

О.С. Калюжная, Л.С. Стрельников, О.П. Стрелец, Г.І. Кабачний

РОЗРОБКА СКЛАДУ І ТЕХНОЛОГІЇ СУПОЗИТОРІЇВ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ ВАГІНАЛЬНИХ ДИСБІОЗІВ

Національний фармацевтичний університет, м.Харків

Ключові слова: супозиторії, біфідобактерії, лактобактерії, ліпофільні основи, поверхнево-активні речовини.

Ключевы слова: суппозитории, бифидобактерии, лактобактерии, липофильные основы, поверхностно-активные вещества.

Key words: suppositoria, bifidobacteria, lactobacteria, lipophilic bases, surfactants.

При разработке состава суппозиториев с пробиотиками и активным компонентом исследовано влияние разных липофильных основ и типа поверхностно-активных веществ на высвобождение действующих веществ. Разработаны оптимальный состав и технология нового лекарственного средства – суппозиториев с пробиотическими культурами и активным веществом, способствующим усилению пробиотических свойств культур микроорганизмов.

Influence of various lipophilic bases and influence of type of surfactants on acting material release at a development of the composition of suppositories with probiotics was studied. Optimal composition and technology of the new medicinal preparation – suppositories with probiotics and active material were designed.

За даними ВООЗ інфекційно-запальні захворювання жіночої статеві сфери зустрічаються у 70 % жінок, хронічні форми яких важко піддаються лікуванню. Незважаючи на постійне поповнення арсеналу ефективних протиінфекційних лікарських засобів (ЛЗ), частота виникнення цієї групи захворювань не має тенденції до зниження [1]. В медичній практиці для лікування урогенітальних інфекцій широко застосовують антимікробні препарати, які мають велику кількість побічних ефектів та порушують, зокрема, склад нормофлори піхви [2]. У зв'язку з цим, особливого значення набуває створення нових комплексних препаратів для відновлення мікробіоценозу організму людини та одночасної профілактики і лікування урогенітальних хвороб.

МЕТОЮ наших **ДОСЛІДЖЕНЬ** було експериментальне обґрунтування і розробка складу та технології вагінальних супозиторіїв, що містять штами пробиотичних культур, для профілактики й лікування вагінальних дисбіозів різної етіології.

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами досліджень були зразки супозиторіїв з культурами лакто- та біфідобактерій, яким, за даними попередніх досліджень, притаманні високий рівень антагонізму, антибіотикорезистентність до великої кількості антимікробних та антигрибкових препаратів, що використовуються в комплексній терапії бактеріальних, грибкових, трихомонадних, хламідійних та різних змішаних урогенітальних інфекцій, бактеріоцинсинтезуючі властивості, достатній рівень адгезії [3, 4].

Для посилення антимікробних та антигрибкових властивостей лікарської форми до складу препарату вводили активну речовину (БАР), яка являє собою біологічно безпечний продукт для макроорганізму та не впливає на життєздатність клітин пробиотичних мікроорганізмів. Введення цього компоненту дозволяє зменшити лужність, що характерне для вагінальних дисбіозів, додатково посилити пробиотичну активність лакто- та біфідобактерій, знизити ризик росту дріжджеподібних грибів, що активізуються при місцевому застосуванні лактовмістних препаратів.

Супозиторії готували методом виливання, використовуючи ліпофільні основи: вітепсол W 35, твердий жир, супоцир NAS 50. Поліетиленоксидні основи не досліджували

через їх сильну гіперосмолярну дію: при контакті основи з біооб'єктом осмотичний тиск вирівнюється за рахунок абсорбції води із біооб'єкта, що призводить до його зневоднення, та супроводжується осмотичним шоком клітин мікроорганізмів та слизової оболонки людини. Це обмежує застосування ПЕО-основ, а в нашому випадку є не бажаним у зв'язку з використанням живих мікробних клітин.

Для виготовлення супозиторіїв використовували наступні поверхнево-активні речовини (ПАР) – твін-80, цетостеариловий спирт, емульгатор Т-2, емульгатор № 1, ланолін безводний в концентраціях 1 % – 5 %.

