

ВИБІР ОПТИМАЛЬНИХ РЕЖИМІВ ФІЛЬТРАЦІЇ ТА ЗАМОРОЖУВАННЯ ДЛЯ ЛІОФІЛІЗОВАНОГО ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ БДЖОЛИНОЇ ОТРУТИ

Ключові слова: фільтрувальні матеріали, ліофілізація, розчин на основі бджолиної отрути, температура заморожування

Опрацьований лікарський засіб – препарат для ін'єкцій на основі бджолиної отрути, одержаний методом ліофілізації. Необхідність його створення зумовлена тим, що бджолина отрута містить близько 40 компонентів, які виявляються надзвичайно ефективними у разі лікування різних захворювань [1, 6]. Основна діюча речовина – мелітин – за своїми протизапальними властивостями, які дуже важливі у разі лікування артриту, істотно перевершує найсучасніші медикаменти (навіть гормон кортизон). Також до складу бджолиної отрути входить адолапін – речовина, яка знімає больовий синдром і запалення. Крім того, мелітин у поєднанні з іншими складовими отрути бджоли стимулює імунну систему та прискорює процес відновлення уражених тканин. Хімічні процеси, спричинені дією бджолиної отрути, стимулюють викидання у кров гормона кортизону, а також особливих речовин (дофамін, серотонін і норадреналін), кожна з яких може допомогти полегшити біль і повернути колишню рухливість суглобу, ушкодженому артритом. Окрім того, бджолина отрута може бути використана як імуностимулятор і для лікування ракових захворювань [1, 4, 6, 10].

Тому необхідність розроблення стабільного, швидкорозчинного, ліофілізованого препарату на основі бджолиної отрути для профілактики та лікування захворювань і патологічних станів опорно-рухового апарату є актуальною.

Створення лікарського засобу передбачає виконання фармацевтичних досліджень, які включають вибір складу, розроблення технології, встановлення критеріїв якості й меж для фармацевтичних параметрів, які гарантують стабільність під час виробництва та зберігання препарату [3].

Окрім того, однією з вимог до парентеральних лікарських засобів є відсутність механічних включень, видимих неозброєним оком [11, 13]. Для видалення частинок використовують метод фільтрації, що забезпечує реалізацію найбільш важливих вимог, пропонованих до ін'єкційних розчинів – відсутність механічних включень, стерильність і, частково, апірогенність.

Фільтрувальні матеріали, застосовувані у виробництві парентеральних розчинів, мають відповідати таким вимогам: затримувати частинки з рідин, які фільтрують; від фільтрувального матеріалу не мають відокремлюватися в розчин механічні частинки, виділятися токсичні й пірогенні речовини; витримувати теплову стерилізацію; не змінювати фізичний стан під час контакту з розчином, який фільтрують; не впливати на хімічний склад, величину рН і електричну провідність фільтрату.

Фармацевтичною промисловістю України використовуються фільтрувальні мембрани, виготовлені з різних матеріалів вітчизняними й закордонними виробника-

ми. Тому на стадії фармацевтичної розробки обов'язковими є дослідження з вибору фільтрувального матеріалу для фільтрації розчину.

Метою нашої роботи було визначення сумісності розчину на основі бджолиної отрути з матеріалами фільтрів з капрону, нейлону і поліефірсульфону, вибір оптимального режиму фільтрації, а також розроблення режиму ліофілізації – підбір умов заморожування розчину на основі бджолиної отрути [3, 5].

Матеріали та методи дослідження

Об'єктами дослідження були субстанція бджолиної отрути, розчин на основі бджолиної отрути, ліофілізований препарат на основі бджолиної отрути, режим фільтрації, режим заморожування препарату. У ході НДР здійснювали якісний і кількісний контроль зразків препарату. Показники якості та методи визначення описано в ДФУ [2] та нормативній документації на препарат [14].

Результати дослідження та обговорення

Як спосіб, що підвищує стабільність розчину на основі бджолиної отрути під час зберігання, обрано ліофілізацію. Ліофілізація являє собою складний технологічний процес, і тільки правильний вибір концентрації, товщини шару розчину, умов заморожування і режиму сублімаційного висушування дає змогу одержувати високоякісний готовий продукт [7, 8, 12, 15]. Використання методу ліофілізації для стабілізації розчину на основі бджолиної отрути в процесі зберігання було зумовлено високою чутливістю препарату до підвищених температур (термолабільність), світла (фотолабільність), наявності кисню в навколишньому середовищі [1].

