

МІНІСТЕРСТВО ОБОРОНИ УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКА ВІЙСЬКОВО-МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

На правах рукопису

УДК: 615.014.2:615.456:615.07:638.178.8:658.562

СКРИПНИК-ТИХОНОВ РОСТИСЛАВ ІГОРОВИЧ

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

15.00.01 – Технологія ліків, організація фармацевтичної справи
та судова фармація

ДИСЕРТАЦІЯ

на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Науковий керівник:
кандидат фармацевтичних наук,
професор
Сирота Петро Савелійович

Київ-2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ АСПЕКТИ СТВОРЕННЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ ОТРУТИ БДЖОЛИНОЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	14
1.1. Вивчення фармацевтичного ринку лікарських препаратів протинкологічної та імуностимулюючої дії в Україні.....	14
1.1.1. Лікарські засоби імуностимулюючої дії на основі отрути бджолиної.....	14
1.1.2. Апітерапія онкологічних захворювань.....	18
1.2. Біологічно активні сполуки отрути бджолиної.....	27
1.3. Загальна характеристика технологічних процесів приготування парентеральних лікарських засобів.....	37
1.4. Характеристика основних стадій технологічного процесу ліофілізації.....	45
Висновки до розділу 1.....	49
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАГАЛЬНОЇ МЕТОДОЛОГІЇ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	50
2.1. Вибір загальної методології досліджень.....	50
2.2. Характеристика об'єктів досліджень.....	51
2.3. Методи дослідження.....	57
2.4. Методики фармакологічних та мікробіологічних досліджень.....	68
Висновки до розділу 2.....	72
РОЗДІЛ 3. ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СКЛАДУ ТА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІОФІЛІЗОВАНОГО ПОРОШКУ ДЛЯ ПРИГОТУВАННЯ ІН'ЄКЦІЙНОГО РОЗЧИНУ ОТРУТИ БДЖОЛИНОЇ.....	73
3.1. Розробка технології розчину для ін'єкцій на основі отрути	

бджолоїної.....	73
3.2. Розробка складу готового лікарського засобу у вигляді ліофілізату отрути бджолоїної для приготування розчину для ін'єкцій по 1 мг	77
3.3. Обґрунтування вибору рН розчину отрути бджолоїної	78
3.4. Вибір допоміжних речовин для лікарських засобів на основі отрути бджолоїної.....	79
3.5. Вплив товщини шару розчину на якість ліофілізату для приготування розчину для ін'єкцій.....	82
3.6. Технологія приготування ліофілізату отрути бджолоїної.....	84
3.6.1. Приготування розчину отрути бджолоїної.....	84
3.6.2. Вибір фільтруючого матеріалу для фільтрації розчину.....	86
3.7. Технологія ліофілізації	88
3.7.1. Розробка режиму заморожування розчину отрути бджолоїної.....	88
3.7.2. Розробка режиму сублимаційної сушки препарату на основі отрути бджолоїної.....	91
3.8. Вибір первинного пакування та дослідження його впливу на показники якості лікарських засобів.....	95
3.9. Технологічний процес приготування ліофілізату «Апікаїн-Р» для приготування ін'єкційного розчину.....	97
Висновки до розділу 3.....	107
РОЗДІЛ 4. РОЗРОБКА ПОКАЗНИКІВ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ «АПКАЇН-Р».....	109
4.1. Розробка методик ідентифікації та кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів отрути бджолоїної методом рідинної хроматографії.....	109
4.2. Опрацювання методик ідентифікації допоміжних речовин лікарського засобу «Апікаїн-Р».....	118
Висновки до розділу 4.....	119

РОЗДІЛ 5. МІКРОБІОЛОГІЧНІ І ФАРМАКОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ «АПІКАЙН-Р».....	120
5.1. Вивчення мікробіологічної чистоти отрути бджолиної.....	120
5.2. Фармакологічні дослідження лікарського препарату «Апікаїн-Р».....	125
5.2.1. Вивчення токсичності лікарського препарату «Апікаїн-Р» при одноразовому введенні.....	125
5.2.2. Вивчення місцевопоздразнюючої дії лікарського препарату «Апікаїн-Р».....	128
5.2.3. Вивчення гемостимулюючої активності препарату «Апікаїн-Р»..	130
Висновки до розділу 5.....	137
ВИСНОВКИ.....	139
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	142
ДОДАТКИ	162

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАР	– Біологічно активні речовини
ВЕРХ	– Високоефективна рідинна хроматографія
ВООЗ	– Всесвітня організація охорони здоров'я
ГАІТ	– Глюкозамінгліконгідролазний комплекс
ГЛЗ	– Готові лікарські засоби
ДСТУ	– Державний стандарт України
ДФУ	– Державна Фармакопея України
ДФЦ	– Державний фармакопейний центр
ЄФ	– Європейська Фармакопея
ЛД ₅₀	– Летальна доза
ЛЗ	– Лікарський засіб
ЛП	– Лікарський препарат
ЛПОБО	– Ліофілізований порошок отрути бджолоїної очищеної
ЛР	– Лікарська речовина
ЛФ	– Лікарська форма
МБК	– Мінімальна бактерицидна концентрація
МК	– Масовий коефіцієнт
МКЯ	– Методи контролю якості
МОЗ	– Міністерство охорони здоров'я України
НТД	– Нормативно-технічна документація
НФаУ	– Національний фармацевтичний університет
ОБ	– Отрута бджолоїної
ОБО	– Отрута бджолоїної очищена
ПВП	– Полівінілпіролідон
ПЕО	– Поліетиленоксид
РЗ	– Референс-зразок
РСЗ	– Робочий стандартний зразок
СЗ	– Стандартний зразок

СОП	– Стандартна операційна процедура
ТР	– Технологічний регламент
ТУ	– Технічні умови
ТШХ	– Тонкошарова хроматографія
ФС	– Фармакопейна стаття
ФСЗ	– Фармакопейний стандартний зразок
ЦНДЛ	– Центральна науково-дослідна лабораторія
ЦФ	– Циклофосфан
BP	– The British Pharmacopoeia
FDA	– Food and Drug Administration
GMP	– Good Manufacturing Practice
PhEur	– European Pharmacopoeia
USP	– U.S. Pharmacopeial Convention

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 бджолоїної» (№ 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 бджолина, допоміжні речовини, ліофілізат для приготування розчину для ін'єкцій – ЛЗ «Апікаїн-Р».

Предмет дослідження. Склад та технологія парентерального ЛЗ на основі отрути бджолиної 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); фармакотехнологічні – 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 обгрунтовано 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 27.01.2009 р.). Лікарський препарат

«Апікаїн-Р» внесено до перспективного плану розвитку виробництва ПАТ «Фармстандарт-Біолік» (№ 158/40 від 15.01.2016 р.).

За результатами досліджень розроблено, затверджено та опубліковано Укрмедпатентінформ МОЗ України інформаційний лист, який ухвалено ПК «Фармація» МОЗ та НАМН України (протокол № 89 від 18.02.2015 р.): № 125–2015 (вип. 9 з проблеми «Фармація») «Технологія виготовлення ліофілізованого препарату для ін'єкцій, які впроваджено в практичну роботу ряду аптек: ПАТ «Аптека Запоріжжя» (акт від 04.12.2015 р.); ТОВ «Аптека № 9», м. Харків (акт від 03.02.2015 р.).

Розроблено й упроваджено в роботу аптек та медичних закладів методичні рекомендації: «Інструкція по лікуванню бджолиною отрутою» (акт від 04.06.2015 р.); «Інноваційні підходи в апітерапії» (акт впровадження від 07.07.2015 р.); «Інноваційні підходи в апітерапії», видання 2-ге, доповнене та перероблене (акт від 22.10.2015 р.); «Технологія виготовлення екстемпоральних лікарських апіпрепаратів і їх застосування в фармації, медицині та косметології» (акт від 10.03.2016 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, дисертангом 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 обгрунтовано 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: сьогодні 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 35 наукових робіт, з яких: 2 монографії, 6 статей у наукових фахових виданнях, 4 методичні рекомендації, 2 патенти України (1 – на винахід, 1 – на корисну модель), 1 навчальний посібник з грифом МОН України, 4 авторські свідоцтва, 16 тез доповідей.

Структура дисертації та її обсяг. Дисертаційна робота викладена на 188 сторінках друкованого тексту (обсяг основного тексту 134 сторінки), складається зі вступу, огляду літератури, 4 розділів експериментальної частини, висновків, списку використаних джерел, додатків. Дисертація ілюстрована 40 таблицями та 32 рисунками. Список використаних джерел містить 186 посилань, з яких 70 іноземних авторів.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ АСПЕКТИ СТВОРЕННЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ НА ОСНОВІ ОТРУТИ БДЖОЛИНОЇ

1.1. Вивчення фармацевтичного ринку лікарських препаратів протионкологічної та імуностимулюючої дії в Україні

1.1.1. Лікарські засоби імуностимулюючої дії на основі отрути бджолоїної

Успіх цивілізації, науково-технічний прогрес, досягнення медицини не призвели до зниження інфекційних та неінфекційних захворювань серед населення планети. Навпаки, росте кількість онкологічних, серцево-судинних, респіраторних, ендокринних захворювань, нервово-психічних розладів [21, 94]. З'явилась група нових, так званих емерджентних інфекцій, у тому числі СНІД, парентеральні гепатити, тощо. Однією з причин такого положення є зниження колективної резистентності населення планети в результаті глобального негативного впливу на організм людини соціальних (недостатнє та неповноцінне харчування), екологічних (забруднення атмосфери та оточуючого середовища техногенними факторами), медичних (невиправдане застосування деяких лікарських засобів, наркотиків, алкоголю, стрес, тощо) факторів. Всі ці причини негативно впливають на імунну систему, викликаючи імунодефіцити та онкологічні захворювання [15, 21, 34, 126].

Імунна система людини – це система захисту організму від сторонніх мікроорганізмів, токсичних речовин та чужорідних предметів, тіл, включень і зовнішнього впливу. Вона складається з неспецифічного та специфічного імунітетів [40-42, 67, 20, 132].

Головними клітинними компонентами неспецифічного імунітету є фагоцити, а його розчинними компонентами – система комплементу, цитокіни, інтерлейкіни та інші білкові комплекси. Неспецифічний імунітет зумовлює

однотипні прості реакції на будь-які чужорідні антигени [15, 21].

Основна функція фагоцитів – захоплювати та переварювати мікроорганізми, які потрапили до організму ззовні. До фагоцитів відносяться нейтрофіли та моноцити, які містяться у крові, а також макрофаги, що містяться у тканинах [118, 132]. Система комплементу складається з групи сироваткових глобулінів, які, при взаємодії у певній послідовності, руйнують стінки клітин, як самого організму, так і клітини мікроорганізмів, що потрапили до нього. В той же час система комплементу активізує специфічний імунітет людини. Вона здатна зруйнувати невірно збудовані клітини еритроцитів, пухлинні клітини.

Клітинними носіями специфічного імунітету є лімфоцити, а розчинними компонентами – імуноглобуліни. Лімфоцити та імуноглобуліни – це глікопротеїни, тобто складні сполуки, які складаються з вуглеводної та білкової частин молекули [21, 87].

Специфічний імунітет формується протягом життя за рахунок постійного синтезу глікопротеїнів [40-42]. Оскільки основні амінокислоти, які необхідні для синтезу білкової частини імуноглобулінів та лімфоцитів, присутні у достатній кількості у крові людини при високобілковому харчуванні, то послаблення специфічного імунітету відбувається через відсутність у крові таких цукрів, як маноза та фруктоза [64, 106].

Послабленням імунітету сьогодні страждають багато людей. Найчастіше хронічна слабкість імунітету супроводжується наступними симптомами [34, 41].

- підвищена схильність до простудних та інших інфекційних захворювань;
- загальна нервозність, дратівливість та втома, не дивлячись на довготривалий сон;
- частий головний біль, іноді ревматичний біль м'язів та суглобів;
- постійні запалення, висипи та подразнення на шкірі;
- схильність до алергічних реакцій шкіри, дихальних шляхів та органів травлення, тощо.

Всі ці симптоми можуть викликати й інші захворювання, але досить часто за ними прихована хронічна слабкість імунітету.

Одним із основних засобів підтримання нормального функціонування імунної системи та відновлення імунітету при імунодефіцитних станах є застосування імуностимуляторів. До них відносять природні та синтетичні речовини, які здібні стимулювати імунну систему організму. В медицині використовується велика кількість імуностимуляторів, проте, вони нерівноцінні за своєю ефективністю та низкою інших властивостей, які визначають їх безпечність, зручність застосування, економічність, тощо [64, 67, 124, 126, 132].

У зв'язку з вищезазначеним, становило інтерес дослідити фармацевтичний ринок лікарських препаратів імуностимулюючої дії.

Імуностимулятори – це лікарські засоби (ЛЗ), які застосовуються при імунодефіцитних станах, хронічних інфекціях, при деяких онкологічних захворюваннях, тощо. Препарати імуностимулюючої дії можна класифікувати за наступними групами [41, 52, 92]:

- імуноглобуліни (загальні, специфічні);
- цитокіни (інтерферони, фактори росту, інтерлейкіни);
- індуктори інтерферонів (природні сполуки, синтетичні сполуки);
- препарати типічного походження (природні сполуки, синтетичні сполуки);
 - препарати бактеріального походження;
 - препарати грибового походження;
 - препарати тваринного походження;
 - препарати рослинного походження;
 - синтетичні препарати (низькомолекулярні, високомолекулярні);
 - вітаміни, мінерали;
 - інші препарати.

Позитивну дію різних лікарських речовин (ЛР) на організм людини (вітаміни, мінерали та ін.) можна пояснити їх здібністю підвищувати загальний опір чи його неспецифічний імунітет, а також впливати на специфічні імунні реакції [157, 159].

Аналіз літературних даних показав, що список імуностимуляторів, які існують у світі та випускаються різними фармацевтичними фірмами, нараховує більш ніж 100 найменувань лікарських препаратів (ЛП) та близько 200 лікарських форм (ЛФ) [52, 92, 106, 156].

Аналіз ЛП імуностимулюючої дії в залежності від лікарської форми наведено на рис. 1.1.

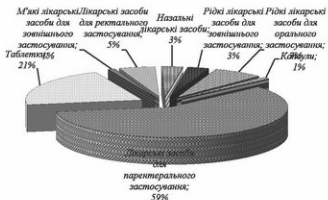


Рис. 1.1. Номенклатура лікарських препаратів імуностимулюючої дії за видом лікарської форми.

З даних рис. 1.1. видно, що найбільша кількість ЛП імуностимулюючої дії представлена у вигляді ЛЗ для парентерального застосування, на долю яких припадає близько 59 % і в основному виробництва закордонних фірм.

Аналіз номенклатури імуностимуляторів в залежності від виробника представлений на рис. 1.2.

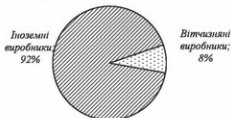


Рис. 1.2. Номенклатура лікарських препаратів імуностимулюючої дії на фармацевтичному ринку України.

Виявлено, що на фармацевтичному ринку України ЛП імуностимулюючої дії закордонного виробництва (92 %) переважають над вітчизняними (8 %).

Здатність таких препаратів підвищувати загальну резистентність організму, прискорювати процеси регенерації сприяє їх широкому застосуванню у комплексній терапії інфекційних та інфекційно-запальних захворювань, при регенераційних процесах та інших захворюваннях [34, 40, 52, 64, 67].

У результаті проведених маркетингових досліджень встановлено, що препарати імуностимулюючої дії – це дуже важлива група ЛЗ, яка використовується для лікування багатьох серйозних захворювань (СНІД, грип, лейкопенія, ГРВІ, тощо), які в основному представлені у вигляді ЛЗ для парентерального застосування. Але велика їх кількість випускається здебільшого іноземними виробниками, та, як і всі інші ЛП, вони мають ряд протипоказань, що обмежує їх застосування [39, 52].

Найбільш прийнятними та адекватними для організму людини є природні, так звані ендогенні імуностимулятори, основу яких складають речовини, що приймають участь у регуляції імунних процесів в організмі людини та тварини [40, 105, 106].

Тому розробка нових вітчизняних ЛП імуностимулюючої дії у вигляді ЛЗ для парентерального застосування на основі природних субстанцій є актуальною задачею фармації.

Одним із потенційних джерел сировини для розробки нових ЛЗ такого спектру дії є продукти бджільництва, зокрема, отрута бджолина. В зв'язку з цим, становило інтерес дослідити хімічний склад та фармакологічні властивості ОБ і на її основі розробити вітчизняний ЛП для лікування онко- та імунопатологій.

1.1.2. Апітерапія онкологічних захворювань

Онкологічні захворювання відомі з незапам'ятних часів. Палеонтологи знайшли пухлинні зміни у щелепі первісної людини, що жила близько півмільйона років тому. Пухлини згадуються у стародавніх папірусах. Проблема

новоутворень стала актуальною останнім часом.

Проблема онкологічних захворювань багатогранна. У її вирішенні беруть участь медики різних спеціальностей і представники інших наук: біологи, генетики, біохіміки, фармакологи, соціологи, психологи, етнографи тощо. На сьогодні накопичено величезний науковий і статистичний матеріал з різних питань, що стосуються причин виникнення захворюваності та смертності від злоякісних пухлин. За останні десятиліття медицина збагатилася новими знаннями й досвідом у лікуванні цієї хвороби [78, 81].

На сьогоднішній день кількість онкологічних захворювань зростає в усьому світі. Так, з 1950 роком вона збільшилася майже на 50 %, при цьому рак легенів і товстого кишківника у чоловіків – на 65 %, рак яечок, простати і нирок – на 100%, а кількість лімфом – більш ніж на 100 %. За даними ВООЗ, щороку кількість онкохворих збільшується на 10 млн. людей. У найближчі 15-20 років кількість хворих на рак зростає до 20 млн., а число смертей – до 12 млн. Онкологічні захворювання є причиною понад 15 % всієї смертності. Причому 40 % хворих помирають на першому році після встановлення діагнозу. За даними світової статистики кожні 72 сек онкозахворювання вражають по одній людині і кожні 97 сек помирає один хворий на рак [98, 116, 145]. На сьогоднішній день виживаність від онкопатологій становить близько 26 % [1, 3, 82].

В Україні щороку виявляється більше 160 тис нових випадків злоякісних новоутворень, майже 100 тис. жителів вмирають від раку, причому 35 % померлих – особи працездатного віку.

Щогодина реєструється більше 20 нових випадків захворювання, а 10 жителів України помирають від раку. За розрахунками фахівців, до 2020 року кількість вперше захворілих на рак в Україні перевищить 200 тис. на рік [36, 46].

Стосовно показників смертності онкологічних захворювань, то кожен другий-третій онкохворий в Україні помирає у перший рік хвороби, що в 10 разів перевищує аналогічний показник у розвинених країнах.

За світовими результатами кількість захворювань на злоякісні пухлини становить 13 %, з них 70 % – це країни з низьким та середнім рівнем прибутків (рис. 1.3) [38, 42].



Рис. 1.3. Захворюваність на злоякісні новоутворення у світі.

Розповсюдженість захворювань серед чоловіків та жінок має відмінності: чоловіки хворіють частіше на рак легенів, шлунку та шкіри, а жінки – на рак молочної залози, статевих органів та шкіри (рис. 1.4).



Рис. 1.4. Найбільш розповсюдені види онкологічних захворювань.

За рівнем смертності від онкологічних захворювань у країнах Східної Європи та Росії перше місце посідає рак легенів та бронхів, друге – рак товстого кишечника, третє – рак молочної залози, четверте – рак шлунку (рис. 1.5) [116].



Рис. 1.5. Статистичні дані смертності від раку у країнах Східної Європи та Росії: 1 – рак легенів та бронхів (16 %); 2 – рак товстого кишечника (12,4 %); 3 – рак молочної залози (11,1 %); 4 – рак шлунка (10 %).

За останніми даними, в Україні щодня від раку помирають 239 людей, або 10 – щогодини. В Україні щорічно на рак хворіє більше 160 тисяч чоловік. Щодня в країні виникає 442 нових випадків раку, або 18 – щогодини.

Захворіти на рак впродовж життя в Україні ризикує кожен третій-четвертий чоловік і кожна п'ята-шоста жінка. Станом на 1 січня 2011 року на обліку онкологічних установ України перебувало понад 960 тисяч онкологічних хворих, в тому числі 5,5 тисяч дітей [78, 81, 82].

Аналіз динаміки ураження населення України злоякісними новоутвореннями на основі персоналізованої бази даних Національного канцер-реєстру свідчить, що за останні 5 років рівень захворюваності на рак збільшився на 2,4 %, а щорічний приріст рівня захворюваності становить 0,6 %.

Зростання захворюваності характерне для раку ротової порожнини, ободової і прямої кишки, шкря, молочної залози, шийки та тіла матки, печінки, передміхурової залози, сечового міхура, щитовидної залози, лімфатичної та кровотворної тканини [81, 82].

Найбільший приріст показників захворюваності (20-50 %) виявлено при злоякісних новоутвореннях передміхурової залози, нирок, щитовидної залози, ободової і прямої кишки, тіла матки.

Найвищі показники захворюваності на рак у порівнянні з загальноукраїнським (331,5 на 100 тисяч населення) спостерігалися у місті Севастополі, у Кіровоградській, Миколаївській та Запорізькій областях (374,7-475,8 на 100 тисяч населення). Рівень захворюваності на рак міського населення України на 15 % вище, ніж сільського [84, 98].

У структурі онкологічної смертності чоловічого населення провідні місця займають рак легенів, шлунка, передміхурової залози, колоректальний рак, що складає 56,1 % від усіх летальних випадків від раку; в структурі жіночої смертності від раку – молочної залози, шлунка, яєчників і колоректальний рак – 52,0 %.

На сьогоднішній день у терапії онкологічних захворювань використовують наступні групи препаратів: алкілюючі агенти, антрацикліни, антиметаболіти та препарати природного походження. Відомо, що більшість із них має цілий ряд побічних ефектів [48-50, 92].

У цьому аспекті пошук нових високоефективних, природних стандартизованих субстанцій, а також розробка на їх основі ЛПІ для застосування у терапії онкологічних захворювань є актуальним завданням сучасної фармації [78, 81, 82].

Однією з таких перспективних стандартизованих субстанцій є ОБ, яка має протизапальну, гіпотензивну, антиаритмічну, антиангінальну, ноотропну, нейротропну, протипроменеву, протипухлинну та антимікробну активність [1, 3, 14].

Перше дослідження впливу ОБ на пухлинні клітини було опубліковано в 1950 році Navas, і лише через 30 років, інші групи вчених почали вести дослідження з вивчення цитотоксичності ОБ на пухлинних клітинах [45-46].

Ефективність ОБ обумовлена властивостями активних речовин, що входять до її складу, зокрема мелітину (до 55 %) - модифікатор клітинних мембран, що

відповідає за стимуляцію активності гормонів надниркових залоз, ферментів – фосфоліпази A2 (до 12 %) і гіалуронідази (до 3 %), апаміну (до 2 %) – це природний нейромодифікатор, а також пептиду (1 %), і похідних (гістаміну, катехоламінів і поліамінів) [94].

Останнім часом значно збільшилося число наукових публікацій з описом перспективних ефектів ОБ на різні лінії пухлинних клітин, показуючи не тільки результати впливу ОБ, але також і характеристик сигнальних шляхів, через які отрута інгібує клітинну проліферацію [98, 100, 116].

Мелітин, що входить до складу ОБ – пептид з найбільшою протипухлинною, антимікробною і протизапальною активністю. Недавні дослідження показали, що мелітин вбиває пухлинні клітини шляхом апоптозу, за допомогою декількох механізмів, викликаючи смерть ракової клітини [109, 116, 125].

Jang et al. вивчали вплив ОБ в концентрації 10 мкг/мл протягом 24 год на клітини раку легенів лінії NCI-H1299. Результати досліджень показали, що клітини, оброблені отрутою, зазнали морфологічних змін, що характерні для апоптотичних клітин [116].

Hu et al. в досліджах *in vitro* на клітинах гепатоми людини лінії SMMC-7721 довели, що ОБ проявляє цитостатичну дію залежно від дози і часу, інгібує проліферацію і індукує апоптоз клітин [145].

В досліджах *in vivo* на мишах лінії BALB/c було показано, що лікування з використанням 1,5 або 3 мг/кг ОБ призводило до значного уповільнення росту клітин лінії SMMC-7721, з інгібуванням пухлини на 31,4 % і 48,2 %, відповідно.

Лікування ОБ в концентрації 1 або 5 мкг/мл знижувало життєздатність клітин лімфоми людини лінії HL-60 і людських лімфоцитів через 24 годин після введення (Lee et al., 2007) [145].

Таким чином, можна припустити, що ОБ може знайти терапевтичне застосування у підвищенні цитотоксичності протипухлинного засобу.

Результати оцінки цитотоксичності і генотоксичності ОБ показали, що вона може бути використана для поліпшення ефективності звичайних

хіміотерапевтичних препаратів і може запобігти небезпеці виникнення вторинних злоякісних пухлин [1, 3].

Крім протипухлинної дії ОБ володіє радіозахисним ефектом. Так, в дослідженнях О. С. Корягіна детально був вивчений радіозахисний ефект отрути бджоли медоносної [2, 53, 99].

Вплив ОБ на систему кровотворення лабораторних тварин в умовах одноразового та фракціонованого (багаторазового) у-опромінення в дозах 1,5 і 3,0 Гр було досліджено О.Н. Гамовим.

ОБ надала радіопротекторну дію в умовах фракціонованого у-опромінення в сумарних дозах 1,5 і 3,0 Гр. Профілактичне курсове введення ОБ надавало захисну дію на генетичний матеріал кровотворних клітин кісткового мозку [145].

Ніколаєвою А. А. також були досліджені радіозахисні властивості ОБ. Проведені дослідження показали, що ОБ у дозах 0,1 і 0,5 мг/кг, при внутрішньочеревному введенні має радіопротекторну дію, що виявляється у поліпшенні низки гематологічних показників. Вона полегшує перебіг променевої хвороби середнього ступеня тяжкості, стимулює відновні процеси у системі крові.

У теперішній час фармацевтична промисловість випускає декілька ЛП отрути бджолиної. Номенклатура ЛЗ представлена як алопатичними, так і гомеопатичними препаратами. Аналіз фармацевтичного ринку показав, що алопатичні препарати на основі ОБ випускаються у різних ЛФ для зовнішнього застосування (рис. 1.6). [14, 49, 92].



Рис. 1.6. Алопатичні препарати з ОБ за видом ЛФ.

ОБ також широко застосовується у гомеопатичній медицині. Номенклатура гомеопатичних ЛЗ представлена загалом комплексними препаратами у вигляді рідких, твердих та м'яких лікарських форм (рис. 1.7) [76, 91]. Гомеопатичні препарати з ОБ призначені, в основному, для внутрішнього застосування. Їх випускають у формі гранул, крапель і таблеток. Також на фармацевтичному ринку є ін'єкційні розчини, сиропи та супозиторії [100].

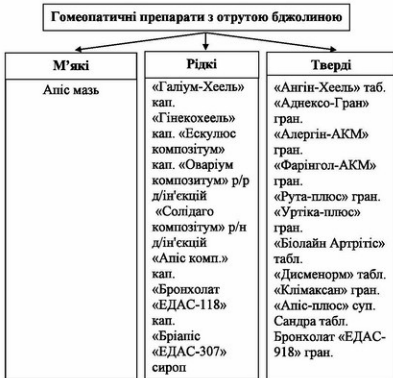


Рис. 1.7. Гомеопатичні препарати з ОБ.

Аналіз ринку препаратів, встановив відсутність оригінального препарату на основі ОБ. У зв'язку з цим розробка даного препарату є перспективним напрямком сучасної фармацевтичної науки і промисловості, з огляду на широкий спектр фармакологічної дії ОБ на організм людини [46, 53]. Дослідження хімічного складу ОБ, не зважаючи на широке її використання, розпочате досить

недавно, але цьому напрямку присвячено багато робіт. Відомо, що до складу ОБ входять низькомолекулярні органічні сполуки, також вільні амінокислоти (цистин, лізин, аргінін, глікокол, аланін, метіонін, кислоти глутамінова і аспарагінова, гістидин, серін, триптофан, треонін, лейцин, ізолейцин), нуклеїнові кислоти (дезоксирібонуклеїнова і рибонуклеїнова), мурашина, соляна і ортофосфорна кислоти, стероїдоподібні речовини, летючі масла, ферменти – гіалуронідаза і фосфоліпаза А [1, 116, 145].

Мінеральна фракція ОБ багатокomпонентна. Дослідження золи ОБ показали присутність в ній магнію (до 0,4 % отрути) і невеликої кількості міді. Інші метали, які широко поширені у біологічних об'єктах – натрій, калій, залізо тощо – в ОБ не виявлені. Вуглеводів вона також не містить.

Ліпоїдна фракція отрути незначна. Вона складається з пахучої речовини та стеринів, що екстрагуються хлороформом [78, 82].

У 50-ті роки минулого століття за рахунок використання хроматографічних методів (рідинна хроматографія, капілярний електрофорез) були виділені та ідентифіковані ферменти фосфоліпаза А_g, гіалуронідаза, поліпептид мелітин.

З літературних даних відомо, що ОБ в незначних дозах підвищує діяльність захисних сил організму як імуностимулятор. Публікації закордонних вчених свідчать про застосування ОБ у захисті від опромінення [106, 124].

Біологічними дослідженнями встановлено, що виражений ефект викликає основний компонент отрути – мелітин [34].

Близько 50 % у складі ОБ припадає на частку мелітину – білку не ферментної природи, який разом з аламіном, вміст якого в отруті становить близько 2 %, зумовлює основну терапевтичну активність і токсичність ОБ.

Важливими компонентами отрути є також гіалуронідаза (вміст у висушеній отруті 1-3 %), фосфоліпаза А (вміст в отруті до 14 %), МСД-пептид [80, 145].

В зв'язку з цим, метою даної роботи стала розробка технології та дослідження ліофілізованого порошку для приготування ін'єкційного розчину з ОБ, який може застосовуватися як імуностимулятор і протионкологічний засіб.

1.2. Біологічно активні сполуки отрути бджолоїни

Отрута бджолоїни (апітоксин) – продукт діяльності отруйних залоз бджоли, протоки яких виходять у жало. У медоносної бджоли отрута починає виділятися з 6-7 денного віку, але найбільш активно продукується у віці 10-18 днів. Виробляють його робочі бджоли і матки (трутні не мають отруйних залоз і жалочого апарату). У отруйній бульбашці бджоли накопичується близько 0,02 мг отрути [38, 53, 78].

Свіжоотриманий від живих бджіл секрет отруйних залоз являє собою густу прозору рідину гірко-пекучого смаку, з сильним різким запахом, що нагадує запах меду. Секрет, що виділяється великою отруйною залозою має кислу реакцію, а малою отруйною залозою – лужну. Кислотність свіжої отрути 0,38-0,56, сухого – 0,30-0,56. Активна реакція середовища отрути кисла (рН 4,5-5,5). Відносна щільність отрути становить 1,08-1,13. Містить 30-48 % сухих речовин. На повітрі висихає, твердне, звільняється від летючих фракцій, але сухий залишок легко абсорбує вологу. Летючі речовини ОБ – це вода та складні ефіри: ізоамілацетат, ізоамілпропіонат, ізоамілбутірат [45, 115, 145].

Отрута стійка до дії кислот, лугів, коливань температури. Нагрівання до 100 °С і заморожування не змінює її склад. Секрет легко розчинний у воді (містить 12 % нерозчинних домішок), водних розчинах гліцерину, рослинних оліях, гірше у спирті етиловому різної концентрації та органічних кислотах. Під впливом травних ферментів і окислювачів він втрачає активність [36, 38, 100].

Висушена ОБ являє собою багатокомпонентну суміш з неорганічних і органічних речовин. Мінеральні речовини, що залишаються після спалювання отрути при температурі 500-800 °С (зольність отрути) складають 2-4 % сухої маси отрути. У золі виявлені кальцій, фосфор, магній, мідь, хлориди.

Органічні речовини ОБ представлені практично всіма групами з'єднань і зустрічаються у тваринному організмі – вуглеводи, жири, білки, пептиди, амінокислоти, біогенні аміни, ароматичні і аліфатичні сполуки. Виявлено в ОБ 2-6 % цукрів (глюкоза, фруктоза) [45].