Для визначення можливості використання у складі лікарської форми живих мікроорганізмів та ПАР досліджували життєздатність клітин МКБ при сумісному культивуванні з допоміжними речовинами. Для вивчення впливу ПАР на змішану культуру пробиотичних штамів проводили культивування в рідкому поживному середовищі з послідовним додаванням досліджуваних емульгаторів. В якості контролю використовували змішану культуру МКБ без додавання ПАР.

Контроль числа життєздатних клітин (КЧО/мл) проводили за методом серійних розведень з послідовним висівом на густе живильне середовище [5]. Через 48 год здійснювали облік й інтерпретацію результатів.

Для проведення випробувань була здійснена наробка зразків супозиторіїв за розробленою нами технологією. Основними стадіями при виготовленні супозиторіїв є підготовка вихідних речовин, введення речовин в основу та гомогенізація, дозування супозиторної маси і формування супозиторіїв, фасування, пакування.

Активну речовину емульгували в кожному з досліджуваних ПАР, змішували з частиною основи, отримуючи концентрат. Після чого змішували концентрат з рештою основи. Попередньо зважену суху біомасу МКБ вводили до основи за типом суспензії. Для досягнення однорідності розподілу в супозиторній масі і точності дозування її додавали до основи при ретельному перемішуванні. Супозиторну масу дозували шляхом виливання у форми по 3 г, які попередньо охолоджували та змащували мильним спиртом. Супозиторії охолоджували до повного застигання (при температурі 3 ± 1 °С, після чого вилучали із форми та упакували.



Одним з етапів нашої роботи було проведення біофармацевтичних і мікробіологічних досліджень для встановлення раціонального складу супозиторіїв із досліджуваними речовинами.

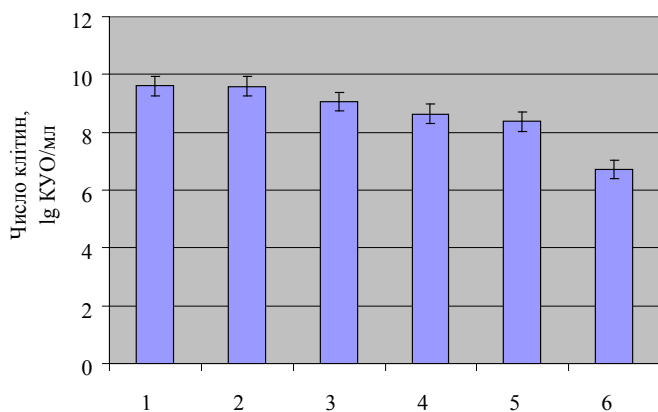
Біофармацевтичні дослідження з вивчення процесу вивільнення активної речовини із супозиторіїв різного складу проводили *in vitro* методом дифузії в агар, що ґрунтується на її здібності утворювати комплексні сполуки з 2, 6 - дихлорфеноліндофенолятом натрія [6]. У даному випадку діюча речовина із супозиторіїв дифундувала в агаровий шар і з реактивом утворювала зону, забарвлену від синього до малинового кольорів. Діаметр забарвленої зони для кожного зразка вимірювали через 1 год протягом 6 годин.

Кількість живих клітин у зразках супозиторіїв на різних основах визначали за методом серійних розведень з послідовним висівом на густе поживне середовище MRS. Дослідження проводили за умов попередньої емульгації зразків у фосфатному буфері рН 7,0 з емульгатором твіном-80 за допомогою скляних кульок при температурі 35-40 °С [7].

Усі досліди проводили в трьох повторах. Статистичну обробку здійснювали за традиційними методами варіаційної статистики. Середні арифметичні значення та їх довірчі інтервали визначали для рівня вірогідності 95 %.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дані дослідження сумісного культивування штамів лакто- та біфідобактерій з твіном-80, цетостеариловим спиртом, емульгатором Т-2, емульгатором № 1, ланоліном безводним наведені на *рис. 1*.



Примітка:

1 – контроль; 2 – твін-80; 3 – емульгатор Т-2;

4 – емульгатор № 1;

5 – ланолін безводний; 6 – цетостеариловий спирт.