Попереднім етапом ліофілізації розчину на основі бджолиної отрути є його фільтрація через фільтри з розміром пор 1 мкм, 0,8 мкм (попередня фільтрація) і 0,2 мкм (кінцева фільтрація) [5, 11].

Для виконання процесу фільтрації було визначено матеріал фільтра, який є найбільш сумісним із розчином, і рейтинг пор, що забезпечує необхідне очищення парентерального розчину від механічних частинок і мікроорганізмів.

Для встановлення взаємного впливу розчину на основі бджолиної отрути і фільтрувальних матеріалів, які використовують у виробництві парентеральних розчинів, ми вивчали мембранні фільтри, виготовлені з капрону (типу «МІФІЛ», Білорусь), нейлону (типу «Ultipor N66», Палл, Німеччина), поліефірсульфону (типу «PROPOR PES», Домнік Хантер, Англія). Вивчали мембрани з розміром пор від 1 мкм і 0,8 мкм (попередня фільтрація) і 0,2 мкм (кінцева фільтрація).

Визначення придатності та ефективності фільтрувального матеріалу здійснювали таким чином. Кожну мембрану вміщували в тримач типу «Мілліпор» (площа фільтрувальної поверхні 12,56 см²). Розчин на основі бджолиної отрути пропускали через фільтр під тиском стисненого повітря зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Збирали фракції фільтрованого розчину через 20, 30, 40 хв.

Після закінчення часу фільтрації досліджуваний розчин аналізували за такими показниками: прозорість, кольоровість, рН і кількісний вміст діючої речовини.

Фільтрувальний матеріал вважали придатним, якщо показники трьох паралельних випробувань збігалися з даними контрольного розчину.

Результати досліджень подано в табл. 1.

Одержані дані дали змогу зробити висновок про сумісність розчину на основі бджолиної отрути з матеріалами фільтрів з капрону (типу «МІФІЛ», Білорусь), нейлону (типу «Ultipor N66, Палл, Германия) і поліефірсульфону (типу «PROPOR PES», Домнік Хантер, Англія). Окрім того, матеріал цих типів фільтрів за робочим діапазоном рН відповідає досліджуваному розчину, витримує термічну стерилізацію і добре сумісний із діючою речовиною.

**Дослідження сумісності розчину на основі бджолоїної отрути
з фільтрувальними матеріалами**

Показники якості	Тривалість фільтрації, хв	Матеріал фільтра		
		капрон	нейлон	поліефірсульфон
рН (4,0–6,0)	0 (контрольний розчин)	5,4	5,3	5,35
	20	5,42	5,32	5,35
	30	5,42	5,35	5,31
	40	5,4	5,36	5,32
Прозорість (ДФУ, 2.2.1)	0	Прозорий	Прозорий	Прозорий
	20, 30, 40	Прозорий	Прозорий	Прозорий
Кольоровість (ДФУ, 2.2.2)	0	Відповідає	Відповідає	Відповідає
	20, 30, 40	Відповідає	Відповідає	Відповідає
Механічні включення, у т. ч. частинки фільтра, що відслоюються	0	Відсутність	Відсутність	Відсутність
	20, 30, 40	Відсутність	Відсутність	Відсутність
Кількісний вміст отрути бджолоїної у перерахунку на мелітин, мг/мл (0,95–1,05)	0	0,98	0,99	0,99
	20, 30, 40	0,98	0,99	0,99

Для вибору оптимальних параметрів процесу фільтрації здійснювали фільтрацію розчину з використанням досліджуваних фільтрувальних мембран. Попередню фільтрацію виконували через мембрани з рейтингом пор 1,0 або 0,8 мкм, кінцеву – 0,2 мкм, тривалість фільтрації за двома етапами – 16 ± 4 хв, тиск стисненого повітря – $0,06 \pm 0,02$ МПа.

Результати досліджень наведено в табл. 2.