Перші дослідження хімічного складу ОБ виконані в Чехії (1897). У СРСР ініціатором вивчення отруту був академік Павловський Е.Н. (1927) [1, 3, 37].

Перші експериментальні дослідження ОБ були виконані через декілька років Комаровим П. М., Ерштейном А. С. і Артемовим Н. М. (1936) [100, 145]. У 40-50-х рр. отримані експериментальні дані про хімічні речовини ОБ.

Хімічний склад ОБ дуже складний і його вивчення постійно триває (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Хімічний склад отрути бджолоїної

Клас речовин	Речовина	Вміст в отруті, %
Азотисті речовини в тому числі: <u>Ферменти:</u>	Фосфоліпаза А ₂	74
	Гіалуронідаза	10-12
	α-глюкозидаза	1-3
	Кисла фосфатаза	1
	Лізофосфатаза (фосфоліпаза В)	0,6 1
<u>Поліпептиди:</u>	Мелітин	40-50
	Апамін	1-3
	МСД-пептид (пептид 401)	1-2
	Мінімін	3
	Кардіопен	сліди
	Терціапін	1
	Секанін	0,5-2
	Адолапін	2-6
<u>Цукри:</u>	Фруктоза, глюкоза	сліди
<u>Протеазні інгібітори:</u>	Інгібітор I, Інгібітор II	сліди
<u>Біогенні аміни:</u>	Гістамін	0,5-2
	Дофамін	0,2-1
	Норадреналін	0,1-0,5
<u>Вільні амінокислоти</u>		1
<u>Мінеральні речовини:</u>	Залізо, магній, фосфор, мідь, сірка, літій, марганець, калій, кальцій, цинк, азот, йод, хлор	3-4
<u>Ліпоїди</u>	<u>Стероли</u> , П-аміловий, ізоаміловий і стилловий ацетати	1-3
<u>Леткі речовини</u>	органічні кислоти	4-8

Отримати синтетичний препарат, який замінить отруту бджіл, на даний час не вдалося.

Основною частиною сухого залишку – більше 80 % – є білки і пептиди. Вони являють собою найбільш активні біохімічні та фармакологічні компоненти ОБ [36, 99, 145].

До теперішнього часу виділені і досліджені такі білки: ензими – гіалуронідаза, фосфоліпаза А, лізофосфоліпаза (фосфоліпаза В), кисла фосфомоноестераза, альфаглюкозидаза; пептиди – мелітин, апамін, МСД-пептид (пептид 401), протеазні інгібітори, адолапін, мелітин F, секапін і терціапін.

Гіалуронідаза ОБ належить до групи ензимів, основна властивість якої полягає у розщепленні кислоти гіалуронової та інших складних полісахаридів, які мають аміні, ацетильні, сульфатні і карбоксильні групи, відомі під назвою мукополісахаридів.

Встановлено, що даний ензим термолабільний, а найвища його активність проявляється у слабо-кислому середовищі (рН = 4-5). Стабільність його невисока і знижується при зберіганні у звичайних умовах. Залежно від ступеня очищення і від приєднаних до пептидного ланцюга молекул вуглеводів, його молекулярна маса становить 35000-41000 Дг. Кількість ферменту становить 1-3 % від маси висушеної отрути і залежить від ступеня очищення, а також від методів отримання ОБ [14, 46, 81].

Біологічне призначення гіалуронідази ОБ зводиться до організації шляхів для токсичних компонентів у напрямку функціональних структур клітин і органів ужаленого організму. У зв'язку з цим власна токсична активність гіалуронідази незначна, якщо не вважати алергенних властивостей, притаманних їй як високомолекулярному чужорідному агенту. Однак, для прояву загального ефекту отрути вказане призначення ферменту в отруті незамінне. Міжклітинна зв'язуюча речовина, що з'єднує клітини органів між собою в єдине, являє собою в'язкий гель високополімерізованої кислоти гіалуронової та протеогліканів – також полімерних речовин великої молекулярної маси, що містять полісахариди, пов'язані з поліпептидами. Речовини, які в нормі транспортуються з кровоносних капілярів в клітини тканини, повинні дифундувати через цей гель, який не перешкоджає проходженню невеликих іонів, води, глюкози, амінокислот і т.д.,

але служить непрохідним бар'єром для великих молекул, таких як білки, пептиди [145].

Ця міжклітинна зв'язуюча речовина може бути зруйнована ферментом – гіалуронідазою, яка присутня у сперматозоїдах, патогенних мікроорганізмах, п'явках, зміях, комах та ін.

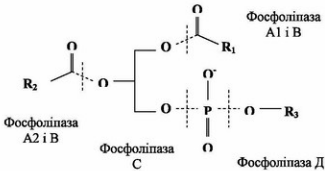


Рис. 1.8. Схема гідролізу фосфоліпиду під дією фосфоліпаз A1, A2, B, C, D.

Фосфоліпаза відноситься до групи ферментів, які розщеплюють жири (ліпази) і які є невід'ємною частиною тваринних організмів. Так розрізняють наступні фосфоліпази отрути бджолоїної A (A1, A2), B, C і D. Однак фосфоліпазу A2 ОБ вважають найактивнішою, оскільки вона перевершує за дією відомі фосфоліпази зміїної отрути. Встановлено, що дана ліпаза здатна розщеплювати ефірний зв'язок гліцерину і жирної кислоти у 2-му положенні, яке вважається важкодоступним (рис. 1.8) [53, 78, 116].

Встановлено, що ензимна молекула фосфоліпази A2 складається з білкової частини, до складу якої входять 183 залишки амінокислот, і не білкової, що складається із залишків вуглеводів – фруктози, галактози, манози та глюкозаміну. Молекулярна маса фосфоліпази становить 15800 Дальтон [77, 80].

Вміст фосфоліпази A2 у висушеній отруті становить близько 14%.

Серед високоактивних компонентів отрути бджолоїної, що визначають ефективність її лікувальної дії, важливе місце також належить групі пептидів.

Пептиди – фрагменти білкових молекул, що складаються із залишків амінокислот, з'єднаних між собою, так званим, пептидним зв'язком.

Білковий комплекс отрути бджолоїного ділиться на три основні фракції: нульова (Ф-0), фракція 1 (Ф-1), фракція 2 (Ф-2).

Білки нульової фракції позбавлені отруйної дії і є баластними речовинами отрути бджолоїної. Вони мало вивчені.

Фракція 1 має токсичну дію і являє собою – мелітин, який є головним компонентом ОБ, що становить близько 50 % сухого залишку отрути.

Мелітин є пептидом, який не руйнується у сильно-кислому середовищі, але менш стійкий до лужного [94, 98, 100].

Пептид мелітин виявляє високу спорідненість з фосфоліпідом в клітинній оболонці. Молекула мелітина складається з 26 залишків амінокислот: Гли-Иле-Гли-Ала-Вал-Лей-Лиз-Вал-Лей-Тре-Тре-Гли-Лей-Про-Ала-Лей-Иле-Сер-Три-Иле-Лиз-Арг-Лиз-Арг-Глн-Глн-NH₂. У складі мелітину немає тирозину, фенілаланіну, аспарагінової кислоти, метіоніну, цистеїну (рис. 1.9).

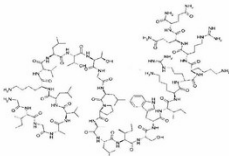


Рис. 1.9. Молекулярна структурна формула мелітину.

У водному розчині пептид мелітин приймає випадкову форму завитка. У метанолі або в присутності фосфоліпиду пептид мелітин приймає впорядковану форму спіралі. Більшість основних гідрофільних амінокислот розміщуються на одній стороні спіралі, а гідрофобні амінокислоти – на протилежному боці. Ці

амфіфільні характеристики є важливими при виявленні цитотрофічної активності [99, 116, 145].

Метіонін знижує поверхневий натяг, що тягне за собою руйнування мембран еритроцитів і лейкоцитів крові, порушення структури клітинних органел – лізосом і мітохондрій. При цьому погіршується доставка кисню тканинам, виникає кисневе голодування.

У результаті руйнування клітинних мембран звільнюються біогенні аміни: серотонін і гістамін, які сприяють розвитку запалення, підвищенню проникності стінок кровоносних капілярів, розширенню судин, зниженню артеріального тиску, розслабленню спазмів бронхів.

Розвиток запального процесу під впливом великих доз мелітину обумовлено збільшенням синтезу в організмі гормоноподібної речовини – простагліцину, що розширює кровоносні судини і затримує утворення тромбів. Пригнічуючи активність тромбобластину і викликаючи денатурацію фібриногену, мелітин зменшує згортаючу здатність крові. Крім того, цей пептид має виражену бактерицидну (*Candida albicans*) і бактериостатичну (*Mycoplasma hominis*, *Chlamidia trachomatis*) дію [1, 14, 99, 145].

Введення в організм людини ОБ підсилює процес утворення гормонів гіпофіза і надниркових залоз. У найбільшій кількості виявляються речовини кортизолу, кортизону і інших гормонів коркового шару наднирників, що мають протизапальну дію. Останнє обумовлено, насамперед, мелітином і пояснює ефективність застосування ОБ як протизапального засобу, найбільш ефективного при лікуванні ревматизму і поліартритів.

Однак при розгляді протизапальної властивості мелітину необхідно враховувати діючу дозу даного пептиду. Встановлено, що в дозі 0,05-2 мкг/мл він стабілізує мембрани лізосом лейкоцитів і надає виражений протизапальний ефект, тоді як при 10 мкг/мл руйнує клітинні мембрани, підвищує проникність судин і сприяє розвитку запалення [37, 116].

При дозах 10-30 мкг / кг (малі дози) у печінці збільшується утворення високоактивної гормоноподібної речовини – циклічного аденозинмонофосфату, який стимулює роботу залоз внутрішньої секреції.

В експерименті модельного запалення, викликаного паличкою Коха, найкращий ефект був зафіксований при невеликих дозах мелітину – 20 мкг/мл, на відміну від великих – 100 мкг/мл [53, 81, 82, 116].

Мелітин у малих дозах володіє радіозахисною дією, проявляючи мембраностабілізуючу активність у дослідах на тваринах, яких піддавали опроміненню у летальних дозах.

У великих дозах (4-6 мг/кг) мелітин пригнічує центральну нервову систему, різко підвищує кров'яний тиск, викликає глибокі порушення роботи серця (миготливу аритмію та ін.), які можуть призвести до летального результату.

Отже, успішне застосування ОБ до теперішнього часу обумовлено, головним чином, властивостями мелітину.

Фракція 2 порівняно малотоксична, складається в основному з амінокислот і ферментів [3, 45].

Апамін – один з найменших пептидів, що має назву нейротоксину.

За допомогою гель-фільтрації та іонообмінної хроматографії вдалося виділити з отрути пептид апамін, що збуджує центральну нервову систему (ЦНС) [37, 82, 100].

Молекула його складається з 18 залишків амінокислот: лізину, гістидину, аргініну, треоніну, проліну, аланіну, цистеїну, лейцину, глутамінової та аспарагінової кислот. Апамін володіє лужними властивостями і його кількість у висушеній отруті становить близько 2-3 %. На відміну від інших пептидів отрути бджолиної апамін містить сірку у вигляді двох сульфідних містків (між Ціс1-Ціс11 і Ціс3-Ціс15) (рис. 1.10).

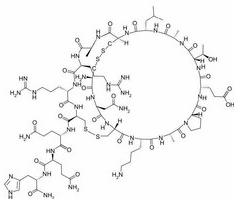


Рис. 1.10. Молекулярная структура апаміну.

Особлива дія апаміну на організм – сильне збудження нервової системи, яке при надходженні великих доз отрути може призводити навіть до появи судом. Апамін порушує передачу нервових імпульсів, посилює збудження і пригнічує процеси гальмування у центральній нервовій системі.

Так, в експерименті на тваринах при внутрішньовенному введенні у дозі 1-4 мг/кг спостерігалися некоординовані рухи кінцівок, що переходять у судоми всього тіла [13, 24]. Апамін проявляє блокуючу дію на альфа-адренореактивні, холінергічні та пуринергічні рецептори. Однак, найбільш виражені властивості пептиду виявляються у кальційзалежних калієвих провідностей у мембранах клітин, як для нейронів, так і для інших тканин [21].

Під впливом апаміну збільшується виробництво біогенних амінів – норадреналіну, дофаміну і серотоніну, які надають збудливий ефект, насамперед, на гіпоталамус і кору головного мозку.

Здатність пептиду активізувати функцію залоз внутрішньої секреції – гіпофіза і надниркових доведена у дослідях на кішках в дозі 10 мкг/кг. При цьому рівень гормонів (адреналіну, кортизолу та кортизону), що володіють потужним протизапальним ефектом, в крові при цьому збільшувався в 8 – 9 разів [13, 24].

Так само апамін має протизапальну дію і пригнічує імунну систему організму. Подібно мелітину, апамін зменшує денатурацію сироваткових білків, викликану фізичними факторами (незначне нагрівання знижує денатурацію на 50 %). Використання апаміну полегшується майже повною відсутністю у нього антигенних і алергенних властивостей. Дана група речовин не виявляється у препаратах ОБ.

У ОБ виявлені також інші жироподібні речовини, які становлять 1-3 %. Приблизно така ж кількість припадає і на вільні амінокислоти [102].

Вченими Національного фармацевтичного університету (м. Харків) під керівництвом академіка Української АН Тихонова О. І. було більш детально вивчено вміст жирних кислот і амінокислот в ОБ [94, 96, 102]. Дослідження виконувалися на базі лабораторії якості кормів і продуктів тваринництва Інституту тваринництва УААН (м. Харків) за допомогою газової хроматографії. Результати дослідження амінокислотного складу ОБ наведено в табл. 1.2.

Таблиця 1.2

Вміст вільних і зв'язаних амінокислот в отруті бджолиній

№ з/п	Вільні		Зв'язані	
	Амінокислоти	мг/100 мг	Амінокислоти	мг/100 мг
1	Аспарагінова к-та	0,7	Аспарагінова к-та	1,7
2	Треонін	1,7	Треонін	3,0
3	Серин	0,9	Серин	2,3
4	Глутамінова к-та	1,3	Глутамінова к-та	4,7
1	2	3	4	5
5	Пролін	2,6	Пролін	1,6
6	Гліцин	2,4	Гліцин	3,6
7	Аланін	1,6	Аланін	3
8	Валін	2,3	Валін	3,7
9	Метіонін	1,5	Метіонін	4,5
10	Ізолейцин	3,2	Ізолейцин	3,8
11	Лейцин	4,3	Лейцин	6,7
12	Тирозин	сліди	Тирозин	сліди
13	Фенілаланін	1,4	Фенілаланін	2,0
14	Гістидин	0,5	Гістидин	7,0
15	Лізін	5,5	Лізін	6,5
16	Аргінін	0,8	Аргінін	8,0
Всього:		30,7	Всього:	62,1

Серед зв'язаних амінокислот у найбільшій кількості знаходяться аргінін, лізин, гістидин, метіонін, кислота глутамінова, ізолейцин, валін. Сумарний вміст вільних амінокислот становить 30,7 мг/100 мг, зв'язаних – 62,1 мг/100 мг. Результати дослідження жирно-кислотного складу ОБ наведені в табл. 1.3.

Таблиця 1.3

Жиро-кислотний склад отрути бджолоїної

№ з/п	Назва жирної кислоти	ОБ, мкг/100 мг
1	Деканова	3,0
2	Монодеканова	4,0
3	Лауринова	5,5
4	Тридеканова	6,0
5	Пентадеканова	38
6	Пальмитинова	40
7	Гептодеканова	–
8	Стеаринова	50,5
9	Олеїнова	225
10	Лінолева	6
11	Ліноленова	48
12	Бегенова	450
13	Мірістинова	9,0
Всього:		885,0

Дані табл. 1.3 свідчать, що у найбільшій кількості містяться бегенова (50,8 %), олеїнова (25,4 %), стеаринова (5,7 %), ліноленова (5,4 %) і пальмітинова (4,5 %) жирні кислоти. При чому, лінолева і ліноленова відносяться до групи незамінних жирних кислот, які не синтезуються в організмі людини, а їх відсутність у раціоні викликає симптоми недостатності.

Отримані літературні дані свідчать, що до складу ОБ входять 16 вільних і зв'язаних амінокислот. Серед вільних амінокислот в найбільшій кількості знаходяться: лізин, лейцин, ізолейцин, пролін, гліцин [98, 102].

Наведені експериментальні дані показали, що вміст жирних кислот в ОБ (у сумарній кількості на 1 мг) становить 8,85 мкг/мг.

Таким чином, ОБ є цінною субстанцією для створення ЛПІ завдяки наявності значної кількості біологічно активних речовин, які проявляють

протипухлинну, імуномодулюючу протигрибкову, протимікробну, нейротоксичну, анальгетичну, та інші дії.

1.3. Загальна характеристика технологічних процесів приготування парентеральних лікарських засобів

На сьогодні парентеральні ЛЗ, які випускаються вітчизняною фармацевтичною промисловістю, складають близько 30 % від усіх готових ЛЗ, та їх виробництво постійно збільшується [6].

Лікарські засоби для парентерального застосування – це стерильні ЛЗ, призначені для введення шляхом ін'єкцій, інфузій або імплантацій в організм людини чи тварини. До таких ЛЗ, відносять: ін'єкційні ЛЗ, внутрішньовенні інфузійні ЛЗ, концентрати для ін'єкційних або внутрішньовенних інфузійних ЛЗ, порошки для ін'єкційних або внутрішньовенних інфузійних ЛЗ, імплантанти [22-29, 35, 120].

Характеристика основних стадій технологічного процесу приготування ін'єкційних розчинів. Найбільш розповсюдженими серед парентеральних лікарських засобів є ЛЗ для ін'єкцій, зокрема стерильні розчини, емульсії або суспензії. Розчини для ін'єкцій у відповідних умовах спостереження мають бути прозорими і практично вільними від часток. Емульсії для ін'єкцій не мають виявляти ознак розшарування. У суспензіях для ін'єкцій може спостерігатися осад, який має швидко диспергуватися при збовтуванні, утворюючи суспензію. Суспензія, що утворилася, має бути достатньо стабільною для того, щоб забезпечити необхідну дозу при введенні [6, 58-59].

Встановлено, що у фармакопеях різних країн світу 10-15 % складають статті на ін'єкційні ЛЗ [133-134]. Як ЛФ, вона отримала широке розповсюдження у всьому світі завдяки низки переваг, таких як [61, 70, 177]:

- швидка дія та абсолютна біологічна доступність ЛР;
- точність та зручність дозування;

- можливість введення ЛПІ хворому, що знаходиться в непритомному стані, або коли ЛЗ не можна вводити перорально;
- відсутність впливу ферментів шлунково-кишкового тракту та ферментів печінки;
- можливість створення великих запасів стерильних препаратів, що полегшує та прискорює відпуск з аптек;

Слід зазначити, що ін'єкційні ЛЗ мають також певні недоліки:

- при введенні препарату через ушкоджений покрив шкіри у кров легко можуть потрапити патогенні мікроорганізми;
- разом з препаратом для ін'єкцій в організм може бути введене повітря, що викличе емболію судин або розлад серцевої діяльності;
- навіть незначна кількість сторонніх домішок може негативно впливати на організм хворого;
- психоемоційний аспект, пов'язаний із болісністю ін'єкційного шляху введення;
- введення стерильних ліків має здійснюватися лише кваліфікованими фахівцями.

Так як ін'єкційний шлях введення ЛПІ припускає порушення шкірного покриву, що пов'язано з можливим інфікуванням патогенними мікроорганізмами та введенням механічних включень, то виробництво ін'єкційних ЛФ порівняно з іншими ЛФ має специфічні особливості, що обумовлене наступними вимогами [7, 103, 138]:

- стерильність;
- прозорість;
- відсутність механічних включень;
- стабільність, тощо.

Стерильність забезпечується асептичними заходами та відповідними способами стерилізації ін'єкційних розчинів [22, 120].

Відсутність апірогенності забезпечується асептичними заходами та відповідною якістю ЛР та розчинників [58].

Ін'єкційні розчини не повинні містити механічні включення, що досягається фільтруванням рідин, підготовкою тари, допоміжних матеріалів та ін. [33].

Стабільність деяких ін'єкційних препаратів досягається шляхом введення до їх складу спеціальних допоміжних речовин – стабілізатори, антиоксиданти, консерванти, солюбілізатори, тощо [6, 8, 22, 56].

Серед найбільш розповсюджених антиоксидантів найчастіше у фармацевтичному виробництві застосовують натрію метабісульфіт, натрію сульфід, кислоту аскорбінову, тощо [5, 22].

Перспективним підходом до вирішення проблеми антимікробного захисту ЛП є застосування консервантів і їх комбінації (спирт бензиловий, ніпагін, ніпазол). Це дозволяє розширити спектр антимікробної дії, застосувати їх у більш низьких концентраціях та запобігти появі резистентних штамів мікроорганізмів [59, 70, 79].

Проблема розчинності АФІ вирішується через застосування солюбілізаторів, які здатні розчинити нерозчинні або важкорозчинні у воді речовини. Один з найпоширеніших солюбілізаторів – це пропіленгліколь, який здатний перешкоджати гідролізу ЛП та дає змогу одержати розчини пролонгованої дії [35, 56, 59].

Однією з умов виробництва якісної стерильної продукції та її реалізації на вітчизняних та іноземних фармацевтичних ринках є забезпечення якості препарату за рахунок виконання, в першу чергу, принципів та правил належної виробничої практики – GMP [57].

Згідно правил GMP стерильну продукцію необхідно виробляти у «чистих» приміщеннях. «Чисті» приміщення – це приміщення або зони, у повітряному середовищі яких облікова концентрація аерозольних частинок та число мікроорганізмів підтримується у суворо визначених межах. Під частинкою розуміють твердий, рідкий або багатофазовий об'єкт чи мікроорганізм з розмірами від 0,005 мкм до 100 мкм. «Чисте» приміщення може містити одну або

декілька «чистих» зон, які можуть створюватися у локальних об'ємах [57, 69, 72].

Важливою характеристикою «чистого» приміщення є його клас. Клас «чистого» приміщення характеризується класифікаційним числом, яке визначає максимально допустиму облікову концентрацію аерозольних частинок, розміром від 0,1 мкм до 5 мкм у 1 м³ повітря. У залежності від цього виділяють чотири класи чистоти виробничих приміщень [57, 72]:

- клас А – локальна зона для операцій, при яких контамінація являє високий ризик. Ця зона повинна обов'язково забезпечуватися ламінарним потоком повітря зі швидкістю 0,45 м/с ± 20 %;
- клас В – навколишнє середовище для зони класу А у разі приготування та наповнення в асептичних умовах;
- клас С і D – «чисті» приміщення для проведення менш критичних стадій виробництва стерильної продукції.

Класифікація «чистих» приміщень за максимально допустимою кількістю частинок у повітрі наведена у таблиці 1.4.

Таблиця 1.4

Класифікація «чистих» приміщень за максимально допустимою кількістю частинок у повітрі, шт/м³

Клас чистоти	Оснащений стан		Функціонуючий стан	
	0,5 мкм	5 мкм	0,5 мкм	5 мкм
А	3 500	1	3 500	0
В	3 500	1	350 000	2 000
С	350 000	2 000	3 500 000	20 000
Д	3 500 000	20 000	Не визначено	

«Оснащений» стан – це стан, при якому система «чистого» приміщення та виробничого обладнання цілком підготовлена до роботи, але персонал відсутній [57, 69, 72].

«Функціонуючий» стан – це стан, при якому система «чистого» приміщення та обладнання функціонує в установленому режимі з певним числом працюючого персоналу [69, 72].

Доступ персоналу, надходження сировини та матеріалів до «чистих» приміщень повинні здійснюватися лише через повітряні шлюзи [57].

Технологія ін'єкційних препаратів являє собою складне та багатостадійне виробництво, яке складається з наступних технологічних стадій [22, 58, 59, 79, 80]:

- підготовка приміщення;
- підготовка сировини;
- підготовка первинної тари;
- приготування розчину;
- фільтрація розчину;
- укупорка;
- стерилізація;
- контроль на герметичність;
- контроль на механічні вclusions;
- маркування та пакування готової продукції;

На стадії «підготовка сировини» відбувається зважування основних та допоміжних речовин, які входять до складу препарату. Процес зважування компонентів відбувається у спеціальних приміщеннях, які зазвичай оснащені ламінарним потоком повітря. Ламінарний потік – це потік, в якому вся маса повітря в обмеженому об'ємі рухається з однаковою швидкістю, близько $0,3-0,45 \text{ м/с} \pm 20 \%$. Ламінарний потік виносить із кімнати всі завислі у повітрі частинки, що надходять із будь-яких джерел (персонал, устаткування, тощо) [22, 79, 80, 120].

На стадії «підготовка первинної тари» відбуваються процеси миття, сушки, стерилізації та охолодження. Як первинне упакування частіше використовують скляну тару: ампули і флакони. Миття – це один із самих відповідальних процесів виробництва. Він складається із зовнішнього та внутрішнього миття. Для зовнішнього миття використовується метод «душвання». Особливо надвитратним процесом є миття ампул. Для внутрішнього миття існують вакуумний, ультразвуковий, термічний та шприцевий методи. Кожен з цих

методів володіє як своїми перевагами, так і недоліками. Але найбільш ефективним для внутрішнього миття ампул є поєднання декількох методів.

Сушіння скляного первинного упакування здійснюється за допомогою продувки зовнішньої та внутрішньої поверхні чистим повітрям. Стерилізація відбувається у спеціальних стерилізаційних тунелях, які складаються з трьох зон: зона нагрівання, зона стерилізації та зона охолодження. У зоні нагрівання температура повітря складає близько 180 °С та відбувається процес досушування. У зоні стерилізації температура повітря складає близько 340 °С, тому зразу відбувається стерилізація скляної тари. У зоні охолодження температура повітря складає близько 30 °С. Тут відбувається охолодження флаконів і ампул [58, 165, 177].

Для приготування ін'єкційних розчинів використовуються спеціальні реактори, які герметично закриваються, обладнані оболонкою та перемішувачем пристроєм. Для приготування водних розчинів ін'єкційних препаратів використовують воду для ін'єкцій. Її застосовують як розчинник при приготуванні ЛЗ для парентерального застосування або для розведення субстанцій перед використанням. Воду для ін'єкцій одержують із води питної або води шляхом дистиляції [22, 79, 80, 120].

На стадії «фільтрація розчину» відбувається очищення розчину від механічних включень, а також від мікроорганізмів при фільтруючій стерилізації. У залежності від механізму затримування включень розрізняють фільтри глибинні та мембранні. При виробництві парентеральних розчинів застосовують саме мембранні фільтри різного діаметру пор [11, 12, 56, 70, 72, 103].

Стадія «наповнення та запайка склотари» є однією з найбільш відповідальних стадій у виробництві ін'єкційних розчинів, оскільки неякісне або тривале у часі запаювання ампул і обкатка ковпачками призводить до браку продукції. У технологічному процесі виробництва ін'єкційних ЛЗ існують два загальновідомі способи наповнення ампул: вакуумний та шприцевий. При вакуумному способі неможливе точне дозування розчину. На сьогодні цей спосіб майже не застосовується у виробництві, адже проходить значний проміжок часу

між наповненням та запайкою ампул. Шприцевий спосіб має більш складне апаратне оформлення та малу продуктивність у порівнянні з вакуумним. Проте, саме цей спосіб наповнення ампул дає можливість точного дозування розчину, до того ж між наповненням та запайкою ампул проходить невеликий проміжок часу. Для запаювання ампул використовують газові пальники та лазерну технологію [70, 72, 112, 185].

Стадія «стерилізація» може бути здійснена наступними методами: парова стерилізація, радіаційна стерилізація, газова стерилізація, стерильна фільтрація. Допускається модифікувати або комбінувати ці методи за умови проведення валідації вибраної процедури стерилізації як щодо її ефективності, так і щодо збереження цілісності продукту [22, 58, 120].

Для контролю ампул на герметичність застосовують три відомі методи: вакуумування, контроль за допомогою розчину індикатора (для водних розчинів) та мильного розчину (для олійних розчинів), контроль за світлінням газового середовища усередині ампули під дією високочастотного електричного поля [58, 70, 72, 103].

На стадії «контроль на механічні вклучення» відбувається 100 % контроль якості парентеральних розчинів за наявністю видимих вклучень візуально і за допомогою використання спеціальних автоматичних приладів, дія яких заснована на принципі світлоблокування. Також проводиться вибірковий контроль за наявністю невидимих вклучень за допомогою інструментальних методів (фотометричний та мембрано-мікроскопічний методи) [58, 70, 72].

Маркування продукції може бути здійснено нанесенням напису або використанням етикеток [58, 70, 103].

В останній час, завдяки планомірному розвитку техніки, створено автоматичні поточні лінії. Використання таких ліній дає можливість поєднати декілька технологічних стадій в одному обладнанні (підготовка, наповнення та запайка ампул, тощо), а також майже повністю виключити фізичну працю людини. Укупорювання флаконів ковпачками проводиться завжди автоматично.

Виробничі стадії у залежності від способу досягнення стерильності поділяються на дві категорії [22]:

- продукція остаточно стерилізується у первинній упаковці;
- продукція виробляється в асептичних умовах на всіх або декількох стадіях.

Асептичні умови забезпечують захист продукту від попадання мікроорганізмів на всіх етапах технологічного процесу. Асептичні умови необхідні при виготовленні термолабільних препаратів, а також малостійких систем – емульсій, колоїдних розчинів, тобто препаратів, які не стерилізуються у первинній упаковці [56, 70, 72, 103, 165]. Асептичні умови повинні завжди застосовуватися при ліофілізації нестійких АФІ [83].

Проте, не менш важливу роль відіграє дотримання правил асептики при виготовленні ЛЗ, які витримують термічну стерилізацію, оскільки цей метод стерилізації не звільняє продукт від загиблених мікроорганізмів та токсинів, що може призвести до пірогенної реакції при введенні такого ЛЗ [56]. Для запобігання контамінації, а також для підвищення якості ЛЗ кожен технологічний етап проводять у спеціальному приміщенні з визначеним класом чистоти [57]. Приклади операцій, які потрібно виконувати у зонах з різними класами чистоти, наведені у табл. 1.5.

Таблиця 1.5

Приклади операцій, які потрібно виконувати у зонах різних типів

Клас	Продукція, яка підлягає фінішній стерилізації	Продукція, яка виробляється в асептичних умовах
A	Наповнення продуктом, коли ризик значний	Приготування та наповнення в асептичних умовах
C	Приготування розчинів, коли ризик незначний. Наповнення продуктом	Приготування розчинів, які підлягають фільтрації
D	Приготування розчинів та підготовка первинної упаковки для подальшого наповнення	Роботи з первинною упаковкою

Виходячи з вищенаведеного можна зробити висновок, що виробництво парентеральних ЛЗ – це складне, багатостадійне виробництво, яке має свої специфічні особливості, та займає одне з провідних місць у виробництві всіх ЛЗ.

1.4. Характеристика основних стадій технологічного процесу ліофілізації

У фармацевтичній промисловості процес ліофілізації застосовують для отримання ЛЗ із субстанцій, які є гідролітично нестійкими та термолабільними. Використання сублімаційного сушіння дозволяє отримати препарати високої якості, стабільні у процесі зберігання не менше, ніж 2 роки [4].

Процес сублімаційного сушіння використовується для отримання препаратів для ін'єкцій, очних крапель, ліпосомальних ЛФ, антибіотиків, протипухлинних препаратів, вакцин, сироваток та ін. При додаванні відповідного розчинника (вода для ін'єкцій, 0,9 % розчин натрію хлориду та ін.) ліофілізат швидко розчиняється (переходить у початковий стан) і є готовим до вживання [10, 62, 110, 121].

Основи процесу ліофілізації. Процес ліофілізації є тривалим і енергетично трудомістким. Тому розробка економічного процесу сублімації є вкрай важливим елементом для промислового виробництва ЛЗ. Даний технологічний процес можна розділити на три основні фази: заморожування, сублімація льоду (первинна сушка) та видалення залишкової вологи при температурі вище 0 °С (досушування) [16, 43, 56]. Першою стадією сублімації є заморожування, і її слід проводити з урахуванням евтектичних температур, які є індивідуальними для кожної речовини [68, 99].