Рис. 1. Залежність життєздатності змішаної культури штамів лакто- та біфідобактерій від виду ПАР

Найбільша кількість клітин спостерігалась при культивуванні мікроорганізмів з твіном-80 та в контролі та складала $(3,858 \pm 0,47) \cdot 10^9$ КУО/мл та $(3,992 \pm 0,342) \cdot 10^9$ КУО/мл, відповідно. Дещо нижчі були результати при культивуванні МКБ з емульгатором Т-2, емульгатором № 1, ланоліном безводним та складала $(1,175 \pm 0,538) \cdot 10^9$ КУО/мл, $(4,325 \pm 0,538) \cdot 10^8$ КУО/мл та $(2,367 \pm 0,072) \cdot 10^8$ КУО/мл, відповідно, а цетостеариловий спирт, затримав ріст пробіотичних штамів. Ці результати свідчать про можливість використання всіх вищеперелічених емульгаторів, окрім цетостеарилового спирту.

При виборі супозиторної основи керувались результатами досліджень, що були отримані при вивченні процесу вивільнення БАР за методом дифузії в агар та кількості живих клітин пробіотичних культур у зразках на різних основах.

За результатами, що наведені на *рис. 2*, бачимо, що кінетика вивільнення діючої речовини з досліджуваних основ відрізняється між собою. Так, через 1 год від початку досліді дифузія БАР з твердого жиру, супоциру, вітепсолу незначна – діаметри забарвлених зон складають 12,03 мм, 9,37 мм, 9,23 мм, відповідно. З часом дифузія діючої речовини збільшується. Найменше вивільнення характерне для вітепсолу – за 6 год досліді діаметр зони забарвлення дорівнює 19,03 мм. На останню годину проведення досліді дифузія з твердого жиру та супоциру приблизно однакова – діаметри забарвлених зон складають 22,47 мм та 22,40 мм, відповідно. Експериментальні дані також показали, що вивільнення БАР із супозиторіїв на основі твердого жиру відбувається повільно з поступовим зростанням, в той час як для зразків із супоциром характерне нерівномірне вивільнення – за перші 3 год діаметри забарвлених зон значно менші, ніж для зразків на твердому жирі. Слід зазначити, що для більш ефективної дії лікарської форми, що розроблюється, необхідно щоб діюча речовина дифундувала з супозиторної основи більш повно на початку введення. Це забезпечить зниження лужності, яке характерне для вагінальних дисбіозів, та буде сприяти швидшій активації клітин пробіотичних штамів.

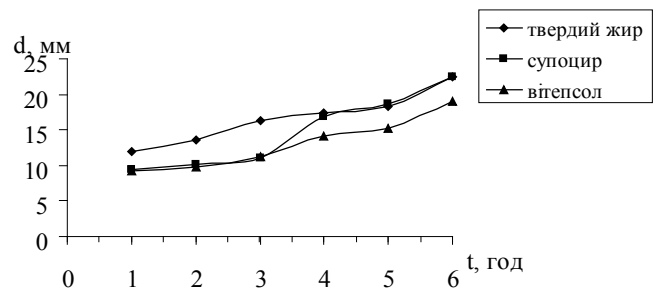


Рис. 2. Кінетика дифузії активної речовини із супозиторіїв на різних ліпофільних основах

При вивченні впливу концентрації ПАР на їх емульгуючу здатність відносно водного розчину БАР в гідрофобній супозиторній основі спостерігалось утворення стабільної емульсії типу вода в маслі вже при додаванні 1 % відповідного емульгатора, тому введення ПАР в більших концентраціях було нераціональним. Крім цього, збільшення концентрації ПАР несуттєво впливало на вивільнення активної речовини зі зразків. Так, через 6 год спостереження забарвлені зони композицій твердий жир + 1 % та 5 % відповідного ПАР складають: твін-80 – 28,37 мм та 29,67 мм, відповідно, емульгатор Т 2 – 21,04 мм та 22,12 мм, відповідно, емульгатор № 1 – 23,97 мм та 22,24 мм, відповідно, ланолін безводний – 17,53 мм та 17,50 мм, відповідно; з композицій супоцир + 1 % та 5 % відповідного ПАР складають: твін-80 – 23,73 мм та 25,25 мм, відповідно, емульгатор Т 2 – 22,47 мм та 22,90 мм, відповідно, емульгатор № 1 – 22,20