Як впливає з даних табл. 2, процес фільтрації необхідно здійснювати під тиском стисненого повітря не менше 0,06 МПа, що забезпечує оптимальну тривалість фільтрації та одержання якісного проміжного продукту, який відповідає вимогам на відсутність механічних включень.

**Вибір оптимальних параметрів фільтрації на основі розчину
бджолоїної отрути**

Тип фільтрувального матеріалу	Технологічні параметри фільтрації								
	Тиск, МПа			Тривалість, хв			Механічні включення		
							1 мкм	0,8 мкм	0,2 мкм
МІФІЛ	0,04	0,06	0,08	10	8	5	Відсутність	Відсутність	Відсутність
Ultipor N 66	0,04	0,06	0,08	10	8	5	Відсутність	Відсутність	Відсутність
PROPOR PES	0,04	0,06	0,08	10	8	5	Відсутність	Відсутність	Відсутність

Для розроблення режиму ліофілізації спочатку підбирали умови заморожування розчину на основі бджолоїної отрути. Послідовно виконували визначення температури заморожування та підбір способу заморожування розчину на основі бджолоїної отрути, вивчення впливу тривалості заморожування на якість кінцевого продукту. Під час розроблення технології ліофілізації препарату на основі бджолоїної отрути треба для встановлення необхідної температури заморожування розчину визначити евтектичну температуру, яка має конкретне значення для кожної речовини [15].

Було використано термічний спосіб визначення евтектичної температури як найбільш простий. У його основі лежить фіксування температури зразка, замороженого

нижче евтектичної точки, в процесі повільного відтаювання. На кривій вимірювання температури матеріалу у разі досягнення евтектичної точки утворюється плато, що відповідає часу, коли тепло, яке надходить ззовні, не призводить до підвищення температури, а витрачається на плавлення льоду за даної евтектичної «концентрації» розчину. Для заморожування використовували розчин бджолоїної отрути з концентрацією 1 мг/мл, який розливали по 1 мл в ампули або флакони. Використовуючи термічний метод, встановили точку евтектики розчину на основі бджолоїної отрути – $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

У процесі вивчення впливу швидкості заморожування на структуру препарату розчин на основі бджолоїної отрути розливали по 1 мл в ампули або у флакони і заморожували на полиці сублімаційної установки до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, застосовуючи такі способи заморожування [9]:

1. Повільне (постадійне) заморожування (рис. 1) – препарат завантажували на полиці камери за температури $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$, охолоджували полиці до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ і витримували 2 год (стадія 1). Далі полиці охолоджували від $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ і витримували ще 2,5 год (стадія 2), потім знижували температуру полиць від $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ і витримували ще 2,5 год, далі знижували температуру до досягнення препаратом температури $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ і витримували його протягом 13 год за цієї температури (стадія 3);

2. Швидке заморожування – препарат завантажували на полиці сублімаційної камери за температури $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$, охолоджували їх за 1 год до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, за 1 год – до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, за 1 год – до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, після того, як температура препарату досягає $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, витримували його за цієї температури протягом 5 год (рис. 2).

