

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ  
ОСВІТИ імені П. Л. ШУПИКА**

**СКРИПНИК-ТИХОНОВ РОСТИСЛАВ ІГОРЕВИЧ**

УДК: 615.014.2:615.456:615.07:638.178.8:658.562

**РОЗРОБКА СКЛАДУ ТА ТЕХНОЛОГІЇ РОЗЧИНУ  
ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ ОТРУТИ БДЖОЛИНОЇ**

15.00.01 – Технологія ліків, організація фармацевтичної справи  
та судова фармація

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата фармацевтичних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі військової фармації Української військово-медичної академії Міністерства оборони України.

**Науковий керівник:** кандидат фармацевтичних наук, професор  
**СИРОТА ПЕТРО САВЕЛІЙОВИЧ**  
Українська військово-медична академія  
Міністерства оборони України,  
професор кафедри військової фармації

**Офіційні опоненти:** доктор фармацевтичних наук, професор  
**КОРИТНЮК РАЇСА СЕРГІЇВНА**  
Національна медична академія післядипломної  
освіти імені П. Л. Шупика,  
професор кафедри фармацевтичної технології та  
біофармації

кандидат фармацевтичних наук, доцент  
**ПРИТУЛА РУСЛАН ЛЕОНІДОВИЧ**  
Національний військово-медичний клінічний  
центр «ГВКГ»,  
начальник фармацевтичного центру

Захист відбудеться « 17 » червня 2016 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.613.04 при Національній медичній академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика за адресою: 04112, м. Київ, вул. Дорогожицька, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика (04112, м. Київ, вул. Дорогожицька, 9).

Автореферат розісланий « 12 » травня 2016 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради

А. О. Дроздова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Протягом перших десятиліть ХХІ ст. онкологічні захворювання все ще залишаються однією з найпоширеніших причин летальних наслідків серед населення багатьох країн світу. Патологія онкозахворювань має не лише соціальне значення, але й потребує обов'язкового вирішення на державному рівні. Незважаючи на ефективну фармакотерапевтичну роль хіміотерапії при лікуванні раку різної етіології, більшість антинеопластичних препаратів спричиняють токсичну дію безпосередньо на здорові клітини організму, а генотоксичний ефект хіміотерапевтичних препаратів призводить до генерування вторинних злоякісних пухлин.

У цьому аспекті особливої уваги заслуговують нові лікарські субстанції з продуктів бджільництва. Численні компоненти отрути бджолиної (ОБ) стимулюють та зміцнюють організм у цілому, а разом з тим і його захисні та відновні функції. Тривале вживання такої природної сировини підвищує опір організму до онкопатологій, стимулює роботу імунної системи.

Отрута бджолина, як сировина, є дуже нестійкою сполукою, тому створення лікарського засобу (ЛЗ) на її основі потребує розробки щадної технології приготування.

З метою створення та організації промислового виробництва ЛЗ на основі ОБ необхідно розробити оптимальну технологію одержання лікарського препарату, яка б забезпечила збереження фізико-хімічних, біофармацевтичних, фармако-технологічних, фармакологічних та інших властивостей протягом не менше двох років. Такий технологічний прийом, як ліофілізація, забезпечує довготривале зберігання ЛЗ і використовується для отримання стабільних ліофілізованих порошків, зокрема, для приготування розчинів для ін'єкцій (наприклад, антибіотиків та ін.). Ліофілізація є перспективним технологічним прийомом для забезпечення стабільності ЛЗ, але в кожному конкретному випадку потребує науково-експериментального підходу.

Таким чином, враховуючи вищезазначене актуальною є розробка науково-практичних підходів і впровадження у фармацевтичне виробництво ЛЗ протипухлинної та імуностимулюючої дії на основі ОБ, що є певним вирішенням проблеми лікування хворих з послабленим імунітетом та мієлосупресією, викликаною цитостатичною терапією.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Української військово-медичної академії (УВМА) та проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України «Розробка складу та технології розчину для ін'єкцій отрути бджолиної» (№ державної реєстрації 0114U000963).

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи – наукове обґрунтування складу та розробка раціональної технології ліофілізату для приготування розчину для ін'єкцій з ОБ для лікування онко- та імунопатологій.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- вивчити асортимент вітчизняного фармацевтичного ринку на наявність ЛЗ протипухлинної та імуностимулюючої дії;
- проаналізувати та узагальнити сучасні літературні джерела щодо хімічного складу ОБ, її стабільності та застосування у медицині;
- визначити методологію створення парентерального ЛЗ у вигляді ліофілізованого порошку для приготування розчину для ін'єкцій;
- теоретично та експериментально обґрунтувати оптимальний склад розчину з отрутою бджолоїною для подальшого виготовлення ліофілізованого порошку;
- експериментально розробити та обґрунтувати раціональну технологію виготовлення із застосуванням способу ліофілізації для отримання ЛЗ на основі ОБ – «Апікаїн-Р»;
- дослідити фізико-хімічні, фармакотехнологічні показники розробленого лікарського препарату та встановити основні показники якості;
- визначити термін придатності, умови зберігання ЛЗ «Апікаїн-Р» і розробити проекти технологічного регламенту (ТР) та методик контролю якості (МКЯ) на ЛЗ «Апікаїн-Р»;
- узагальнити результати мікробіологічних і фармакологічних досліджень опрацьованого лікарського препарату «Апікаїн-Р».

**Об'єкти дослідження.** Отрута бджолоїна, допоміжні речовини, ліофілізат для приготування розчину для ін'єкцій – ЛЗ «Апікаїн-Р».

**Предмет дослідження.** Склад та технологія парентерального ЛЗ на основі отрути бджолоїної із застосуванням методу ліофілізації.

**Методи дослідження.** Використані в ході виконання дисертації: бібліосемантичний – для узагальнення даних літературних джерел; фізико-хімічні – для визначення прозорості та ступеня забарвлення, рН, якісного складу і кількісного вмісту активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ); фармако-технологічні – для визначення об'єму, наявності видимих і невидимих механічних включень; технологічний – метод ліофілізації; мікробіологічні – для визначення стерильності; фармакологічні – для визначення подразнювальної дії, токсичності, гемостимулюючої активності; математико-статистичні – для статистичної обробки результатів експериментальних досліджень. На підставі експериментально одержаних результатів використані методи досліджень дозволяють об'єктивно і повною мірою оцінити якісні та кількісні показники розробленого лікарського препарату.

**Наукова новизна одержаних результатів** полягає в науково-методичному і експериментальному підході до створення, розробки складу, технології нового парентерального ЛЗ у вигляді ліофілізату для приготування ін'єкційного розчину «Апікаїн-Р» з метою лікування онко- та імунопатологій на основі ОБ.

*Вперше:*

- за допомогою фізико-хімічних, фармако-технологічних, мікробіологічних і фармакологічних досліджень експериментально розроблено та науково обґрунтовано оптимальний склад і раціональну технологію парентерального ЛЗ «Апікаїн-Р»;

- встановлено показники якості ЛЗ «Апікаїн-Р»;
- досліджено стабільність лікарського препарату в процесі зберігання, а також узагальнено результати визначення його специфічної фармакологічної активності;
- новизна досліджень захищена патентами України на корисну модель «Ліофілізований препарат для ін'єкцій» № 97105 від 25.02.2015 р. та на винахід «Ліофілізований препарат для ін'єкцій» № 111273 від 11.04.2016 р.

*Удосконалено:*

- особливості підходу до розробки складу і технології ін'єкційних лікарських засобів;
- режими ліофілізації (швидке заморожування, сублімаційне висушування розчину ОБ) для отримання ЛЗ «Апікаїн-Р».

*Набуло подальшого розвитку:*

- вивчення препарату «Апікаїн-Р» з метою застосування його як перспективного протипухлинного та імуностимулюючого ЛЗ;
- застосування і розробка технологічного методу ліофілізації для отримання нестійких ЛЗ на основі ОБ;
- комплексність оцінки показників якості розробленого ЛЗ «Апікаїн-Р».

**Практичне значення одержаних результатів.** Створено та запропоновано для практичної медицини новий вітчизняний парентеральний лікарський препарат «Апікаїн-Р» з протипухлинними та імуностимулюючими властивостями. Одержані результати науково-практичних досліджень є основою для оптимізації технологічних принципів розробки нового парентерального ЛЗ у вигляді ліофілізату для приготування ін'єкційного розчину ОБ.

Розроблено проекти ТР та МКЯ на виробництво ЛЗ «Апікаїн-Р», які апробовано та впроваджено в умовах промислового виробництва на ПАТ «Фармстандарт-Біолік» (акт від 27.12.2010 р.). Лікарський препарат «Апікаїн-Р» внесено до перспективного плану розвитку виробництва ПАТ «Фармстандарт-Біолік» (№ 158/40 від 15.01.2016 р.).

Результати наукових досліджень впроваджено до навчального процесу кафедр ряду вищих медичних і фармацевтичних закладів України: кафедри промислової фармації та технології парфумерно-косметичних засобів Національного фармацевтичного університету (акти від 02.12.2013 р.); кафедри технології ліків Запорізького державного медичного університету (акт від 15.09.2015 р.); кафедри фармацевтичної технології і біофармації Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика МОЗ України (акт від 08.09.2015 р.); Київського медичного університету УАНМ (акти від 15.02.2015 р., 04.04.2015 р., 03.05.2015 р.); Науково-практичного центру Харківського національного медичного університету (акт від 28.09.2015 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею.