мм та 23,75 мм, відповідно, ланолін безводний – 18,63 мм та 19,20 мм, відповідно; з композицій вітепсол + 1 % та 5 % відповідного ПАР складають: твін-80 – 15,20 мм та 17,12 мм, відповідно, емульгатор Т 2 – 14,87 мм та 15,28 мм, відповідно, емульгатор № 1 – 15,83 мм та 16,09 мм, відповідно, ланолін безводний – 14,73 мм та 16,2 мм, відповідно. Враховуючи вищенаведене, перевагу було надано композиціям з вмістом 1 % ПАР.

Динаміка вивільнення БАР з ліпофільних основ у присутності 1 % ПАР наведені на *рис. 3-5*.

Згідно з даних, що наведені на *рис. 3*, введення емульгаторів до супозиторіїв на твердому жирі значно покращує дифузію активного компонента. Найбільш інтенсивне вивільнення протягом всього часу дослідження спостерігається при додаванні твіна-80: діаметри забарвлених зон мають значення 14,53 мм та 28,37 мм на початок та кінець спостереження, відповідно.

Подібна динаміка вивільнення спостерігається і для супозиторіїв, виготовлених на супоцирі (*рис. 4*): найбільші діаметри забарвлених зон характерні для зразків з твіном-80 та дорівнюють 10,20 мм та 23,73 мм на початок та кінець спостереження, відповідно. Але, як і для зразка без додавання ПАР, спостерігається нерівномірна дифузія БАР, особливо на початку спостереження, що в нашому випадку не є задовільним.

Кінетика вивільнення активного компоненту зі зразків на вітепсолі з ПАР носить зовсім інший характер, а саме, введення емульгаторів до основи уповільнює дифузію; так, на кінець спостереження діаметр забарвленої зони для вітепсолу дорівнює 19,03 мм, а для зразків з твіном-80, емульгатором Т 2, емульгатором № 1, ланоліном безводним – 15,20 мм, 14,87 мм, 15,83 мм та 14,73 мм, відповідно.

Результати наведених досліджень показали, що на інтенсивність вивільнення діючого компонента з супозиторіїв впливає вид супозиторної основи та ПАР. Слід відзначити, що найбільш повне та рівномірне вивільнення спостерігається із зразків на твердому жирі, а додавання твіна-80 посилює її дифузію. Тому нами перевага була надана супозиторіям на твердому жирі і твіні-80 в якості емульгатора.

Визначення кількісного вмісту мікроорганізмів в одному супозиторії на твердому жирі з додаванням емульгатора твіну-80 показало: кількість життєздатних клітин пробіотичних штамів – не менше $1 \cdot 10^7$ КУО/мл, що доводить доцільність використання даної супозиторної основи.

ВИСНОВКИ

Проведено експериментальні дослідження зі створення супозиторіїв з пробіотиками та активною речовиною, що посилює пробіотичні властивості культур мікроорганізмів, для профілактики та лікування вагінальних дисбіозів. Вивчено вплив різних ліпофільних основ та ПАР на кінетику вивільнення діючих компонентів із супозиторіїв. Встановлено, що найбільш доцільним для ЛЗ, що розроблюється, є використання в якості супозиторної основи твердого жиру з додаванням в якості емульгатора твіна-80, котрий сприяє найбільш ефективному вивільненню активного компонента.

ЛІТЕРАТУРА

1. Венцовский Б. М. Микрoэкологические аспекты репродук-

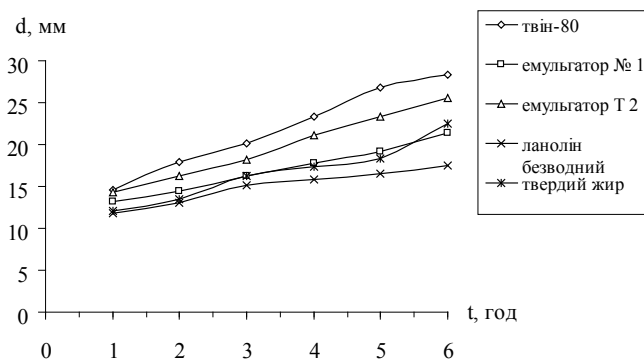


Рис. 3. Вплив ПАР на вивільнення активної речовини із супозиторіїв на твердому жирі