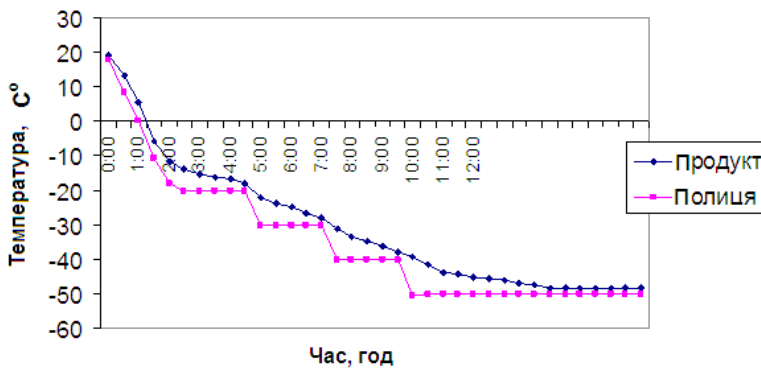


Рис. 1. Режим повільного заморожування розчину на основі бджолоїної отрути

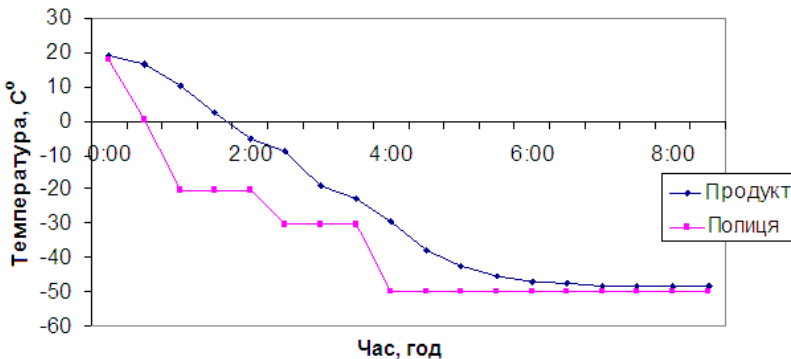


Рис. 2. Режим швидкого заморожування розчину на основі бджолоїної отрути

Оцінювання впливу способу заморожування на якість ліофілізату бджолоїної отрути виконували за такими показниками: зовнішній вигляд препарату, прозорість, волога, розчинність, значення рН, кількісний вміст бджолоїної отрути по мелітину. Показники якості ліофілізованого препарату на основі бджолоїної отрути подано в табл. 3.

Вплив способу заморожування на стабільність ліофілізованого препарату на основі бджолиної отрути

Показники якості	Тривалість зберігання, міс.	Способи заморожування	
		повільне заморожування	швидке заморожування
Зовнішній вигляд (Суха пориста маса білого кольору)	0 (вихідні дані)	Суха пориста маса білого кольору	Суха пориста маса білого кольору
	12	Суха пориста маса білого кольору	Суха пориста маса білого кольору
Прозорість (має бути прозорим порівняно з водою Р)	0	Прозорий	Прозорий
	12	Прозорий	Прозорий
РН (4,0–6,0)	0	5,5	5,55
	12	5,4	5,45
Розчинність (легко розчинний у 2 мл протягом 1 хв)	0	Відповідає	Відповідає
	12	Відповідає	Відповідає
Волога (не більше 4,0%)	0	2,3	2,5
	12	2,31	2,52
Кількісний вміст отрути бджолиної у перерахунку на мелітин, мг/мл (0,95–1,05)	0	0,96	0,97
	12	0,96	0,96

Таким чином, можна зробити висновок про можливість використання для одержання ліофілізованої лікарської форми на основі бджолиної отрути як швидкого, так і повільного заморожування.

В и с н о в к и

1. Визначено сумісність розчину на основі бджолиної отрути з матеріалами фільтрів з капрону, нейлону і поліефірсульфону. Обрано оптимальний режим фільтрації для цього препарату: фільтрацію рекомендуємо здійснювати під тиском стисненого повітря не менше 0,06 МПа, що забезпечує оптимальну тривалість фільтрації та одержання якісного проміжного продукту, що відповідає вимогам на відсутність механічних включень.

2. Термічним методом визначено евтектичну температуру розчину на основі бджолиної отрути, яка становить $-4,5$ – $-5,5$ °С.

3. Вивчено режими швидкого і повільного заморожування продукту. Встановлено, що режим заморожування не впливає на якість препарату, тому для одержання ліофілізованої лікарської форми на основі бджолиної отрути можна використовувати режими як швидкого, так і повільного заморожування.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Тихонов А. И., Бондарчук Л. И., Тихонова С. А. и др. Яд пчелиный в фармации и медицине (теория, технология, медицинское применение): Монография / Под ред. А. И. Тихонова. – Харьков: Оригинал, 2010. – 280 с.
2. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. – Харків: ООО Рирег, 2001. – 531 с.
3. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8). Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.0:2011. – К.: МОЗ України, 2011. – 33 с.
4. Патент на корисну модель № 61039 (Україна). МПК 2006.01 А 61 К 9/08, А 61 К 35/64, А 61 К 37/04. Препарат «Ін'єкційний засіб з імуностимулюючими та загальнозміцнюючими властивостями» / Тихонов О. І., Ємельянов А. В., Алмакаєва Л. Г., Скрипник-Тихонов Р. І., Муртіцев О. М., Чехута О. О. – № 61039; Заявл. 19. 11. 2010 р.; Опубл. 11. 07. 2011 р., Бюл. № 3.
5. Технология и стандартизация лекарств. Т. 2. / Под ред. В. П. Георгиевского, Ф. А. Конева. – Харьков: ИГ РИРЕГ, 2000. – 784 с.
6. Тихонов О.І., Бодня К.І., Тихонова С.О. та ін. Інноваційні підходи в апітерапії: Метод рекомендації (Узгоджено Департаментом медичної допомоги МОЗ України від 25. 03. 2015 р.) / За ред. О. І. Тихонова. – К., 2015. – 32 с.