У комплексному дослідженні, над яким працював творчий колектив співавторів публікацій, дисертантом особисто отримані такі результати:

- досліджено фармацевтичний ринок протипухлинних та імуностимулюючих лікарських препаратів в Україні;

- проаналізовано та узагальнено дані літератури стосовно технологічних прийомів, хімічного складу ОБ, а також її застосування у сучасній медицині;
- вивчено технологічні аспекти створення парентеральних ЛЗ;
- досліджено фізико-хімічні, фармакотехнологічні показники якості опрацьованого ЛЗ;
- розроблено та обґрунтовано оптимальний склад і раціональну технологію виготовлення ліофілізату для приготування розчину для ін'єкцій ЛЗ «Апікаїн-Р»;
- вивчено стабільність розробленого ЛЗ та встановлено термін і умови зберігання;
- узагальнено результати мікробіологічних і фармакологічних досліджень;
- статистично оброблено та систематизовано результати експериментальних досліджень.

Постановку завдань, обговорення одержаних результатів, формулювання основних положень і висновків здійснено за участю наукового керівника. За участю автора вивчено стабільність під час зберігання ЛЗ. Результати випробувань статистично оброблені, систематизовані та проаналізовані дисертантом. Персональний внесок в усіх опублікованих із співавторами наукових працях (П. С. Сиротою, О. І. Тихоновим та ін.) вказується за текстом дисертації, а також в авторефераті у списку опублікованих праць.

**Апробація результатів дисертації.** Фрагменти дисертаційної роботи викладено та обговорено:

➤ на з'їздах: VII Національному з'їзді фармацевтів України «Фармація України. Погляд у майбутнє» (Харків, 2010); IV з'їзді апітерапевтів України «Апітерапія: сьогодення та майбутнє фармації» (Харків, 2011); V з'їзді апітерапевтів і апіконсультантів-бджолярів України з міжнародною участю спеціалістів у галузях медицини, фармації, апітерапії, бджільництва, косметології та харчової промисловості «Апітерапія України» (Київ, 2015);

➤ науково-практичних інтернет-конференціях: Харків, 2009; Харків, 2014;

➤ науково-практичних конференціях з міжнародною участю: Харків, 2011; Харків, 2012; Харків, 2013; Харків, 2014; П'ятигорськ, 2010;

➤ науково-практичних конференціях: Харків, 2010; Харків, 2011; Київ, 2013; Київ, 2014; Київ 2016; Луганськ, 2014 р; Харків, 2015.

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 33 наукові роботи, з яких: 2 монографії, 6 статей у наукових фахових виданнях, 4 методичні рекомендації, 2 патенти України (1 – на винахід, 1 – на корисну модель), 3 авторські свідоцтва, 16 тез доповідей.

**Структура дисертації та її обсяг.** Дисертаційна робота викладена на 134 сторінках друкованого тексту (обсяг основного тексту 126 сторінок), складається зі вступу, огляду літератури, 4 розділів експериментальної частини, висновків, списку використаних джерел, додатків. Дисертація ілюстрована 39 таблицями та 75 рисунками. Список використаних джерел містить 166 посилань, з яких 55 іноземних авторів.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У *вступі* дисертаційної роботи обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету та основні завдання досліджень, визначено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів.

У *розділі 1 «Сучасні аспекти створення парентеральних лікарських препаратів на основі отрути бджолоїної» (огляд літератури)* наведено результати аналізу фармацевтичного ринку України лікарських препаратів протипухлинної та імуностимулюючої дії. Виявлено, що більшість із них випускаються у вигляді парентеральних ЛЗ і здебільшого іноземними виробниками. Представлено узагальнені сучасні дані літератури стосовно хімічного складу ОБ та її застосування у медичній практиці. Доведено перспективність цієї субстанції, як АФІ, при розробці нових ЛЗ широкого спектра дії. Розглянуто особливості технології ЛЗ із застосуванням способу ліофілізації. У розділі обґрунтовано раціональність розробки нового ін'єкційного ЛЗ протипухлинної та імуностимулюючої дії на основі ОБ.

У *розділі 2 «Обґрунтування загальної методології досліджень»* надано матеріали, які враховують особливості підходу до створення та обґрунтування складу та технології парентеральних ЛЗ. Представлено характеристику АФІ (ОБ), а також використаних допоміжних речовин, які визначають технологію виготовлення парентерального ЛЗ у вигляді ліофілізату для приготування ін'єкційного розчину.

Обґрунтовано вибір методик, що використані для проведення фізико-хімічних, фармакотехнологічних, мікробіологічних і фармакологічних досліджень, а також умови їх проведення та статистичну обробку результатів.

Технологічні, аналітичні, мікробіологічні розробки та дослідження проводилися спільно з науково-дослідними базами МОЗ України м. Харкова.

У *розділі 3 «Теоретичне та експериментальне обґрунтування складу та технології парентерального лікарського засобу «Апікаїн-Р»»* наведено результати експериментальних досліджень щодо розробки оптимального складу розчину ОБ з подальшою технологією виготовлення з нього ліофілізованого порошку (ЛПОБ).

Для визначення складу розчину було напрацьовано 3 серії водного розчину отрути бджолоїної (ОБ) з концентрацією 0,01; 0,05 та 0,1 %. Розчин фільтрували в асептичних умовах та розливали в ампули по 5 мл.

Результати проведених досліджень показали, що при спостереженні за зовнішнім виглядом та рН зразків розчину впродовж 1, 5 та 14 днів було виявлено, що препарат є нестабільним. При нижчих і при вищих концентраціях ОБ зберігалася тенденція до зниження рН та зміна зовнішнього вигляду розчину.

Отримані зразки ЛЗ з ОБ оцінювали за зовнішніми характеристиками (колір, прозорість, відсутність механічних включень) та за кількісним вмістом основної діючої речовини – мелітину. У результаті спостережень була виявлена неможливість отримання стабільного розчину для ін'єкцій. У кожній серії з виготовлених зразків уже протягом 2,5 міс спостереження було виявлено знижену кількість мелітину, помутніння розчинів, а в деяких серіях – випадіння осаду та зміну рН розчинів.

Узагальнюючи всі попередні дослідження, авторами було прийнято рішення розробити готову лікарську форму у вигляді ліофілізату для ін'єкцій ОБ по 1 мг у флаконах по 5 мл, яка перед введенням хворому буде розчинятися в 1мл води для ін'єкцій.

Фармакотехнологічні дослідження проводилися спільно на базі науково-дослідної лабораторії парентеральних і оральних рідких лікарських засобів Національного фармацевтичного університету (м. Харків) під керівництвом завідувача лабораторії Л. Г. Алмакаєвої.

Одним з основних фізичних параметрів, який впливає на стабільність парентеральних лікарських препаратів, є рівень рН. Стабільність водного розчину ОБ (1:100) забезпечується при коливанні рН від 4,0 до 6,0.

З метою підтвердження такого інтервалу були проведені дослідження 6 серій препарату з різними значеннями рН, які досягалися додаванням 1М розчину натрію гідроксиду або 1М розчину кислоти хлористоводневої (табл. 1).

Таблиця 1

**Показники якості розчинів ОБ з різними значеннями рН**

Показники	Номер серії					
	1	2	3	4	5	6
рН (4,0–6,0)	3,5	4,0	4,65	5,25	6,0	6,5
Прозорість	прозорий	прозорий	прозорий	прозорий	прозорий	прозорий
Механічні включення	відсутні	відсутні	відсутні	відсутні	відсутні	відсутні
Кольоровість (не більше $Y_6$ )	$Y_6$	$Y_6$	$Y_6$	$Y_6$	$Y_6$	$Y_6$
Кількісний вміст: ОБ (у перерахунку на мелітин, мг/мл): (0,90-1,10)	0,98	0,97	0,98	0,97	0,97	0,96

Примітка. Кількість вимірів  $n = 5$ ;  $P = 95 \%$ .

З даних табл. 1 видно, що розчини з випробуваними значеннями рН не змінюють таких своїх характеристик, як прозорість, кольоровість, кількісний вміст АФІ, відсутність механічних включень у розчині, і відповідають встановленим показникам якості.

Як наповнювач для отримання ліофільного порошку на основі ОБ нами був використаний багатоатомний спирт – маніт у концентрації 2 %, який збільшує масу ліофілізату, її компактність, впливає на швидкість проведення процесу сушіння, а також на значення кінцевого показника вологості.

Ін'єкції лікарських препаратів на основі ЛПОБ викликають подразнення при внутрішньом'язовому введенні. У зв'язку з цим до складу препарату був введений місцевий анестетик – лідокаїну гідрохлорид у концентрації 0,5 %. Для регулювання ізотонічності використано натрію хлорид.



Таким чином, на основі літературних даних і теоретичних розрахунків і власного експерименту був обраний склад розчину для наступної ліофілізації препарату на основі ОБ (табл. 2).

Таблиця 2

Склад розчину для ліофілізації на основі ОБ

Компонент	Кількісний вміст в одній ампулі (флакони), мг	Функціональне призначення компонента
Отрута бджолина	1	АФІ
Маніт	20	формоутворювач
Лідокаїну гідрохлорид	0,5	анестетик
Натрію хлорид	6,0	ізотонізуючий регулятор
Вода для ін'єкцій	1,0 мл	розчинник

Для приготування розчину були досліджені режими розчинення субстанції ОБ, лідокаїну гідрохлориду, тривалість і швидкість перемішування при розчиненні, а також обрана послідовність введення інгредієнтів у розчин.

