компонентов.

Следует отметить, что применение дженериков вызывало у испытуемых неприятные ощущение

при инстилляциях препаратов в виде жжения или пощипывания в области конъюнктивы.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что по сравнению с вольтамперограммой слезной жидкости здоровых людей влияние препаратов бетоптика, ксонефа, бетофтана и беталмика ЕС наблюдается в основном для ртути и кобальта — токи растворения этих металлов уменьшаются от 12 до 6 мкА для кобальта и от 12 до 5 мкА — для ртути.

2. Изученные препараты достаточно устойчивы во времени и через 12 ч после инстилляций продолжают оказывать действие на слезную жидкость.

3. Применение дженериков бетоптика (ксонефа, бетофтана и беталмика ЕС) вызывало незначительные неприятные ощущения при инстилляциях в виде жжения или пощипывания в области конъюнктивы.

4. Метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии позволяет анализировать в формате «Электронный язык» действие различных офтальмологических препаратов на слезную жидкость во времени.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием человека, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям.

От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. П. Нестеров, *Глаукома* (Медицинское информационное агенство, М., 2014).
2. И. Б. Бондарева, *Клин. фармакокинетика*, № 1(2), 7 (2005).
3. И. И. Колесниченко, А. Л. Ключев, В. М. Ганшин и др., *Физикохимия поверхности и защита материалов* **50** (4), 440 (2014).
4. Л. М. Балашова, И. И. Колесниченко и Е. П. Кантаржи, *Клин. геронтология* **23** (9–10), 6 (2017).
5. И. И. Колесниченко, Л. М. Балашова и Е. П. Кантаржи, *Клин. геронтология* **23** (9–10), 36 (2017).
6. И. И. Колесниченко, А. Н. Доронин, Е. П. Кантаржи и Л. М. Балашова, *Вестн. МГТУ им. Н.Э. Баумана. Сер. Естеств. науки*, № 2, 107 (2018).
7. Л. М. Балашова, В. А. Намиот, И. И. Колесниченко и др., *Биофизика* **63** (4), 825 (2018).

A Multisensory Stripping Voltammetry Method for Analysis of Generic Anti-Glaucoma Drug Betoptic

L.M. Balashova^{*, **}, I.I. Kolesnichenko^{***}, V.A. Namiot^{****},
A.N. Doronin^{***}, N.A. Bakunina^{*}, Yu.D. Kuznetsova^{*, **}, and S.N. Udaltsov^{****}

^{*}International Scientific and Practical Center for Tissue Proliferation, ul. Prechistenka 29/14, Moscow, 119034 Russia

^{**}Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

^{***}Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071

^{****}Institute of Nuclear Physics, Moscow State University, Leninskie gory 1, Moscow, 119991 Russia

^{*****}Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

A new electrochemical method of multisensory stripping voltammetry has been used to know if it is appropriate for determination of generic medications of the preparation Betoptic such as Xonef, Betoftan, Betalink EU in tear fluid. Measurements were carried out on a planar three-electrode interdigitated electrode. It has been shown that this method is effective for determination of generics. The dynamics of changes in their concentrations over time are examined. After instillation of generics in glaucoma patients, their concentrations in the lacrimal fluid remained unchanged within 12 hours. The list of organic substances, which can be determined by the method of multisensory stripping voltammetry, is extended.

Keywords: multisensory stripping voltammetry, planar electrodes, generics