7. Barresi A. A., Velardi S. A., Pisano R. et al. // Inter. J. refrigeration. – 2009. – V. 32. – P. 1003–1014.
8. Kamath L. // Genetic Engineering & Biotechnology News. – 2006. – V. 26, N 20. – P. 1–4.
9. Kasper J. C., Friess W. // Europ. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2011. – V. 78. – P. 248–263.
10. Tichonov A. I., Bondarczuk L. I., Tichonowa S. A. et al. Jad pszczeli w farmacji I medycynie. Teoria, technologia, zastosowanie lecznicze: monografia / Pod redakcja Akademika Ukrainskiej Akademii Nauk A. I. Tichonowa; Redakcja wydania polskiego K. Sodzawiczny, prof. dr hab. B. Kedzia / Apipol-Farma. – Myslenice. – 2011. – 274 s.
11. Фетисова Е. Г., Андрюкова Л. Н. Изучение совместимости фильтрующих материалов с глазными каплями кромогликата натрия 2% // Фармаком. – 2007. – № 3. – С. 93–97.
12. Sadikoglu H., Ozdemir M., Seker M. // Drying Technology. – 2006. – V. 24, N 7. – P. 849–861.
13. Алмакаева Л. Г., Доля В. Г., Буднікова Т. М. Проблема наявності механічних включень у препаратах для парентерального застосування та їх нормування // Фармацевт. журн. – 2006. – № 5. – С. 67–72.
14. Тихонов А. И., Коваленко С. Н., Гусаров В. И., Скрипник-Тихонов Р. И. Разработка методики анализа яда пчелиного методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Мед. альманах. – 2011. – № 4 (17). – С. 263–266.
15. Пат. на корисну модель 97105 Україна, МПК⁵¹ (2015.01), А61К 9/14 (2006.01), А61К 35/00, А61К 35/56 (2015.01). Ліофілізований препарат для ін'єкцій / Тихонов О. І., Алмакаева Л. Г., Скрипник-Тихонов Р. І.; патентовласники: Тихонов О. І., Алмакаева Л. Г. – № u 201411347; Заявл. 17. 10. 2014; Опубл. 25. 02. 2015, Бюл. № 4. – 4 с.

Надійшла до редакції 08. 04. 2015.

Р. И. Скрипник-Тихонов¹, П. С. Сирота¹, А. И. Тихонов², Л. Г. Алмакаева², Л. Г. Науменок²

¹ Украинская военно-медицинская академия, г. Киев

² Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ РЕЖИМОВ ФИЛЬТРАЦИИ И ЗАМОРАЖИВАНИЯ ДЛЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ПЧЕЛИНОГО ЯДА

Ключевые слова: фильтрующие материалы, лиофилизация, раствор на основе пчелиного яда, температура замораживания

А Н Н О Т А Ц И Я

В последнее время наблюдается повышенный интерес к созданию препаратов из пчелиного яда, особенно для парентерального применения. Одним из способов получения препарата высокого качества является применение технологии лиофилизации. Процесс лиофилизации длителен и энергетически ёмок. Поэтому разработка экономичного процесса лиофилизации является крайне важным элементом в фармацевтической разработке с обоснованием выбора оптимальных параметров на всех стадиях получения лекарственного средства.

Целью работы было изучение совместимости раствора на основе пчелиного яда с материалами фильтров из капрона, нейлона, полиэфирсульфона, а также определение оптимального режима фильтрации и условий замораживания продукта при лиофилизации. Объектами исследований были субстанция пчелиного яда серии № 250 В производства компании Ariadna Ltd Co., раствор на ее основе. Лيوфилизацию проводили в сублимационных установках типа ТГ-50.