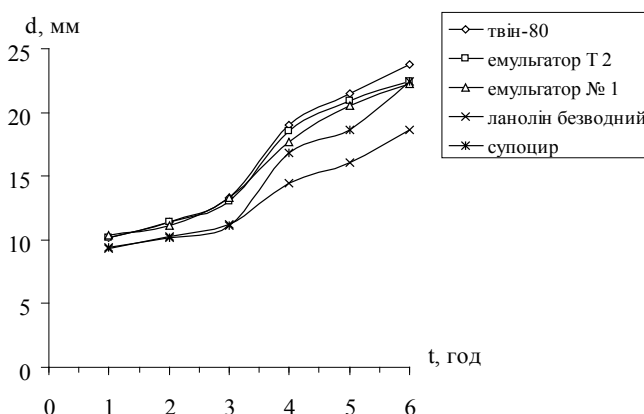


Рис. 4. Вплив ПАР на вивільнення активної речовини із супозиторіїв на супоцирі

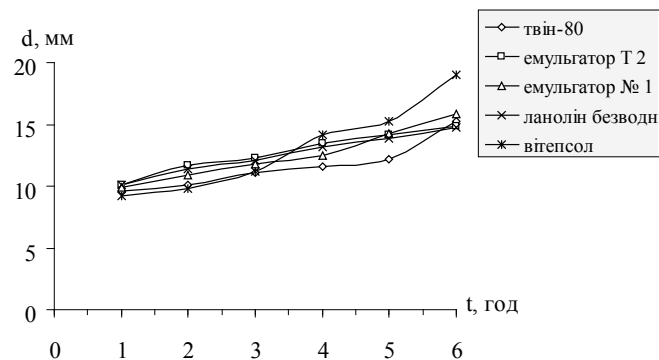


Рис. 5. Вплив ПАР на вивільнення активної речовини із супозиторіїв на вітепсолі

тивного здоров'я жінчини и современные подходы к его поддержке / Б. М. Венцовский, В. А. Товстановская, Д. С. Янковский, Г. С. Дымент // Здоровье жінчини. – 2002. – № 3 (11). – С. 86–91.

2. Половые болезни : Энцикл. Справ. – К. : Укр. энцикл. М. : «Аст-Пресс», 1994. – 480 с.

3. Калюжная О. С. До питання розробки лікарських засобів із нормобіотиками. Вивчення антагоністичної активності лактобактерій / О. С. Калюжная, Л. С. Стрельников, О. П. Стрільць // Фармаком. – 2008. – № 1. – С. 46–49.

4. Калюжная О. С. Вивчення антибіотикорезистентності пробіотичних штамів до антибіотиків та протигрибкових препаратів / О. С. Калюжная, Л. С. Стрельников, О. П. Стрільць // Запорожский медицинский журнал. – 2008. – № 5. – С. 120–122.



5. Янковский Д. С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления / Дмитрий Станиславович Янковский. – К. : Эксперт ЛТД, 2005. – 362 с.

6. Кольбаева Х.Б. Разработка составов и технологии вагинальных лекарственных форм противовоспалительного и ранозажив-

ляющего действия : автореф. дис. к-та фармац. наук: 15.00.01 / Х.Б. Кольбаева. – М., 1993. – 21 с.

7. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів : метод. рекомендації / [Волянський Ю.Л., Гриценко І.С., Ширококов В. П. та ін.]. – Київ, 2004. – 39 с.

Відомості про авторів:

Калужная Ольга Сергіївна, аспірант кафедри біотехнології НФаУ з відривом від виробництва (2006). Тел.служ. – 706 – 47 – 87, тел. дом. 719 – 91 – 42.

Стрельников Леонід Семенович, доктор фармацевтичних наук (1992), професор (1994), завідувач кафедри біотехнології НФаУ. Тел.служ. 706 – 47 – 87, тел. дом. 94 – 48 – 81.