Евтектична або криогідратна температура – це температура, при якій відбувається кристалізація (заморожування) розчину, що підлягає висушуванню. При зазначеній температурі знаходяться у рівновазі рідина та тверда фаза, що утворюється при заморожуванні. Заморожування розчинів, як і заморожування чистих речовин, відбувається при постійній температурі. Встановлення

евтектичної температури лабільних препаратів є обов'язковим, оскільки це дозволяє визначити допустимий рівень нагрівання при висушуванні препаратів [147-149].

Різні речовини характеризуються своїми евтектичними точками (температурами). Тому їх враховують при заморожуванні розчинів, оскільки властивості кінцевого сухого продукту, висушеного сублімацією, будуть змінюватися залежно від умов заморожування. Швидкість заморожування визначає форму і розміри кристалів льоду, що утворюються [16, 122, 123]. У кінці етапу заморожування препарат набуває структури, від якої будуть залежати умови сублімації та якість кінцевого продукту. Режимы заморожування також впливають на розміри отриманих кристалів замороженого продукту. При повільному заморожуванні утворюються великі кристали, а при швидкому – дрібні. Витримування замороженого препарату при низьких температурах може змінювати його фізико-хімічні властивості, тому слід вивчити вплив тривалості знаходження замороженого препарату у даних умовах [160, 162, 178].

Із дрібних кристалів сушка проходить швидше, оскільки в цьому випадку відношення поверхні до об'єму матеріалу буде значно більшим. При сушінні дрібних кристалів отримують світлий, легкорозчинний порошок, а при повільному – осмолений, який розчиняється повільно [110,121].

Первинна сушка полягає у сублімації льоду із замороженого продукту [62]. Сублімація льоду може відбуватися у тому випадку, коли парціальний тиск парів у камері ліофільної установки буде нижчим від тиску парів води над продуктом [110].

Різниця тисків може бути досягнута як шляхом підвищення тиску пари над поверхнею матеріалу, що висушується, так і шляхом зниження тиску у навколишньому середовищі за допомогою конденсації пари на охолоджувальній поверхні, поглинання хімічними речовинами або безпосереднього видалення в атмосферу за межі сублімаційної установки [43, 104, 160].

Вторинна сублимація – процес досушування (видалення залишкової вологи) або абсорбованої води (10-35 % від початкового вмісту води у препараті) шляхом зміни термобаричних умов у камері [181].

Технологічні параметри сублимаційної сушки встановлюються експериментально і є індивідуальними для кожного матеріалу, що висушується. Слід зазначити, що загальні закономірності технології сушіння препаратів біологічного походження, які можна було б використовувати у промисловості, не винайдені. Для кожного препарату їх необхідно розробляти індивідуально.

Видалення вологи з матеріалів повинно проводитися при оптимальних умовах, які встановлюють шляхом лабораторних досліджень, а потім перевіряються і переносяться у промислове виробництво. Оптимальний режим повинен забезпечувати мінімальну тривалість сушіння та найкращі технологічні властивості висушеного препарату, ефективне використання відповідного обладнання [104, 121, 123].

Допоміжні речовини, що застосовуються у процесі ліофілізації. До допоміжних речовин, що використовуються у виробництві сублимаційно висушених препаратів, відносяться: розчинники, наповнювачі, консерванти, регулятори рН, солубілізатори, стабілізатори, кріопротектори. Вони повинні забезпечити збереження належного терапевтичного ефекту, стабільності розчину до ліофілізації, фармакокінетичних і фармакотерапевтичних параметрів ЛІЗ [7].

Для підтримки рівня рН в установленому інтервалі найчастіше застосовують такі буферні агенти: ацетатні, фосфатні; натрію і калію гідроксиди, органічні кислоти і їх солі [8].

Основним розчинником, що використовується для розчинення речовин, у процесі ліофілізації є вода для ін'єкцій. Крім води, для приготування розчинів використовуються і неводні розчинники (етанол, багатоатомні спирти та ін.) [43]. Застосування наведених розчинників дозволяє збільшити концентрацію препарату у розчині та швидкість сублимації, зменшити час розчинення готового продукту [51].

Природа розчинника і його кількість впливають на всі етапи ліофілізації. Тому його вибір є дуже важливим і може впливати на швидкість і ступінь кристалізації речовини, що висушується, і його кристалічну структуру [122].

Як наповнювачі, що вводяться до складу ЛФ, якщо вміст АФІ є незначним або речовина, яка піддається ліофілізації, є малорозчинною у воді, найчастіше використовуються: високомолекулярні сполуки – полівінілпіролідон (ПВП) [23]; вуглеводні – сахароза, лактоза; багатоатомні спирти – маніт, сорбіт; амінокислоти – гліцин.

Кріопротектори – речовини, що захищають компоненти ЛФ у процесі ліофілізації від шкідливої дії заморожування. Серед них найбільш відомі гліцерин, диметилсульфоксид, цукри, гліколи і деякі полімерні сполуки (ПВП, поліетиленоксид та ін.) [7, 160, 181]. Дані речовини послаблюють ефект кристалізації, змінюючи її характер. Наприклад, цукри, полімери та спирти знижують температуру заморожування води і уповільнюють її кристалізацію [8].

При процесі ліофілізації введення навіть невеликої кількості допоміжних речовин може вплинути не тільки на показники якості ЛП, а й на його фармакотерапевтичні властивості. Тому при розробці ін'єкційних ЛФ враховують властивості як діючих, так і допоміжних речовин, що забезпечують фармакологічні властивості препарату та його хімічну стійкість. При цьому питання про склад ЛФ і концентрацію речовин вирішується для кожної субстанції індивідуально з проведенням фізико-хімічних, технологічних, і біофармацевтичних досліджень препарату, що розробляється. Визначення оптимального співвідношення діючих і допоміжних речовин є необхідною умовою отримання якісного та стабільного ЛП [7, 83, 148].

Результати досліджень, що викладені в цьому розділі, опубліковані в 14 друкованих роботах: [1, 2, 3, 36, 37, 38, 76, 77, 81, 82, 91, 116, 145].

Висновки до розділу 1

1. В результаті проведених маркетингових досліджень вітчизняного фармацевтичного ринку щодо ЛЗ для лікування онко- та імунопатологій 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. Доведено перспективність цієї субстанції, як АФІ, при розробці нових ЛЗ широкого спектра дії.

3. Проаналізовано технологічні аспекти створення перентеральних ЛЗ та виявлено, що їх виробництво – це складний, багатостадійний, трудомісткий процес. Акцентовано увагу на основних стадіях технологічного процесу та показано критичні точки при виготовленні ін'єкційних і ліофілізованих ЛЗ.

4. На основі бібліосемантичного аналізу показано, що у фармацевтичній промисловості застосовують процес ліофілізації для отримання ЛЗ із субстанцій, які є гідролітично нестійкими та термолабільними. Використання сублімаційного сушіння дозволяє отримати препарати високої якості, які стабільні у процесі зберігання.

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАГАЛЬНОЇ МЕТОДОЛОГІЇ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Вибір загальної методології досліджень

Сучасний фармацевтичний ринок України представлений в основному ЛЗ іноземного виробництва (70 %). При чому, велика кількість препаратів мають низьку якість (Індія, Китай, тощо) [31, 32, 48, 52].

Враховуючи все вищезазначене, розширення асортименту ЛПЗ вітчизняного виробництва є одним з пріоритетних завдань фармації. Саме розробка нових вітчизняних ЛЗ належної якості може не тільки скоротити кількість експортованих препаратів на фармацевтичному ринку України, але й збільшити кількість імпортованої вітчизняної продукції.

Метою дисертаційних досліджень було створення нового вітчизняного апіпрепарату для ін'єкцій на основі ОБ для лікування онко- та імунопатологій. Для досягнення поставленої мети необхідно було вибрати та обґрунтувати оптимальну кількість діючих та допоміжних речовин, а саме:

- концентрацію діючої речовини – отрути бджолоїної – здійснювали на підставі фармакотехнологічних та фармакологічних досліджень;

- допоміжні речовини для одержання стабільного ін'єкційного розчину, які обирали на підставі фізико-хімічних досліджень;

- вид ЛФ препарату, що розробляється, який здійснювали з урахуванням технологічних особливостей діючої субстанції, а також аналізу ринку імуностимулюючих та протионкологічних препаратів. Саме парентеральна ЛФ є найбільш розповсюдженою на ринку даної категорії ЛЗ.

З аналізу літературних джерел відомо, що парентеральна ЛФ забезпечує 100 % біодоступність лікарської речовини (ЛР), що є дуже важливим для ЛПЗ комбінованої дії [5, 6].

Таким чином, експериментальні дослідження були проведені у наступній послідовності:

- розробка технології отримання діючої субстанції (АФІ) – ОБ;
- проведення фізико-хімічних та мікробіологічних досліджень субстанції, одержаної за створеною технологією;
- обґрунтування концентрації АФІ на підставі технологічних та фармакологічних досліджень;
- визначення концентрації допоміжних речовин на підставі фізико-хімічних досліджень;
- розробка раціональної технології виготовлення апіпрепарату для ін'єкцій;
- встановлення критеріїв якості отриманого препарату за допомогою фізико-хімічних, фармакотехнологічних та мікробіологічних методів дослідження, а також створення на їх основі проектів МКЯ та ТР на виробництво даного препарату;
- дослідження стабільності апіпрепарату для ін'єкцій за проектом МКЯ з метою обґрунтування його терміну придатності та умов зберігання;
- проведення фармакологічних досліджень отриманого розчину для ін'єкцій та їх обговорення.

Дотримання вище наведеного плану дозволило нам створити ефективний та безпечний, а також економічно доступний апіпрепарат для ін'єкцій на основі ОБ.

2.2. Характеристика об'єктів досліджень

З метою теоретичного обґрунтування складу, оптимізації технологічних параметрів та стандартизації кількісних характеристик компонентів ЛФ об'єктами дослідження стала субстанція ОБ, яка забезпечує основний

фармакотерапевтичний ефект, та її суміш з допоміжними речовинами, а також сам розчин для ін'єкцій.

Отрута бджолина (Venenum Apium) (Наказ МОЗ України № 427 від 15.09.2003 р.; Реєстраційне посвідчення № Р.09.03/07400).

Характеристика показників якості ОБ наведена в табл. 2.1.

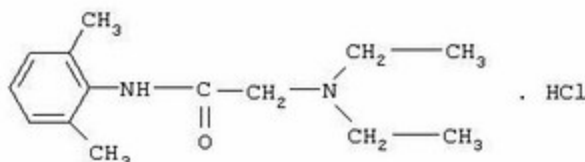
Таблиця 2.1

Показники якості ОБ згідно АНД «Отрута бджолина» (Venenum Apium)		
Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
1	2	3
Опис	Жовтий з сіруватим або буруватим відтінком порошок. Застосовується у виробництві нестерильних лікарських форм.	За п.1, візуально
Розчинність	Розчинний у воді <i>P</i> , 96 % етанолі <i>P</i> та ацетоні <i>P</i> .	За п.2, ДФУ, 1 вид., 1.4.
Ідентифікація Пептиди	З біуретовим реактивом <i>P</i> з'являється синє забарвлення.	Метод титрування
Фосфоліпазна активність	Фосфоліпазна активність повинна відповідати вимогам розділу кількісне визначення.	Спектрофотометричний метод
Активність глюкозамінглікангідролазного комплексу (ГАГТ)	Активність глюкозамінглікангідролазного комплексу повинна відповідати вимогам розділу кількісне визначення.	
Втрата в масі при висушуванні	Втрата в масі при висушуванні не повинна перевищувати 12 %.	За п.4, ДФУ, 1 вид., 2.2.32
Нерозчинні у воді домішки	Нерозчинних у воді <i>P</i> домішок має бути не більше 10 %	За п. 5 АНД, Наказ МОЗ України № 427 від 15.09.2003 р., РП № Р.09.03/07400
Загальна зола	Не повинно бути більше 2 %	За п.6, ДФУ, 1 вид., 2.4.16

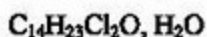
Продовж. табл. 2.1

1	2	3
<p>Кількісне визначення</p> <p>1. Визначення активності фосфоліпази А</p> <p>2. Визначення активності глюкозамінглікан-гідролазного комплексу (ГАГТ)</p>	<p>Активність фосфоліпази А в 1 мг препарату має бути не менше за 100 МО.</p> <p>Активність ГАГТ в 1 мл препарату має бути не менше 70 мМО.</p>	<p>За п.7.1, метод титрування</p> <p>За п.7.2, АНД, Наказ МОЗ України № 427 від 15.09.2003 р., РП № Р.09.03/07400. Спектрофотометричний метод</p>
Зберігання	У сухому, захищеному від світла місці, при температурі не вище + 18 °С, в упаковці виробника.	
Термін придатності	5 років.	

Лідокаїну гідрохлорид (Lidocaini hydrochloridum) (ДФУ 2.0, Том 2, с. 401-403) [27].



2-Диетиламіно-2', 6'-ацетоксилидиду гідрохлорид, або α-диетиламіно-2, 6-диметилацетаніліду гідрохлориду, моногідрат.



М. м. 288,8

Білий або майже білий кристалічний порошок, дуже легко розчинний у воді, легко розчинний у 95% спирті, розчинний у хлороформі, практично нерозчинний в ефірі.

Температура плавлення від 74 °С до 79 °С. рН 4,0 – 5,5 (0,5 % водний розчин, потенціометрично, ДФУ, 1 2.2.3). Важкі метали – не більше 0,0005 % (5ppm). Вода – від 5,5 % до 7,0 %. Сульфатна зола – не більше 0,1 %.

Використовується як анестезуючий засіб.

Натрію хлорид (Natrii chloridum) (ДФУ 2.0, с. 490) [30].

NaCl

М.м. 58.44

Вміст: не менше 99,0 % і не більше 100,5 %, у перерахунку на суху речовину.

Кристалічний порошок білого або майже білого кольору або безбарвні кристали, або крупинки білого або майже білого кольору. Легко розчинний у воді *P*, практично не розчинний в етанолі *P*.

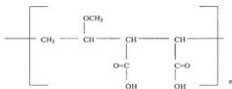
Важкі метали – не більше 0,0005 % (5ppm). Втрата в масі при висушуванні – не більше 0,5 %. Амонію солі – не більше 0,004 % (40 ppm).

Маніт (Mannitolum) (ДФУ 2.0, с. 430) [30].

Вміст: не менше 97,0 % і не більше 102,5 %, у перерахунку на безводну речовину.

Кристали або порошок білого або майже білого кольору. Легко розчинний у воді *P*, дуже мало розчинний в етанолі (96 %) *P*. Виявляє поліморфізм.

Питоме оптичне обертання – від 23 ° до 25 °, у перерхунку на безводну речовину. Питома електропровідність – не більше 20 мкСм×см⁻¹. Температура плавлення від 165 °С до 170 °С. Відновні цукри – не більше 0,1 %, у перерахунку на глюкозу. Важкі метали – не більше 0,0005 % (5ppm). Втрата в масі при висушуванні – не більше 0,5 %.



C₆H₁₄O₆

М.м. 182.2

Використовується як наповнювач при виробництві нестерильних та стерильних ЛПІ.

Етанол (96 %) (Ethanolum (96 per centum)) (ДФУ 2.0, с. 233) [30].



М.м. 46,07

Прозора, безбарвна, летка, легкозаймиста рідина, гігроскопічна. Змішується з водою *P* і метиленхлоридом *P*.

Температура кипіння – 78 °С. Відносна густина – від 0,805 до 0,812.

Застосовується як розчинник.

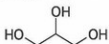
Пропіленгліколь. (III) (RS)-пропан-1,2-діол. (ДФУ 2.0, с. 563) [30].



М.м. 76,1

В'язка, прозора, безбарвна гігроскопічна рідина, без запаху, пекуча на смак. Змішується з водою і спиртом. Змішується з водою, спиртом етиловим у всіх співвідношеннях. Не змішується з жирними оліями. Застосовується у виробництві МЛФ як компонент основ.

Гліцерин. Пропан-1,2,3-триол. (ДФУ 2.0, с. 162) [30].



М.м. 92,1

В'язка, липка на дотик, прозора, безбарвна, солодка на смак, без запаху рідина. Температура кипіння 290 °С; показник заломлення – 1,4740. Змішується в будь-яких співвідношеннях з водою, етанолом, метанолом, ацетоном, нерозчинний у хлороформі й ефірі, розчинний в їх сумішах з етанолом. Поглинає вологу з повітря (до 40 % за масою). При змішуванні гліцерину з водою виділяється тепло і відбувається контракція (зменшення об'єму).

Гліцерин використовується як пом'якшувач для шкіри, допоміжна речовина у технології медичних та косметичних кремів, мазей, супозиторіїв,

компонент емульгаторів [113, 130].

Поліетиленгліколь-300 (ПЕГ-300) (Макроголі) (Macrogola, ДФУ 2.0, с. 424) [30].

Макроголі являють собою суміш полімерів із зігільною формулою $\text{H}-(\text{OCH}_2\text{-CH}_2)_n\text{-OH}$, де n – середня кількість оксіетиленових груп.

Прозора, в'язка, безбарвна, або майже безбарвна, гігроскопічна рідина. Змішується з водою *P*, дуже легко розчинний в ацетоні *P*, етанолі (96 %) *P* і метиленхлориді *P*, практично не розчинний у жирних оліях і мінеральних маслах.

Застосовується як розчинник.

Натрію сульфат безводний, або натрію метабісульфат (Natrii sulfis anhydricus) (ДФУ 2.0, с. 486) [30].

Na_2SO_3

М.м. 126.0

Вміст: не менше 95.0 % і не більше 100.5 % Na_2SO_3 .

Порошок білого або майже білого кольору. Легко розчинний у воді *P*, дуже мало розчинний в етанолі (96 %) *P*.

Бензиловий спирт (Alcohol benzylicus) (ДФУ 2.0, с. 82) [29].

$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$

М.м. 108.1

Вміст: не менше 98.0 % і не більше 100.5 %.

Прозора, безбарвна, масляниста рідина. Розчинний у воді *P*, змішується з етанолом (96 %) *P* і жирними та ефірними оліями.

Відносна густина: від 1.043 до 1.049.

Вода для ін'єкцій (Aqua ad iniectionem) (ДФУ 2.0, с. 125) [30].

H_2O

М.м. 18.02

Вода для ін'єкцій – вода, яка використовується як розчинник для приготування ЛЗ для парентерального застосування (вода для ін'єкцій «in bulk») або для розведення субстанцій або ЛЗ для парентерального застосування перед використанням (вода для ін'єкцій стерильна). Прозора, безбарвна рідина.

Загальний органічний вуглець – не більше 0,5 мг/л. Нітрати – не більше 0,00002 % (0.2 ppm). Алюміній – 0,000001 % (10 ppb). Бактеріальні ендотоксини – менше 0,25 МО/мл.

2.3. Методи досліджень

При виконанні роботи були використані сучасні фармакотехнологічні, фізико-хімічні, мікробіологічні та фармакологічні методи дослідження, які дозволяють оцінювати використані зразки вихідних речовин і якість готового лікарського засобу (ГЛЗ) [20, 25-30, 33, 58, 69, 130, 163].

Препарат «Апікаїн-Р» оцінювали за наступними фізико-хімічними показниками: зовнішній вигляд, колір, розчинність, втрата в масі при висушуванні, ідентифікація, кількісне визначення у перерахунку на мелітин.

Опис. Аморфний порошок сірувато-жовтого або жовтого кольору. Гігроскопічний.

Розчинність. Легко розчинний у воді з утворенням опалесцентних розчинів, практично не розчинний у 95 % етанолі і ацетоні.

Втрата в масі при висушуванні. Близько 0,1 г препарату (точна наважка) сушили при температурі 100-105 °С до постійної маси. Втрата в масі не повинна перевищувати 7 %.

Методики технологічного контролю опрацьованого ЛЗ

Ідентифікація АФІ

Для виявлення АФІ у субстанції ОБ та розчині для ін'єкцій застосовували загальноприйняті якісні реакції тотожності [25-30, 133, 134].

Реакція з 0,9 % ізотонічним розчином натрію хлориду

У 2 пробірки однакового діаметру вносили по 0,5 мл суспензії еритроцитів, додавали по 0,3 мл 0,9 % ізотонічного розчину натрію хлориду. Пробірки поміщали на водяну баню, нагріту до 37 °С. Через 5 хвилин в першу (контрольну) пробірку додавали 0,2 мл 0,9 % ізотонічного розчину натрію хлориду, а в другу (дослідну) – 0,2 мл розчину препарату (1: 5000).

Вміст контрольної пробірки повинен залишитися без зміни, вміст дослідної – має стати прозорим протягом 5 хвилин, тобто через нього повинно бути видно стандартний шриффт, поставлений безпосередньо до стінки пробірки (мелітин).

Визначення фосфоліпазної активності: див. розділ «Кількісне визначення».

Примітки:

1. *Приготування суспензії еритроцитів.* 4 мл декалітованої крові збирали у склянку і додавали 6 мл 1 % розчину натрію цитрату. Суміш ретельно, але обережно, перемішували і центрифугували протягом 10 хвилин при 3000 об./хв. Потім надосадову рідину відсмоктували і до осаду еритроцитів додавали 10 мл 0,9 % ізотонічного розчину натрію хлориду. Суміш знову обережно перемішували і центрифугували 10 хвилин. Надосадову рідину відсмоктували і повторювали промивання осаду ще раз. До 1 мл осаду еритроцитів додавали 9 мл 0,9 % ізотонічного розчину натрію хлориду і ретельно перемішували. Суспензію еритроцитів застосовували свіжовиготовлену.

2. *Приготування 1 % розчину натрію цитрату.* У мірній колбі на 100 мл розчиняли 1 г натрію цитрату у 0,9 % ізотонічному розчині натрію хлориду і розбавляли тим же розчином до 100 мл.

3. *Приготування стандартного шриффту.* Три лінії шириною 1, 0,6 і 0,3 мм наносили на білий папір чорним на відстані 5 мм один від одного.

Кількісне визначення

Фосфоліпазний метод. Близько 0,12 г препарату (точна наважка) розчиняли у 0,9 % ізотонічному розчині натрію хлориду у мірній колбі місткістю 50 мл і доводили об'єм розчину тим же розчинником до мітки. 1 мл даного розчину переносили у мірну колбу місткістю 50 мл і доводили об'єм розчину 0,9 % ізотонічним розчином натрію хлориду до мітки.

Жовтково-буферну суміш розливали у три пробірки по 1 мл і додавали 0,9 % ізотонічного розчину натрію хлориду: у першу пробірку 0,34 мл, у другу – 0,46 мл і в третю (контрольну) – 0,5 мл. Всі пробірки поміщали у термостат при 37 °С. Через 5 хвилин у першу пробірку додавали 0,16 мл розчину препарату, у

другу – 0,04 мл. Пробірки залишали у термостаті ще на 10 хвилин, потім поміщали на киплячу водяну баню на 2 хвилини.

Вміст першої пробірки не повинен згортатися. Вміст другої і третьої пробірок повинен згортатися. Проводили три паралельні визначення.

Запобігання теплової коагуляції жовтково-буферної суміші випробуванним розчином в кількості 0,16 мл вказує на наявність в даному об'ємі не менше 8 мкг ОБ, повна коагуляція жовтково-буферної суміші в присутності випробуваного розчину у кількості 0,04 мл вказує на наявність в даному об'ємі не більше 2 мкг ОБ.

Примітки:

1. *Приготування жовтково-буферної суміші.* 10 мл жовтка свіжого курячого яйця ретельно очищали від плівки, змішували з 12,5 мл фосфатного буферного розчину. Суміш застосовували свіжоприготованою.

2. *Приготування фосфатного буферного розчину.* 3 мл 1/15 М розчину двозаміщеного фосфату натрію (11,876 г в 1 л) змішували з 2 мл 1/15 М розчину однозаміщеного фосфату калію (9,078 г в 1 л). рН отриманого розчину дорівнює 7. Розчин застосовували свіжовиготовлений.

Жовтково-буферну суміш та фосфатний буферний розчин готували відповідно до вимог ФС 42-1486-84 «Отрута бджолина очищена» (*Venenum Apium depuratum*).

Метод високоефективної рідинної хроматографії (ДФУ 1.1, п. 2.2.29, с. 60-62) [25].

При ідентифікації субстанції ОБ використовували наступні розчинники та реактиви: ацетонітрил для хроматографії (Sigma-Aldrich, кат. № 34851), метанол для хроматографії (Sigma-Aldrich, кат. № 34860), воду Millipore Direct-Q5), кислоту трифтороцтову (Merck, кат. № 8.08260).

Для проведення ідентифікації компонентів ОБ були використані стандарти апаміну (Sigma-Aldrich, кат. № A1289, с. 111M4138), мелітину (Sigma-Aldrich, кат. № M7391, с. 098K4131), фосфоліпази А₂ (Sigma-Aldrich, кат. № P9279, с. 032M4001V). Для визначення вмісту ОБ у зразках ліофілізованого препарату

використовували попередньо стандартизовану ОБ. Аналіз проводили методом зовнішнього стандарту, як розчин порівняння був використаний розчин стандартизованої ОБ у номінальній концентрації (1 мг/мл) [108, 127, 128].

Методика кількісного визначення мелітину та апаміну в ОБ.

Розчин порівняння А. Близько 0,010 г ФСЗ апаміну (точна наважка) поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, додають 5 мл води, перемішують до розчинення, доводять до позначки тим самим розчинником та перемішують.

Розчин порівняння Б. Близько 0,020 г ФСЗ мелітину (точна наважка) поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, додають 25 мл води, перемішують до розчинення, додають 1 мл розчину порівняння А, доводять до позначки водою та перемішують.

На хроматограмі випробуваного розчину, отриманого при проведенні методики «Кількісне визначення мелітину та апаміну», час утримування основного піка мелітину / апаміну повинен відповідати часу утримування основного піка мелітину / апаміну на хроматограмі стандартного розчину з точністю $\pm 2\%$.

Реактиви та матеріали:

1. Оцтова кислота льодяна.
2. Фосфорна кислота.
3. Трифтороцтова кислота для хроматографії.
4. Ацетонітрил для хроматографії.
5. Вода високоочищена MilliQ.

Примітки:

Для аналізу були приготовлені відповідні розчини:

– розчин стандарту апаміну: 0,2 мг стандарту апаміну розчиняли в 1,8 мл суміші вода-ацетонітрил (10:90, об/об);

– розчин стандарту фосфоліпази А₂: 0,8 мг стандарту фосфоліпази А₂ розчиняли у 1,8 мл суміші вода-ацетонітрил (10:90, об/об);

– *розчин стандарту мелітину*: 10,9 мг стандарту мелітину розчиняли в 20,0 мл води;

– *випробуваний розчин 1*: вміст флакону ліофілізату розчиняли в 1,0 мл рухомої фази А;

– *випробуваний розчин 2*: вміст флакону ліофілізату розчиняли в 1,0 мл рухомої фази А;

– *розчин ОБ*: 25,7 мг субстанції ОБ поміщали у колбу на 25 мл, додавали 15 мл рухомої фази А, витримували на ультразвуковій бані 5 хв, доводили до мітки тим же розчинником і профільтрували через нейлоновий бактеріальний фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

Перевірка придатності хроматографічної системи:

Результати кількісного аналізу вважаються достовірними, якщо виконуються вимоги тесту „Перевірка придатності хроматографічної системи”.

Примітки:

1. Приготування буферного розчину. Близько 2,0 г тетрадециламонію броміду та 2,0 г тетрагептиламонію броміду розчиняють в 440 мл води Р, додають 55 мл фосфатного буферного розчину, рН 7,0, 5 мл цитратного буферного розчину, рН 5,0, (який готують розчиненням 20,17 г лимонної кислоти у 800 мл води, та доводять рН до 5,0 10 % розчином натрію гідроксиду). Об'єм розчину доводять до 1000 мл водою та перемішують.

2. „Перевірка придатності хроматографічної системи”. Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються наступні вимоги:

– ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком *мелітину* / *атаміну* на хроматограмі розчину порівняння повинна бути не менше 2000 теоретичних тарілок (ДФУ І вид., с. 47);

– відносне стандартне відхилення розраховане для величин площі піку *мелітину* / *атаміну*, розраховане з хроматограм розчину порівняння не має перевищувати 2 %;

- ступінь розділення між будь-якими піками в розчині препарату повинна бути не менше 5;
- коефіцієнт асиметрії піка, розрахований з піка *мелітину* / *апаміну*, повинен бути від 0,8 до 2,0.

Коефіцієнт асиметрії піка (T) розраховують за формулою (2.1):

$$T = \frac{\mu_{0,05}}{2 \cdot f}, \quad (2.1)$$

де: $\mu_{0,05}$ - ширина піка на висоті 5 % від базової лінії, мм;

f – відстань від початку піка на висоті 5 % від базової лінії до перпендикуляру, проведеного з його вершини, мм.

З метою виконання вимог тесту придатності хроматографічної системи, допускається коректування умов хроматографування.

Хроматографують випробовуваний розчин, отримуючи таку ж кількість хроматограм, що й для розчину порівняння. Записують хроматограми та вимірюють площі піків *мелітину* / *апаміну*.

Отримують послідовно $n_0=2,3,\dots,8$ паралельних хроматограм розчину порівняння та розраховують відносне стандартне відхилення RSD. Величина n_0 є достатньою, якщо значення RSD, розраховане для площ піків апаміну та піком мелітину, не перевищує RSD_{\max} , що наведені у табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Кількість паралельних інжекцій, n_0						
2	3	4	5	6	7	8
RSD_{\max}						
1,01	2,68	3,85	4,75	5,50	6,16	6,76

Якщо одержані величини RSD не перевищує величини RSD_{\max} , поперемінно хроматографують однакову кількість $n \geq n_0$ разів розчин порівняння Б та препарат (випробовуваний розчин).

Підбір умов хроматографування наведено в табл. 2.3 та 2.4.

Таблиця 2.3

Параметри хроматографування

Хроматографічна колонка	Ascentis RP-Amid, 250x4,6 мм, з розміром часток 3 мкм або аналогічна
Швидкість потоку	1,0 мл/хв
Довжина хвилі детектування	210 нм
Об'єм інжектування	20 мкл
Температура автосамплера	25 °С
Температура термостата колонок	40 °С

Рухома фаза А – вода – трифтороцтова кислота (1000 : 1, об/об); рухома фаза В – ацетонітрил – трифтороцтова кислота (1000 : 1, об/об).

Перед хроматографуванням розчини порівняння фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор не більше 0,45 мкм.

Таблиця 2.4

Умови хроматографування

Час (хв.)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)	Режим елювання
0 – 2	95	5	Ізократичний режим
2 – 12	95 → 30	5 → 70	Лінійний градієнт
12 – 16	30	70	Ізократичний режим
12 – 16	30 → 95	70 → 5	Лінійний градієнт
16 – 20	95	5	Ізократичний режим

Вміст апаміну (X), у мг/мл препарату, розраховували за формулою:

$$X = \frac{S_1 * m_0 * P}{S_0 * 10 * 50 * 100} \quad (2.2)$$

де: S_1 – середнє значення площ піку апаміну, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піку апаміну, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_0 – маса наважки ФСЗ апаміну, мг;

P – вміст активної речовини ФСЗ апаміну, %;

Вміст мелітину (X), у мг/мл препарату, розраховували за формулою:

$$X = \frac{S_1 * m_0 * P}{S_0 * 50 * 100} \quad (2.3)$$

де: S_I – середнє значення площ піку мелітину, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піку мелітину, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_0 – маса наважки ФСЗ мелітину, мг;

P – вміст активної речовини ФСЗ мелітину, %.

Вміст апаміну має бути від 0,018 г до 0,022 мг/мл (90,0 – 110,0 %).

Вміст мелітину має бути від 0,45 г до 0,55 мг/мл (90,0 – 110,0 %).

Стерильність. Оскільки розроблений нами розчин для ін'єкцій не піддається кінцевій стерилізації, то вихідна сировина (ОБ) повинна бути стерильною. Дослідження стерильності ОБ проводили на базі Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова» за методиками, викладеними у ДФУ 1-е вид., п. 2.6.1. [24].