*Наступним етапом наших досліджень був вибір фільтрувального матеріалу, який найбільш сумісний з розчином і забезпечує необхідну очистку розчину від механічних часток і мікроорганізмів.*

Для встановлення взаємного впливу розчину і фільтрувальних матеріалів, які застосовуються у виробництві парентеральних розчинів, нами вивчалися мембранні фільтри, виготовлені з капрону (типу «МІФІЛ», Білорусь), нейлону (типу «Ultrapor N 66», фірми «Палл», Німеччина), поліефірсульфону (типу «PROPOR PES», фірми «Домнік Хантер», Англія). Вивчалися мембрани з розміром пор 0,45 мкм (попередня фільтрація) і 0,2 мкм (остаточна фільтрація). Матеріал вважався придатним, якщо показники трьох паралельних випробувань збігалися з даними контрольного розчину (табл. 3).

Результати проведених досліджень показали сумісність розчину на основі ОБ із зазначеними фільтрувальними матеріалами, так як не спостерігалось зміни фізико-хімічних властивостей розчину. Крім того, матеріал для цих типів фільтратів за робочим діапазоном рН відповідав досліджуваному розчину, витримував термічну стерилізацію і був сумісний зі складом розчину.

Встановлено, що процес фільтрації проводили під тиском інертного газу (0,06 МПа), що забезпечував оптимальну тривалість фільтрації та отримання якісного проміжного продукту, що відповідав вимогам на відсутність механічних включень і стерильності.

*У подальшому для розробки режиму ліофілізації визначали умови заморожування і сублімаційного сушіння розчину ОБ.*

*Першою стадією процесу ліофілізації є заморожування розчину. На першому етапі встановили точку евтектики розчину на основі ОБ, яка складає  $-5^{\circ}\text{C}$ . Потім послідовно проводили визначення температури і способу заморожування.*

Для вивчення впливу тривалості заморожування на якість кінцевого продукту розчин розливали по 1 мл у флакони на 5 мл і заморожували на полиці

сублимаційної установки до  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), застосовуючи повільне і швидке заморожування.

Таблиця 3

**Результати дослідження сумісності розчину на основі ОБ  
з фільтрувальними матеріалами**

Показники якості	Тривалість фільтрації, хв	Матеріал фільтра		
		капрон	нейлон	поліефір-сульфон
рН (4,0–6,0)	0 (контрольний розчин)	5,35±0,03	5,35±0,03	5,35±0,04
	20	5,42±0,03	5,32±0,02	5,35±0,03
	30	5,42±0,04	5,35±0,03	5,31±0,04
	40	5,40±0,03	5,36±0,02	5,32±0,02
Прозорість	0	прозорий	прозорий	прозорий
	20, 30, 40	прозорий	прозорий	прозорий
Кольоровість (не більше Y5)	0	Y6	Y6	Y6
	20, 30, 40	Y6	Y6	Y6
Механічні включення - частинки фільтру, що відшарувалися	0	відсутні	відсутні	відсутні
	20, 30, 40	відсутні	відсутні	відсутні
Кількісний вміст ОБ (у перерахунку на мелітин), мг/мл:(0,90-1,10)	0	0,93±0,04	0,92±0,03	0,93±0,04
	20, 30, 40	0,99±0,05	0,99±0,04	0,98±0,04
Кількісний вміст лідокаїну гідрохлориду, мг/мл (0,45–0,55)	20, 30, 40	0,49±0,01	0,49±0,02	0,48±0,03

Примітка. Кількість вимірів  $n = 5$ ;  $P = 95\%$ .

При повільному заморожуванні знижували температуру напівпродукту у камері ліофільної сушки від  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  з різним інтервалом витримки – протягом 20 год. При швидкому заморожуванні знижували температуру від  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  з коротшим інтервалом витримки – протягом 8 год (рис. 1).

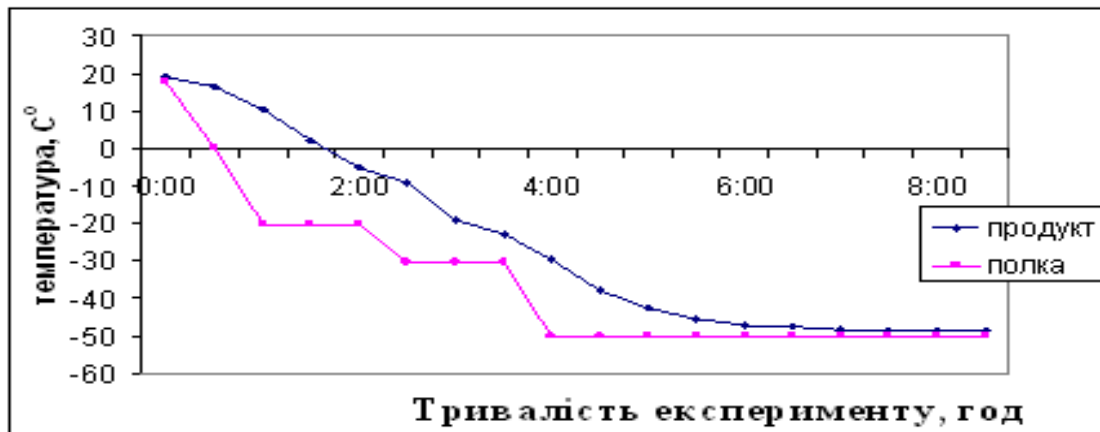


Рис.1. Кінетична крива швидкого заморожування розчину на основі ОБ

Одночасно з розробкою складу та режиму заморожування проводили *вивчення впливу товщини шару розчину на якість висушеного препарату*. З цією метою розчин на основі ОБ дозували у флакони місткістю 5 мл по 1, 2 і 4 мл. Зразки препарату проходили процес ліофілізації у сушарці згідно з обраним режимом (рис. 2).

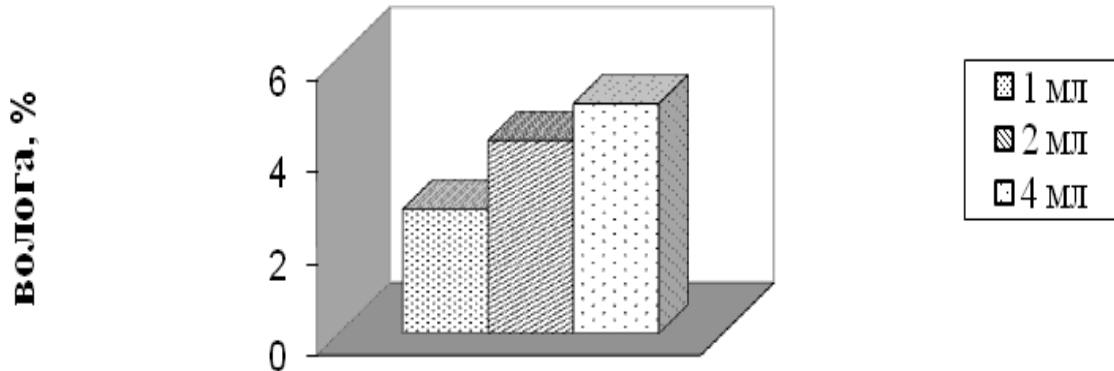


Рис. 2. Вплив товщини шару розчину у флаконі на показник залишкової вологи у ліофілізаті ОБ

З рис. 2 видно, що у флаконах з об'ємом наповнення 2 мл залишкова волога становила 4,5 %, а з об'ємом наповнення 4 мл – 5 %, що не відповідало встановленій специфікації. Тому для ліофілізації було визначено товщину шару ( $9,0 \pm 1$  мм) при проведенні висушування препарату у флаконах місткістю 5 мл з об'ємом наповнення 1 мл, де залишкова волога становила 3,2 %, кількісний вміст ОБ (по мелітину) і рН розчину відповідали показникам якості.

Після визначення товщини шару *вивчався вплив способу заморожування на якість ліофілізату для ін'єкцій ОБ одразу після виготовлення і в процесі зберігання протягом 12 місяців за такими показниками: зовнішній вигляд, прозорість, волога, розчинність, значення рН, кількісний вміст ОБ (по мелітину), кількісний вміст лідокаїну гідрохлориду*. Показники якості ліофілізату для ін'єкцій на основі ОБ наведено у табл. 4.

Як видно з табл. 4 показники якості при швидкому та повільному заморожуванні відповідали встановленим вимогам. У зв'язку з цим нами обраний більш економний режим – швидке заморожування.

*Другим етапом ліофілізації є сублімаційне сушіння, режим якого необхідно було визначити експериментально.*

З цією метою вивчали вплив швидкості підігріву напівпродукту, тривалість сублімаційного сушіння і температури досушування.

При проведенні досліджень розчин ОБ дозували по 1 мл у флакони місткістю по 5 мл (товщина шару становила 9–10 мм) і піддавали швидкому заморожуванню, як описано вище. Після цього проводили сублімаційне сушіння замороженого розчину ОБ, використовуючи чотири різні режими. При всіх режимах полиці ліофільної камери витримували при температурі  $-50$  °С і мінімальному тиску в камері (4,0–6,0 Па) протягом 4 год.

Далі полиці нагрівали від  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$  при різному інтервалі збільшення температури підігріву та різному терміну витримки. При повільному збільшенні температури (режим № 1) процес тривав 41 год, при більш швидкому – 33 год (режим 2 і 4) та 26 год (режим 3).