Для осуществления процесса фильтрации были определены совместимые с раствором фильтрующие материалы, которые могут быть использованы для фильтрации при производстве препарата. Для установления взаимного влияния раствора и фильтрующих материалов, используемых в производстве инъекционных растворов, изучали мембранные фильтры, изготовленные из капрона (типа «МИФИЛ», Беларусь), нейлона (типа «Ultiprog N 66», Палл, Германия), полиэфирсульфона (типа «Prorog Res», Dominic hanteg, Англия). Изучали мембраны с размером пор 0,8 мкм (предварительная фильтрация) и 0,2 мкм (окончательная фильтрация).

Определена совместимость раствора на основе пчелиного яда с материалами фильтров из капрона, нейлона и полиэфирсульфона. Выбран оптимальный режим фильтрации для этого препарата: фильтрацию рекомендуем проводить под давлением сжатого воздуха не менее 0,06 МПа, что обеспечивает оптимальную длительность фильтрации и получение качественного промежуточного продукта, отвечающего требованиям на отсутствие механических включений.

Нами разработан режим лиофилизации лекарственного средства на основе пчелиного яда. Последовательно было проведено определение температуры замораживания раствора, подбор способа замораживания раствора, изучение влияния продолжительности замораживания на качество конечного продукта. Для установления требуемой температуры замораживания раствора была определена эвтектическая температура. Установлено, что скорость замораживания продукта существенно не влияет на качество лиофилизированного препарата на основе пчелиного яда.

R. I. Skrypnik-Tikhonov¹, P. S. Syrota¹, O. I. Tikhonov², L. G. Almakaeva², L. G. Naumenok²

¹Ukrainian Military Medical Academy, Kyiv

²National University of Pharmacy, Kharkiv

THE CHOICE OF OPTIMAL FILTRATION AND FREEZING MODES
FOR FROZEN-DRIED MEDICINE ON THE BASIS OF BEE VENOM

Key words: filter materials, freeze-drying, bee venom, freezing temperature

A B S T R A C T

Lately there is heightened interest in creation of medicines from bee venom, especially for parenteral application. Application of freeze-drying technology is one of the ways for obtaining the medicine of high quality. The process of freeze-drying is prolonged and power-consuming. Therefore development of economic process of freeze-drying with the ground of choice of optimal parameters at all stages of medicine obtaining is the extremely important element in pharmaceutical development.

The aim of our work was study of compatibility of the solution on the basis of bee venom with materials of filters from caprone, nylon, polyestersulphone, and also choosing the optimal mode of filtration and determination of conditions of the product freezing when freeze-drying. The objects of our investigations were the substance of bee venom (batch № 250 B) produced by Ariadna Ltd Co. and the solution on its basis. Freeze-drying was conducted using freeze-drying devices of TG-50 type.

The researches on creation of the new frozen-dried medicine for injections on the basis of bee venom have been conducted. The modes of filtration of the solution on the basis of bee venom have been studied. Filter materials, which are compatible with the solution and can be used for filtration when medicine producing, have been determined for realization of the filtration process. For establishment of interference of the solution and filter materials used in producing the injection solutions we have studied the membrane filters made from caprone («MIFIL» type, Belarus), nylon («Ultipor N 66» type, Pall, Germany), polyestersulphone («ProporPes» type, Dominic hanter, England). The membranes with the pore size of 0.8 µm (previous filtration) and 0.2 µm (final filtration) have been studied. The compatibility of the solution on the basis of bee venom with filters materials from caprone, nylon and polyestersulphone have been established. The optimal filtration mode has been chosen for the medicine: it is recommended to carry out filtration by compressed air with the pressure of not less than 0,06 MPa that provides the optimal duration of filtration and obtaining intermediate product of high quality that satisfies the requirements of absence of the mechanical inclusions.

The freeze-drying mode for the medicine on the basis of bee venom has been developed by us. Such actions as determination of freezing temperature for the solution; choosing the method of the solution freezing; studying the influence of freezing duration on the quality of final product have been conducted sequentially. The eutectic temperature has been determined for establishing the necessary temperature of the solution freezing. It has been set that the freezing speed of the product does not influence substantially on the quality of frozen-dried medicine on the basis of bee venom.

Електронна адреса для листування з авторами: almakaeva@ukr.net