Розчин для ін'єкцій на основі ОБ оцінювали за наступними фізико-хімічними та фармакотехнологічними показниками:

- зовнішній вигляд;
- вологість;
- прозорість;
- ступінь забарвлення;
- ідентифікація;
- рН розчину;
- густина;
- об'єм, що витягається;
- механічні включення: невидимі та видимі частки.

Також були проведені дослідження аномальної токсичності та тест на апірогенність.

Прозорість. Визначення прозорості препарату для ін'єкцій проводили згідно ДФУ 1-е вид., п. 2.2.1, с. 15. [25]. Розчин для ін'єкцій повинен бути прозорим у порівнянні з водою для ін'єкцій.

Кольоровість. Визначення кольоровості проводили згідно ДФУ 1-е вид., п. 2.2.2, метод II, с. 15. [25]. Отриманий препарат повинен витримувати порівняння з еталоном Y_5 .

pH. Визначення pH розчину для ін'єкцій проводили потенціометрично на приладі pH-метр фірми «METTLER TOLEDO» (Швейцарія), згідно ДФУ 1-е вид., п. 2.2.3, с. 17. [25].

Густина. Визначення густини препарату «Апікаїн-Р» проводили згідно ДФУ 1-е вид., п. 2.2.5, за методом 1, с. 20. [25].

Механічні включення.

Невидимі частки. Визначення невидимих часток у препараті проводили згідно ДФУ 1-е вид., доп. 2, п. 2.9.19, с. 164. [26, 33]. Для випробування відбирали 50 ампул препарату об'ємом 2 мл. Кожну ампулу перед використанням перевертали 20 разів і розкривали у стерильному ламінарному потоці повітря. Розчин з ампул переносили шприцом медичним у колбу місткістю 100,0 мл. Розчин зі шприца видавлювали поволі, уникаючи утворення струменя і бульбашок повітря. Колбу закривали пробкою та залишали на 2 хв, щоб з розчину виділилися бульбашки повітря.

Визначення невидимих механічних включень у розчині проводили лічильником часток APSS 2000 фірми «PARTICLE MEASURING SYSTEMS» (США). Принцип дії апарату – блокування світла. Для проведення одного вимірювання кількості невидимих механічних включень використовували 2,0 мл аналізованого розчину. Результат аналізу обчислювали як середній з п'яти паралельних вимірювань.

Часток, розміром ≥ 10 мкм – повинно бути не більше 6000 на ампулу.

Часток, розміром ≥ 25 мкм – повинно бути не більше 600 на ампулу.

Примітка:

1. Підготовка води, вільної від невидимих механічних включень. Воду, вільну від невидимих механічних включень отримували, фільтруючи воду для ін'єкцій крізь мембранний фільтр з розміром пор 0,2 мкм або менше.

2. Підготовка посуду. Колбу, місткістю 100,0 мл і шприц медичний місткістю 10 мл після промивання ополіскували водою, вільною від механічних включень.

Видимі частки. Визначення видимих часток у препараті проводили візуально згідно ДФУ 1.1, п. 2.9.20, с. 166. [26]. Розчин для ін'єкцій не повинен містити видимих механічних включень.

Аномальна токсичність. Визначення аномальної токсичності ліофілізату «Апікаїн-Р» проводили згідно ДФУ 1.0, п. 2.6.9, с. 109. [25]. Розчин для ін'єкцій повинен бути нетоксичним.

Пірогени. Тест на пірогени проводили згідно ДФУ 1.0, п. 2.6.8, с. 107. [25]. Розчин для ін'єкцій повинен бути апірогенним [20].

Мас-спектри записані за допомогою LCMS-системи аналізу багатокомпонентних сумішей органічного походження, яка містить: хроматограф Shimadzu Analytical HPLC SCL10Avr, автосамплер Gilson 215, мас-спектрометр PE SCIEX API 165 [27-30, 133, 134].

Хроматографічний аналіз проводили на хроматографі Varian ProStar з двоканальною градієнтною системою (Varian ProStar 210) та УФ-діодною матрицею (Varian ProStar 330). Використовували колонки Merck Silica 60 (150×4,6 мм), Zorbax Sil (250×4,6 мм), Microsorb 100-5 C18 (250×4,6 мм), Ascentis RP-Amide (250×4,6 мм), Диасорб-130-C16T (250×15 мм). Використовували розчинники та реактиви: ацетонітрил «gradient grade» (Sigma-Aldrich), метанол «gradient grade» (Sigma-Aldrich), калій дигідрофосфат (Merck), кислота трифтороцтова (Fluka), вода (Millipore Direct-Q5).

Терези аналітичні Ohaus Adventuer AR2114.

Зразки стандартних речовин (С3): Апамін (Sigma-Aldrich), Мелітин (Sigma-Aldrich), фосфоліпаза А₂ (Sigma-Aldrich) сер. 032M4001V.

Зразки: ліофілізат розчину отрути бджолоїної (зразок №1), ліофілізат розчину отрути бджолоїної з лідокаїном (зразок № 2), отрута бджолоїної – субстанція, сер. 250В 20.01.95, Ariandra Ltd Co.

Аналіз ліофілізату «Апікаїн-Р» на динамічно модифікованому силікагелі

Метод аналізу розробляли на колонках, заповнених немодифікованим силікагелем з використанням у якості елюента суміші органічних розчинників (ацетонітрил, метанол) з фосфатним буфером.

Аналіз на колонці Merck Silica 60.

Приготування розчину для аналізу. 16 мг ОБ поміщують в колбу на 5 мл, додають 2 мл ацетонітрилу для хроматографії, 2 мл 1М фосфатного буфера и доводять до позначки водою для хроматографії. Перед вводом пробу фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор 0,45 мкм.

Рухома фаза А: суміш ацетонітрил-метанол (95:5) – 10 %, 0,70М розчин дигідрофосфату калію – 90 %.

Рухома фаза В: суміш ацетонітрил-метанол (95:5) – 50 %, 0,35М розчин дигідрофосфату калію – 50 %.

Елюювання градієнтне.

Детектування за довжини хвилі 210 нм.

Аналіз на колонці Zorbax Sil.

Приготування розчину для аналізу. 10 мг ЛПОБ поміщують в колбу на 10 мл, розчиняють в 5 мл суміші ацетонітрил-вода для хроматографії (1:1), доводять до позначки тим самим розчинником. Перед вводом пробу фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор 0,45 мкм.

Рухомі фази – як для розділення на колонці Merck Silica 60. Елюювання градієнтне. Детектування за довжини хвилі 210 нм.

Метод аналізу розробляли на аналітичних колонках Microsorb 100-5 C18 (250 x 4,6 мм), Ascentis RP-Amide (250 x 4,6 мм), та напівпрепаративній колонці Диасорб-130-C16T (250x15 мм), з використанням у якості елюенту суміші ацетонітрил-вода-трифтороцтова кислота.

Аналіз на колонці Ascentis RP-Amide

Колонка Ascentis RP-Amide (розмір пор сорбенту 100Å) призначена для аналізу в умовах високого вмісту води у рухомих фазах. Але за результатами літературного пошуку, найкраще розділення відбувається на сорбентах з розміром пор 180 та 300 Å.

Для цієї колонки були підібрані умови, в яких проходить розділення, я припускаю, що отримані піки відповідають фосфоліпазі і мелітгїну, але в них можуть міститися і мінорні компоненти.

Приготування розчину для аналізу. 10 мг ОБ вміщують в колбу на 10 мл, розчиняють у 5 мл суміші ацетонїтрил-вода для хроматографії (1:1), доводять до позначки тим самим розчинником. Перед вводом пробу фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор 0,45 мкм.

Рухома фаза А: вода з доваванням 0,1% трифтороцтової кислоти.

Рухома фаза В: ацетонїтрил з доваванням 0,1% трифтороцтової кислоти.

Елюювання градієнтне.

Детектування при довжині хвилі 210 нм.

Для спроби масштабування розробленої методики було виконане розділення ОБ на напівпрепаративній колонці Діасорб-130-С16Т.

Приготування розчину для аналізу. 200 мг сухої ОБ вміщують в колбу на 5 мл, додають 2,5 мл суміші ацетонїтрил-вода-трифтороцтова кислота (800:200:1), 2 мл води для хроматографії, вміщують на ультразвукову баню на 5 хвилин, ретельно перемішують та доводять до позначки водою. Отримують жовту каламутну рідину. Перед вводом пробу фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор 0,45 мкм.

Рухома фаза А: вода з доваванням 0,1% трифтороцтової кислоти.

Рухома фаза В: ацетонїтрил з доваванням 0,1% трифтороцтової кислоти.

Елюювання градієнтне. Детектування за довжини хвилі 210 нм.

Об'єм вводу проби 250 мкл (відповідає 10 мг ОБ).

2.4. Методики фармакологічних та мікробіологічних досліджень

Фармакологічні дослідження. Дослідження були проведені за загальноприйнятими методиками (токсикологічними, біохімічними, статистичними) [17, 55, 107].

Вивчення місцевоподразнюючої дії ЛЗ «Апікаїн-Р». Для порівняння використовували препарат «Апітоксин-Р» без лідокаїну при різних шляхах введення (внутрішньом'язовому та підшкірному).

При проведенні експерименту керувалися методичними рекомендаціями [17, 55, 151].

Дослідження були проведені на білих безпородних щурах-самцях з вихідною масою тіла 280-300 г. В експерименті було використано 12 тварин.

Щури були отримані з розплідника лабораторних тварин ПП «Далі-2001» (Київ). Під час експерименту тварини знаходилися у віварії при температурі повітря 18-20 °С та вологості 50-60 %, природному світловому режимі «день-ніч», у пластикових клітках, на стандартному харчовому раціоні.

Щури були розподілені на чотири групи по 3 тварини у кожній. Першій і третій групі щурів у ліву *M. vastus lateralis* і підшкірно вводили препарат «Апітоксин-Р» без лідокаїну, другій та четвертій групі – у ліву *M. vastus lateralis* і підшкірно в область лівої лопатки вводили препарат «Апікаїн-Р» з лідокаїном у дозі 0,5 мл /тварина. При внутрішньом'язовому введенні контролем служила права *M. vastus lateralis*, при підшкірному – область правої лопатки. Всім тваринам в якості контролю вводили ізотонічний розчин хлориду натрію 0,5 мл / тварина.

Оцінка місцевоподразнюючої дії включала щоденний макроскопічний контроль стану місць введення, а також макроскопічне і гістологічне дослідження біоптатів, взятих з місць введення препаратів після закінчення експерименту.

Вивчення токсичності препарату «Апікаїн-Р». Вивчення токсичності препарату «Апікаїн-Р» проводили у гострому досліді на мишах при підшкірному введенні. При проведенні експериментів керувалися методичними рекомендаціями [17, 55, 107].

Дослідження проведені на мишах обох статей з вихідною масою тіла 20-25 г. Експериментальні групи тварин налічували по 5 самців і 5 самок. Усього в експерименті використано 80 мишей.

Тварини були отримані з розплідника лабораторних тварин ПП «Далі-2001» (Київ). У період карантину і під час експерименту тварини знаходилися у віварії при температурі повітря 18-20°C, вологості 50-60 %, природному світловому режимі «день-ніч», у стандартних клітках, на стандартному харчовому раціоні.

Досліджувані препарати вивчали при одноразовому підшкірному введенні в дозах 5,0, 8,0, 10 і 20 мл / кг за ЛФ, що відповідає 4,0, 5,0, 6,3 і 10 мг / кг за діючою речовиною.

Критеріями оцінки токсичності препарату були клінічна картина інтоксикації, життєпроможність тварин, динаміка маси тіла тварин (вихідні дані, 3, 7, 14 діб). Спостереження за тваринами проводили протягом 2-х тижнів.

Визначення показника «мікробіологічна чистота» проводили згідно ДФУ [27]. «Мікробіологічну чистоту» досліджували на 3-х серіях розчину ОБ (серія 10310, серія 20310, серія 30310). У кожній серії було по 5 флаконів з маркуванням.

Живильні середовища, які застосовували для проведення дослідницької роботи, були стандартними, а виробник – «Махачкалінський завод живильних середовищ». Всі середовища готували у відповідності з вимогами виробника (кількість порошку в г/літр, рН середовища, умови автоклавування тощо). Кожне середовище, яке використовувалось в експерименті, перевіряли на ростові властивості згідно нормативних документів.

При проведенні досліджень застосовували тіогліколіве напіврідке середовище, рідке середовище Сабуро, тверді живильні середовища: живильний агар, середовище Сабуро. Для ідентифікації патогенного *St. aureus* та *Ps. aeruginosa* і різних видів ентеробактерій – середовище Чистовича, кров'яний агар на основі живильного агару з додаванням дефібринованої крові або еротрицитарної маси, середовище Ендо [112].

Перед проведенням дослідження на «мікробіологічну чистоту» проводили дослідження на відповідність ростових властивостей живильних середовищ. Живильні середовища інокулювали невеликою кількістю відповідних тест-

штамів мікроорганізмів (10^2 колонієутворюючих одиниць (КУО) / мл). Зростання тест-культури мікроорганізму на даному середовищі через 18-20 год підтверджує його придатність для дослідницької роботи. На середовище Сабуро засівали *Candida alb.* На живильний агар – *Ps. aeruginosa* та *B. subtilis*, на Чистовича – *St. aureus*, на середовище Ендо – *E. coli*. Тіогліколіве середовище витримували у термостаті при температурі 35 °С впродовж 3 діб.

Всі культури мікроорганізмів відповідали таксономічному визначенню штаму, а морфологія колоній при культивуванні на середовищах та морфологія клітин при мікроскопії була типовою. Тіогліколіве середовище відповідало вимогам на стерильність – ріст мікроорганізмів відсутній, середовище прозоре.

Дослідження розчину ОБ за показником «мікробіологічна чистота» проводили методом прямого посіву на рідкі середовища (бактерії). При цьому розливали стерильно у пробірки тіогліколіве середовище і рідке середовище Сабуро по 10,0 мл. В кожну з пробірок вносили по 1 мл (1 г) досліджуваного препарату. Висіви інкубували протягом 28 днів на тіогліколевому середовищі у термостаті при температурі 35 °С, висіви – на рідкому середовищі Сабуро при температурі 25 °С.

При дослідженні методом глибокого посіву (гриби), який включав додавання препарату у кількості 1 г (1,0 мл) до агару і прямого посіву (1 г або 1,0 мл) – на агар визначили кількість життєздатних клітин мікроорганізмів і грибів. Дослідження глибокого та прямого посіву препаратів на чашках Сабуро показали відсутність росту грибів. При культивуванні на живильному агарі – ріст мікроорганізмів не спостерігався.

Після контамінації мікроорганізмами препарат через певні інтервали часу висівали на агар для визначення числа життєздатних клітин. Відсутність росту на агарі або не збільшення кількості колоній після 14 днів інкубації вказували на те, що препарат відповідає вимогам ДФУ.

Після 6-ти годинного культивування логарифм числа життєздатних клітин склав для *Candida alb.* – 3,28. Клітини *Candida alb.* не виділяються після 7-ми, 14-ти та 28-ми діб культивування. Після 6-ти годин культивування логарифм

числа колоній мікроорганізмів склав 3,0 для *St. aureus* і 3,05 для *Ps. aeruginosa*. Через 24 год мікроорганізми не рееструвалися. На 7-у, 14-у та 28-у добу інкубації колонії *St. aureus* та *Ps. aeruginosa* не рееструвалися. Дослідження показало, що розчин для ін'єкцій ОБ відповідав критерію «А» згідно вимог ДФУ.

Статистичну обробку результатів фармакотехнологічних, фізико-хімічних, фармакологічних і мікробіологічних досліджень проводили за методикою, наведеною в розділі “Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту” ДФУ 1.1, с. 187 [25, 107].

Висновки до розділу 2

1. Обгрунтовано загальну концепцію комплексного дисертаційного дослідження, яка враховує особливості підходу до розробки складу та технології ін'єкційних ЛЗ.

2. Вивчені властивості АФІ і допоміжних речовин, які використовуються при розробці та дослідженні ЛЗ «Апікаїн-Р» – ліофілізованого порошку ОБ для приготування розчину для ін'єкцій.

3. На підставі фармакотехнологічних, фізико-хімічних, мікробіологічних та фармакологічних методів досліджень теоретично обгрунтовано план досліджень зі створення парентерального ЛЗ на основі ОБ, що дозволяє об'єктивно оцінити технологічну та фармакотерапевтичну якість препарату.

4. Для хімічного контролю основних компонентів ОБ (апаміну, мелітину та фосфоліпази А₂) наведені методики якісного і кількісного визначення.

РОЗДІЛ 3

ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СКЛАДУ ТА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІОФІЛІЗОВАНОГО ПОРОШКУ ДЛЯ ПРИГОТУВАННЯ ІН'ЄКЦІЙНОГО РОЗЧИНУ ОТРУТИ БДЖОЛИНОЇ

Необхідність створення ЛЗ для ін'єкцій на основі ОБ зумовлена тим, що ОБ містить близько 40 БАР, які є надзвичайно ефективними у лікуванні різних захворювань [2, 45, 145]. Основний АФІ в ОБ – мелітин, який у поєднанні з іншими складовими частинами ОБ стимулює імунну систему та прискорює процес відновлення уражених тканин. Хімічні процеси, викликані дією ОБ, стимулюють викид у кров гормону кортизону, а також особливих речовин (допамін, серотонін і норадреналін), кожен з яких може допомогти полегшити біль і повернути колишню рухливість суглобів, ушкоджених артритом [46, 53, 98, 100, 116]. Крім того, ОБ може бути використана як імуностимулятор для лікування пухлинних захворювань [82].

3.1. Розробка технології розчину для ін'єкцій на основі отрути бджолиної

Основним етапом наших досліджень було отримання розчину для ін'єкцій з метою подальшої ліофілізації. Концентрація розчинів з ОБ була обрана на основі літературних даних і проведених попередніх фармакологічних досліджень і становила у перерахунку на мелітин 1 мг/мл, яка відповідає терапевтичній концентрації АФІ в аналогічних препаратах на основі ОБ [88, 89, 176].

Були виготовлені модельні розчини, які містили тільки ОБ та розчинник – воду для ін'єкцій (табл. 3.1).

Розчини готували масо-об'ємним способом та візуально проводили спостереження. В серії 10210 розчин був каламутним, в серії розчинів 20210 та 30210 нерозчинених часток ОБ не спостерігалось.

Таблиця 3.1

Склади 3-х серій розчинів отрути бджолоїної

Компонент розчину	Кількість компоненту у розчині		
	серія 10210 (0,1%)	серія 20210 (0,05%)	серія 30210 (0,01%)
Отрута бджолоїної	0,1 г	0,05 г	0,01 г
Вода для ін'єкцій	до 100 мл	до 100 мл	до 100 мл

Після цього кожний розчин ОБ фільтрували крізь мембранний фільтр з розміром пор 0,2 мкм, виробництва «Domnik hunter» (Англія) з фільтруючою мембраною із поліефірсульфону (тип фільтру PROPOR PES). Процес фільтрації вели за допомогою лабораторної установки для фільтрації фірми «Millipore» (США). Фільтрацію проводили під тиском стиснутого повітря [103].

Після фільтрації розчини ОБ розливали за допомогою ручного дозатора у стерильні ампули місткістю 5 мл і запаювали, використовуючи інертний газ (азот) для заміщення вільного об'єму повітря в ампулі.

Процес наповнення і запайки ампул здійснювали в асептичних умовах у зоні класу А з ламінарним потоком повітря.

Після того як процес наповнення та запайки було закінчено всі ампули з розчинами ОБ різної концентрації перевіряли на механічні вклучення. У всіх зразках розчину ОБ вони були відсутні.

При спостереженні за зовнішнім виглядом та рН зразків розчину для ін'єкцій з ОБ впродовж 1, 5, 14 днів було виявлено, що препарат є нестабільним. Експериментальні дані наведені у табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Результати дослідження розчину для ін'єкцій з ОБ

Серія	Термін зберігання розчину, доба		
	1	5	14
1	2	3	4
Зовнішній вигляд			
10210	прозорий розчин	помутніння розчину	каламутний розчин
20210	прозорий розчин	прозорий розчин	помутніння розчину
30210	прозорий розчин	прозорий розчин	прозорий розчин
Механічні вклучення			

Продовж. табл. 3.2

1	2	3	4
10210	відсутні	завись	осад
20210	відсутні	відсутні	опалесценція
30210	відсутні	відсутні	відсутні
	pH		
10210	5,22	5,10	4,84
20210	5,24	5,18	4,96
30210	5,21	5,10	5,07

З даних табл. 3.2 видно, що використання як вищих, так і нижчих концентрацій ОБ не призводить до отримання необхідних результатів. Зберігається тенденція зниження рН та зміна зовнішнього вигляду розчину.

На наступному етапі досліджень нами була розглянута і досліджена можливість стабілізації розроблюваного розчину шляхом використання низки допоміжних речовин, що здатні виконувати функції сольобілізаторів та стабілізаторів [7, 87]. Для проведення дослідження нами були обрані багатоатомні спирти: пропіленгліколь, гліцерин; поліетиленоксид-300, спирт стиловий. Як антиоксидант – запропоновано натрію метабісульфіт [7, 35, 59].

З літературних джерел відомо, що для стабілізації ін'єкційних розчинів часто застосовують консерванти – хімічні речовини, які запобігають мікробному забрудненню препарату, оскільки в результаті мікробної контамінації також може спостерігатися зміна зовнішнього вигляду розчину та інших властивостей препарату [68, 74, 79, 112].

Як консервант нами запропонований спирт бензиловий [7, 59]. В подальших дослідженнях було напрацьовано декілька серій розчинів для ін'єкцій з додаванням різних сольобілізаторів, стабілізаторів, склад яких наведено у табл. 3.3.

Зразки готували масо-об'ємним способом. Кожну наважку ОБ кількісно переносили до хімічного стакану, в який попередньо додавали воду для ін'єкцій та визначену суму неводних розчинників при температурі 25 ± 5 °C, та перемішували на магнітній мішалці протягом 10-15 хвилин.

Таблиця 3.3

Склад серій ін'єкційних розчинів з отрутою бджолоною

№ серії	Склад, %							
	Отрута бджолона	Гліцерин	ПЕГ-300	Спирт етиловий 96 %	Пропіленгліколь	Натрію метабісульфіт	Спирт бензиловий	Вода для ін'єкцій
1070213	0,1	15	-	20	-	0,05	-	до 100
2070213	0,1	-	20	20	-	0,05	-	до 100
3070213	0,1	10	10	10	-	0,05	1	до 100
ЗА070213 з лідокаїном	0,1	10	10	10	-	0,05	1	до 100
4070213	0,1	-	10	10	10	0,05	1	до 100

Потім доводили об'єм розчину у мірному циліндрі водою для ін'єкцій до 100 мл. Після цього розчин ще раз перемішували впродовж 5 хв.

Одержані зразки були каламутними, та в деяких спостерігалась опалесценція; більш прозорим був розчин серії 3070213, який не мав нерозчинених часток ОБ.

Після цього кожний розчин ОБ фільтрували крізь мембранний фільтр з розміром пор 0,2 мкм, виробництва «Domnik hunter» (Англія) з фільтруючою мембраною із поліефірсульфону (тип фільтру PROPOR PES) та розливали у флакони як описано вище.

Одержані зразки аналізували за зовнішніми характеристиками (колір, прозорість, відсутність механічних включень), та за кількісним вмістом мелітину за розробленою методикою [93].

Так, у результаті спостережень було виявлено, що отримати стабільний розчин для ін'єкцій так і не вдалося. Оскільки у кожній серії з виготовлених зразків вже протягом 2,5 міс було виявлено знижену кількість мелітину, помутніння розчину, а в деяких серіях випадіння осаду (серії 1070213 та 2070213). Також було виявлено зміну показника рН розчинів у кислий бік [88].

Узагальнюючи всі попередні дослідження, нами було прийнято рішення розробити готову ЛФ у вигляді ліофілізату для ін'єкцій ОБ по 1 мг у флаконах [12, 16, 65, 66, 84, 87, 88] з використанням для подальшої ліофілізації водного розчину.

3.2. Розробка складу готового лікарського засобу у вигляді ліофілізату отрути бджолої для приготування розчину для ін'єкцій по 1 мг

Першочерговим завданням було необхідним правильно обрати концентрацію АФІ та допоміжних речовин. Важливим є також вибір первинного пакування для препарату, оскільки це пов'язано з товщиною шару розчину, призначеного для ліофілізації [82]. На якість препарату впливають умови заморожування і режиму сублимаційного висушування. Їх правильний вибір дозволяє отримати високоякісний готовий продукт, який не змінює своїх властивостей протягом терміну придатності [10, 16].

Використання методу ліофілізації для стабілізації розчину ОБ у процесі зберігання було обумовлено крайньою чутливістю препарату до підвищених температур (термолабільність), світла (фотолабільність), наявності кисню у навколишньому середовищі та вологи [83, 90].

Для вибору оптимального складу та отримання стабільної ЛФ нами більш ретельно вивчалися фізико-хімічні властивості АФІ та допоміжних речовин [89].

Отрута бджолої – прозора, ароматична, жовтуватого кольору рідина, гіркувата на смак, пекуча, густина 1,085 – 1,131, в середньому 1,11 г/см³. На повітрі ОБ швидко висихає. Суха отрута гігроскопічна, легко розчиняється у воді і водно-гліцеринових сумішах, важче у водно-етанольних сумішах і кислотах, наприклад, мурашиній. У водному розчині, а також під впливом травних ферментів та інших окисників, ОБ швидко інактивується. Низькі температури і заморожування не чинять впливу на компоненти ОБ, а підвищення температури, світла, кисню, повітря інактивують і руйнують їх [45, 98]. Ці властивості ОБ ускладнюють отримання стабільного водного розчину, але обумовлюють можливість отримання ЛЗ на її основі у вигляді ліофілізату для приготування ін'єкційного розчину з використанням різних допоміжних речовин.

3.3. Обґрунтування вибору рН розчину отрути бджолоїної

Одним із основних фізико-хімічних параметрів, які впливають на стабільність парентеральних лікарських препаратів, є рівень рН. Для забезпечення необхідного значення рН ЛЗ при приготуванні розчинів використовують різні буферні системи, в основному, ацетатні, цитратні, фосфатні і їх комбінації, а також органічні і неорганічні кислоти, їх солі та лужні агенти [5, 79, 86].

Тому, важливим напрямком роботи при створенні препарату є дослідження впливу рН у встановлених межах на стабільність розчину ОБ. рН водного розчину ОБ 1:100 коливається від 4,0 до 6,0. З метою підтвердження цього інтервалу рН нами проведені дослідження 4 серій розчинів ОБ з різними значеннями рН, які досягалися додаванням 1М розчину натрію гідроксиду або 1М розчину кислоти хлористоводневої (табл. 3.4) [89, 93].

Таблиця 3.4

Показники якості розчинів ОБ з різними значеннями рН розчину

Показники (проект МКЯ)	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 (в перерахунку на мелітин, мг/мл): (0,90–1,10)	0,98	0,97	0,98	0,97	0,97	0,96
Лідокаїну гідрохлорид, мг/мл (0,45–0,55)	$0,48 \pm 0,03$	$0,49 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,02$

Примітка: $n = 5$; $P = 0,95$.

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.

У результаті проведених досліджень встановлено, що розчини з критичними значеннями рН впродовж 5 год не змінюють своїх фізико-хімічних характеристик, таких як прозорість, кольоровість, кількісний вміст АФІ, відсутність механічних включень у розчині. Вони відповідають встановленим у проекті МКЯ нормам.

Використання буферних систем, кислотних і лужних агентів для підтримки рН для розчинів на основі ОБ не є актуальним [5-6].

Тому, враховуючи отримані результати і дані літератури, для препарату на основі ОБ встановлені оптимальні межі рН – 4,0-6,0.

3.4. Вибір допоміжних речовин для лікарських засобів на основі отрути бджолиної

До допоміжних речовин, що використовуються у виробництві ліофільних препаратів, відносяться: розчинники, солнобілізатори, наповнювачі, консерванти, стабілізатори, кріопротектори. Вони забезпечують збереження належного терапевтичного ефекту і стабільність показників якості ЛП [7, 22, 51, 61, 68, 83].

Вміст ОБ у лікарській формі невеликий – 1 мг/мл, тому для отримання ліофілізату для приготування розчину для ін'єкцій ми застосовували різні формоутворюючі наповнювачі. Як наповнювачі найчастіше використовують високомолекулярні сполуки: полівінілпіролідон; полісахариди (камеді, пектини); дисахариди (сахароза, лактоза); багатоатомні спирти: маніт, сорбіт [7, 59, 88]. Для отримання ліофільного препарату на основі ОБ як наповнювач 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 [6, 7, 83, 88, 111].

Ін'єкції лікарських препаратів на основі ОБ викликають подразнення при внутрішньом'язовому введенні. У зв'язку з цим до складу препарату був введений

місцевий анестетик – лідокаїну гідрохлорид у концентрації 0,5 %. Така концентрація обрана на основі літературних даних та присутності на ринку України ін'єкційних ЛЗ з лідокаїну гідрохлоридом [6, 8, 22, 31-32].

Однією з вимог, що висуваються до ін'єкційних лікарських засобів, є ізотонічність розчину, що обумовлює необхідність доведення осмотичного тиску розчину до рівня осмотичного тиску біологічних рідин організму за допомогою додавання допоміжних речовин, здатних підвищувати осмотичність [8, 27, 58]. Нами запропоновано як регулятора ізотонічності натрію хлорид, що одночасно виконує роль наповнювача. Для визначення необхідної кількості натрію хлориду, що забезпечує ізотонічність розроблювального ЛЗ, використовували розрахунок по закону Вант-Гоффа, за допомогою рівняння Клапейрона (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Осмотичний тиск компонентів препарату без натрію хлориду

Діюча і допоміжні речовини	m, г/л	i	M	P
Бджолина отрута	1,00	-	-	-
Маніт	20,00	1,00	182,17	2,79
Лідокаїну гідрохлорид	0,50	1,86	288,80	0,08
Разом:				2,87

Загальний осмотичний тиск розчину за законом Дальтона складатиметься з осмотичного тиску всіх компонентів, тобто загальний осмотичний тиск P в розчині без натрію хлориду становить 0,1 атм. Осмотичний тиск ізотонічного розчину дорівнює осмотичному тиску крові та становить 7,4 атм, тому розчин необхідно ізотонувати додаванням натрію хлориду в кількості, що здатна збільшити осмотичний тиск на $7,4 - 2,87 = 4,53$ атм. Ця кількість розраховується за формулою:

$$X_{\text{NaCl}} = \frac{(7,4 - P) \times M_{\text{NaCl}}}{24,42 \times i_{\text{NaCl}}} = \frac{4,53 \times 58,44}{25,42 \times 1,86} = 5,59 \text{ г/л (мг/мл)}$$

Таким чином, для досягнення ізотонічності розчину слід додати натрію хлорид в кількості близько 6 мг / мл. На основі вивчення літературних даних і

теоретичних розрахунків був обраний наступний склад препарату на основі ОБ (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Найменування компонентів	Кількісний вміст в одній ампулі (флакони), мг	Функціональне призначення компонента
Отрута бджолина	1	Діюча речовина
Маніт	20	Формоутворюючий наповнювач
Лідокаїну гідрохлорид	0,5	Анестезуючий агент
Натрію хлорид	6,0	Ізотонічний регулятор
Вода для ін'єкцій	До 1,0 мл	Розчинник

З метою підтвердження теоретично обраного складу препарату на основі ОБ напрацьовані 3 серії препарату даного складу і вивчені його показники якості у процесі зберігання [79-80, 84]. Результати досліджень представлені в табл. 3.7.