Таблиця 4

**Результати визначення впливу способу заморожування на стабільність ліофілізату на основі ОБ при виготовленні і зберіганні протягом 12 місяців**

Показники якості	Тривалість зберігання, міс.	Спосіб заморожування	
		повільний	швидкий
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
Після розчинення у воді для ін'єкцій			
Прозорість (має бути прозорим порівняно з водою <i>P</i> )	0	прозорий	прозорий
	12	прозорий	прозорий
рН (4,0–6,0)	0	$5,50 \pm 0,05$	$5,55 \pm 0,06$
	12	$5,40 \pm 0,04$	$5,45 \pm 0,04$
Розчинність (легко розчинний в 1 мл протягом 1 хвилини)	0	відповідає	відповідає
	12	відповідає	відповідає
Вологість (не більше 4,0 %)	0	$2,60 \pm 0,02$	$2,62 \pm 0,03$
	12	$2,62 \pm 0,01$	$2,63 \pm 0,02$
Кількісний вміст ОБ в перерахунку на мелітин, мг/мл (0,90–1,10)	0	$0,96 \pm 0,04$	$0,97 \pm 0,03$
	12	$0,96 \pm 0,02$	$0,96 \pm 0,03$
Кількісний вміст лідокаїну гідрохлориду, мг/мл (0,45–0,55)	0	$0,49 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,02$
	12	$0,48 \pm 0,03$	$0,49 \pm 0,02$

Примітка. Кількість вимірів  $n = 5$ ;  $P = 95\%$ .

У результаті вивчення режимів сублимаційного сушіння та контролю якості отриманого препарату нами рекомендований режим № 4 (рис. 3).

Як видно з рис. 3, полиці витримували при температурі  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  і мінімальному тиску в камері (4,0–6,0 Па) протягом 4 год, далі їх нагрівали від  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  зі швидкістю  $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{год}$ , потім – від  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  зі швидкістю  $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{год}$ , а від  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$  – зі швидкістю  $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{год}$ . Після досягнення напівпродуком температури  $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$  (мінімальний тиск в камері 4,0 Па) його витримували при зазначеній температурі протягом 4 год. Процес тривав 33 год. Порівняльні дані режимів сублимаційного сушіння наведено у табл. 5.

Після завершення процесу сушіння вакуум у сублимаційній камері гасили чистим азотом, який пропускали крізь стерильний фільтр з розміром пор  $0,22\text{ }\mu\text{m}$ .

За результатами проведених досліджень препарат відповідав показникам якості: опис (колір, пористість, однорідність), розчинність у воді, прозорість і значення рН після розчинення в 1 мл води для ін'єкцій, втрата у масі при висушуванні.

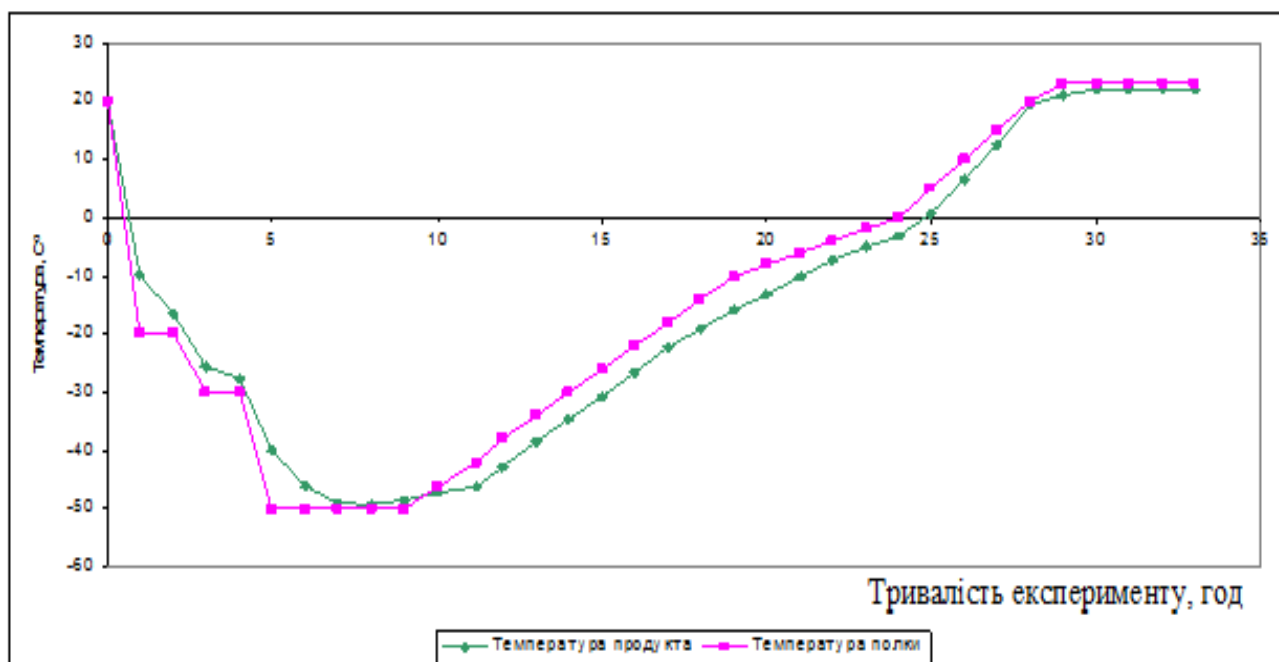


Рис. 3. Кінетична крива сублімаційного сушіння розчину на основі ОБ відповідно режиму № 4

Таблиця 5

**Вплив режимів сублімаційного сушіння на показники якості ліофілізату на основі ОБ**

Режим сушки	Опис	Розчинність	Залишкова вологість, %	Прозорість
№ 1	Суха щільна маса білого кольору	Розчинний в 1мл води для ін'єкцій протягом 3 хв.	2,0	прозорий
№ 2	Суха пориста маса білого кольору	Розчинний в 1мл води для ін'єкцій протягом 5 хв.	3,0	прозорий
№ 3	Неоднорідна пориста маса	Розчинний в 1мл води для ін'єкцій протягом 5 хв, розчин мутний	3,8	непрозорий
№ 4	Суха пориста маса білого кольору	Легкорозчинний в 1мл води для ін'єкцій протягом 1 хв.	2,6	прозорий

Таким чином, нами розроблено режим ліофілізації розчину для ін'єкцій на основі ОБ при швидкому заморожуванні напівпродукту та при режимі № 4. Обраний

режим вимагає меншого часу сушіння, тобто менших енерговитрат з отриманням продукту відповідної якості та з найменшою втратою у масі – 2,6 %.

Наступним етапом дослідження стало визначення впливу *різних видів первинного пакування* на стабільність ліофілізату при зберіганні протягом 24 місяців у флаконах з марки скла НС-1і УСП-1 (табл. 6).

Таблиця 6

**Показники якості ліофілізату при зберіганні у флаконах із різних марок скла протягом 24 місяців**

Показники якості	Тривалість спостереження	Марки скла	
		НС-1	УСП-1
Опис	вихідні дані	суха пориста маса білого кольору	суха пориста маса білого кольору
	2 роки	суха пориста маса білого кольору	суха пориста маса білого кольору
Після розчинення у воді для ін'єкцій			
Прозорість	вихідні дані	прозорий	прозорий
	2 роки	прозорий	прозорий
Кольоровість (не більше $Y_5$ )	вихідні дані	відповідає	відповідає
	2 роки	відповідає	відповідає
рН розчину (4,0–6,0)	вихідні дані	5,30±0,03	5,30±0,02
	2 роки	5,36±0,05	5,32±0,02
Механічні включення	вихідні дані	відсутні	відсутні
	2 роки	відсутні	відсутні
Втрата в масі при висушуванні (не більше 4,0 %)	вихідні дані	2,6±0,01	2,6±0,02
	2 роки	3,2±0,03	2,9±0,03
<b>Кількісний вміст, мг/мл</b>			
ОБ (у перерахунку на мелітин), мг/мл (0,90–1,10)	вихідні дані	0,96±0,01	0,96±0,02
	2 роки	0,94±0,02	0,95±0,03
Лідокаїну гідрохлорид, мг/мл (0,45–0,55)	вихідні дані	0,51±0,01	0,51±0,001
	2 роки	0,48±0,01	0,49±0,001

Примітка:  $n = 5$ ;  $P = 0,95$ .

Як видно з даних табл. 6, флакони з марок скла НС-1 та УСП-1 дозволяють одержати ЛЗ стабільний протягом 2 років зберігання.

У промислових умовах нами було проведено оптимізацію критичних параметрів технологічного процесу та корекцію алгоритму виробництва препарату «Апікаїн-Р» для приготування розчину для ін'єкцій (*ex tempore*) по 1 мг у флаконах на 5 мл.

На основі проведених досліджень було розроблено та апробовано у промислових умовах технологію отримання ЛЗ «Апікаїн-Р» – ліофілізованого порошку ОБ для приготування розчину для ін'єкцій.

Схема технологічного процесу приготування ЛЗ «Апікаїн-Р» – ліофілізат для приготування розчину для ін'єкцій наведена на рис. 4.