Стрілець Оксана Петрівна, кандидат фармацевтичних наук (2001), доцент кафедри біотехнології (2004). Тел.служ. 706 – 47 – 87.

Кабачний Геннадій Іванович, кандидат фармацевтичних наук (1980), доцент кафедри біотехнології (2008). Тел.служ. 706 – 47 – 87.

Адреса для листування: 61002, Україна, м.Харків, вул. Мельникова, 12 службовий телефон: 706 – 47 – 87.

УДК 615.21.3.074:543

И.М. Кейтлин¹, А.В. Мазулин², Г.В. Падалко¹, В.П. Рева¹

ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК. СООБЩЕНИЕ 3 ПРАВИЛЬНОСТЬ И ТОЧНОСТЬ

¹Запорожская областная государственная инспекция по контролю качества лекарственных средств,

²Запорожский государственный медицинский университет,

Государственная инспекция по контролю качества лекарственных средств

Ключові слова: валидація, правильність, точність, критерій оцінки, відносне стандартне відхилення.

Ключевые слова: валидация, правильность, точность, критерий оценки, относительное стандартное отклонение.

Key words: validation, accuracy, precision, acceptance criteria, relative standard deviation.

Розглянуто дві характеристики валидації аналітичних методик – правильність і точність, як для кількісного визначення діючих речовин, так і для визначення домішок, рекомендовано критерії оцінки.

Рассмотрены две характеристики валидации аналитических методик - правильность и точность, как для количественного определения действующих веществ, так и для определения примесей, рекомендованы критерии оценки.

Two characteristics of validation of analytical methods were considered. They are the accuracy and precision. The consideration concerned as well assay and impurities degradation determination. The acceptance criteria are recommended.

К ак уже описано в сообщениях 1 и 2 по теме «Валидация аналитических методик», валидация аналитических методов состоит в определении точности, воспроизводимости, чувствительности, межлабораторной воспроизводимости, линейности и других характеристик аналитических методов [1], [2].

Характеристики метода, используемые в валидации, определяются мировыми фармакопеями как следующие:

Accuracy - Правильность

Precision - Точность

Specificity - Специфичность, избирательность

Detection Limit - Предел обнаружения

Quantitation Limit - Предел количественного определения

Linearity - Линейность

Range - Диапазон применения

Кроме Фармакопейных, применяются также нефармакопейные характеристики:

Robustness - Надежность, устойчивость, стойкость

Stability of sample and Standard solutions -

Стабильность (устойчивость во времени) растворов образца и стандарта

Прежде чем приступать к валидации, составляется валидационный протокол, где описываются все требования предстоящей валидации метода (применяется термин «будет выполнено»). Этот протокол утверждается и является планом валидации. Любое отклонение от требований СОП должно быть аргументировано.

Данная статья посвящена валидации метода количественного определения и определения примесей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в

лекарственной форме. Также подлежат валидации все другие методы (растворение, равномерность содержания и др.)

Accuracy - Правильность аналитического метода характеризует соотношение результатов, полученных данным методом, к истинному значению (или к справочной величине).

Существует 2 категории определения правильности аналитического метода:

1. Для методов количественного определения.

2. Для методов определения примесей.

Для методов количественного определения правильность оценивается тремя измерениями при каждой из трех концентраций: 70%, 100% и 130% от рабочей концентрации.

Правильность при количественном определении компонентов в лекарственных формах там, где есть стадия экстракции, проводится данным методом с определенным количеством плацебо (смесь неактивных ингредиентов), к которому добавлены известные количества анализируемого вещества при 70%, 100% и 130% от номинальной концентрации (три измерения при каждой концентрации).

Accuracy (Правильность) рассчитывается следующим образом:

Найденная концентрация $\times 100\%$

Рассчитанная концентрация

$$\text{Найденная концентрация} = \frac{\text{Сигнал образца} \times \text{Концентр. стандарта}}{\text{Среднее значение сигнала стандарта}}$$

$$\text{Рассчитанная концентрация} = \frac{\text{навеска образца (mg)}}{\text{объем р-ра образца (ml) \times \text{разведение}}$$