Таблиця 3.7

Показники якості	Тривалість зберігання, міс.	Номера серій		
		5	6	7
1	2	3	4	5
Зовнішній вигляд (суха пориста маса білого кольору)	0 (вихідні дані)	Відповідає	Відповідає	Відповідає
	12	Відповідає	Відповідає	Відповідає
Розчинність (легко розчинний у 1 мл протягом 1 хвилини)	0 (вихідні дані)	Відповідає	Відповідає	Відповідає
	12	Відповідає	Відповідає	Відповідає
рН (4,0-6,0)	0 (вихідні дані)	5,50	5,35	5,40
	12	5,45	5,30	5,35
Прозорість (повинен бути прозорий в порівнянні водою P)	0 (вихідні дані)	Прозорий	Прозорий	Прозорий
	12	Прозорий	Прозорий	Прозорий

Продовж. табл. 3.7

1	2	3	4	5
Вологість (не більше 4,0 %)	0 (вихідні дані)	2,3	2,5	2,7
	12	2,3	2,5	2,6
Кількісний вміст отрути бджолиної в перерахунку на мелітин, мг/мл (0,90-1,10)	0 (вихідні дані)	0,98	0,97	0,99
	12	0,97	0,97	0,98
Кількісний вміст лідокаїну гідрохлориду, мг/мл (0,45-0,55)	0 (вихідні дані)	0,51	0,50	0,51
	12	0,51	0,50	0,51

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

Використання натрію хлориду у складі препарату надає розчину ізотонічності, а речовина-наповнювач маніт дозволяє отримати після ліофільної сушки добре сформованому масу у вигляді таблетки ЛЗ (ліофілізату для приготування розчину для ін'єкцій), що розчиняється в 1 мл води для ін'єкцій протягом 1-2 хв [77, 79, 86].

Як видно з табл. 3.7, обраний склад дозволяє отримати ліофілізат для приготування розчину для ін'єкцій на основі ОБ за показниками якості відповідає встановленим вимогам на момент випуску і у процесі зберігання (12 міс).

3.5. Вплив товщини шару розчину на якість ліофілізату для приготування розчину для ін'єкцій

Одночасно з розробкою складу ліофілізату для приготування розчину для ін'єкцій на основі ОБ проводили вивчення впливу товщини шару розчину на якість ліофілізату. З метою визначення оптимальної товщини шару для отримання препарату необхідної якості розчин на основі ОБ дозували у флакони місткістю 5 мл по 1, 2 і 4 мл і в ампули місткістю 2 мл по 0,5, 1 і 2 мл. Зразки

препарату сушили у сублимаційній сушарці згідно обраного режиму. Визначали якість ліофільного препарату за зовнішнім виглядом, рН розчину, залишкової вологи і кількісним вмістом АФІ. Дані досліджень представлені на рис 3. 1 і 3.2.

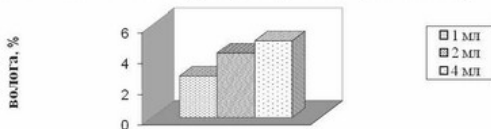


Рис. 3.1. Вплив товщини шару розчину у флаконі на показник залишкової вологи у ліофілізаті ОБ.

З рис. 3.1. видно, що при проведенні ліофілізації препарату у флаконах місткістю 5 мл з об'ємом наповнення 1 мл залишкова волога у ЛФ становила 3,2 %. Кількісний вміст ОБ по мелітину і рН розчину відповідали встановленим вимогам. У флаконах препарату з об'ємом наповнення 2 мл залишкова волога становила 4,5 %, з об'ємом наповнення 4 мл – 5 %, що не відповідало встановленій специфікації [79-80].

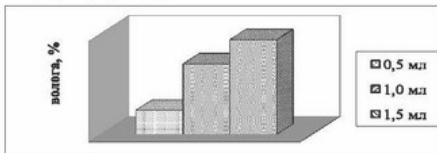


Рис. 3.2. Вплив товщини шару розчину в ампулі на показник остаточної вологи у ліофілізаті.

З рис. 3.2. видно, що при проведенні процесу ліофілізації препарату в ампулах місткістю 2 мл з об'ємом наповнення 0,5 мл залишкова волога в ЛФ становила 1,5 %. Кількісний вміст ОБ по мелітину і рН розчину відповідали вимогам встановленим показникам. За зовнішнім виглядом препарат являв собою суху нерівномірно пористу масу, що не відповідало вимогам за

показником «Опис». В ампулах з об'ємом наповнення 1 мл залишкова волога у препараті становила 3,7 %. Всі показники якості відповідали вимогам нормативної документації, з об'ємом наповнення 2 мл волога – 4,7 %, що не відповідало вимогам за показником «Волога». Кількісний вміст ОБ по мелітину в препараті становив 0,93 мг/мл, що не відповідало вимогам нормативної документації [93].

Таким чином, враховуючи отримані дані, оптимальний об'єм наповнення розчином для проведення процесу ліофілізації – 1 мл, як для ампул, так і для флаконів. Товщина шару ліофільного препарату при наповненні 1мл в ампулах була 14 ± 1 мм, у флаконах – 9 ± 1 мм, відповідно. Залишкова волога для препарату у флаконах становила – 3,2 %, а для препарату в ампулах – 3,7 %. За показниками рН, кількісним вмістом АФІ і зовнішнім виглядом препарат, як в ампулах, так і у флаконах відповідав встановленим показникам якості. Тому для первинного пакування ліофільного препарату на основі ОБ можна рекомендувати, як ампули, так і флакони з об'ємом наповнення 1 мл. Проте кращим первинним пакуванням при ліофілізації препаратів є флакони та спеціальні гумові пробки (тип 3) з прорізом для виходу вологи у процесі ліофілізації та можливістю герметизації флаконів у сушильній камері [6, 83-84].

3.6. Технологія приготування ліофілізату отрути бджолоїної

3.6.1. Приготування розчину отрути бджолоїної

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

Субстанції, що входять до складу ЛЗ, мають певний кількісний вміст і вологу у сировині. Залежно від відсоткового вмісту і вологи сировини, що надійшла, при завантаженні проводять розрахунок необхідної кількості субстанцій (ОБ, лідокаїну гідрохлориду, маніту, натрію хлорид) у технічній масі для завантаження за формулою:

$$X_2 = \frac{V \times X_1 \times 100}{100 - b},$$

- де: X_2 – маса наважки, мг;
 V – об'єм завантаження, мл;
 X_1 – концентрація в 100 %, мг/мл;
 b – волога, %.

Склад розчину ОБ наведено у табл. 3.8.

Таблиця 3.8

Склад розчину ОБ для ліофілізації

Вхідні інгредієнти	Кількісний вміст в одній ампулі (флакони), мг	Кількість інгредієнтів на дослідну серію
Отрута бджолина	1	10,0 г (тех. маса 10,8)
Лідокаїну гідрохлорид	20	5,0 г
Маніт	0,5	0,0200 г
Натрію хлорид	6,0	60,0 г
Води для ін'єкцій	1,0 мл	до 10,0 л

При розробці технології виробництва ЛЗ на основі ОБ використовували загальноприйнятту схему приготування ін'єкційних розчинів [22].

Параметри приготування дослідної серії на основі ОБ наведені в табл. 3.9.

Таблиця 3.9

Режим приготування розчину отрути бджолиної

Склад розчину, г/ порядок введення компонентів	Режим приготування		
	Температура, °C	Час, хв	Швидкість перемішування об/хв
Депірогенізація натрію хлориду	(180-200) °C	120	-
Натрію хлорид – 60,0 г Маніт – 200,0 г Води для ін'єкцій до 8,0 л	(20±5)°C	5-10	100-150
Натрію хлорид – 60,0 г Маніт – 200,0 г Отрута бджолина – 10,0 г Лідокаїну гідрохлорид – 5,0 г Води для ін'єкцій до 10л	(20±5)°C	15-20	100-150

У ємність для приготування розчину наливали 8 л води для ін'єкцій при температурі 25-30 ° С, проводили барботаж інертним газом азотом протягом 10-15 хв. Потім поступово при перемішуванні додавали розраховану кількість натрію хлориду, маніту і перемішували протягом 10 хв. Потім додавали розраховану кількість ОБ і лідокаїну гідрохлориду. Розчин перемішували протягом 15-20 хв. Доводили об'єм до необхідного водою для ін'єкцій, перемішували протягом 10 хв. Вимірювали рН розчину і передавали на фільтрацію (табл. 3.9) [86-87].

3.6.2. Вибір фільтруючого матеріалу для фільтрації розчину

Для проведення процесу фільтрації був визначений матеріал фільтру, який найбільш сумісний з розчином, і рейтинг пор, забезпечує необхідну очистку парентерального розчину від механічних частинок і мікроорганізмів [12, 16, 44].

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 «Ultipor N 66», фірми «Палл», Німеччина), поліефірсульфона (типу «PROPOR PES», фірми «Домнік Хантер», Англія). Вивчалися мембрани з розміром пор 0,45 мкм (попередня фільтрація) і 0,2 мкм (остаточна фільтрація) [103, 122].

Визначення придатності та ефективності фільтруючого матеріалу проводили наступним чином. Кожну мембрану поміщали в утримувач типу «Міліпор» (площа фільтруючої поверхні 12,56 см²). Розчин на основі бджолиної отрути пропускали через фільтр під тиском інертного газу азоту зі швидкістю потоку 1 мл / хв. Збирали фракції фільтрованого розчину через 20, 30, 40 хв.

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

Фільтруючий матеріал вважався придатним, якщо показники трьох паралельних випробувань збігалися з даними контрольного розчину (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

**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 $n = 5$; $P = 95\%$.

Отримані дані дозволили зробити висновок про сумісність розчину на основі ОБ з матеріалами фільтрів з капрону (типу «МІФІЛ», Білорусь), нейлону (типу «Ultipog N 66», фірми «Палл», Німеччина) і поліефірсульфона (типу «PROPOR PES», фірми «Домнік Хантер», Англія). Крім того, матеріал цих типів фільтрів по робочому діапазону рН відповідає досліджуваному розчину, витримує термічну стерилізацію і добре сумісний з діючою речовиною [79–80].

Для вибору оптимальних параметрів процесу фільтрації проводили фільтрацію розчину з використанням досліджених фільтруючих мембран. Фільтрацію проводили через мембрани з рейтингом пор 0,45 мкм (попередня фільтрація) і 0,2 мкм (остаточна фільтрація). Результати досліджень наведені в табл. 3.11.

Таблиця 3.11

Оптимальні параметри фільтрації розчину ОБ

Тип фільтруючого матеріалу	Технологічні параметри фільтрації							
	Тиск, МПа			Тривалість, хв.			Механічні включення	
							0,45 мкм	0,2 мкм
МФІЛ	0,04	0,06	0,08	10	8	5	Відсутність	Відсутність
Ultipor N 66	0,04	0,06	0,08	10	8	5	Відсутність	Відсутність
PROPOR PES	0,04	0,06	0,08	10	8	5	Відсутність	Відсутність

Як видно з даних табл. 3.11 процес фільтрації рекомендується проводити 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 [33, 84].

3.7. Технологія ліофілізації

3.7.1. Розробка режиму заморожування розчину отрути бджолоїної

При розробці готової ЛФ – ліофілізату ОБ по 1 мг у флаконах більш детально вивчали умови проведення процесу ліофілізації.

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).

Заморожування розчину – перша стадія процесу ліофілізації, від якого багато в чому залежить ефективність всього процесу. Наприкінці стадії заморожування близько 70-90 % вихідної вологи знаходиться у замороженому стані, а кількість, що залишилася знаходиться в адсорбованому вигляді. Температура заморожування, швидкість кристалізації і ступінь охолодження – важливі фактори, що впливають на загальний час сушіння та якість продукту. На підставі фізичних і хімічних властивостей продукту можна оптимізувати алгоритм дій при заморожуванні з метою досягнення найбільш ефективних

результатів ліофілізації, особливо таких, як висока якість препарату і тривалість сушки [68, 90, 104, 110, 121].

Для розробки режиму ліофілізації спочатку вивчали умови заморожування розчину на основі ОБ. Послідовно проводили визначення температури та способу заморожування розчину; вивчення впливу тривалості заморожування на якість кінцевого продукту. При розробці технології ліофілізації препарату на основі ОБ необхідно для встановлення певної температури заморожування розчину визначити евтектичну температуру, що має конкретне значення для кожної речовини [16, 90].

Нами був використаний термічний спосіб визначення евтектичної температури, як найбільш простий. В основі даного способу лежить фіксування температури зразка, який заморожений нижче евтектичної точки в процесі повільного відтавання. На кривій вимірювання температури матеріалу при досягненні евтектичної точки утворюється плато, відповідне часу, коли тепло, яке надходить ззовні, не призводить до підвищення температури, а витрачається на плавлення льоду при даній евтектичній «концентрації» розчину. Для заморожування використовували розчин ОБ з концентрацією 1 мг / мл, який розливали по 1 мл в ампули або флакони. Використовуючи термічний метод, встановили точку евтектики розчину на основі ОБ – 5 °С.

У процесі вивчення впливу швидкості заморожування на структуру препарату розчин на основі ОБ розливали по 1 мл в ампули або у флакони і заморожували на полиці сублимаційної установки до - 50 °С- 60 °С, застосовуючи наступні способи заморожування [16, 68, 147-149]:

1. Повільне (постадійне) заморожування (рис. 3.3) – препарат завантажували на полиці камери при температурі +20 °С, охолоджували полиці до - 20 °С і витримували 2 год. Далі полиці охолоджували від - 20°С до -30 °С і витримували ще 2,5 год, потім знижували температуру полиць від - 30 °С до - 40 °С, і витримували ще 2,5 год. Далі знижували температуру до досягнення препаратом температури -50 °С і витримували його протягом 13 год при даній температурі.

2. Швидке заморожування – препарат завантажували на полиці сублимаційної камери при температурі $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 чого температура препарату досягає $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, витримували його при даній температурі протягом 5 год (рис. 3.4).



Рис. 3.3. Кінетична крива повільного заморожування розчину на основі ОБ.

Оцінку впливу способу заморожування на якість ліофілізату для ін'єкцій ОБ проводили за такими показниками: зовнішній вигляд препарату, прозорість, волога, розчинність, значення рН, кількісний вміст ОБ по мелітину, кількісний вміст лідокаїну гідрохлориду.

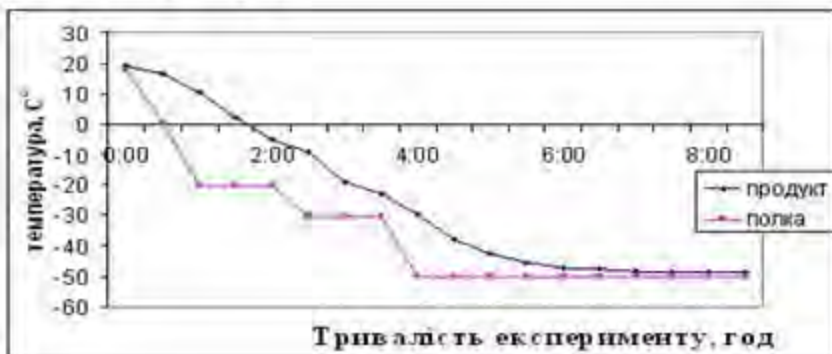


Рис. 3.4. Кінетична крива швидкого заморожування розчину на основі ОБ.

Показники якості ліофілізату для ін'єкцій на основі ОБ представлені в табл. 3.12.

Таблиця 3.12

Результати вивчення впливу способу заморожування на стабільність ліофілізованого препарату на основі отрути бджолиної

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 Р)	0	прозорий	прозорий
	12	прозорий	прозорий
рН (4,0–6,0)	0	5,50±0,05	5,55±0,06
	12	5,40±0,04	5,45±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±0,02	2,62±0,03
	12	2,62±0,01	2,63±0,02
Кількісний вміст ОБ в перерахунку на мелітин, мг/мл (0,90–1,10)	0	0,96±0,04	0,97±0,03
	12	0,96±0,02	0,96±0,03
Кількісний вміст лідокаїну гідрохлориду, мг/мл (0,45–0,55)	0	0,49±0,03	0,50±0,02
	12	0,48±0,03	0,49±0,02

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

3.7.2. Розробка режиму сублимаційної сушки препарату на основі отрути бджолиної

Ліофілізацію ЛФ проводили в сублимаційній установці ТГ-50 [10, 62, 104]. Для оптимізації технологічного процесу та отримання якісного препарату вивчали вплив швидкості підігріву продукту, тривалість сублимаційного сушіння і температури досушування. Розчин ОБ дозували по 1 мл у флакони місткістю

5 мл (товщина шару становила 9-10 мм) і піддавали швидкому заморожуванню, як описано в пункті 3.8.1. (метод 2). Після цього проводили сублимаційне сушіння замороженого розчину ОБ, використовуючи при цьому наступні режими:

Режим 1. 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 $3\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{год}$. Потім полиці нагрівали від $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ зі швидкістю $20\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{год}$, а від $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ зі швидкістю $4\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{год}$. Після досягнення препаратом температури $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (мінімальний тиск в камері 4,0 Па) його витримували при цій температурі протягом 4 год. Ліофілізація тривала 41 год (рис. 3.5).

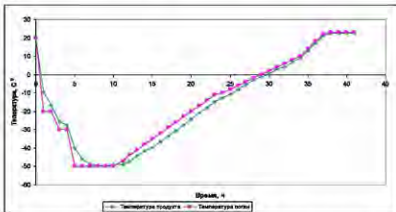


Рис. 3.5. Кінетична крива ліофілізації розчину ОБ відповідно режиму № 1.

Режим 2. 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 $6\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{год}$. Потім полиці нагрівали від $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+50\text{ }^{\circ}\text{C}$ зі швидкістю $30\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{год}$, а від $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+15\text{ }^{\circ}\text{C}$ зі швидкістю $2\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{год}$. Далі полиці нагрівали від $+15\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ зі швидкістю $3\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{год}$. Після досягнення препаратом температури $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (мінімальний тиск в камері 4,0 Па) його

витримували при цій температурі протягом 4 год. Ліофілізація тривала 33 год (рис. 3.6).

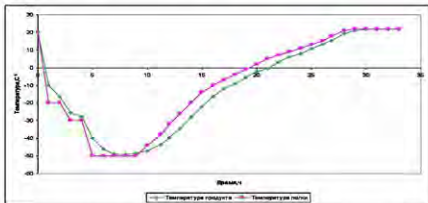


Рис. 3.6. Кінетична крива ліофілізації розчину ОБ відповідно режиму № 2.

Режим 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 $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ зі швидкістю $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{год}$. Потім полиці нагрівали від $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ зі швидкістю $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{год}$, а від $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ – зі швидкістю $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{год}$. Після досягнення препаратом температури $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (мінімальний тиск в камері 4,0 Па) його витримували при цій температурі протягом 4 год. Ліофілізація тривала 26 год (рис. 3.7).

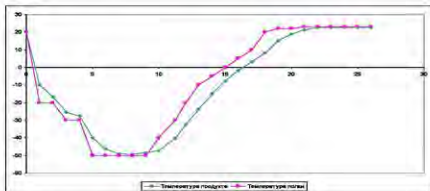


Рис. 3.7. Кінетична крива ліофілізації розчину ОБ відповідно режиму № 3.

Режим 4. Полиці витримували при температурі $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ і мінімальному тиску в камері (4,0-6,0Па) 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 полиці нагрівали 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 препаратом температури $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (мінімальний тиск в камері 4,0 Па) його витримували при цій температурі протягом 4 год. Ліофілізація тривала 33 год (рис. 3.8).

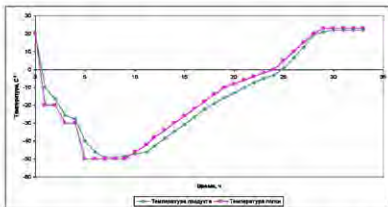


Рис. 3.8. Кінетична крива ліофілізації розчину ОБ відповідно режиму № 4.

Після завершення процесу сушіння вакуум в сублимаційній камері гасиди чистим азотом, пропущеним через стерильний фільтр з розміром пор $0,22\text{ }\mu\text{м}$. Флакони з препаратом вивантажували зі сублимаційної камери, закривали пробками і обкатували алюмінієвими ковпачками.

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 [80, 89].

При аналізі отриманих даних був обраний оптимальний режим ліофілізації, при якому можна отримувати препарат на основі ОБ відповідний всім заданим параметрам якості (табл. 3.13).

Таблиця 3.13

Результати впливу різних режимів ліофілізації на якість препарату

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 %.

За результатами досліджень розроблено, затверджено та опубліковано Укрмедпатентінформ МОЗ України інформаційний лист «Технологія виготовлення ліофілізованого препарату для ін'єкцій» (Додаток Л) та упроваджено в роботу аптек: ПАТ «Аптеки Запоріжжя», м. Запоріжжя; ТОВ «Аптека № 9», м. Харків (Додатки М.1 – М.2).

3.8. Вибір первинного пакування та дослідження його впливу на показники якості лікарських засобів

На стадії розробки ЛЗ на основі ОБ важливим етапом є вивчення впливу первинного пакування на стабільність препарату протягом терміну зберігання [56, 58, 95].

При вивченні товщини шару розчину для ліофілізації було встановлено, що кращим первинним пакуванням для ЛЗ є флакони по 5 мл, ніж ампули, через меншу товщину розчину при наповненні [80]. Тому вивчення стабільності ЛЗ

проводили тільки у флаконах, які застосовуються на фармацевтичних підприємствах та пройшли реєстрацію в установленому порядку.

Вивчення стабільності ЛЗ «Апікаїн-Р» проводили у первинному пакуванні у флаконах місткістю 5 мл із трубки скляної типу ФЛП зі скла медичного марки УСП-1 (водостійкість внутрішньої поверхні класу А) і нейтрального скла марки НС-1. Закупорювальні засоби (пробки) для скляних флаконів виготовлені з гумової суміші (бромкаучук) марки IP-119 і пробки типу LK-5 з гумових сумішей на основі бромбутилового і хлорбутилового каучуку. Виробник «Sanockie Zakłady Przemysłu Gumowego» STOMIL SANOK SA, (Польща). Флакони були герметично обтиснуті ковпачками алюмінієвими типу К-2-13 або К-2-14 за ТУ У 14257180-003-98. Результати визначення впливу різних видів первинного пакування на стабільність ліофілізату при зберіганні протягом 24 міс у флаконах з марки скла НС-1і УСП-1 представлені в табл. 3.14.

Таблиця 3.14

Показники якості ЛЗ «Апікаїн-Р» при зберіганні у флаконах із різних марок скла

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 вклучення	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
Кількісний вміст, мг/мл			
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. 3.14, флакони з марок скла НС-1 та УСП-1 дозволяють одержати ЛЗ стабільний протягом 2 років зберігання.

Наукова новизна розробленого ЛЗ захищена патентом України на корисну модель: № 97105 «Ліофілізований препарат для ін'єкцій» та на винахід № 111273 «Ліофілізований препарат для ін'єкцій» [65, 66] (Додатки А.1-А.2).

3.9. Технологічний процес приготування ліофілізату «Апікаїн-Р» для приготування ін'єкційного розчину

На основі проведених нами досліджень було розроблено та апробовано у промислових умовах технологію отримання ЛЗ «Апікаїн-Р», ліофілізат для приготування розчину для ін'єкцій по 1 мг у скляних флаконах на 5 мл.

Технологічний процес одержання ЛЗ включає наступні стадії [22, 43, 56, 69, 95]:

- санітарна підготовка виробництва;
- підготовка первинного пакування;
- приготування і фільтрація розчину;
- наповнення флаконів розчином;
- ліофілізація;
- герметизація флаконів;
- контроль на механічні вклучення та інші види браку;
- маркування та пакування флаконів.

Виробництво ЛЗ «Апікаїн-Р» проводиться з урахуванням санітарних і гігієнічних вимог, спрямованих на попередження мікробного забруднення сировини і готової продукції. З цією метою проводиться санітарна підготовка виробництва, яка включає операції приготування спеціальних дезінфікуючих розчинів, підготовки вентиляційного повітря, виробничих приміщень, устаткування, інвентарю, спеціального одягу і персоналу до роботи. Санітарна підготовка виробництва проводиться на підприємстві згідно із затвердженою

документацією (СОП (стандартна операційна процедура) на кожну операцію). Чітко ведуться всі записи «Протоколу серії» на ЛЗ.

Приготування та ліофілізацію розчину на основі ОБ відпрацьовували на промислових установках сублімаційної сушки ТТ-50 на підприємстві ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК», м. Харків» (Додатки 3, Ж). В промислових умовах проводилась оптимізація критичних параметрів технологічного процесу.

Процес виробництва ЛЗ «Апікаїн-Р» здійснюється у приміщеннях із класами чистоти С, (зона А), D, які визначаються за максимально припустимим вмістом механічних часток і мікроорганізмів у повітрі робочої зони. У класі чистоти С здійснюються процеси приготування розчинів, у класі С (А) проводять фільтрацію, наповнення флаконів розчинами, ліофілізацію та герметизацію. У приміщеннях класу чистоти D проводять підготовку первинного пакування (мигтя, сушіння і стерилізацію флаконів, пробок та ковпачків), перегляд флаконів із препаратом на механічні вклучення, маркування та пакування флаконів у пачки, або коробки.

Перед роботою персонал проходить спеціальну обробку згідно з діючими СОП, мие і дезінфікує руки і одягає спеціальний одяг.

Приготування розчину для ЛЗ «Апікаїн-Р» здійснюють у реакторі з нержавіючої сталі (P-1), оснащеним якірною мішалкою і паровою сорочкою для підігріву й охолодження вмісту реактора. З установки водопідготовки води для ін'єкцій по трубопроводу самопливом у реактор (P-1) заливають близько 70 л води для ін'єкцій по мітці на мірному склі реактора при температурі $(80 \pm 5)^{\circ}\text{C}$. При подачі в парову сорочку реактора холодної води, охолоджують воду для ін'єкцій у реакторі до температури $(25 \pm 5)^{\circ}\text{C}$. Включають мішалку реактора (P-1) та завантажують у нього відважені на вагах (КП-2) розраховану кількість натрію хлориду та маніту, перемішують на протязі 10 -15 хвилин. Одночасно проводять барботацію розчину, подаючи в реактор інертний газ(азот). Потім додають розраховану кількість ОБ та розраховану кількість лідокаїну гідрохлориду, перемішують на протязі 15-20 хвилин. Після повного розчинення відключають

мішалку і доводять об'єм розчину до позначки на мірному склі 80,0 л водою для ін'єкцій, включають мішалку і перемішують протягом 5-10 хв.

Після приготування розчину проводять відбір проби на аналіз перед фільтрацією та наповненням у флакони за наступними показниками: прозорість, кольоровість, рН, кількісний вміст. Згідно зі специфікацією до МКЯ розчин має бути прозорим, кольоровість не перевищувати Y_5 , рН від 4,0 до 6,0; вміст в 1 мл препарату: ОБ (у перерахуванні на мелітин) – 0,90 мг до 1,10 мг, лідокаїну гідрохлориду – 0,45 мг до 0,55 мг [89, 176].

Після одержання позитивних результатів аналізу розчин передають на фільтрацію через систему фільтрів (Ф-3) за допомогою інертного газу азоту. Діаметр пор послідовних фільтруючих елементів складає 0,45 мкм та 0,22 мкм. Підготовлену систему для фільтрації перевіряють на герметичність.

Приготовлений розчин ЛЗ з реактора (Р-1) під тиском азоту 0,6 МПа, через нижній зливний кран подається через систему фільтрації у проміжний збірник чистого розчину (З-4). Після 15-20 хв з початку фільтрації відбирають пробу фільтрованого розчину для контролю на відсутність механічних включень неозброєним оком у світлі електроламп 60 Вт на чорно-білому екрані. Механічні включення у фільтрованому розчині повинні бути відсутні.

Розчинник зі збірника розчину (З-4) подається на установку для наповнення флаконів розчином (ГФ-5). У процесі виробництва використовують флакони із скла марки УСП-1 місткістю 5 мл, пробки із гумової суміші марки 52-599/І та ковпачки алюмінієві типу К-2-14. Підготовку флаконів проводять наступним чином: флакони набирають у спеціальні касети, в яких вони потрапляють на установку для миття флаконів (ГФ-7), де відмивають внутрішню та зовнішню поверхні флаконів водою очищеною. Остаточне промивання здійснюється водою для ін'єкцій, профільтрованою через фільтр (Ф-8). Вимиті флакони в касетах подають на сушку та стерилізацію в сушильну шафу (СП-9).

Пробки миють в машині (ГФ-10). Промивають водою очищеною. Сушку і стерилізацію пробок здійснюють у стерилізаторі паровому (Р-11). Простерилізовані пробки контролюють на стерильність.

Мийку ковпачків проводять в машині (ГФ-10) окремо з пробками. Промивають водою очищеною. Сушку і стерилізацію ковпачків здійснюють у стерилізаторі паровому (Р-11). Простерилізовані ковпачки контролюють також на стерильність.

Перед початком наповнення налагоджують машину для наповнення на відповідний об'єм розчину у флаконі. Встановлюють необхідну дозу наповнення на заданий об'єм (1 мл). Після заповнення системи розчином перевіряють дозу наповнення об'ємним способом за допомогою шприца.

Стерильні флакони в касетах подають до машини на дозуючий пристрій установки (ГФ-5). Наповнені флакони за допомогою передаточного диску збирають у спеціальні касети, в яких їх подають в камеру ліофілічної установки.

Ліофілізацію проводять в установках сублимаційної сушки типу ТГ-50 (СУ-12). Спочатку проводять заморожування продукту. Препарат завантажували на полиці камери при температурі від +20 °С, охолоджували полиці до -20 °С і витримували 1 год. При заморожуванні продукту застосовували розроблений нами метод швидкого заморожування № 2.

Після повного циклу заморожування препарату включали підігрів полиць від -50° С до -10 °С зі швидкістю 4 °С/г. При сушінні використовували розроблений нами спосіб № 4. Процес сушіння продовжувався 33 год. Після досягнення атмосферного тиску в камері, касети з препаратом вивантажують і передають на операцію укупорки і герметизації флаконів.

Флакони з ліофілізатом закривають попередньо підготовленими стерильними гумовими пробками на столі для укупорки (ГФ-13) і герметизують алюмінієвими ковпачками на установці (ГФ-14). Обтисненні флакони подають на стіл (ГФ-15) для перегляду якості обтиснення та інші види браку. Відбирається проба для аналізу вологості, рН розчину, середньої маси. рН розчину

знаходиться в межах від 4,0 до 6,0, втрата в масі при висушуванні (вологість) не більше 4,0 %, середня маса контейнера від 0,0266 - 0,0326 г.

Наступною стадією є контроль на механічні включення та інші види браку (цілісність флаконів, герметичність, якість укупорки). Для контролю на механічні включення відбирають 5-10 флаконів від серії і розчиняють фільтрованою водою для ін'єкцій в кількості 1 мл. Перегляд флаконів з розчином проводиться неозброєним оком у світлі електролампи 60 Вт на чорно-білому екрані на столі для перегляду (ГФ-15).

Флакони передають для етикетування на машину (ГФ-16), де на флакони наклеюють етикетки, виготовлені типографським способом з паперу етикетного. Номер серії та термін придатності препарату на етикетку наносять методом тиснення на цьому ж автоматі (ГФ-16). По 5 флаконів із препаратом поміщають у блістер. Блістер разом з інструкцією із застосування поміщають у пачку з картону хром-ерзац на столі (ГФ-17). Проводять відбір проби на відповідність готового продукту вимогам МКЯ за всіма показниками. Після одержання задовільних результатів аналізу, продукцію з аналітичним паспортом направляють на склад готової продукції.

Результати досліджень показали, що отриманий ЛЗ «Апікаїн-Р» за розробленою нами технологією за всіма показниками відповідає проекту МКЯ (табл. 3.15). Схема технологічного процесу наведена на рис. 3.9. Апаратурна схема одержання ЛЗ представлена на рис. 3.10.

Розроблено й упроваджено в роботу аптек та медичних закладів методичні рекомендації: «Інструкція по лікуванню бджолою отрутою»; «Інноваційні підходи в апітерапії»; «Технологія виготовлення екстемпоральних лікарських апіпрепаратів і їх застосування в фармації, медицині та косметології» (Додатки Б.1 – Б.4).

Розроблено проект технологічного регламенту (ТР) та МКЯ на виробництво ЛЗ «Апікаїн-Р» (Додатки В, Д).

Результати досліджень, що викладені в цьому розділі, опубліковані в 14 друкованих роботах [16, 54, 65, 66, 79, 83, 84, 86-88, 96, 97, 129, 131].