*Вихідна сировина,  
проміжні продукти*

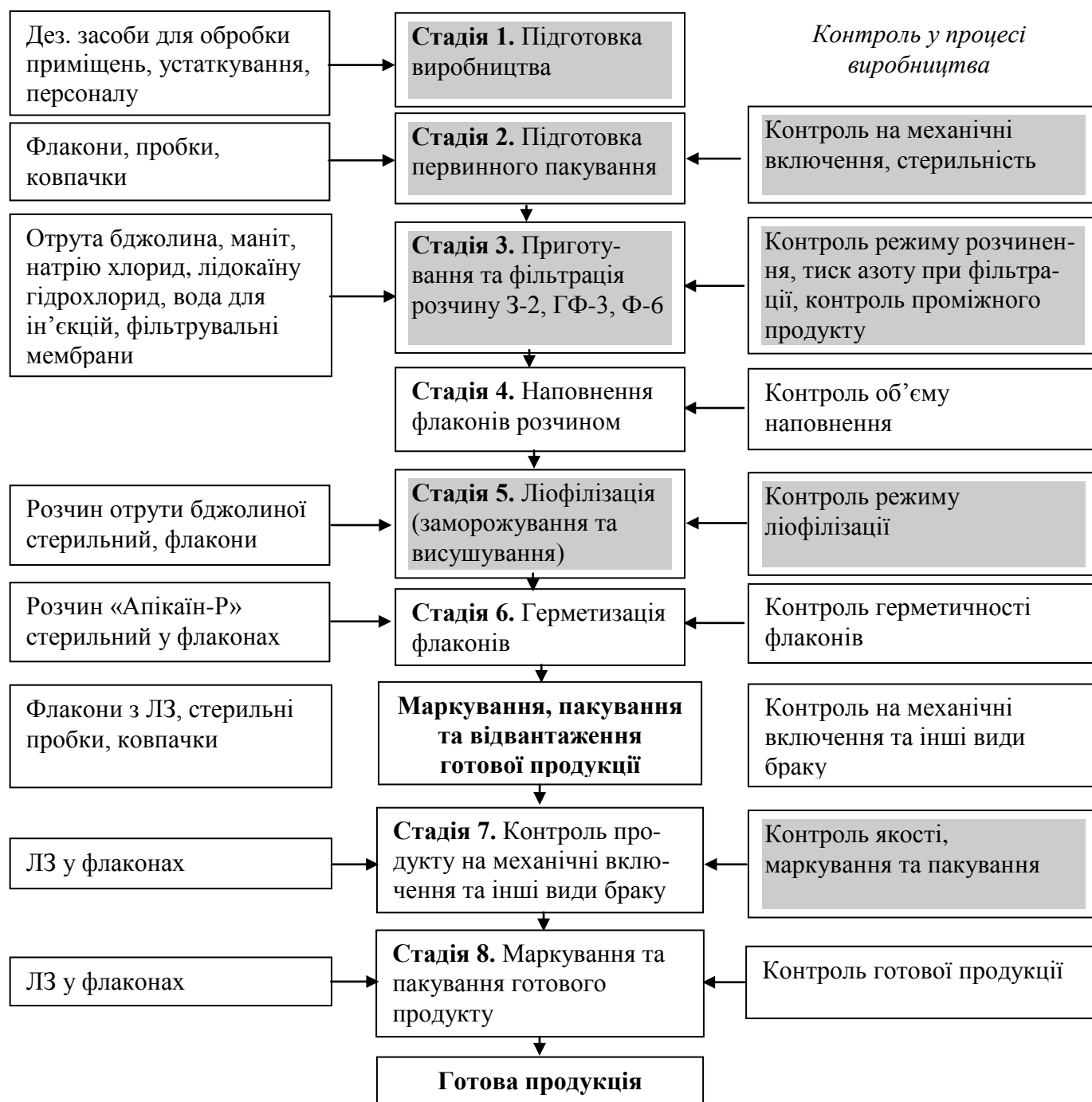


Рис. 4. Технологічна схема виробництва ЛЗ «Апікаїн-Р»

Технологічні дослідження з розробки режиму ліофілізації виконувались на базі лабораторії кріовакуумного консервування біологічних субстратів при Тернопільському державному медичному університеті імені І. Я. Горбачевського та при Тернопільській обласній станції переливання крові та ПАТ «Фармстандарт-Біолік» (м. Харків).

У розділі 4 «Розробка показників якості лікарського засобу «Апікаїн-Р»» опрацьовано методики визначення основних АФІ ЛЗ «Апікаїн-Р» на основі нормативної документації на ОБ.

Аналітичні дослідження проводилися на базі державної науково-дослідної лабораторії контролю якості лікарських засобів «Національний фармацевтичний університет» (м. Харків) під керівництвом завідувача лабораторії С. М. Губарь.

Якість ліофілізованого порошку ОБ також було підтверджено методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), який дозволяє одночасно визначати основні компоненти. Це дало можливість ідентифікувати поліпептид мелітин, апамін, фермент фосфоліпазу А2 та МСД-пептид. У ході досліджень використано хроматографічну колонку Lichroprep RP-8, Nucleosi 100-5 C18. Найкращі результати отримано на колонках із розміром пор 180 та 300 А. Детектування проводили при 220 нм.

Лідокаїну гідрохлорид дає на хроматограмі відокремлений пік. У зв'язку з цим за хроматографічним профілем можливе здійснення ідентифікації ОБ по мелітину і лідокаїну гідрохлориду.

Таким чином розроблена методика та показана можливість кількісного визначення мелітину у розчині ОБ та її ліофілізату з лідокаїну гідрохлоридом методом зовнішнього стандарту.

За результатами ВЕРХ виявлено, що вміст ОБ (у перерахунку на мелітин) у ліофілізаті становив 0,90–1,10 мг/мл, а лідокаїну гідрохлорид – 0,45–0,55 мг/мл.

У розділі 5 «Мікробіологічні і фармакологічні дослідження лікарського засобу «Апікаїн-Р»» наведено узагальнені результати вивчення «мікробіологічної чистоти» ОБ як вихідної речовини, а також описано визначення показника «стерильність» та фармакологічні дослідження ЛЗ «Апікаїн-Р».

*Вивчення мікробіологічної чистоти ОБ як вихідної речовини.* Мікробіологічні дослідження виконувалися на базі ДУ «Інститут мікробіології і імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України» (м. Харків) у лабораторії біохімії мікроорганізмів і харчових середовищ під керівництвом завідувача лабораторії Т. П. Осолодченко.

Отрута бджолина, що використана як АФІ для виготовлення ЛЗ «Апікаїн –Р», є досить нестійкою речовиною. У зв'язку з тим, що в процесі приготування не передбачена теплова стерилізація, доцільно було визначити «мікробіологічну чистоту» субстанції для розробки таких технологічних процесів, які в повній мірі гарантують стерильність готового ЛЗ.

Визначення показника «мікробіологічна чистота» проводили методом прямого посіву на рідкі середовища (бактерії) та глибокого посіву на агар (гриби) згідно з вимогами Державної фармакопеї України (ДФУ).

Випробування ОБ за показником «мікробіологічна чистота» встановили її відповідність нормам ДФУ 1.4 (2.6.12, 2.6.13) як для готового ЛЗ: в 1 г ОБ загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів – менше  $10^2$  бактерій і грибів сумарно. *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus* і представники родини *Escherichia coli* відсутні.



Визначення показника «стерильність» ліофілізованого порошку для приготування ін'єкційного розчину проводили згідно з методиками ДФУ. Для чого готували 3 серії розчину по 5 флаконів ліофілізованого порошку ОБ та розчиняли в 1мл води для ін'єкцій. Встановлена відповідність розробленого ЛЗ «Апікаїн-Р» нормам ДФУ за показником «стерильність».

*Фармакологічні дослідження лікарського препарату «Апікаїн-Р» спрямовані на вивчення місцевоподразнювальної дії, токсичності при підшкірному одноразовому введенні, гемостимулювальної активності при циклофосфан-індукованому пригніченні кровотворення у мишей.*

Фармакологічні дослідження проводилися на базі ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і виробів медичного призначення» (ДП «ДНЦЛЗ», м. Харків) у лабораторії лікарської і промислової токсикології під керівництвом проф. Н. С. Нікітіної.

Вивчення місцевоподразнювальної дії було проведено при двох шляхах введення: внутрішньом'язовому та підшкірному. Встановлено, що внутрішньом'язове введення викликає виражену місцево подразнюючу дію. При підшкірному шляху введення подразнююча дія виражена менше.

Вивчення токсичності ЛЗ «Апікаїн-Р» при одноразовому введенні показало, що у місцях введення препарату подразнень, гіперемії не виявлено, і підшкірне введення препарату не спричиняє токсичного впливу на масу тіла тварин. Загибелі тварин усіх експериментальних груп не відзначалося. Результати показали, що досліджуваний ЛЗ «Апікаїн-Р» можна віднести до групи токсично безпечних. При підшкірному введенні доза становила у перерахунку на мелітин 1 мг/мл, що також відповідає терапевтичній концентрації в аналогічних препаратах з ОБ.

Специфічну гемостимулюючу активність препарату «Апікаїн-Р» досліджували за загальноприйнятими методиками, що дозволили визначити і кількісно оцінити вплив препарату на морфологічні показники гемопоезу, у тому числі кістково-мозкового, в умовах його пригнічення введенням цитостатику. При цьому оцінювали також деякі інтегральні показники життєдіяльності тварин, які відображають вираженість патології і ефект лікування ЛЗ «Апікаїн-Р». Для моделювання мієлосупресії було обрано циклофосфан. Результати оцінки дії препарату на склад периферичної крові й на процеси кістково-мозкового кровотворення тварин в умовах мієлосупресії, показали, що ЛЗ «Апікаїн-Р» має очевидний фармакотерапевтичний ефект і спрямований на нормалізацію показників периферійної крові та на процеси кістково-мозкового кровотворення при його введенні в дозах 0,5 і 2,5 мг/кг.

## ВИСНОВКИ

Теоретично узагальнено та експериментально визначено наукові підходи щодо обґрунтування складу і розробки раціональної технології розчину для ін'єкцій «Апікаїн-Р» – ліофілізований порошок ОБ для лікування онко- та імунопатологій.