Таблиця 3.15
 Результати дослідження якості ЛЗ «Алікаїн-Р» – ліофілізат для приготування розчину для ін'єкцій
 по 1 мг у флаконах

Показник	Вимоги МКЯ	Номер серії				
		110713	120713	130713	210713	220713
1	2	3	4	5	6	7
Опис	Суша пориста маса білого кольору	Суша пориста маса білого кольору	Суша пориста маса білого кольору	Суша пориста маса білого кольору	Суша пориста маса білого кольору	Суша пориста маса білого кольору
Термін розчинення	Не більше 3 хв	Відповідає	Відповідає	Відповідає	Відповідає	Відповідає
Ідентифікація						
Отрута бджолина	Фосфоліпазна активність повинна відповідати вимогам розділу кількісне визначення (метод титрування)	Відповідає	Відповідає	Відповідає	Відповідає	Відповідає
Активність глюкозамініліка	Активність гідролізного комплексу повинна відповідати вимогам розділу кількісне визначення (спектрофотометричний метод)	Відповідає	Відповідає	Відповідає	Відповідає	Відповідає
Натрію хлорид	Реакції на хлориди та натрій	Відповідає	Відповідає	Відповідає	Відповідає	Відповідає

1	2	3	4	5	6
Маніт	Метод ТПХ. На хроматограмі випробуваного розчину повинна виявитись основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (а), відповідно її за розміром і забарвленням.	Відповідає	Відповідає	Відповідає	Відповідає
Середня маса вмісту	0,0266 – 0,0326 г	0,0303 ± 0,0012	0,0300 ± 0,0012	0,0290 ± 0,0011	0,0305 ± 0,0014
Прозорість	Має бути прозорим	Відповідає	Відповідає	Відповідає	Відповідає
Кольоровість	Не інтенсивніше за еталон Y ₅	Y ₆	Y ₆	Y ₆	Y ₆
рН	Від 4,0 до 6,0	5,22 ± 0,03	5,15 ± 0,02	5,24 ± 0,04	5,18 ± 0,01
Механічні вклучення	Відсутні	Відповідає	Відповідає	Відповідає	Відповідає
Стерильність	Має бути стерильним	Стерильний	Стерильний	Стерильний	Стерильний
Кількісний вміст в одному контейнері ОБ у перерахунку на мелітин	0,90 – 1,10 мг	0,94 ± 0,04	0,93 ± 0,02	0,93 ± 0,03	0,96 ± 0,04
Кількісний вміст лідокаїну гідрохлориду	0,45-0,55	0,51	0,50	0,51	0,51
					0,97 ± 0,02
					0,50

Продовження табл. 3.15

1	2	3	4	5	6	7
Однорідність маси вмісту	Відхилення у масі вмісту кожного контейнера допускається на величину $\pm 10\%$ від середньої маси. Тільки дві маси із 20 можуть мати відхилення від середньої маси більше $\pm 10\%$, але не більш ніж удвоє	Відповідає	Відповідає	Відповідає	Відповідає	Відповідає
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 4,0 %	2,61 \pm 0,03	2,62 \pm 0,01	2,10 \pm 0,01	2,83 \pm 0,03	2,24 \pm 0,03

Прямітка. $n = 5$, $P = 0,95$.

Примітка. Сірим кольором позначені критичні стадії у процесі виробництва

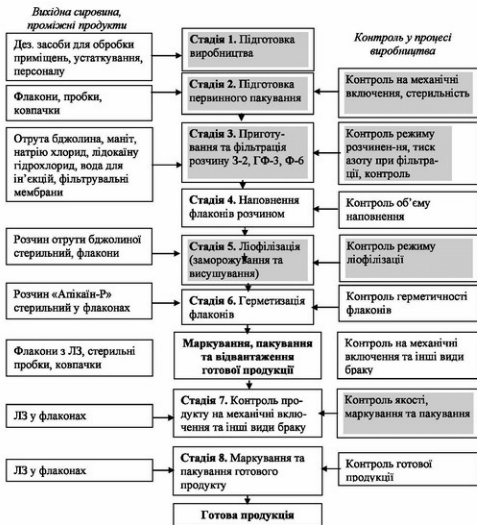


Рис. 3.9. Технологічна схема виробництва ЛЗ «Апікаїн-Р».

Технологія виробництва ЛЗ «Апікаїн-Р» апробована в умовах промислового виробництва на ПАТ «Фармстандарт-Біолік» (Додатки 3, Ж).

Лікарський препарат «Апікаїн-Р» внесено до перспективного плану розвитку виробництва ПАТ «Фармстандарт-Біолік» (Додаток К).

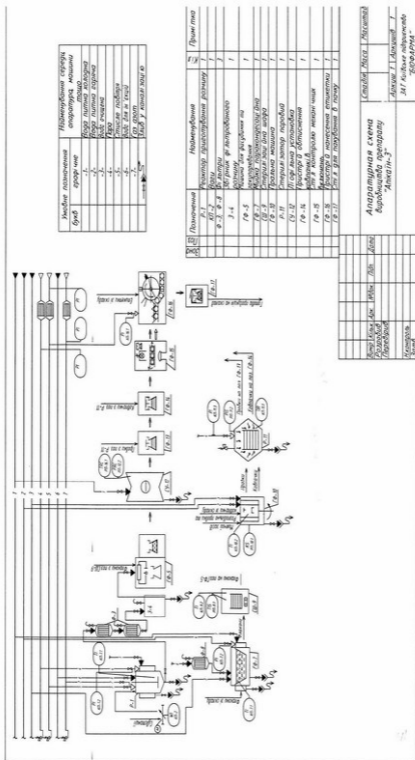


Рис. 3.10. Аппаратурная схема приготовления препарата «Алкаин-Р».

Висновки до розділу 3

1. На підставі фармакотехнологічних та фізико-хімічних 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.

2. 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).

3. Вивчено та встановлено оптимальний режим ліофілізації: 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. Вакуум гаситься чистим азотом, пропущеним крізь стерильний фільтр (0,22 мкм).

4. 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.

5. Визначено товщину шару розчину для ліофілізації, 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 %.

6. Встановлено, що обидві марки скла НС-1і УСІІ-1 забезпечують стабільність розробленого ЛЗ «Апікаїн-Р» протягом 2-х років.

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

Наукова новизна розробленого ЛЗ захищена патентом України на корисну модель: № 97105 «Ліофілізований препарат для ін'єкцій» та на винахід № 111273 «Ліофілізований препарат для ін'єкцій».

РОЗДІЛ 4
РОЗРОБКА ПОКАЗНИКІВ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ
«АПКАІН-Р»

Отрута бджолина є продуктом секреторної діяльності спеціальних залоз в тілі робочої бджоли. Це безбарвна, дуже густа рідина з різким характерним запахом, що нагадує запах меду, і гірким пекучим смаком. Реакція отрути кисла, щільність 1131 кг/м³; вона має високий вміст сухої речовини (до 41 %), на повітрі швидко твердне. рН водних розчинів знаходиться в межах 4,5-5,5. При висушуванні ОБ втрачає разом з водою і частину (до 25%) своїх летких кислот [18, 77, 82].

У сухому вигляді ОБ не втрачає своїх основних властивостей впродовж тривалого проміжку часу. Низькі температури і заморожування не впливають на компоненти ОБ, а підвищення температури інактивує та руйнує їх. Так, при 60°C помітно інактивується фосфоліпаза отрути, розбавлена водою у співвідношенні 1:1000, а при 100°C за 15 хв майже повністю руйнується гіалуронідаза; при 150°C через 15 хв повністю розпадається мелітин [77, 78, 80, 143, 155].

У Ризькому медичному інституті встановлено, що при дотриманні умов зберігання ОБ добре зберігає ферментну активність навіть після восьми років зберігання [136, 154, 180].

4.1. Розробка методик ідентифікації та кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів отрути бджолиної методом рідинної хроматографії

Основним документом, який регламентує показники якості ОБ є фармакопейні статті ФС 42-2683-89 та АНД Р.09.03/07400, які широко використовуються у лабораторній практиці, достатньо прості і не вимагають дефіцитних реактивів та обладнання [51, 58, 116]. Проте, явище гемолізу еритроцитів крові лабораторних тварин, яке покладене в основу фармакопейної

методики, може бути викликане багатьма іншими факторами, зокрема, іонами важких металів, а тому може бути використане для фальсифікації отрути. До того ж ця методика не дозволяє отримувати кількісні числові показники. У зв'язку з цим є необхідним удосконалення способу визначення компонентів ОБ [71, 73, 93].

Авторами опрацьовано методики, що придатні для стандартизації ОБ з використанням методу ВЕРХ та мас-спектроскопії [71, 75, 89, 93, 176].

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.

Хроматографічні дослідження виконували на хімічно модифікованих силкагелях на аналітичній колонці Ascentis RP-Amide, яка дозволяє використовувати як рухому фазу суміш розчинників з великим вмістом води (до 95%). Оптимальні умови градієнта рухомих фаз, при яких спостерігалось задовільне розділення компонентів отрути – мелітину та фосфоліпази А₂.

Хроматограма ОБ наведена на рис. 4.1.

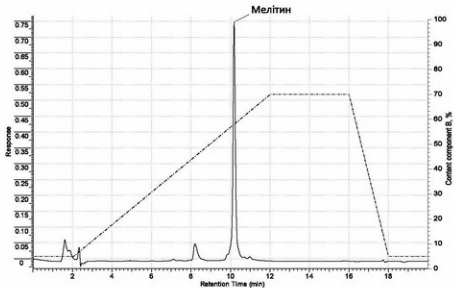


Рис. 4.1. Хроматограма ОБ на колонці Ascentis RP-Amide.

Рухомі фази: А) 0,1 % CF_3COOH у воді; Б) 0,1 % CF_3COOH у ацетонітрилі.
Градiєнт: 0-2 хв – 5 % Б, 2-12 хв – 5 → 70 % Б, 12-16 хв – 70 % Б, 16-18 хв – 70 → 5 % Б, 18-20 хв – 5 % Б. Швидкість потоку 1 мл/хв, $t=20^\circ\text{C}$.

Також було здійснене препаративне видiлення основного компонента отрути – мелiтину з використанням напiвпрепаративної колонки Діасорб-130-С16Т. Хроматограма ОБ, отриманої з використанням цієї колонки, наведена на рис. 4.2.

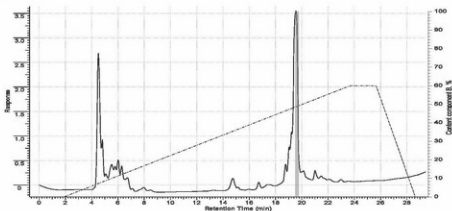


Рис. 4.2. Хроматограма ОБ на колонці Діасорб-130-С16Т.

Рухомі фази: А) Ацетонітрил-вода- CF_3COOH (450:550:1) (об./об.);
Б) Ацетонітрил-вода- CF_3COOH (850:150:1) (об./об.); Градiєнт 0,1 % CF_3COOH у ацетонітрилі. Градiєнт: 0-2 хв – 0 % Б, 0-34 хв – 0 → 60 % Б, 24-26 хв – 60 % Б, 26-29 хв – 60 → 0 % Б, 29-30 хв – 0 % Б. Швидкість потоку 5 мл/хв, $t=25^\circ\text{C}$.

Фракції збирали вручну. Відповідні елюати з часом утримання 19,5 по 19,8 хв збирали, об'єднували та концентрували у вакуумі. З отрути було отримано 8 мг аморфного порошку білого кольору з ледь жовтуватим відтінком.

Мас-спектр (спосiб йонізації – електровприскування, позитивний режим) характеризувався наявністю таких йонів, m/z : 570,32; 712,67; 949,91.

Отримані дані узгоджувалися з теоретичними значеннями молярної маси мелiтину, а саме 2846,5 а.о.м. (для пептидів характерне утворення багатозарядних

йонів, молярна маса обчислюється з врахуванням величини заряду йону z (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Результати даних мас-спектра мелітину	
Реєстрований йон [m/z], а. о. м.	Молекулярная масса (М. м.), а. о. м. М.м. = [m/z] * z - z
570,32	(570,32 * 5) - 5 = 2846,6
712,67	(712,67 * 4) - 4 = 2846,6
949,91	(949,91 * 3) - 3 = 2846,7

Кращого розділення у порівнянні до такого на колонці PRP-3 (розділення між піками мелітину та ферментом фосфоліпазою A_2 становило 3; час утримання мелітину 16,7 хв) вдалося досягти на колонці Ascentis RP-Amide (розділення 6,9 при часі утримання мелітину 10,2 хв).

Хроматограма ОБ при розділенні на колонці PRP-3 наведена на рис. 4.3.

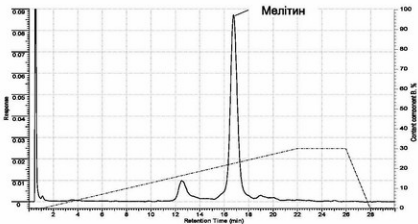


Рис. 4.3. Хроматограма ОБ на колонці PRP-3.

Рухомі фази: А) 0,1 % CF_3COOH у воді; Б) 0,1 % CF_3COOH у ацетонітрилі.
Градiєнт: 0-1 хв – 0 % Б, 1-22 хв – 0 → 30 % Б, 22-26 хв – 30 % Б, 26-28 хв – 30 → 0 % Б, 28-30 хв – 0 % Б. Швидкість потоку 2,5 мл/хв, $t=30\text{ }^\circ\text{C}$.

Результати розділення для колонки LiChrospher Si 60 (Роздільна здатність між піками мелітину та фермента фосфоліпазою A_2 2,3; час утримання мелітину 24,5 хв) виявилися близькими до результатів, отриманих на колонці PRP-3.

Підсумовуючи отримані результати, можна зробити висновок, що найбільш придатною колонкою серед апробованих є колонка Ascentis RP-Amide.

Враховуючи рекомендації стосовно вибору аналітичних умов хроматографічного визначення, ми поставили перед собою завдання розробити методики стандартизації субстанції ОБ з використанням стандартних зразків поліпептиду мелітину, апаміну та фермента фосфоліпази A_2 , а також розробити методику кількісного визначення мелітину у ліофілізаті розчину ОБ, який містить анестетик лідокаїн.

Отримані хроматограми виготовлених розчинів СЗ апаміну, мелітину та фосфоліпази A_2 , а також розчину ОБ представлені на рис. 4.4-4.7.

На хроматограмах розчинів СЗ апаміну, фосфоліпази та мелітину (рис. 4.4-4.6) спостерігається поряд з основними піками присутність мінорних піків домішок. Згідно з сертифікатами виробників, вміст основної речовини у СЗ апаміну становить 94,1 %, а у стандарті мелітину – 68,5 %. Чистота фосфоліпази у сертифікаті не вказана, охарактеризована тільки біологічна активність. Слід зауважити, що вище згадані домішки були відсутні на хроматограмі розчину ОБ, використаної для його виготовлення (рис. 4.7).

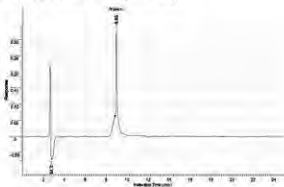


Рис. 4.4. Хроматограма розчину СЗ апаміну (С=0,1 мг/мл).

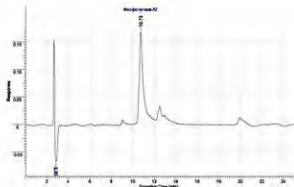


Рис. 4.5. Хроматограма розчину СЗ мелітину (C=0,37 мг/мл).

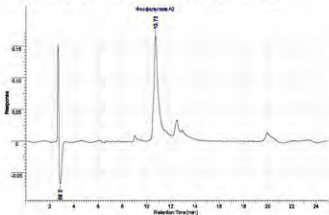


Рис. 4.6. Хроматограма розчину СЗ фосфоліпази А₂ (C=0,4 мг/мл).

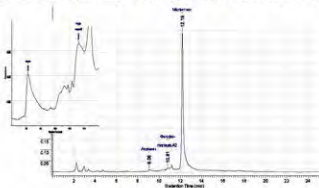


Рис. 4.7. Хроматограма розчину ОБ, Агіадна Ltd Co (C=0,95 мг/мл).

З використанням хроматографічних профілів СЗ здійснена ідентифікація та методом стандарту визначений кількісний вміст мелітину, апаміну та фосфоліпази А₂ в ОБ, що становив 80,1, 0,27 та 25,3 % відповідно у перерахунку на суху речовину (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Результати кількісного визначення мелітину методом ВЕРХ із використанням зовнішнього стандарту

Розчин порівняння (СЗ)	Значення величин
Наважка мелітину, мг	10,9
Об'єм колби для розчинення СЗ, мл	20
Вміст основної речовин, %	68,5
Вміст води, %	0,97
Площа піку мелітину, ум. од.	18209391
Вміст мелітину, мг/мл	0,37
Випробуваний розчин	
Наважка отрути, мг	25,7
Вміст води, %	7,2
Об'єм колби для розчинення, мл	25
Площа піку мелітину, ум. од.	37654484
Концентрація мелітину, мг/мл	0,77
Вміст мелітину у наважці, мг	19,11
Наважка мелітину у субстанції, %	74,4
Вміст мелітину в субстанції у перерахунку на суху речовину	80,1

Згідно ГОСТ 30426-97 кількісний вміст фосфоліпази А₂ у ОБ не визначають, а визначають біологічну активність фермента до 1 мг отрути МО. Згідно ГОСТу 30426-97 вміст апаміну та мелітину повинен становити не менше 2 % та 50 % відповідно.

У методиці згідно ГОСТ кількісне визначення виконують методом внутрішньої нормалізації [69, 72]. Нами рекомендовано кількісне визначення вмісту основної речовини у фармацевтичній субстанції виконувати більш точним способом – методом зовнішнього стандарту [71, 75, 176].

Як розчин порівняння використаний розчин СЗ отрути бджолиної відомого складу з номінальною концентрацією 1 мг/мл. Значення величин вмісту ОБ

перераховане на мелітин (вміст мелітину у розчині СЗ отрути 1 мг/мл прийнятий за 100 %) (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Результати кількісного визначення ОБ методом ВЕРХ у ліофілізатах	
Розчин порівняння (СЗ)	Значення величин
Наважка ОБ для розчину порівняння СЗ, мг	25,7
Вміст води, %	7,2
Об'єм колби для розчинення СЗ, мл	25
Площа піку мелітину, ум. од.	37654484
Ліофілізат без лідокаїну	
Об'єм розчинника, мл	1,0
Площа піку мелітину, ум. од.	36321940
Вміст отрути у флаконі (за мелітином), мг	0,92
Ліофілізат з лідокаїном	
Об'єм розчинника, мл	1,0
Площа піку мелітину, ум. од.	36841680
Вміст отрути у флаконі (за мелітином), мг	0,93

Хроматограми ліофілізату розчину ОБ та ліофілізату розчину отрути, що містять лідокаїн наведені на рис. 4.8-4.9.

На хроматограмі ліофілізату з лідокаїном, спостерігається його уособлений від піків ОБ. Тому за хроматографічним профілем можливе здійснення ідентифікації компонентів ліофілізату отрути з анестетиком.

Отже, за допомогою методу ВЕРХ показана можливість здійснення ідентифікації основних компонентів ОБ (апаміну, мелітину та фосфоліпази А₂). Розроблена методика та показана можливість кількісного визначення мелітину у субстанції ОБ методом зовнішнього стандарту [117, 119, 155, 168, 176].

Вміст мелітину у випробуваній субстанції становив 74,4 % (або 80,1 % у перерахунку на суху речовину).

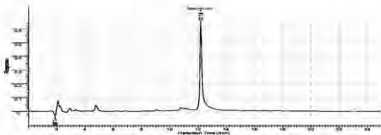


Рис. 4.8. Хроматограма ліофілізату для приготування ін'єкційного розчину ОБ без лідокаїну.

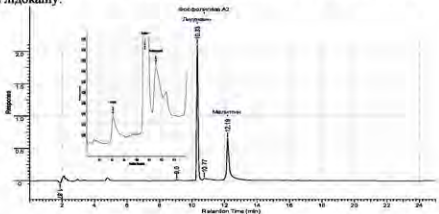


Рис. 4.9. Хроматограма ліофілізату для приготування розчину ОБ з лідокаїном.

Вміст ОБ (у перерахунку на мелітин) у ліофілізатах без лідокаїну становив від 0,92 до 0,93 мг/мл відповідно.

Вміст апаміну становив від 0,018 до 0,022 мг/мл (90,0 – 110,0 %).

Вміст мелітину становив від 0,45 до 0,55 мг/мл (90,0 – 110,0 %).

Лідокаїну гідрохлорид

Ідентифікацію лідокаїну гідрохлориду проводили відповідно до ДФУ методом ВЕРХ [27-30].

1. Час утримання головних піків стандартного зразку для *лідокаїну гідрохлориду* повинен співпадати з часом утримання піків досліджуваних зразків (метод ВЕРХ) і дорівнює 10,33 хв з точністю $\pm 2\%$.

2. До близько 5 мг субстанції додають 0,5 мл азотної кислоти димлячої Р, упарюють насухо на водяній бані, охолоджують, залишок розчиняють у 5 мл ацетону Р, додають 0,2 мл калію гідроксиду розчину спиртового Р – з'являється зелене забарвлення.

Кількісне визначення

0,220 г субстанції розчиняють у 50 мл *етанолу (96 %) Р*, додають 5,0 мл 0,01 М розчину *хлористоводневої кислоти* та титрують 0,1 М розчином *натрію гідроксиду* потенціометрично (2.2.20). У розрахунок беруть об'єм титранту між двома стрибками потенціалів на кривій титрування.

1 мл 0,1 М розчину *натрію гідроксиду* відповідає 27,08 мг $C_{14}H_{23}ClN_2O$.

4.2. Опрацювання методик ідентифікації допоміжних речовин лікарського засобу «Апікаїн-Р»

Маніт

Ідентифікацію проводили методом ТПХ із застосуванням розчинів порівняння згідно ДФУ [29, 30].

Розчин порівняння А. 25 мг ФЗС *маніту* розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин порівняння В. 25 мг ФЗС *маніту* та 25 мг ФЗС *сорбіту* розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Умови проведення. Пластинка ТПХ із шаром *сілікагелю Р*; система розчинників – вода Р – *етилацетат Р* – *пропанол Р* (10 : 20 : 70).

Виявлення. Обприскують *4-амінобензойної кислоти Р* і сушать у потоці холодного повітря. Пластинку нагрівають при температурі 100 °С протягом 15 хв, охолоджують, обприскують розчином 2 г/л *натрію періодату Р* і сушать у потоці холодного повітря.

На хроматограмі випробуваного розчину виявляється основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (А), відповідно за її розміром і забарвленням.

Натрію хлорид

Ідентифікація. Субстанція дає реакції на хлориди (ДФУ 2.0, п. 2.3.1) та на натрій (ДФУ 2.0, п. 2.3.1).

Результати досліджень, що викладені в цьому розділі, опубліковані у 8 друкованих роботах [71, 75, 80, 85, 89, 93, 102, 176].

Висновки до розділу 4

1. За показник доброякісності отрути бджолоїної запропоновано обрати основний компонент ОБ – мелітин. Проведене препаративне виділення мелітину з ОБ, з використанням методу мас-спектрометрії і підтверджено структуру виділеної сполуки.

2. Оптимізовано умови хроматографічного визначення основних компонентів ОБ методом ВЕРХ з використанням різних хроматографічних колонок. Встановлено, що найбільш придатною колонкою з перевірених для вирішення поставленої задачі є колонка Ascentis RP-Amide.

4. Розроблені методики для здійснення ідентифікації основних компонентів ОБ (апаміну, мелітину та фосфоліпази A₂) за допомогою методу ВЕРХ та методом стандарту визначений їх кількісний вміст, що становив 80,1, 0,27 та 25,3 % відповідно у перерахунку на суху речовину.

5. Показана можливість кількісного визначення мелітину у субстанції ОБ методом зовнішнього стандарту, вміст якого у випробуваній субстанції становив 74,4 % (або 80,1 % у перерахунку на суху речовину). Встановлено, що вміст ОБ (у перерахунку на мелітин) у ліофілізатах без лідокаїну становив 0,92 і 0,93 мг/мл відповідно.

6. Доведена можливість визначення лідокаїну гідрохлориду методом ВЕРХ одночасно з основними АФІ отрути бджолоїної.

РОЗДІЛ 5
МІКРОБІОЛОГІЧНІ І ФАРМАКОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ «АПІКАЙН-Р»

5.1. Вивчення мікробіологічної чистоти отрути бджолиної

Процес виробництва ЛЗ має виключати можливі причини мікробної контамінації. Тому, необхідним є регулювання тих факторів, що заздалегідь впливають на якість ЛЗ. Мікробіологічна чистота, що регламентується ДФУ, є важливим показником гарантії якості готової продукції [25, 28, 65, 69, 72, 74].

Вивчення мікробіологічної чистоти ОБ як вихідної речовини. Отрута бджолина, що використана як АФІ для виготовлення ЛЗ «Апікаїн –Р», є досить нестійкою речовиною. Під впливом травних ферментів та окисників вона втрачає активність. 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 [1, 2, 14, 38, 98].

Виходячи з актуальності вищенаведеного, нами проведені біологічні випробування ОБ як вихідної речовини за показником «мікробіологічна чистота» [25, 28, 74].

З метою випробування мікробіологічної чистоти ОБ визначали кількість живих аеробів (бактерії і гриби), а також присутність патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів: *St. aureus*, *Ps. aeruginosa*, родини *Enterobacteriaceae*.

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.

При проведенні випробувань використовували поживні середовища та тест-мікроорганізми відповідно до вимог ДФУ.

Поживні середовища відповідали за ростовими, інгібіторними, індикативними властивостями та витримували випробування на стерильність відповідно до вимог ДФУ (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Ростові властивості живильних середовищ при інокуляції тест-штамами мікроорганізмів перед випробуванням ОБ за показником «мікробіологічна чистота»

Тест-штами	Живильні середовища	Умови культивування		Спостереження
		Температура	Час культивування	
Staphylococcus aureus ATCC 6538	Чистовичка	35 °C	24-72 год	Морфологія колоній і клітин типова
Escherichia coli ATCC 25922	Ендо	35 °C	24-72 год	Морфологія колоній і клітин типова
Bacillus subtilis ATCC 6633	Живильний агар	35°C	24-72 год	Морфологія колоній і клітин типова
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	Живильний агар	35 °C	24-72 год	Морфологія колоній і клітин типова
Candida albicans ATCC 885/653	Середовище Сабуро	35°C	24-120 год	Морфологія колоній і клітин типова
X	Тіогліколеве середовище для контролю стерильності	35 °C	24-72 год	Ріст мікроорганізмів відсутній

Примітка: X – мікроорганізми не засівали.

Як видно з даних табл. 5.1, усі культури мікроорганізмів відповідали таксономічному значенню штаму, а морфологія колоній при культивуванні на середовищах і морфологія клітин при мікроскопії була типовою [74].

Перелік та призначення тест-мікроорганізмів наведено у табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Тест-мікроорганізми, використані для перевірки придатності методики

Тест-мікроорганізм	Номер штаму	Придатність методики випробування
Bacillus subtilis	ATCC 6633	на загальне число аеробних мікроорганізмів
Staphylococcus aureus	ATCC 6538	на загальне число аеробних мікроорганізмів та випробування на окремі види мікроорганізмів
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	на загальне число аеробних мікроорганізмів і дріжджових та плісневих грибів
Candida albicans	ATCC 885/653	на загальне число аеробних мікроорганізмів і дріжджових та плісневих грибів
Escherichia coli	ATCC 25922	на загальне число аеробних мікроорганізмів

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).

При цьому розливали стерильно у пробірки тіогліколеве середовище та рідке середовище Сабуро по 10,0 мл. В кожному з пробірок вносили по 1 мл (1 г) досліджуваного препарату.

Посіви інкубували 28 днів на тіогліколовому середовищі в термостаті при температурі 35 °С, посіви на рідкому середовищі Сабуро при температурі 25 °С (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

**Випробування за показником «мікробіологічна чистота»
ОБ методом прямого посіву на рідкі середовища накопичення**

Номер серії препарату	Середовища та умови культивування	
	Тіогліколеве середовище 28 днів при 35 °С	Рідке середовище Сабуро 28 днів при 25 °С
Серія 10310	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній
Серія 20310	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній
Серія 30310	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній

Примітка: Х – мікроорганізми не засівали.

Як видно з табл. 5.3, після 28 днів інкубації на середовищі Сабуро ріст грибів не реєструвався, на тіогліколовому середовищі ріст мікроорганізмів не спостерігався.

При дослідженні методом глибокого посіву, який полягає в додаванні препарату у кількості 1 г (1,0 мл) в агар та поверхневого посіву (1 г або 1,0 мл) - на агар визначали кількість життєздатних клітин мікроорганізмів та грибів. Дослідження глибокого та поверхневого посіву препарату на чашках Сабуро показали відсутність росту грибів. При культивуванні на живильному агарі ріст мікроорганізмів не спостерігався (табл. 5.4).

Як видно з даних табл. 5.4 ріст грибів та мікроорганізмів відсутній при дослідженні всіх 3-х серій розчину ОБ.

Таблиця 5.4

**Дослідження за показником «мікробіологічна чистота»
ОБ методом прямого посіву**

Серія препарату	Наявність росту на середовищах			
	Метод глибокого посіву 1 г (мл)		Метод поверхневого посіву 1 г (мл)	
	Живильний агар 35°C 3 доби	Сабуро 25°C 5 діб	Живильний агар 35 °C 3 доби	Сабуро 25°C 5 діб
Серія 10310	-/	-/	-/	-/
Серія 20310	-/	-/	-/	-/
Серія 30310	-/	-/	-/	-/

Примітка: «-/» - відсутність росту.

Критерієм оцінки ефективності розчину ОБ було зменшення кількості життєздатних колоній клітин мікроорганізмів за визначений період після контамінації. У відповідності з вимогами ДФУ в препаратах для парентерального застосування, а також для офтальмологічних ЛЗ, логарифм зменшення кількості життєздатних колоній бактерій через 6 год повинен складати не менше 2-х, через 24 год – не менше 3-х, в подальшому кількість життєздатних колоній бактерій не повинно збільшуватися. Логарифми зменшення кількості життєздатних клітин грибів через 7 діб не менше 2-х. Ці показники відповідають критерію «А».

У відповідності з критерієм «В» в препаратах для парентерального застосування та офтальмологічних ЛЗ логарифм кількості життєздатних колоній мікроорганізмів через 24 год повинен складати не менше 1-го, через 7 діб – не менше 3-х, в подальшому кількість життєздатних колоній не повинна збільшуватися. Логарифми зменшення кількості життєздатних грибів за 14 діб повинен складати не менше 1-го і в подальшому не збільшуватися [25, 28, 74, 186].

Після контамінації мікроорганізмами препарат через зазначені проміжки часу висівали на агар для встановлення кількості життєздатних клітин. Відсутність росту на агарі або відсутність збільшення колоній після 14 днів інкубації вказували на те, що препарат відповідає вимогам ДФУ (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

Результати визначення ефективності розчину ОБ

Експозиція	Вимоги ДФУ		Логарифм числа мікроорганізмів (КУО/мл)		
	Число бактерій КУО/мл Lg зменшення	Число грибів КУО/мл Lg зменшення	St. aureus ATCC 6538	Ps. aeruginosa ATCC 9027	Candida alb. ATCC 885/653
Мікробне навантаження	10 ⁶	10 ⁶	2,24 · 10 ⁴ (5,34)	2,64 · 10 ⁴ (5,41)	2,54 · 10 ⁵ (5,39)
Первинний посів	-	-	5,34 · 10 ⁴ (0,62)	4,34 · 10 ⁴ (0,78)	4,74 · 10 ⁴ (0,72)
6 год	2	-	2,24 · 10 ⁴ (3,0)	2,34 · 10 ⁴ (3,05)	2,74 · 10 ⁴ (2,96)
24 год	3	-	НВ	НВ	1,34 · 10 ⁴ (3,28)
7 діб	-	2	НВ	НВ	НВ
14 діб	-	-	НВ	НВ	НВ
28 діб	НЗ	НЗ	НВ	НВ	НВ

Примітка: НЗ – мікроорганізми не збільшуються
НВ – мікроорганізми або гриби не виділяються.

Як видно з даних табл. 5.5, після 6-ти год культивування логарифм кількості життєздатних клітин грибів складав 2,96 для *Candida alb.* Через 24 год контамінації логарифм кількості життєздатних клітин складав для *Candida alb.* – 3,28. Клітини *Candida alb.* не виділяються після 7-ми, 14-ти і 28-ми діб культивування. Після 6-ти год культивування логарифм кількості колоній мікроорганізмів складав 3,0 для *St. aureus* та 3,05 для *Ps. aeruginosa*. Через 24 год мікроорганізми не рееструвалися. На 7-му, 14-ту та 28-му добу інкубації колонії *St. aureus* та *Ps. aeruginosa* не рееструвалися.

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 10² бактерій і грибів сумарно. *Ps. aeruginosa* та *St. aureus* і представники родини *E. coli* відсутні.

Визначення показника «стерильність» ліофілізованого порошку для приготування ін'єкційного розчину проводили згідно з методиками ДФУ [25, 27].

З цією метою 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».

5.2. Фармакологічні дослідження лікарського препарату «Апікаїн-Р»

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

5.2.1. Вивчення токсичності лікарського препарату «Апікаїн-Р» при одноразовому введенні

Дослідження були проведені за загальноприйнятими методиками (токсикологічними, біохімічними, статистичними) [13, 17, 20, 21, 24, 63, 107].

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.

Метою дослідження було вивчення впливу препарату на токсичність ЛЗ «Апікаїн-Р» при одноразовому підшкірному введенні у дозі 5,0, 8,0, 10,0 і 20 мл/кг і вивчалось на мишах (табл. 5.6).

У результаті проведених досліджень встановлено, що після введення досліджуваного препарату в дозі 5,0 мл/кг у тварин спостерігалось пригнічення, рухової активності, дихання прискорене, реакція на звукові і тактильні подразники слабка.

Через 15-20 хвилин всі тварини почали активно відчувати свербіж в області живота, боків і мордочки. У самців також відзначається свербіж геніталій.

Таблиця 5.6

**Параметри токсичності препарату «Апікаїн-Р»
при пероральному введенні**

Стать тварин	Кількість тварин	Доза, мл/кг (за ЛФ)	Доза, мг/кг (за АФІ)	Легальність, %
Самці	5	5,0	4,0	0
Самки	5			0
Самці	5	8,0	5,0	0
Самки	5			0
Самці	5	10,0	6,3	0
Самки	5			0
Самці	5	20,0	10,0	0
Самки	5			0

Через 60-75 хв миші починали активно пересуватися по клітці, реагували на подразники і перестали відчувати свербіж.

Після введення мишам препарату у дозі 8,0, 10,0 і 20 мл/кг зазначені вище симптоми клінічної інтоксикації мали більш виражений характер.

У місцях введення препарату подразнення, гіперемії не відзначено (табл. 5.7).

Таблиця 5.7

Маса тіла мишей при гострому впливі препарату «Апікаїн-Р»

Період спостереження, доба	Маса тіла, г	
	1	3
Доза 5,0 мл/кг		
0	24,4 ± 0,43	21,6 ± 0,73
3	25,2 ± 0,52	21,7 ± 0,84
7	25,0 ± 0,98	21,2 ± 1,08
14	25,3 ± 1,42	20,5 ± 1,23
Доза 8,0 мл/кг		
0	23,4 ± 0,99	22,6 ± 0,70
3	23,3 ± 1,27	22,4 ± 0,93
7	23,0 ± 0,75	21,9 ± 0,87
14	23,3 ± 0,60	20,3 ± 0,60
Доза 10,0 мл/кг		
0	23,3 ± 0,76	22,2 ± 0,97
3	22,7 ± 0,86	21,8 ± 1,23

Продовж. табл. 5.7

1	2	3
7	22,6 ± 1,28	22,0 ± 1,17
14	23,4 ± 1,19	23,1 ± 1,34
Доза 20,0 мл/кг		
0	24,4 ± 0,20	22,6 ± 1,02
3	24,3 ± 0,44	22,8 ± 1,18
7	24,3 ± 0,69	23,1 ± 0,92
14	24,2 ± 1,39	23,2 ± 1,17

Примітка: $n = 5$; $P = 0,95$.

Аналіз отриманих даних показав, що підшкірне введення препарату не спричиняє токсичного впливу на масу тіла тварин: Самці не втрачали в масі тіла, а самки добавляли у масі тіла. Тварини всіх експериментальних груп протягом періоду спостереження охоче пили воду і вживали корм. Загибелі тварин усіх експериментальних груп, протягом періоду спостережень не відзначалося. Миші всіх дослідних груп не втрачали в масі тіла (табл. 5.6).

У результаті проведених досліджень встановлено, що після введення досліджуваного ЛЗ «Апікаїн-Р» у дозі 5,0 мл/кг у тварин спостерігалось пригнічення, рухової активності, прискорене дихання, слабка реакція на звукові і тактильні подразники [65, 66, 80].

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.

5.2.2. Вивчення місцевоподразнюючої дії лікарського препарату «Апікаїн-Р»

Застосування ОБ у вигляді ін'єкцій викликає місцеві реакції у вигляді болю, свербіжу, гіперемії і припухлості [98, 145, 154, 183-184].

У зв'язку з цим, метою даного дослідження було порівняльне вивчення місцевоподразнюючої дії препаратів, які містять ОБ без лідокаїну («Апітоксин-Р») і з лідокаїном («Апікаїн-Р») при двох шляхах введення (внутрішньом'язовому та підшкірному) [24, 55].

При проведенні досліджень шури були розподілені на чотири групи по 3 тварини у кожній. Першій і третій групі щурів в ліву *M. vastus lateralis* і підшкірно вводили препарат «Апітоксин-Р» без лідокаїну, другій та четвертій групі – в ліву *M. vastus lateralis* і підшкірно в область лівої лопатки вводили препарат «Апікаїн-Р» з лідокаїном у дозі 0,5 мл/кг. При внутрішньом'язовому введенні контролем слугувала права *M. vastus lateralis*, при підшкірному – область правої лопатки. Всім тваринам як контроль вводили ізотонічний розчин натрію хлориду 0,5 мл/кг.

Оцінка місцевоподразнюючої дії включала щоденний макроскопічний контроль стану місць введення, а також макроскопічне і гістологічне дослідження біоптатів, узятих з місць введення препаратів після закінчення експерименту. При внутрішньом'язовому введенні патологічні зміни, відмічені у всіх без винятку тварин, практично не відрізнялися по важкості ураження і поширеності процесу між досліджуваним препаратом і препаратом порівняння.

У сполучнотканинних прошарках розвивалась виражена запальна реакція з проліферацією клітин. Клітинні інфільтрати були густі, обширні, що склалися в основному з лімфоцитів і плазматичних клітин з домішкою нейтрофілів. У тих ділянках, де запалення проникало у товщу м'язових волокон, порушувалась їх структура, відзначалися грубі дистрофічні процеси (рис. 5.1). У деяких волокнах розглядалися ознаки вираженої дегенерації (рис. 5.1 Б). Середній бал по групах склав 3,66, що відповідає сильному ступеню подразнення.

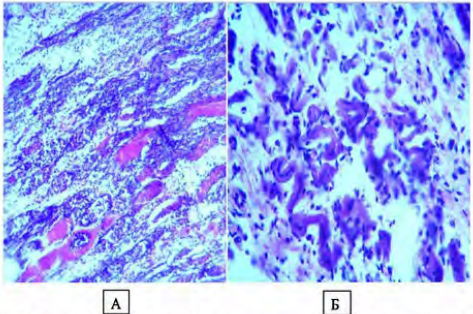


Рис. 5.1. Внутрішньом'язове введення в стегновий м'яз ЛЗ «Апітоксин-Р» x 250:
 А: Проміжне продуктивне запалення, фрагменти набрякових волокон.
 Б: Дегенерація м'язових волокон: набряки, базофілія, інверсія ядер, зміна їх форми.

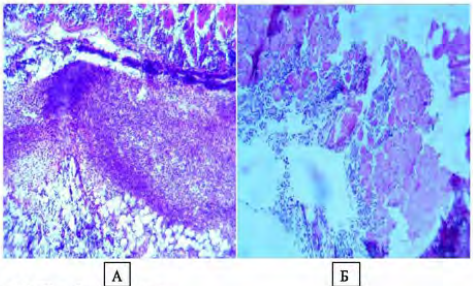


Рис. 5.2. Підшкірне введення:
 А: Обширий гнійний інфільтрат в підшкірній клітковині, що проникає у між'язовий простір. ЛЗ «Апітоксин-Р» x 250.
 Б: Відносно збережена структура м'язових волокон, незначний круглоклітинний інфільтрат. ЛЗ «Апікаїн» x 100.

При підшкірному введенні у тварин після введення препарату «Апітоксин-Р» у підшкірній клітковині відзначалися великі інфільтрати, що мали гнійний характер. Клітинні інфільтрати струменем проникали в між'язовий простір, розсовуюч і фрагментуюч м'язові волокна. Середній бал становив 3,66. Після введення досліджуваного препарату морфологічна картина значно більш спокійна: круглоклітинні інфільтрати мізерні, волокна більш збережені. Середній бал – 1,66. Внутрішньом'язове введення препарату «Апікаїн-Р» також викликало виражену місцевоподразнюючу дію.

Таким чином, проведені дослідження показали, що при підшкірному введенні ЛЗ «Апікаїн-Р» викликає незначну місцевоподразнюючу дію [80, 93].

5.2.3. Вивчення гемостимулюючої активності препарату «Апікаїн-Р»

Метою дослідження було вивчення впливу препарату «Апікаїн-Р» на морфологічні показники гемопоезу, кістково-мозкове кровотворення і специфічної гемостимулювальної активності препарату «Апікаїн-Р» при циклофосфан-індукованому пригніченні кровотворення у мишей [17, 20, 64, 168].

Вплив препарату «Апікаїн-Р» на деякі морфологічні показники периферійної крові. Введення циклофосфану у дозі 200 мг/кг на 2 добу викликало депресію кровотворення. У групі, що отримувала циклофосфан, відзначалося зниження кількості еритроцитів у 1,4 рази, лейкоцитів у 8 разів, тромбоцитів у 1,6 рази порівняно з аналогічними показниками контрольної групи (табл. 5.8).

Вплив циклофосфану на загальну кількість лейкоцитів представлено на рис. 5.3. На другу добу лейкоцити в групі позитивного контролю зменшилися у 8 разів, в дослідних групах на 6,5, 4,5 і 21 разів відповідно.

Результати проведених експериментів, представлені у табл. 5.8, і свідчать, що досліджуваний препарат викликає розвиток вираженого лейкоцитозу у тварин на 7-у добу експерименту.

Таблиця 5.8

Результати впливу ЛЗ «Апікаїн-Р» на клінічні показники периферійної крові мишей при циклофосфан-індукованому пригніченні гемопоезу

Показники	Контроль інтактний	Контроль патологія	Доза, 0,5 мг/кг	Доза, 2,5 мг/кг	Доза, 5,0 мг/кг
2 доби					
Еритроцити, $\times 10^{12}/л$	5,22 \pm 0,07	3,63 \pm 0,18*	5,10 \pm 0,07**	5,17 \pm 0,15**	5,38 \pm 0,14
Лейкоцити, $\times 10^9/л$	8,50 \pm 0,85	1,03 \pm 0,15*	1,30 \pm 0,20*	1,90 \pm 0,88*	0,40 \pm 0,09***
Тромбоцити, $\times 10^9/л$	602,2 \pm 116,7	372,6 \pm 84,4*	490,8 \pm 61,91	655,0 \pm 132,2	669,8 \pm 187,0
7 діб					
Еритроцити, $\times 10^{12}/л$	5,40 \pm 0,25	4,40 \pm 0,342*	4,48 \pm 0,04*	4,43 \pm 0,17*	4,22 \pm 0,23*
Лейкоцити, $\times 10^9/л$	8,18 \pm 0,42	4,20 \pm 0,64*	20,04 \pm 2,61***	29,02 \pm 8,76***	20,10 \pm 1,38**
Тромбоцити, $\times 10^9/л$	461,8 \pm 29,45	426,0 \pm 94,15	399,66 \pm 68,77	535,8 \pm 121,9	454,4 \pm 43,28
14 діб					
Еритроцити, $\times 10^{12}/л$	5,18 \pm 0,15	4,82 \pm 0,41	5,39 \pm 0,17	5,14 \pm 0,17	5,19 \pm 0,25
Лейкоцити, $\times 10^9/л$	7,86 \pm 0,56	5,14 \pm 0,59*	6,84 \pm 1,77**	8,18 \pm 1,19	14,30 \pm 7,70
Тромбоцити, $\times 10^9/л$	489,4 \pm 39,76	623,2 \pm 46,85	629,4 \pm 26,18*	660,4 \pm 105,2	787,5 \pm 67,50*

Примітка: $n = 5$; * - $p \leq 0,05$ відносно інтактного контролю;

** - $P \leq 0,05$ відносно позитивного контролю.

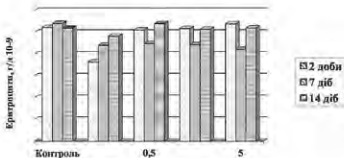


Рис. 5.3. Вплив препарату «Апікаїн-Р» на показники периферійної крові мишей.

У дослідних групах тварин, що отримували препарат «Апікаїн-Р», відзначалося зниження кількості лейкоцитів до нормальних величин у порівнянні з інтактними мишами і тваринами, що отримували циклофосфан.

За результатами досліджень циклофосфан не причинив значного впливу на кількість тромбоцитів.

Вплив препарату «Апікаїн-Р» на лейкоцитарну формулу крові. Результати оцінки морфологічного складу периферійної крові щурів показали, що препарат «Апікаїн-Р», який вводиться щодня у дозах 0,5, 2,5 і 5,0 мг/кг на фоні циклофосфан-індукованого пригнічення кровотворення, надає очевидний фармакотерапевтичний ефект, спрямований на нормалізацію показників периферійної крові тварин (табл. 5.9).

Таблиця 5.9

Показники впливу ЛЗ «Апікаїн-Р» білої периферійної крові мишей при циклофосфан-індукованому пригніченні гемопоезу

Показники	Контроль інтактний	Контроль патологія	Доза, 0,5 мг/кг	Доза, 2,5 мг/кг	Доза, 5,0 мг/кг
2 доби					
Нейтрофіли п/я, %	0,80 ± 0,37	0,40 ± 0,24	0,40 ± 0,24	0,40 ± 0,24	0,40 ± 0,24
Нейтрофіли с/я, %	15,20±2,35	24,00 ± 3,16	12,60 ± 3,03**	4,00±2,07***	3,60 ± 1,03***
Еозинофіли, %	2,20 ± 0,58	0,20 ± 0,20*	1,00 ± 0,45	0,40 ± 0,40*	0,20 ± 0,20*
Моноцити, %	1,40 ± 0,40	1,40 ± 0,40	1,00 ± 0,55	0,40 ± 0,24	0,20 ± 0,20***
Лімфоцити, %	80,40±2,25	74,00 ± 2,74	85,00±3,48**	94,80±2,58***	95,60±1,25***
7 діб					
Нейтрофіли п/я, %	1,00 ± 0,45	5,40 ± 1,72*	3,60 ± 0,88*	5,00 ± 0,89*	12,80 ± 4,57*
Нейтрофіли с/я, %	18,80±2,91	44,00 ± 4,91*	48,00±5,79*	40,40 ± 9,99*	41,00 ± 1,58*
Еозинофіли, %	1,00 ± 0,00	0,60 ± 0,24	1,00 ± 0,32	1,40 ± 0,24	1,80 ± 0,40
Моноцити, %	1,20 ± 0,58	3,40 ± 0,81	2,80 ± 0,66	0,80 ± 0,37	2,40 ± 0,51*
Лімфоцити, %	78,00±2,76	46,60 ± 6,12*	44,80±5,84*	52,40 ± 9,24*	42,20 ± 3,32*
14 діб					
Нейтрофіли п/я, %	0,60 ± 0,24	4,00 ± 0,32*	4,80 ± 0,86*	3,80 ± 1,32*	5,50 ± 4,50*
Нейтрофіли с/я, %	15,40±1,78	19,60 ± 1,96	28,80±3,72*	17,80 ± 2,92	37,50±7,50***
Еозинофіли, %	1,80 ± 0,80	1,40 ± 0,40	1,60 ± 0,40	2,60 ± 0,81	3,00 ± 0,00
Моноцити, %	1,40 ± 0,51	1,60 ± 0,40	2,00 ± 0,84	0,40 ± 0,24**	3,00 ± 1,00
Лімфоцити, %	80,80±1,74	73,40 ± 2,52	62,80±5,05*	75,40 ± 3,49	51,00 ± 11,00

Примітка: n = 5; * - p < 0,05 відносно інтактного контролю;

** - P < 0,05 відносно позитивного контролю.

В подальшому була визначалася оптимальна доза ЛЗ «Апікаїн-Р» на процеси кістково-мозкового кровотворення в умовах мієлосупресії, викликаній введенням циклофосфаном у дозах 0,5; 2,5 мг / кг і 5,0 мг/кг (табл. 5.10 – 5.12).

Таблиця 5.10

**Показники мієлограми мишей, що отримували
ЛЗ «Апікаїн-Р» у дозі 0,5 мг/кг**

Показники мієлограми	Відносний вміст клітин кісткового мозку, %								
	Інтактний Контроль, доба			Контроль, Патологія, доба			Патологія + «Апікаїн-Р», 0,5 мг/кг		
	2	7	14	2	7	14	2	7	14
Мієлобласти	1,6	1,7	1,3	1,0	1,1*	4,3	1,3	1,5	2,4
Нейтрофілі:									
- промієлоцити	1,3	0,8	1,5	0,9	0,5	1,1	1,2	0,7	1,6
- мислоцити	7,1	8,1	8,5	3,5*	6,5	8,3	2,6	8,3	6,3
- метамієлоцити	8,8	8,5	9,1	3,9*	9,0	8,6	2,0*	10,4	7,2
- палочкоядерні	23,3	23,8	22,5	13,6*	34,4	35,0*	2,5**	41,4*	33,6*
- сегментоядерні	11,2	14,2	13,6	4,0*	1,7*	10,7	0,5*	4,3*	8,2*
Еозінофілі в/г	2,1	1,0	1,5	0,8*	0,1	1,4	5,3	0,6	1,0
Базофілі	0,2	0,3	0,4	0,1	0,1	0,0	0,3	0	0,5
Еритробласти	1,4	1,2	1,7	1,0	0,5*	3,7	2,4	3,0**	3,1
Пронормоцити	1,0	1,3	1,1	0,7	1,0	1,0	2,0**	2,2**	1,4
Нормоб. базофіліні	1,9	1,7	1,9	0,3*	0,7	5,0	1,3**	0,4	0,6
Нормоб. поліхромат	8,9	8,6	8,6	2,5*	3,5*	9,2	1,6	2,1**	5,4*
Нормоб. оксифільні	2,3	1,2	0,6	0,0*	0,2	1,1	0,3	0	0,9
Моноцити	1,4	0,8	0,9	0,5	0,3*	0,9	0,1*	1,3**	0,7
Лімфоцити	14,2	1,9	17,7	13,0	26,1	9,1	76,3**	23,9	18,9
Плазматичні клітини	0,1	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0,1
Індекс дозрівання нейтрофілів	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,98	0,4	0,4
Індекс дозрівання еритроцитів	0,7	0,7	0,5	0,6	0,6	0,6	0,1	0,3	0,6

Примітка: n = 5; * - p ≤ 0,05 відносно інтактного контролю;

** - P ≤ 0,05 відносно позитивного контролю.

На 2-у добу відзначалося зменшення паличкоядерних нейтрофілів з подальшим їх збільшенням у 2 рази на 7-у і 14-у добу, порівняно з контрольною групою (табл. 5.10). Відзначається статистично достовірне збільшення кількості лімфоцитів (у 5 разів), з подальшою нормалізацією до кінця експерименту.

При введенні мишам препарату в дозі 2,5 мг/кг зазначалося пригнічення лімфоїдного паростка і збільшення еритроїдного паростка порівняно з контрольною і нелікованою групою. На 7-у добу відмічалось відновлення всіх паростків. Виняток становило збільшення числа паличкоядерних нейтрофілів порівняно з контрольною групою (табл. 5.11).

Таблиця 5.11

**Показники мієлограми мишей, що отримували ЛЗ «Апікаїн-Р»
у дозі 2,5 мг/кг**

Показники мієлограми	Відносний вміст клітин кісткового мозку, %								
	Інтактний Контроль, доба			Контроль, Патологія, доба			Патологія + «Апікаїн-Р», 2,5 мг/кг		
	2	7	14	2	7	14	2	7	14
Мієлобласти	1,6	1,7	1,3	1,0	1,1*	4,3	8,7	2,2	2,2
Нейтрофільні:									
- промієлоцити		0,8	1,5	0,9	0,5	1,1	1,0	1,2	1,4
- мислоцити	1,3	8,1	8,5	3,5*	6,5	8,3	1,5*	8,6	10,6
- метамієлоцити	7,1	8,5	9,1	3,9*	9,0	8,6	1,5***	11,6*	8,8
- паличкоядерні	8,8	23,	22,5	13,6*	34,4	35,0	4,3***	42,0*	33,8
- сегментоядерні	23,3	8							
	11,2	14, 2	13,6	4,0*	1,7*	10, 7	1,6*	7,2*	11,0
Еозінофіли в/г	2,1	1,0	1,5	0,8*	0,1	1,4	0*	0,1	1,3
Базофіли	0,2	0,3	0,4	0,1	0,1	0,0	0*	0,1	0,5
Еритробласти	1,4	1,2	1,7	1,0	0,5*	3,7	14,1***	3,3**	1,8
Пронормоцити	1,0	1,3	1,1	0,7	1,0	1,0	3,2***	2,3	0,9
Нормоб. базофільні	1,9	1,7	1,9	0,3*	0,7	5,0	1,1	0,2	1,7
Нормоб. поліхроматоф.	8,9	8,6	8,6	2,5*	3,5*	9,2	9,9**	1,4	7,8
Нормоб. оксифільні	2,3	1,2	0,6	0*	0,2	1,1	0,7**	0	0,6
Моноцити	1,4	0,8	0,9	0,5	0,3*	0,9	0,3*	1,6***	0,7
Лімфоцити	14,2	1,9	17,7	13,0	26,1	9,1	63,8**	18,2	14,4
Плазматичні клітини	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0	0	0,1
Індекс дозрівання нейтрофілів	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,9	0,4	0,5
Індекс дозрівання еритроцитів	0,7	0,7	0,5	0,6	0,6	0,6	0,3	0,2	0,7
Лейкоеритробластне відношення									

Примітка: $n = 5$; * - $p \leq 0,05$ відносно інтактного контролю;

** - $P \leq 0,05$ відносно позитивного контролю.

Введення мишам препарату в дозі 5,0 мг/кг викликало аналогічну картину по зміні кількості паличкоядерних нейтрофілів. У цій групі також коливалася кількість еритроїдного ряду порівняно з контрольною групою. Відзначалося збільшення лімфоцитів на 2-у добу, порівняно з контрольною групою та подальша нормалізація до контрольних значень на 7-у і 14-у добу (табл. 5.12).

Таблиця 5.12

Показники мієлограми мишей, що отримували препарат у дозі 5,0 мг/кг									
Показники мієлограми	Відносний вміст клітин кісткового мозку, %								
	Інтактний Контроль, доба			Контроль, Патологія, доба			Патологія + «Апікаїн-Р», 5,0 мг/кг		
	2	7	14	2	7	14	2	7	14
<i>l</i>	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Мієлобласти	1,6	1,7	1,3	1,0	1,1*	4,3	4,9	3,1	0,7
Нейтрофілії:									
- промієлоцити	1,3	0,8	1,5	0,9	0,5	1,1	0,5	0,7	0,5
- мислоцити			8,5	3,5*	6,5	8,3	8,1	7,0	6,7
- метамієлоцити	7,1	8,1	9,1	3,9*	9,0	8,6	4,7	8,3	13,3***
- паличкоядерні	8,8	8,5	22,5	13,6*	34,4	35,0*	4,4***	32,6	38,0
- сегментоядерні	23,3	23,8							
	11,2	14,2	13,6	4,0*	1,7*	10,7	1,4*	4,5*	6,5
Еозінофілія в/г	2,1	1,0	1,5	0,8*	0,1	1,4	0,0*	0,2	0,5*
Базофілі	0,2	0,3	0,4	0,1	0,1	0,0	0,0*	0,0	0,5
Еритробласти	1,4	1,2	1,7	1,0	0,5*	3,7	18,6**	8,7	2,1
Пронормоцити	1,0	1,3	1,1	0,7	1,0	1,0	3,8**	3,6	1,5
Нормоб. базофілії	1,9	1,7	1,9	0,3*	0,7	5,0	0,6	0,4	0,3
Нормоб. оліхроматоф.	8,9	8,6	8,6	2,5*	3,5*	9,2	1,9*	4,4*	3,1***
Нормоб. оксифілії	2,3	1,2	0,6	0,0*	0,2	1,1	0,1	0	1,0
Моноцити	1,4	0,8	0,9	0,5	0,3*	0,9	0,0*	1,0	0,4
Лімфоцити	14,2	1,9	17,7	13,0	26,1	9,1	51,4***	26,0	24,8***
Плазматичні клітини	0,1	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0
Індекс дозрівання нейтрофілів	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	3,7	0,7	0,5
Індекс дозрівання еритроцитів	0,7	0,7	0,5	0,6	0,6	0,6	0,0	0,3	0,5
Лейкоеритробластне відношення									

Примітка: $n = 5$; * - $p < 0,05$ відносно інтактного контролю;

** - $P < 0,05$ відносно позитивного контролю.

Таким чином, результати оцінки морфологічного складу периферичної крові щурів показали, що введення препарату «Апікаїн-Р» надавало стимулюючий вплив на процеси кістково-мозкового кровотворення в умовах міелосупресії, викликаній введенням циклофосфаном, яке більш виражене при введенні препарату у дозах 0,5 і 2,5 мг / кг.

Вплив препарату «Апікаїн-Р» на кількість мегакаріоцитів. Загальна кількість мегакаріоцитів у тварин, яким вводили циклофосфан і препарат в дозі 0,5 мг/кг на 2-у добу зменшувалась в 2 рази порівняно з контролем. У групі, що отримувала препарат у дозі 5,0 мг/кг, кількість мегакаріоцитів збільшувалась в 3 рази порівняно з нелікованими тваринами.

На 7-у добу тенденція до зменшення мегакаріоцитів залишалася. У групі, що отримувала препарат у дозі 2,5 мг/кг, загальна кількість мегакаріоцитів зменшилась у 1,5 рази. Виражений спад кількості мегакаріоцитів – майже в 4 рази спостерігався у групі, що отримувала препарат у дозі 5,0 мг / кг.

На 14-у добу відзначалося збільшення загальної кількості мегакаріоцитів у всіх піддослідних групах порівняно з контролем (табл. 5.13).

Таблиця 5.13

Вплив досліджуваного препарату «Апікаїн-Р» на загальну кількість мегакаріоцитів крові мишей

Контроль інтактний	Контроль патологія	Доза, 0,5 мг/кг	Доза, 2,5 мг/кг	Доза, 5,0 мг/кг
2 доби				
119,0 ± 5,88	53,30 ± 5,68*	52,50 ± 12,59*	107,3 ± 14,48	155,0 ± 36,36**
7 діб				
139,8 ± 11,12	63,80 ± 5,36	74,50 ± 6,77*	74,30 ± 6,75*	37,50 ± 6,85***
14 діб				
145,0 ± 8,71	96,00 ± 5,25*	83,75 ± 10,19*	97,50 ± 12,44*	93,75 ± 43,75

Примітка: n = 5; * - p < 0,05 відносно інтактного контролю;

** - P < 0,05 відносно позитивного контролю.

Вплив ЛЗ «Апікаїн-Р» на деякі інтегральні показники життєдіяльності. Динаміка маси тіла мишей і їх виживаність обрані як інтегральні показники лікувального впливу препарату «Апікаїн-Р», що прямо / побічно пов'язані або

відображають вплив, викликаних циклофосфаном порушень кровотворення в кістковому мозку і в складі периферійної крові, на життєдіяльність організму тварин в цілому.

Динаміка маси тіла нелікованих тварин, які зазнали впливу цитостатика циклофосфану, незважаючи на відсутність достовірних відмінностей з контрольною групою, мало очевидну тенденцію до зниження до 14 доби експерименту порівняно з вихідним рівнем.

У групах, які отримували препарат в дозах 0,5, 2,5 і 5,0 мг/кг, відзначалося незначне зниження маси тіла, порівняно з контрольною групою мишей. Надалі у мишей, яких лікували запропонованим препаратом, визначалася тенденція до підвищення маси тіла.

Аналіз виживання і летальності тварин показав, що в групі, яка одержувала циклофосфан загинула один миша; в групі, яка одержувала препарат у дозі 5,0 мг/кг – троє тварин.

Окремі фрагменти роботи впроваджені до навчального процесу ряду ВНЗ України (Додатки Н.1 – Н.7).

Розроблено проект загальної статті «Методи приготування гомеопатичних базисних препаратів і потенціювання» з метою її включення до ДФУ (Додаток П).

Результати досліджень, що викладені в цьому розділі, опубліковані в 7 друкованих роботах [65, 66, 74, 77, 78, 80, 93].

Висновки до розділу 5

1. Випробування ОБ за показником „мікробіологічна чистота” методом прямого посіву на рідкі середовища (бактерії) та глибокого посіву на агар (гриби) 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. *Ps. aeruginosa* та *St. aureus* і представники родини *E. coli* відсутні.

2. Доведена відповідність розробленого ЛЗ «Апікаїн-Р» нормам ДФУ при перевірці на «стерильність».

3. На підставі проведених фармакологічних досліджень встановлено, що розроблений препарат «Апікаїн-Р» є перспективним ефективним імуностимулюючим засобом для лікування хворих на мієлосупресію, викликану цитостатичною терапією.

4. Результати вивчення токсичності 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.

5. Вивчення місцевоподразнювальної дії показало, що внутрішньом'язове введення викликає виражену місцевоподразнюючу дію. При підшкірному шляху введення подразнююча дія виражена менше.

6. 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 уведенні в дозах 0,5 і 2,5 мг/кг.

7. Отримані експериментальні дані, дозволяють розглядати препарат «Апікаїн-Р» як перспективний ефективний гемостимулюючий засіб для лікування і профілактики хворих при опроміненні, який проявляє радіозахисний ефект, обумовлений стимуляцією клітин кісткового мозку.

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 бджолоїної – «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 $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ з інтервалом витримки – протягом 8 год; другий етап – сублімаційне сушіння – протягом 33 год при температурі -50 до $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (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 УСР-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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. А. с. 59987. Методичні рекомендації «Інструкція по лікуванню бджолою отрутою» / О. І. Тихонов, С. О. Тихонова, Р. І. Скрипник-Тихонов, О. С. Шпичак ; Державна служба інтелектуальної власності України. – заявл. 04.06.2015. – Харків, 2015. – 1 с.
2. А. с. 59988. Монографія «Яд пчелиный в фармации и медицине» / О. І. Тихонов, Р. І. Скрипник-Тихонов ; Державна служба інтелектуальної власності України. – заявл. 04.06.2015. – Харків, 2015. – 1 с.
3. А. с. 60550. Методичні рекомендації «Інноваційні підходи в ангітерапії» / О. І. Тихонов, С. О. Тихонова, Р. І. Скрипник-Тихонов, О. С. Шпичак ; Державна служба інтелектуальної власності України. – заявл. 07.07.2015. – Харків, 2015. – 1 с.
4. Акифьев О. Н. Разработка технологии получения лиофилизированного фторафура / О. Н. Акифьев, В. Я. Галвина, Т. И. Тихвинская // Применение лиофилизации в фармации : тез. докл. семинара. – Рига, 2006. – С. 26–27.
5. Алмакаева Л. Г. Обоснование состава и технологии получения препарата «Глутарсол» для инфузионной терапии / Л. Г. Алмакаева, Л. Г. Науменок, И. В. Шевченко // Фармаком. – 2007. – № 2. – С. 67–71.
6. Алмакаева Л. Г. Состояние и перспективные направления создания препаратов для парентерального применения в ГП ГНЦІС / Л. Г. Алмакаева // Фармаком. – 2005. – № 2/3 – С. 30–37.
7. Аршинова О. Ю. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов / О. Ю. Аршинова, Н. А. Оборотова, Е. В. Санарова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – № 1 (2). – С. 16–17.
8. Багирова В. Л. Современные аспекты использования вспомогательных веществ в технологии лекарственных препаратов / В. Л. Багирова, Н. Б. Демина, И. А. Девяткина // Фарматека. – 1998. – № 6. – С. 34–36.