1. Вивчено фармацевтичний ринок ЛЗ для лікування онко- та імунопатологій в Україні. Встановлено, що найбільша кількість даних препаратів представлена у

вигляді ЛЗ для парентерального застосування, на частку яких припадає близько 59 % (в основному закордонного виробництва).

2. На підставі аналізу даних літературних джерел встановлено, що ОБ містить понад 360 біологічно активних речовин, завдяки чому вона виявляє різноманітні фармакологічні ефекти, що, у свою чергу, робить її потенційним джерелом для розробки нових ЛЗ різного спектру дії.

3. Обґрунтовано загальну методологію досліджень, яка враховує особливості підходу до виробництва ЛЗ «Апікаїн-Р» – ліофілізат для приготування розчину для ін'єкцій по 1 мг у флаконах місткістю 5 мл у поєднанні з ампулою – 1 мл води для ін'єкцій.

4. На підставі проведених фізико-хімічних, фармакотехнологічних, мікробіологічних і фармакологічних досліджень науково обґрунтовано склад розчину для подальшої ліофілізації: ОБ – 1,0 мг; лідокаїну гідрохлорид – 0,5 мг; маніт – 20,0 мг; натрію хлорид – 6,0 мг; вода для ін'єкцій – до 1 мл.

5. Експериментально обґрунтовано та розроблено раціональну технологію ліофілізації для отримання ЛЗ на основі отрути бджолиної – «Апікаїн-Р».

Експериментальними дослідженнями підтверджено оптимальний рівень рН розчину ОБ (4,0–6,0), який підлягає подальшій ліофілізації. Визначено режим процесу стерильної фільтрації з використанням фільтрувальних мембран (попередня – рейтинг пор 0,45 мкм, остаточна – 0,2 мкм) під тиском інертного фільтрованого газу азоту (не менш ніж 0,06 МПа).

Вивчено та встановлено оптимальний режим ліофілізації розчину для одержання ЛЗ «Апікаїн-Р»: перший етап – швидке заморожування при зниженні температури від +20 °С до –50 °С з інтервалом витримки – протягом 8 год; другий етап – сублімаційне сушіння – протягом 33 год при температурі –50 до +22 °С (мінімальний тиск у камері 4,0 Па) з витримкою при кінцевій температурі протягом 4 год. Після завершення процесу сушіння вакуум у сублімаційній камері гасився чистим азотом, пропущеним крізь стерильний фільтр з розміром пор 0,22 мкм.

6. Експериментально встановлено фізико-хімічні та фармакотехнологічні показники розробленого ЛЗ «Апікаїн-Р». Ліофілізат після розведення водою для ін'єкцій відповідав показникам якості: прозорість, кольоровість, механічні включення відповідали вимогам ДФУ; рН становив – 4,0–6,0; кількісний вміст ОБ (у перерахунку на мелітин) у ліофілізаті дорівнював 0,90–1,10 мг/мл, а лідокаїну гідрохлорид – 0,45–0,55 мг/мл.

Визначено товщину шару ліофільного препарату, яка становила в ампулах 14±1 мм, у флаконах місткістю 5 мл – 9±1 мм відповідно. Залишкова вологість препарату у флаконах – 3,2 %, в ампулах – 3,7 %.

7. Експериментально доведено вплив різних видів первинного пакування на стабільність розробленого ЛЗ «Апікаїн-Р» при зберіганні, що дозволило встановити термін його придатності 2 роки у флаконах з марок скла НС-1і УСП-1. Встановлено, що обидві марки скла можуть бути використані.

Розроблено та затверджено проекти технологічного регламенту та методик контролю якості на виробництво запропонованого ЛЗ «Апікаїн-Р», який апробовано в умовах промислового виробництва на ПАТ «Фармстандарт-Біолік» (м. Харків).

Результати проведених досліджень підтверджені патентами України на корисну модель та на винахід «Ліофілізований препарат для ін'єкцій» № 97105 від 25.02.2015 р. та № 111273 від 11.04.2016 р. відповідно. Фрагменти дисертаційної роботи впроваджено у навчальний процес ряду вищих медичних і фармацевтичних закладів України.

8. Мікробіологічними дослідженнями встановлено, що ОБ як вихідна сировина за показником «мікробіологічна чистота» відповідає нормам ДФУ. Доведено також відповідність розробленого ЛЗ «Апікаїн-Р» нормам ДФУ при перевірці на «стерильність».

Фармакологічними дослідженнями встановлено, що на моделі мієлосупресії, викликаній циклофосфаном, ЛЗ «Апікаїн-Р» має стимулюючу дію на процеси кістково-мозкового кровотворення при його введенні в дозах 0,5 і 2,5 мг/кг. Доза при підшкірному одноразовому введенні становила у перерахунку на мелітин 1 мг/мл, що відповідає терапевтичній концентрації в аналогічних препаратах з ОБ.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у фахових виданнях

1. Тихонов О. І. Теоретичні аспекти розробки загальної статті до державної фармакопеї України по виготовленню гомеопатичних базисних препаратів / О. І. Тихонов, С. О. Тихонова, О. О. Гайдукова, Г. Б. Юр'єва, О. Ю. Сергєєва, Р. І. Скрипник-Тихонов // Вісник фармації. – 2009. – № 4 (60). – С. 42–49. (*Особистий внесок*: вивчення особливостей виготовлення гомеопатичних базисних препаратів, оформлення статті).

2. Тихонов А. И. Разработка методики анализа яда пчелиного методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / А. И. Тихонов, С. Н. Коваленко, В. И. Гусаров, Р. И. Скрыпник-Тихонов // Медицинский альманах, 2011. – № 4 (17). – С. 263–266. (*Особистий внесок*: планування експерименту, статистична обробка та інтерпретація результатів, підготовка статті).

3. Сирота П. С. Мікробіологічні дослідження отрути бджолиної / П. С. Сирота, Р. І. Скрипник-Тихонов // Військова медицина України. – 2012. – Т. 12, № 4. – С. 73–78. (*Особистий внесок*: приготування зразків препаратів, узагальнення результатів досліджень, оформлення статті).

4. Tikhonov A. I. The problem of development of the direction for creation and manufacture of medicines with bee pro / A. I. Tikhonov, O. G. Bashura, T. G. Yarnykh, S. A. Tikhonova, R. I. Skrypnik-Tikhonov. – Kharkov: News of Pharmacy, 2013. – P. 37–42. (*Особистий внесок*: вивчення літературних джерел щодо проблеми створення лікарських препаратів з отрутою бджолиною, інтерпретація результатів, підготовка статті).

5. Skrypnik-Tikhonov R. I. Development of composition and some technology aspects of frozen-dried medicine on the basis of bee venom / R. I. Skrypnik-Tikhonov, P. S. Sirota, A. I. Tikhonov, M. S. Almaev, L. G. Naumenok, N. V. Begunova // The Pharma Innovation Journal. – Deli (India), 2015. – Vol. 4, Issue 3. – P. 82–85. (*Особистий внесок*: проведення експерименту, узагальнення результатів досліджень, оформлення статті).

6. Скрипник-Тихонов Р. І. Вибір оптимальних режимів фільтрації та заморожування для ліофілізованого препарату на основі бджолиної отрути / Р. І. Скрипник-Тихонов, П. С. Сирота, О. І. Тихонов, Л. Г. Алмакаєва, О. І. Тихонов, Л. Г. Алмакаєва, Л. Г. Науменок // Фармацевтичний журнал. – 2015. – № 3. – С. 45–52. (*Особистий внесок*: планування експерименту, інтерпретація результатів, оформлення статті).

### Монографії

7. Тихонов А. И. Яд пчелиный в фармации и медицине (теория, технология, медицинское применение) / А. И. Тихонов, Л. И. Бондарчук, С. А. Тихонова, К. Б. Содзавичный, А. Б. Юрьева, Р. И. Скрыпник-Тихонов. и др. : монографія; под ред. А. И. Тихонова. – Х. : Оригинал, 2010. – 280 с. (*Особистий внесок*: участь у формуванні, написанні і оформленні розділів монографії).

8. Tichonow A. I. Jad pszczeli w farmacji i medycynie (teoria, technologia, zastosowanie lecznicze) / A. I. Tichonow, L. I. Bodnarczuk, S. A. Tichonowa, K. Sodzawiczny, A. B. Juriewa, R. I. Skrypnik-Tichonow, W. W. Michajczenko, N. A. Czernaja; pod redakcja A. I. Tichonowa. – Myslenice; Apipol-Farma, 2011. – 240 s. (*Особистий внесок*: участь у формуванні, написанні та оформленні розділів монографії).

### Патенти

9. Патент на корисну модель № 97105 Україна МПК (2015.01) А61К 9/14 (2006.01), А61К 35/00 (2006.01), А61К 35/56. Ліофілізований препарат для ін'єкцій / О. І. Тихонов, Л. Г. Алмакаєва, Р. І. Скрипник-Тихонов. – № u 2014 11347, заявл. 17.10.2014, опубл. 25.02.2015, Бюл. № 4. – 4 с. (*Особистий внесок*: планування патентного пошуку, розробка технології ліофілізованого препарату для ін'єкцій, участь у підготовці формули винаходу та опису до патенту).

10. Патент на винахід № 111273 Україна МПК (2016.01) А61К 9/14 (2006.01), А61К 35/00. Ліофілізований препарат для ін'єкцій / О. І. Тихонов, Л. Г. Алмакаєва, Р. І. Скрипник-Тихонов. – № a 2014 11344, заявл. 17.10.2014, опубл. 11.04.2016, Бюл. № 7. – 3 с. (*Особистий внесок*: планування патентного пошуку, розробка технології ліофілізованого препарату для ін'єкцій, участь у підготовці формули корисної моделі та опису до патенту).

### Авторські свідоцтва

11. Авторське свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір № 59987. Методичні рекомендації «Інструкція по лікуванню бджолиною отрутою» / О. І. Тихонов, С. О. Тихонова, Р. І. Скрипник-Тихонов, О. С. Шпичак // Державна служба інтелектуальної власності України, дата реєстрації: 04.06.2015. – Харків, 2015. – 1 с.

12. Авторське свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір № 59988. Монографія «Яд пчелиный в фармации и медицине» / О. І. Тихонов, Р. І. Скрипник-Тихонов // Державна служба інтелектуальної власності України, дата реєстрації: 04.06.2015. – Харків, 2015. – 1 с.

13. Авторське свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір № 60550. Методичні рекомендації «Інноваційні підходи в апітерапії» / О. І. Тихонов,

С. О. Тихонова, Р. І. Скрипник-Тихонов, О. С. Шпичак // Державна служба інтелектуальної власності України, дата реєстрації: 07.07.2015. – Харків, 2015. – 1 с.

### **Методичні рекомендації**

14. Інструкція по лікуванню бджолою отрутою : метод. рек. / О. І. Тихонов, С. О. Тихонова, Р. І. Скрипник-Тихонов [та ін.], за ред. О. І. Тихонова. – Х., 2014. – 31 с. (*Особистий внесок*: планування змісту методичних рекомендацій, участь у написанні).

15. Інноваційні підходи в апітерапії: метод. рек. / О. І. Тихонов, Р. І. Скрипник-Тихонов [та ін.], за ред. О. І. Тихонова. – К., 2015. – 32 с. (*Особистий внесок*: планування змісту методичних рекомендацій, участь у написанні).

16. Інноваційні підходи в апітерапії: метод. рек. / О. І. Тихонов, Р. І. Скрипник-Тихонов [та ін.], за ред. О. І. Тихонова. – Вид. 2-ге, допов. та перероб. – К., 2015. – 55 с. (*Особистий внесок*: планування змісту методичних рекомендацій, участь у написанні).

17. Технологія виготовлення екстемпоральних лікарських апіпрепаратів і їх застосування в фармації, медицині та косметології : метод. рек. / О. І. Тихонов, Р. І. Скрипник-Тихонов [та ін.], за ред. О. І. Тихонова. – Х., 2016. – 75 с. (*Особистий внесок*: планування змісту методичних рекомендацій, участь у написанні).

### **Тези**

18. Скрипник-Тихонов Р. І. Современное состояние гомеопатической фармации на Украине / Р. И. Скрипник-Тихонов, А. И. Тихонов, С. А. Тихонова // матер. наук.-практ. інтернет-конф. «Сучасні напрямки розвитку гомеопатії в Україні». – Х., 26–27 листоп. 2009 р. – С. 7. (*Особистий внесок*: проведення огляду літератури, підготовка тез).

19. Методи приготування гомеопатичних базисних препаратів і потенціювання. / О. І. Тихонов, С. О. Тихонова, Р. І. Скрипник-Тихонов та ін. // Державна фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-е вид., 3 доповнення. – Х., 2009. – С. 141–145. (*Особистий внесок*: аналіз та узагальнення даних, підготовка тез).

20. Тихонов А. И. Состояние гомеопатической фармации на Украине / / А. И. Тихонов, С. А. Тихонова, Е. А. Гайдукова, О. Ю. Сергеева, А. В. Шереметьева, Р. И. Скрипник-Тихонов // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. под. ред. М. В. Гаврилина. – Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2010. – Вып. 65. – С. 759, 760. (*Особистий внесок*: проведення огляду літератури, підготовка тез).

21. Скрипник-Тихонов Р. І. Перспективи розробки апіпрепаратів для фармакотерапії онкологічних захворювань / Р. І. Скрипник-Тихонов, О. І. Тихонов // матер. Всеукраїнської наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених «Актуальні питання створення нових лікарських засобів». – Х., 2010. – С. 213. (*Особистий внесок*: проведення огляду літератури, підготовка тез).

22. Скрипник-Тихонов Р. І. Дослідження по розробці технології ін'єкційного лікарського препарату отрути бджолою / Р. І. Скрипник-Тихонов, О. І. Тихонов та ін. // Апітерапія: сьогодні та майбутнє : матер. IV з'їзду апітерапевтів України. –

К., 12–13 трав. 2011 р. – С. 57–62. (*Особистий внесок*: аналіз та узагальнення даних, підготовка тез).

23. Скрипник-Тихонов Р. І. Фізико-хімічні дослідження розчину для ін'єкцій отрути бджолої / Р. І. Скрипник-Тихонов, Г. Б. Юр'єва // матер. Всеукр. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених, присвяченої 140-річчю з дня народження доктора фармацевтичних та хімічних наук, професора Миколи Овксентійовича Валяшка. – Х., 2011. – С. 224, 225. (*Особистий внесок*: аналіз та узагальнення даних, підготовка тез).

24. Скрипник-Тихонов Р. І. Розробка технології ліофілізованого порошку отрути бджолої для ін'єкцій / Р. І. Скрипник-Тихонов, Г. Б. Юр'єва // матер. II наук.-практ. конф. з міжн. участю. – Х., 2011. – С. 186, 187. (*Особистий внесок*: проведення дослідження, аналіз та узагальнення даних, підготовка тез).

25. Скрипник-Тихонов Р. І. Доказова фармація: безпечність отрути бджолої у складі лікарських препаратів / Р. І. Скрипник-Тихонов, Г. Б. Юр'єва // матер. VIII наук.-практ. конф. «Досудове слідство, фармацевтичне і медичне право, як складові державної політики України у протидії наркозлочинності та поширенню наркоманії». – Х., 2011. – С. 241. (*Особистий внесок*: проведення огляду літератури, підготовка тез).

26. Скрипник-Тихонов Р. І. Дослідження розчину отрути бджолої // матер. VII Національного з'їзду фармацевтів України «Фармація України. Погляд у майбутнє». – Х., 15–17 верес. 2013 р. – С. 427. (*Особистий внесок*: проведення дослідження, аналіз та узагальнення даних, підготовка тез).

27. Скрипник-Тихонов Р. І. Количественное определение мелиттина в лиофилизате яда пчелиного / Р. І. Скрипник-Тихонов, П. С. Сирота // матер. VI наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Управління якістю в фармації». – Х., 2013. – С. 125, 126. (*Особистий внесок*: проведення дослідження, аналіз та узагальнення даних, підготовка тез).

28. Скрипник-Тихонов Р. І. Застосування препаратів отрути бджолої для лікування онкологічних захворювань / Р. І. Скрипник-Тихонов, П. С. Сирота // наук. конф. молодих вчених. – К., 21–22 берез. 2014. – С. 83, 84. (*Особистий внесок*: проведення огляду літератури, підготовка тез).

29. Скрипник-Тихонов Р. І. Вивчення очищеної отрути бджолої // наук.-практ. журн. «Український медичний альманах». – Луганськ. – Т. 17, № 1. – 2014. – С. 241. (*Особистий внесок*: аналіз та узагальнення даних, підготовка тез).

30. Скрипник-Тихонов Р. І. Технологія розчинів отрути бджолої різної концентрації / Р. І. Скрипник-Тихонов, П. С. Сирота // матер. I міжн. наук.-практ. інтернет-конф. «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії». – Х. : НФаУ, 7–8 листоп, 2014 р. – С. 157, 158. (*Особистий внесок*: проведення дослідження, аналіз та узагальнення даних, підготовка тез).

31. Skrypnik-Tichonov R. I. Application of high fragments for fluids in progress chromatography methods for determining the quality of bee venom / R. I. Skrypnik-Tichonov, Syrota P. S. // Topical issues of new drugs development. – Kh. : Publishing

office NUPh, April 23, 2015. – P. 223. (*Особистий внесок*: проведення дослідження, аналіз та узагальнення даних, підготовка тез).

32. Tikhonov A. I. Current status of the apipreparation the national university of pharmacy / A. I. Tikhonov, O. S. Shpychak, R. I. Skrypnyk-Tkhonov a oth. // Modern directions in chemistry, biology, pharmacy and biotechnology: International scientific congress. – Lviv, 29 September-2 October 2015. – P. 190–195. (*Особистий внесок*: аналіз та узагальнення даних, підготовка тез).

33. Скрипник-Тихонов Р. І. Теоретичне обґрунтування розробки ін'єкційного препарату отрути бджолої для застосування в онкологічній практиці / Р. І. Скрипник-Тихонов, О. І. Тихонов // Апітерапія України: матер. V з'їзду апітерапевтів і апіконсультантів- бджолярів України з міжн. участю. – К., 15–16 жовт. 2015 р. – С. 51–55. (*Особистий внесок*: аналіз та узагальнення даних, підготовка тез).

## АНОТАЦІЯ

**Скрипник-Тихонов Р. І. Розробка складу та технології розчину для ін'єкцій отрути бджолої. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.01 – Технологія ліків, організація фармацевтичної справи та судова фармація. – Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, м. Київ, 2016.

Вперше теоретично узагальнено та експериментально доведено наукові підходи щодо обґрунтування складу і розробки раціональної технології розчину для ін'єкцій «Апікаїн-Р» – ліофілізований порошок отрути бджолої (ЛПОБ) для лікування онко- та імунопатологій.

Обґрунтовано загальну концепцію досліджень, яка враховує особливості підходу до розробки складу і технології ін'єкційних лікарських засобів.

Із застосуванням сучасних фізико-хімічних, фармакотехнологічних, мікробіологічних та фармакологічних методів розроблено та впроваджено у виробництво готову лікарську форму «Апікаїн-Р» – ліофілізат для приготування розчину для ін'єкцій по 1 мг у флаконах з ампулою по 1 мл ізотонічного розчину.

Експериментально визначено оптимальні процеси фільтрації розчину з використанням фільтрувальних мембран (попередня – рейтинг пор 0,45 мкм, остаточна – 0,2 мкм) під тиском інертного фільтрованого газу азоту (не менше, ніж 0,06 МПа).

На розроблений лікарський засіб із застосуванням стандартних зразків розроблено показники якості та технологічний регламент для виробництва розчину для ін'єкцій «Апікаїн-Р». Технологію апробовано на ПАТ «Фармстандарт-Біолік» (м. Харків). Отримані експериментальні результати дозволяють розглядати препарат «Апікаїн-Р» як перспективний ефективний гемостимулюючий засіб для стимуляції клітин кісткового мозку.

Враховуючи численні дані літературних джерел про виявлення отрутою бджолоїною протипухлинного й антинеопластичного ефектів і проведені дослідження, вважаємо за доцільне подальше вивчення препарату «Апікаїн-Р» з

метою застосування його як перспективного протипухлинного ЛЗ імуностимуючої дії.

За одержаними результатами роботи отримано патент України на корисну модель «Ліофілізований препарат для ін'єкцій» № 97105 від 25.02.2015 р. та на винахід «Ліофілізований препарат для ін'єкцій» № 111273 від 11.04.2016 р.

*Ключові слова:* Апікаїн-Р, розчин для ін'єкцій, ліофілізований порошок отрути бджолиної, технологія.

## АННОТАЦІЯ

**Скрипник-Тихонов Р. И. Разработка состава и технологии раствора для инъекций яда пчелиного. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.01 – Технология лекарств, организация фармацевтического дела и судебная фармация. – Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика, г. Киев, 2016.

Диссертация посвящена разработке и экспериментальному обоснованию состава и технологии раствора для инъекций на основе лиофилизированного порошка яда пчелиного (ЛПЯП) с противоопухолевым и иммуностимулирующим действием.

С учетом результатов исследования влияния яда пчелиного на стабильность растворов авторами экспериментально подобран оптимальный режим лиофилизации раствора для получения препарата «Апикаин-Р» – лиофилизированный порошок яда пчелиного (ЯП) для лечения онко- и иммунопатологий.

Фармакологическими исследованиями была доказана терапевтическая концентрация лекарственного средства на основе яда пчелиного в перерасчете на меллитин (основное действующее вещество) в количестве 1 мг/мл, которая отвечает терапевтической концентрации в аналогичных препаратах из ЯП.

Одним из физических параметров, влияющих на стабильность парентеральных лекарственных препаратов, является значение рН, которое было установлено в оптимальном интервале – 4,0–6,0.

Проведено комплекс теоретических и экспериментальных исследований, на основании которых научно обоснован состав раствора для дальнейшей лиофилизации: ЯП – 1 мг; лидокаина гидрохлорид – 0,5 мг; маннит – 20,0 мг; натрия хлорид – 6,0 мг; вода для инъекций – до 1,0 мл, с учетом влияния толщины слоя раствора на качество лиофилизата.

Полученными результатами показано, что оптимальный объем наполнения раствором для проведения лиофилизации – 1 мл, как для ампул, так и для флаконов. Толщина слоя лиофильного препарата при наполнении 1 мл в ампулах была  $14 \pm 1$  мм, во флаконах –  $9 \pm 1$  мм, соответственно остаточная влага для препарата во флаконах – 3,2 %, а для препарата в ампулах – 3,7 %. По показателям рН, количественному содержанию действующих веществ и внешнему виду препарат, как в ампулах, так и во флаконах, отвечает показателям качества. В связи с этим для первичной упаковки лиофильного препарата на основе ЯП можно рекомендовать, как ампулы, так и флаконы, с объемом наполнения 1 мл.



При изучении процесса фильтрации для получения лиофилизата получены данные о совместимости раствора препарата «Апикаин-Р» с материалами фильтров капрона («МИФИЛ», Беларусь), нейлона («Ultiporn № 66», Германия) и полиэфирсульфона («PROPER PES», Великобритания). Материалы этих фильтров по рабочему диапазону рН отвечают исследованному раствору, выдерживают термическую стерилизацию и хорошо совместимы с АФИ.

Лиофилизация препарата проводилась в сублимационной установке ТГ-50 (ПАТ «Фармстандарт-Биолек», г. Харьков). Раствор дозировали по 1 мл во флаконы вместимостью 5 мл (толщина слоя 9–10 мм) и проводили быстрое замораживание, затем сублимационное высушивание раствора ЯП, применяя разработанные режимы. Препарат оценивали согласно показателям качества (цвет, пористость, однородность), растворимость в воде, прозрачность и значение рН после растворения в воде, потеря в массе при высушивании.

На разработанный состав получен патент Украины на полезную модель «Ліофілізований препарат для ін'єкцій» № 97105 от 25.02.2015 г. и на изобретение «Ліофілізований препарат для ін'єкцій» № 111273 від 11.04.2016 р.

Критические точки производства препарата установлены и внесены в промышленную технологическую схему на ПАТ «Фармстандарт-Биолек» (г. Харьков).

На лекарственное средство разработан проект технологического регламента на производство лиофилизата для приготовления раствора для инъекций «Апикаин-Р».

Качественный состав активных фармацевтических ингредиентов подтвержден реакциями идентификации. Количественное содержание активных субстанций раствора и лиофилизата для инъекций «Апикаин-Р» определяли методом ВЖХ.

Установлено, что разработанный состав и технология получения лиофилизата и раствора для инъекций «Апикаин-Р» позволяют сохранить весь спектр биологически активных веществ лиофилизированного порошка яда пчелиного в готовом препарате. Экспериментально установлены физико-химические и фармакотехнологические показатели разработанного препарата «Апикаин-Р». Лиофилизат после разведения водой для инъекций отвечал показателям качества: прозрачность, окрашенность, механические включения соответствовали требованиям Государственной фармакопеи Украины; рН 4,0–6,0; количественное содержание ЯП (в пересчете на меллитин) в лиофилизате составил 0,90–1,10 мг/мл, а лидокаина гидрохлорид – 0,45–0,55 мг/мл.

Микробиологическими исследованиями установлено, что препарат отвечает требованиям Государственной Фармакопеи Украины при проверке на стерильность.

Проведенными фармакологическими исследованиями установлено, что препарат «Апикаин-Р» является перспективным и эффективным противоопухолевым средством с иммуностимулирующим действием.

*Ключевые слова:* Апикаин-Р, раствор для инъекций лиофилизированного порошка яда пчелиного, технология.

## SUMMARY

### **Skrypnyck-Tikhonov R. I. Development of composition and technology of solution for injections of bee venom. – Manuscript.**

The thesis for the degree of candidate of pharmaceutical sciences, specialty 15.00.01 – Drug technology, organization of pharmacy and judicial pharmacy. – National Medical Academy of Postgraduate Education named after P. L. Shupik, Kyiv, 2016.

First theoretically and experimentally have been developed composition and technology of solution for injections “Apikayin-R” – dried powder of purified bee venom for the treatment of oncological and immune pathologies.

General concept of study was grounded that takes into account the approach to the development of composition and technology of injecting drugs.

With the use of modern physical, chemical, technological, microbiological, pharmacological methods has been developed and mastered the production of finished dosage form “Apikayin-R” – lyophilisates for solution for injection for JSC “Pharmstandard-Biolik” (Kharkiv) 1 mg vials combined with ampoule – 1 ml of isotonic solution.

Experimentally have been defined the optimum processes of solution filtration using a membrane filter (pre-pore rating of 0.45 microns, final 0.2 micron) under pressurized inert gas nitrogen (not less than 0.06 mPa).

With the use of reference materials have been developed projects of quality control methods and the technological requirements for the production of injection solution “Apikayin-R”, which is pyrogen-free. Obtained experimental results permit to consider drug “Apikayin-R” as promising hemostimulating effective medicine for the treatment and prophylaxis of patients during irradiation, which exhibits radio protective effect due to the stimulation of bone marrow cells.

Given the numerous references data to detection by bee venom antitumor and antimetastatic effects and our research consider appropriate to conduct further study of the drug “Apikayin-R” to use it as a promising antitumor and immune stimulatory agent.

According to obtained results has been received patent of Ukraine “Freeze-dried medicine for injections” № 97105 from 02.25.2015.

*Key words:* Apikayin-R, solution for injection, lyophilized powder of purified bee venom, technology.

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

АФІ	– активний фармацевтичний інгредієнт
ВЕРХ	– високоефективна рідинна хроматографія
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ДНЦЛЗ	– Державний науковий центр лікарських засобів
ДП	– Державне підприємство
ДФУ	– Державна фармакопея України
ЛЗ	– лікарський засіб
ЛПОБ	– ліофілізований порошок отрути бджолої
ЛПЯП	– лиофилизированный порошок яда пчелиного
МКЯ	– методики контролю якості
МОЗ	– Міністерство охорони здоров'я
НАМН	– Національна академія медичних наук
ОБ	– отрута бджолої
ПАТ	– Публічне акціонерне товариство
ТР	– технологічний регламент
УАНМ	– Київський медичний університет Української асоціації народної медицини
УВМА	– Українська військово-медична академія
ЯП	– яд пчелиний