9. Барабой В. А. Биологическое действие растительных фенольных соединений / В. А. Барабой. – К. : Наук. думка, 2006. – 260 с.

10. Бахтин И. А. Совершенствование процесса сублимационного высушивания лекарственных препаратов : автореф. дис. канд. фармац. наук. / И. А. Бахтин. – Пермь, 2012. – 26 с.

11. Брик М. Т. Енциклопедія мембран : у 2 т. / Т. М. Брик. – К. : Видав. дім «Києво-Могилянська академія», 2005. – 656 с.

12. Брок Т. Мембранная фильтрация / Т. Брок. – М. : Мир, 1987. – 464 с.

13. Бутенко Г. М. Вивчення імуноотоксичної дії лікарських засобів / Г. М. Бутенко, О. П. Терешіна // Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – С.102–114.

14. Вахонина Т. В. Пчелиная аптека / Т. В. Вахонина. – 2-е изд. перераб. и доп. – СПб. : Лениздат, 1995. – 240 с.

15. Вельтищев Ю. Е. Становление и развитие иммунной системы у детей. Иммунная недостаточность. Иммунодиатезы / Ю. Е. Вельтищев. – М. : НИИ педиатрии и хирургии, 2006. – 80 с.

16. Вибір оптимальних режимів фільтрації та заморожування для ліофілізованого препарату на основі бджолиної отрути / Р. І. Скрипник-Тихонов, П. С. Сирота, О. І. Тихонов та ін. // Фармац. журн. – 2015. – № 3. – С. 45–52.

17. Гамова О. Н. Механизмы радиопротекторного действия некоторых зоотоксинов на систему кроветворения крыс при однократном и фракционированном гамма-облучении : дис. на соискание ученой степ. канд. биологических наук / О. Н. Гамова. – Н. Новгород, 2007. – 111 с.

18. Гиниятуллин М. Г. Технология получения пчелиного яда / М. Г. Гиниятуллин, С. С. Салихов. – Рига : Венера, 1991. – 35с.

19. Гиниятуллин М. Г. Технология получения пчелиного яда / М. Г. Гиниятуллин, С. С. Салихов. – Рига, 1991. – 257 с.

20. Глазова Н. В. Оценка методов определения пирогенности в воде для инъекций / Н. В. Глазова, В. Л. Багирова, А. В. Караваева // Фармация. – 2005. – № 4. – С. 9–11.

21. Грунтенко Е. В. Иммуитет «за» и «против» / Е. В. Грунтенко. – 2-е изд. перераб. – М. : Знание, 1982. – 208 с.

22. Губин М. М. Современный технологический комплекс для изготовления стерильных растворов в аптеках / М. М. Губин, С. З. Умаров // Фармация. – 2006. – № 2. – С. 25–29.

23. Гусаров Д. А. Лиофилизация биофармацевтических белков (миниобзор) / Д. А. Гусаров // Биофармац. журн. – 2010. – Т. 2, № 5. – С. 3–7.

24. Гуцин И. С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль / И. С. Гуцин. – М. : Фармарус Принт, 1998. – 250 с.

25. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х. : РІРЕГ, 2001. – 556 с.

26. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид., 1 допов. – Х. : РІРЕГ, 2004. – 494 с.

27. Державна фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид., 2 допов. – Х. : Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.

28. Державна фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-е вид., 3 допов. – Х. : Держ. п-во «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2009. – 280 с.

29. Державна фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-е вид., 4 допов. – Х. : Держ. п-во «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. – 540 с.

30. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Х. : Державне

підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. – Т. 2. – 724 с.

31. Державний реєстр лікарських засобів України [Електронний ресурс] / МОЗ України. – К., 2015. – Режим доступу : <http://www.drlz.kiev.ua>.

32. Державний формуляр лікарських засобів. Випуск перший / під ред. В. Т. Чумака [та ін.]. – К., 2009. – С. 751–803.

33. Доля В. Г. Методи контролю наявності механічних включень в ін'єкційних розчинах / В. Г. Доля // Фармаком. – 2002. – № 1. – С. 62–64.

34. Дранник Г. М. Иммуностропные препараты / Г. М. Дранник, Ю. Я. Гриневиц, Г. М. Дзизик. – К. : Здоров'я, 1994. – 288 с.

35. Инфузионная терапия и клиническое питание / под ред. проф. Г. Н. Хлябича. – Франкфурт-на-Майне : Фирма Фрезениус, 1992. – 795 с.

36. Інноваційні підходи в апітерапії : метод. рек. / О. І. Тихонов [та ін.]; за ред. О. І. Тихонова. – К., 2015. – 32 с.

37. Інноваційні підходи в апітерапії: метод. рек. / О. І. Тихонов [та ін.]; за ред. О. І. Тихонова. – Вид. 2-ге, допов. та перероб. – К., 2015. – 55 с.

38. Інструкція по лікуванню бджолиною отрутою : метод. рек. / О. І. Тихонов, С. О. Тихонова, Р. І. Скрипник-Тихонов та ін.; за ред. О. І. Тихонова. – Х., 2014. – 31 с.

39. Кабиев О. К. Природные фенолы – перспективный класс проивоопухолевых и радиопотенцирующих соединений / О. К. Кабие. – М. : Медицина, 1975. – 192 с.

40. Караулов А. В. Клиническая иммунология / А. В. Караулов // Медицинское информационное агенство. – М., 1999. – 650 с.

41. Караулов А. В. Природные иммуностимуляторы / А. В. Караулов // Практикующий врач. – 1996. – № 1. – С. 11.

42. Кетлинский С. А. Иммунология для врача / С. А. Кетлинский, Н. А. Калинина. – СПб., 1998. – 155 с.

43. Ключкова Т. И. Организация, масштабирование и оптимизация производства лиофилизированных препаратов / Т. И. Ключкова, З. С. Шпрах // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 115–122.

44. Кочкодан В. М. Полімерні мембрани в медицині та фармакології / В. М. Кочкодан // Фармац. журн. – 2007. – № 3. – С. 70–76.

45. Крылов В. Н. Пчелиный яд свойства, получение, применение / В. Н. Крылов. – Н. Новгород : Изд-во ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 1995. – 224с.

46. Кузьмина К. Лечение пчелиным медом и ядом / К. Кузьмина. – К. : Знание Украины, 1992. – 95 с.

47. Кулагина С. В. Антиоксиданты – стабилизаторы раствора тиамин хлорида / С. В. Кулагина, А. В. Симоняк // Фармация. – 2009. – № 6 – С. 7–9.

48. Лекарственные препараты Украины. 1999-2000 : в 3-х т. Т. 1. А–К. / Р. В. Богатырева, А. Ф. Возианов, Ю. П. Спиженко и др. – Х. : Прапор, 1999. – 622 с.

49. Лекарственные препараты Украины. 1999-2000 : в 3-х т. Т. 2. Л–У. / Р. В. Богатырева, А. Ф. Возианов, Ю. П. Спиженко и др. – Х. : Прапор, 1999. – 638 с.

50. Лекарственные препараты Украины. 1999-2000 : в 3-х т. Т. 3. Ф–Е. / Р. В. Богатырева, А. Ф. Возианов, Ю. П. Спиженко и др. – Х. : Прапор, 1999. – 464 с.

51. Масштабирование производства лекарственной формы аранозы лиофилизированной для инъекций и его особенности / Т. И. Ключкова, П. В. Лопатин, Т. В. Мкртчян и др. // Химиотерапия опухолей в СССР. – 1988. – № 51. – С. 63–66.

52. Машковский, М. Д. Лекарственные средства : в 2 т. / М. Д. Машковский. – 13-е изд. – Х. : Торсинг, 1998. – 540 с.

53. Мед натуральный в медицине и фармации (происхождение, свойства, применение, лекарственные препараты) : моногр. / А. И. Тихонов, С. А. Тихонова, Т. Г. Ярных и др. ; под ред. А. И. Тихонова. – Х. : Оригинал, 2010. – 263 с.

54. 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.

55. Миколаєва, А. А. Порівняльний аналіз радіозахисних властивостей бджолоїної отрути відносно системи крові щурів / А. А. Миколаєва // Вісник Нижегородського університету ім. Н.І. Лобачевського. – 2011. – № 6 (1). – С. 149–153.

56. Моисеева, Е. В. Влияние технологического процесса на качество инфузионных растворов / Е. В. Моисеева // Фармация. – 2005. – № 2 – С. 20–24.

57. Надлежащая производственная практика лекарственных средств / под ред. Н. А. Ляпунова, В. А. Загория и др. – К. : МОРИОН, 1999. – С. 508–545.

58. Настанова 42-3.1:2004 Настанова з якості. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка. – К. : МОЗ України, 2004. – 16 с.

59. Настанова 42-3.6:2004. Настанови з якості. Лікарські засоби. Допоміжні речовини. – К., 2004. – 12 с.

60. Науменок Л. Г. Использование смешанных систем растворителей для создания стабильной инъекционной лекарственной формы дифената / Л. Г. Науменок, Л. Г. Алмакаева // Фармаком. – 2001. – № 4 – С. 44–46.

61. Науменок Л. Г. Разработка состава и технологии получения раствора дроверина гидрохлорида 2 % для инъекций с использованием буферных систем / Л. Г. Науменок // Фармаком. – 2007. – № 3. – С. 86–89.

62. Нежута А. А. Разработка научно-обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов / А. А. Нежута // Биотехнология. – 2001. – № 6. – С. 59–67.

63. Никольский И. С. Клинико-иммунологические исследования лечебной эффективности «иммунала» при остром бронхите у часто и длительно болеющих детей / И. С. Никольский, В. В. Никольская, Л. Я. Кушко // Лікарська справа. – 1998. – № 6. – С. 128–131.

64. Новиков Д. К. Оценка иммунного статуса / Д. К. Новиков, В. И. Новикова. – М. – Витебск, 1996. – С. 163–180.

65. Пат. 97105 Україна МПК А61К 9/14, А61К 35/00, А61К 35/56. Ліофілізований препарат для ін'єкцій / Тихонов О. І., Алмакаєва Л. Г., Скрипник-Тихонов Р. І. – № у 2014 11347; заявл. 17.10.2014; опубл. 25.02.2015, Бюл. № 4. – С. 4.

66. 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. – № а 2014 11344, заявл. 17.10.2014, опубл. 11.04.2016, Бюл. № 7. – 3 с.

67. Петров Р. В. Иммунология / Р. В. Петров. – М. : Медицина, 2003. – 368с.

68. Полищук Е. И. Выбор стабилизирующей среды для получения лиофилизированных живых культур возбудителей микозов / Е. И. Полищук, Н. В. Колтукова // Лаб. диагностика. – 1999. – №. 4. – С. 29–33.

69. Правила производства лекарственных средств Европейского Союза (GMP ЕС) / пер. АСИНКОМ. – М., 2003. – 160 с.

70. Разработка инъекционных лекарственных форм цитостатиков с использованием растворимого поливинилпирролидона / Н. А. Оборотова, З. С. Шпрах, В. Л. Багирова и др. // Хим.-фармац. журн. – 2001. – № 5. – С. 39–43.

71. 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.

72. Руководство 42-01-2001 Лекарственные средства. Надлежащая производственная практика. – К. : МЗ Украины, 2001. – 82 с.

73. Сапрыкин Л. В. Динамическое модифицирование в практике ВЭЖХ / Л. В. Сапрыкин // Хим. анализ. – 2005. – № 1. – С. 20-36.

74. Сирота, П. С. Мікробіологічні дослідження отрути бджолоїної / П. С. Сирота, Р. І. Скрипник-Тихонов // Військова медицина України. – 2012. – Т. 12, № 4. – С. 73–78.

75. Скрипник-Тихонов Р. И. Количественное определение мелитгина в лиофилизате яда пчелиного / Р. И. Скрипник-Тихонов, П. С. Сирота // Управління якістю в фармації : матеріали VII наук.–практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 17 трав. 2013 р. – X., 2013. – С. 125–126.

76. Скрипник-Тихонов Р. И. Современное состояние гомеопатической фармации на Украине / Р. И. Скрипник-Тихонов, А. И. Тихонов, С. А. Тихонова // Сучасні напрямки розвитку гомеопатії в Україні : матеріали наук.–практ. інтернет–конф., м. Харків, 26–27 листоп. 2009 р. – X., 2009. – С. 7.

77. Скрипник-Тихонов Р. І. Вивчення очищеної отрути бджолоїної / Р. І. Скрипник-Тихонов // Укр. мед. альм. – 2014. – Т. 17, № 1. – С. 241.

78. Скрипник-Тихонов Р. І. Доказова фармація: безпечність отрути бджолоїної у складі лікарських препаратів / Р. І. Скрипник-Тихонов, Г. Б. Юр'єва // Досудове слідство, фармацевтичне і медичне право, як складові державної політики України у протидії наркозлочинності та поширенню наркоманії: від поліцейської хімії і судової фармації до фармацевтичного і медичного законодавства, соціальної, доказової медицини і фармації : тез. доп. VIII Міжнар. наук.–практ. конф., 18–19 листоп. 2011 р. – X., 2011. – С. 241.

79. Скрипник-Тихонов Р. І. Дослідження по розробці технології ін'єкційного лікарського препарату отрути бджолоїної / Р. І. Скрипник-Тихонов, О. І. Тихонов // Апітерапія: сьогодні та майбутнє фармації : мат. IV з'їзду апітерапевтів України, м. Київ, 12–13 трав. 2011 р. – X., 2011. – С. 57–62.

80. Скрипник-Тихонов Р. І. Дослідження розчину отрути бджолоїної / Р. І. Скрипник-Тихонов // Фармація України. Погляд у майбутнє : матеріали VII Нац. з'їзду фармац. України, м. Харків, 15–17 верес. 2010 р. – X., 2010. – Т. 1. – С. 427.

81. Скрипник-Тихонов Р. І. Застосування препаратів отрути бджолоїної для лікування онкологічних захворювань / Р. І. Скрипник-Тихонов, П. С. Сирота // Наукова конференція молодих вчених, м. Київ, 21-22 берез. 2014 р. – К., 2014 – С. 83–84.

82. Скрипник-Тихонов Р. І. Перспективи розробки апіпрепаратів для фармакотерапії онкологічних захворювань / Р. І. Скрипник-Тихонов, О. І. Тихонов // Актуальні питання створення нових лікарських засобів : матеріали всеукр. наук.-практ. конф. студ. та молодих вчених, м. Харків, 21–22 квіт. 2010 р. – Х., 2010. – С. 213.

83. Скрипник-Тихонов Р. І. Розробка технології ліофілізованого порошку отрути бджолоїної для ін'єкцій / Р. І. Скрипник-Тихонов, Г. Б. Юр'єва // Матеріали II наук.-практ. конф. з міжнар. участю. – Х., 2011. – С. 186–187.

84. Скрипник-Тихонов Р. І. Розробка технології та дослідження розчину для ін'єкцій отрути бджолоїної для профілактики та терапії онкологічних захворювань : магістерська робота / Р. І. Скрипник-Тихонов. – К., 2013. – 62 с.

85. Скрипник-Тихонов Р. І. Розробка фотометричного визначення нінгідринактивних речовин отрути бджолоїної // Р. І. Скрипник-Тихонов, П. С. Сирота // Сучасні досягнення фармацевтичної технології : матеріали III наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 21-23 листоп 2012 р. – Х. : Вид-во НФаУ, 2012. – С. 265–266.

86. Скрипник-Тихонов, Р. І. Теоретичне обґрунтування розробки ін'єкційного препарату отрути бджолоїної для застосування в онкологічній практиці / Р. І. Скрипник-Тихонов, О. І. Тихонов // Апітерапія України : матеріали V з'їзду апітерапевтів і апіконсультантів-бджолярів України з між нар. участю спеціалістів в галузях медицини, фармації, апітерапії, бджільництва, косметології та харчової промисловості, м. Київ, 15-16 жовт. 2015 р. / за ред. академіка УАН О. І. Тихонова. – Х. : Оригінал, 2015. – С. 51–55.

87. Скрипник-Тихонов Р. І. Теоретичне обґрунтування розробки ін'єкційного препарату отрути бджолоїної для застосування в онкологічній

практиці / Р. І. Скрипник-Тихонов, Г. Б. Юр'єва // Апітерапія в лікуванні опорно-рухової системи : матеріали V Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю з апітерапії, м. Київ, 21–22 берез. 2013 р. – К., 2013. – С. 139–142.

88. Скрипник-Тихонов Р. І. Технологія розчинів отрути бджолоїної різної концентрації / Р. І. Скрипник-Тихонов, П. С. Сирота // Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії : матеріали I Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 7–8 листоп. 2014 р. – Х. : НФаУ, 2014. – С. 157–158.

89. Скрипник-Тихонов Р. І. Фізико-хімічні дослідження розчину для ін'єкцій отрути бджолоїної / Р. І. Скрипник-Тихонов, Г. Б. Юр'єва // Актуальні питання створення нових лікарських засобів : матеріали всеукр. наук.-практ. конф. студ. та молодих вчених, присвяч. 140-річчю з дня народж. д-ра фармац. та хім. наук, проф. Миколи Овксентійовича Валяшка, м. Харків, 21–22 квіт. 2011 р. – Х., 2011. – С. 224–225.

90. Совершенствование технологии лиофильного высушивания производственного штамма *Salmonella typhimurium* / Ю. Г. Опарин, З. Ф. Богаутдинов, И. К. Пивоварова и др. // Биотехнология. – 1996. – № 9. – С. 29–31.

91. Состояние гомеопатической фармации на Украине / А. И. Тихонов, С. А. Тихонова, Е. А. Гайдукова и др. // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. науч. тр. / под ред. М. В. Гаврилина. – Пятигорск : Пятигорская ГФА, 2010. – Вып. 65. – С. 759–760.

92. Справочник ВИДАЛЬ. Лекарственные препараты в России / под ред. Е. А. Толмачева. – М. : Астра Фарм Сервис, 2010. – 1728 с.

93. Теоретичні аспекти розробки загальної статті до державної фармакопеї України по виготовленню гомеопатичних базисних препаратів / О. І. Тихонов, С. О. Тихонова, О. О. Гайдукова та ін. // Вісник фармації. – 2009. – № 4 (60). – С. 42–49.

94. Теория и средства апитерапии / В. Н. Крылов, А. В. Агафонов, Н. И. Кривцов и др. – М., 2007. – С. 19–95.

95. Технология и стандартизация лекарств : сб. науч. тр. – Х. : ИГ «РИРЕГ», 2000. – Т. 2. – С. 369–373.

96. Технологія виготовлення екстемпоральних лікарських апіпрепаратів і їх застосування в фармації, медицині та косметології : метод. рек. / О. І. Тихонов [та ін.] ; за ред. О. І. Тихонова. – Х., 2016. – 75 с.

97. Тихонов О. І. Практикум з аптечної технології ліків : навч. посіб. для студ. вищ. навч. закладів / О. І. Тихонов, С. О. Тихонова, О. П. Гудзенко, Д. В. Семенів, Г. П. Пекліна, О. Г. Башпура, Л. В. Соколова, О. С. Шпичак, Р. І. Скрипник-Тихонов; за ред. О. І. Тихонова та С. О. Тихонової. – Х. : Оригінал, 2014. – 448 с.

98. Тихонов, А. И. Перспективы применения пчелиного яда в медицине / А. И. Тихонов, О. С. Данькевич, Т. В. Калиниченко // Апитерапия сегодня с биологической аптекой в XXI век : материалы II Междунар. науч.-практ. конф. – Уфа, 2000. – С. 31–35.

99. Тихонов, А. И. Проблема создания и внедрения апипрепаратов в Украине / А. И. Тихонов, Т. Г. Ярных, О. С. Шпичак // Buletinul academiei de stiinte a moldovei stiitey medicale: revista stiintifico practica. – Chisinau, 2006. – С. 31–41.

100. Тихонов, А. И. Состояние и перспективы создания лекарственных препаратов на основе продуктов пчеловодства / А. И. Тихонов, Т. Г. Ярных, О. С. Шпичак // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики : зб. наук. ст. – Запоріжжя : вид-во ЗДМУ, 2006. – Т. 2, Вип. XV. – С. 275–280.

101. Тихонов, А. И. Технология лекарств : учеб. для вузов / А. И. Тихонов, Т. Г. Ярных. – 2-е изд., испр. и доп. ; пер. с укр. ; под ред. А. И. Тихонова. – Х. : Оригінал, 2006. – 704 с.

102. Тихонов, О. І. Вивчення амінокислотного складу отрути бджолоїни / О. І. Тихонов, Н. А. Чорна // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики: зб. наук. ст. – 2007. – Вип. XX. – С. 200–206.

103. Травина, Л. А. Фильтрование растворов для инъекций / Л. А. Травина, М. А. Селецкий // Химико-фармацевтическое производство : обзор информ. – 1984. – № 3. – 39 с.

104. Филиппо Назо. Основы сублимационной сушки / Филиппо Назо // ВОС Edwards Pharmaceutical Systems : Междунар. конф. – М., 2005. – С. 2-47.

105. Фрейдлин, И. С. Имунная система и ее дефекты : рук. для врачей / И. С. Фрейдлин. – СПб., 1998. – 113 с.

106. Хаитов, Р. М. Иммуномодуляторы и некоторые аспекты клинического применения. / Р. М. Хаитов, Б. В. Пенегин // Клиническая иммунология. – 1996. – № 8. – С. 7–12.

107. Халафян, А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных : учеб. / А. А. Халафян. – 3-е изд. – М. : ООО «Бином-Пресс», 2007. – 512 с.

108. Химико-фармацевтическая стандартизация лиофилизированной термозависимой липосомальной лекарственной формы доксорубина (ТЛЛФД-лио) / Е. В. Игнатьева, А. П. Полозкова, О. Л. Орлова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 14.

109. Хисматуллина, Н. З. Апитерапия / Н. З. Хисматуллина. – Пермь : Мобиле, 2005. – 296 с.

110. Шевелев, К. Ю. Сублимационная сушка. Описание технологии / К. Ю. Шевелев // Сублимационная сушка в фармацевтической и пищевой промышленности : материалы науч.-техн. конф. – М., 2005. – С.114-127.

111. Шевченко, В. О. Вивчення впливу допоміжних речовин на антимікробну дію комбінованого ін'єкційного препарату / В. О. Шевченко, Н. Ю. Шевельова, С. О. Тихонова // Вісник фармації. – 2007. – № 4 (52) – С. 72–74.

112. Шевченко, В. О. Вивчення впливу стабілізаторів і методів ампулювання на якість комбінованого ін'єкційного препарату антимикробної дії / В. О. Шевченко, Д. В. Рибачук, І. В. Шевченко // Вісник фармації. – 2006. – № 1 (45) – С. 37–40.

113. Шевченко, И. В. Обоснование состава – этап фармацевтической разработки парентерального лекарственного средства на основе витаминов группы В / И. В. Шевченко, Л. Г. Алмакаева, М. С. Алмакаев, В. А. Шевченко // Фармаком. – 2008. – № 4. – С. 83–86.

114. Шишкова, Л. О. Вплив Ультрафіолетового опромінення на стійкість розчинів калію глутамінату для ін'єкцій / Л. О. Шишкова // Фармац. журн. – 2000. – № 2 – С. 81–84.

115. Экспресс-анализ подлинности пчелиного яда / В. Д. Чиванов, В. И. Еременко, Р. А. Зубарев, А. Н. Кныш // Пчеловодство. – 1993. – № 9. – С. 46–47.

116. Яд пчелиный в фармации и медицине (теория, технология, медицинское применение) : моногр. / А. И. Тихонов, Л. И. Бондарчук, С. А. Тихонова и др. ; под ред. А. И. Тихонова. – Х. : Оригинал, 2010. – 280 с.

117. 3,4-Dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE): a cytotoxic glucose degradation product in fluids for peritoneal dialysis / T. Linden, C. Arie, R. Deppisch et al. // *Kidney Int.* – 2002. – Vol. 62, № 2. – P. 697–703.

118. A review of Molecular Mechanisms of the Anti-Leukemic Effects of Phenolic Compounds in Honey / M. B. Abubakar, W. Z. Abdullah, S. A. Sulaiman, A. B. Suen // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – № 13. – P. 15054–15073.

119. A high efficiency method for purification and assay of bee venom phospholipase A2 / V. Ameratunga, R. Hawkins, R. Prestidge, J. Marbrook // *Pathology.* – 1995. – Vol. 27, № 2. – P. 157–160.

120. Akers J. E. Experience in the design and use of isolator systems for sterility testing / J. E. Akers, J. P. Agalloco, C. M. Kennedy // *PDA J. of Pharm. Sci. and Technol.* – 1995. – Vol. 49, № 3. – P. 140–144.

121. Aurelie H. Sublimation kinetics during freeze-drying of pharmaceutical protein formulation / H. Aurelie, A. Julien, V. Severine // *Drying Technology*. – 2007. – Vol. 25, № 4–6. – P. 753–758.

122. Baker R. W. Membrane Technology and Application / R. W. Baker. – N.-Y. : McGraw-Hill, 2000. – 514 p.

123. Bakier S. Structura miodu skryształizowanego / S. Bakier // *Pszczelarskiej: mat. XXXIX Naukowej Konfer.* – Pulawy, 2002. – S. 95–97.

124. Bauer R. Influence of Echinacea extracts on phagocytic activity / R. Bauer, P. Reminger, K. Jurcic // *Z. Phytoterapie*. – 1989. – Vol. 10. – P. 43–48.

125. Bee Venom Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Cervical Epidermoid Carcinoma Ca Ski Cells / Siu-wan ip, hsiu-chuan wei, jing-pin lin et al. // *Anticancer research*. – 2008. – № 28. – P. 833–842.

126. Chena J. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A do u ble-edged sword / J. Chena, W. R. Lariviere // *Prog. Neurobiol.* – 2010. – Vol. 92, № . – P. 151–183.

127. Choi K. E. Cancer Cell Growth Inhibitory Effect of Bee Venom via Increase of Death Receptor 3 Expression and Inactivation of NF-kappa B in NSCLC Cells / K. E. Choi, C. J. Hwang, S. M. Gu // *Toxins*. – 2014. – № 6 – P. 2210–2228.

128. Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the determination of some bee venom components / V. Pacáková, K. Štulík, Hau P. Thi et al // *Journ. Chromatog. A*. – 1995. – Vol. 700, №1–2. – P. 187–193.

129. Current status of the apipreparation the national university of pharmacy / A. I. Tikhonov, O. S. Shpychak, R. I. Skrypnik-Tkhonov et al. // *Modern directions in chemistry, biology, pharmacy and biotechnology: International scientific congress, 29 September–2 October 2015*. – Lviv, 2015 – P. 190–195.

130. Development of a method for the complex isolation of physiologically active components from bee venom / Zh. F. Ziyavitdinov, U. K. Inogamov,

N. Zh. Sagdiev, Sh. I. Salikhov // *Chem. Natural Compounds*. – 1995. – Vol. 31, № 6. – P. 726–730.

131. 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 et al. // *The Pharma Innovation Journal(India)*. – 2015. – Vol. 4, № 3. – P. 82–85.

132. Enas M. A. Dissection of antimycotic and antitumor effect of honey bee venom in- vitro and vivo / M. A. Enas // *Academic Journals*. – 2013. – Vol. 7, № 29. – P. 3730–3739.

133. *European Pharmacopoeia*. – 4-th ed. – Strasbourg : Council of Europe, 2003. – Suppl. 5 – 3794 p.

134. *European Pharmacopoeia*. – 5th ed. – Strasbourg : European Department for the Quality of Medicines, 2006. – P. 1872–1873.

135. Fissore D. In-line control of a freeze-drying process in vial / D. Fissore, S. A. Velardi, A. A. Barresi // *Drying Technology*. – 2008. – Vol. 26. – P. 685–694.

136. Florea A. Bee Venom Induced In Vivo Ultrastructural Reactions Of Cells Involved In The Bone Marrow Erythropoiesis And Of Circulating Red Blood Cells / A. Florea, C. Craciun // *Microscopy and Microanalysis*. – 2013. – Vol. 19, № 2. – P. 123–127.

137. Freeze-drying of pharmaceuticals in vials on trays: effects of drying chamber wall temperature and tray side on lyophilization performance / K. H. Gan, R. Bruttini, O. K. Crosser et al. // *Int. J. Heat. Mass. Transf.* – 2005. – Vol. 48. – P. 1675–1687.

138. Friedman R. L. Design of barrier isolators for aseptic processing – a GMP perspective / R. L. Friedman // *Pharm. Engineering*. – 1998. – Vol. 18, № 2. – P. 28–36.

139. Ganguly A. Rarefied gas dynamics aspects of pharmaceutical freeze-drying / A. Ganguly, S. L. Nail, A. A. Alexeenko // *Vacuum*. – 2012. – Vol. 86. – P. 1739–1747.

140. Graham L. *Chemia medyczna. Podstawowe zagadnienia*. Drugie wydanie / L. Graham. – Warszawa: Wydawnictwa naukowo–techniczne, 2003. – 697 s.

141. How to avoid glucose degradation products in peritoneal dialysis fluids / M. Erixon, A. Wieslander, T. Linden et al. // *Perit. Dial. Int.* – 2006. – Vol. 26, № 4. – P. 490–497.

142. In–line control of the lyophilization process. A gentle PAT approach using software sensors / A. A. Barresi, S. A. Velardi, R. Pisano et al. // *International journal of refrigeration*. – 2009. – Vol. 32. – P. 1003–1014.

143. Isolation and structure analysis of bee venom mast cell degranulating peptide/ E. M. Dotimas, K. R. Hamid, R. C. Hider, U. Ragnarsson // *Biochim. Bioph. Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*. – 1987. – Vol. 911, № 3. – P. 285–293.

144. Izumi J. Molecularly imprinted polymeric membranes for optical resolution / J. Izumi, M. Yoshikawa, T. Kitao // *J. Membrane Sci.* – 1997. – Vol. 22. – P. 149–154.

145. *Jad pszczele w farmacji i medycynie (teoria, technologia, zastosowanie lecznicze)* / A. I. Tichonow, L. I. Bodnarczuk, S. A. Tichonowa et al. ; pod redakcja A.I. Tichonowa. – Myslenice : Apipol–Farma, 2011. – 240 s.

146. Kalghatgi K. Rapid displacement chromatography of melittin on micropellicular octadecyl–silica / K. Kalghatgi, I. Fellegvári, C. Horváth // *J. Chromatography A*. – 1992. – Vol. 604, № 26. – P. 47–53.

147. Kamath L. *Practical Technologies for Lyophilization* / L. Kamath // *Genetic Engineering & Biotechnology News*. – 2006. – Vol. 26, № 20. – P. 1–4.

148. Kamath L. *Practical Technologies for Lyophilization* / L. Kamath // *Genetic Engineering & Biotechnology News*. – 2006. – Vol. 26, № 20. – P. 1–4.

149. Kasper J. C. The freezing step in lyophilization: Physico–chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals / J. C. Kasper, W. Friess // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2011. – Vol. 78. – P. 248–263.

150. Kawai, K. Stabilizing effect of four types of disaccharide on the enzymatic activity of freeze-dried lactate dehydrogenase: step by step evaluation from freezing to storage / K. Kawai, T. Suzuki // *Pharm. Res.* – 2007. – Vol. 24. – P. 2003–1890.

151. Kitamura K. A. A foodpad weigh assay method to evaluate delayed-type hypersensitivity in the mouse / K. A. Kitamura // *J. Immunol. Methods.* – 2010. – Vol. 39. – P. 277–283.

152. Knapp J. Z. Overview of the International Conference on Particle Detection, Metrology, and Control / J. Z. Knapp, T. A. Barber // *J. Parent. Sci. Technol.* – 2010. – Vol. 44, № 5. – P. 257–263.

153. Kokot Z. J. Application of Principal Component Analysis for evaluation of chemical and antimicrobial properties of honey bee (*Apis mellifera*) venom / J. K. Zenon, J. Matysiak, J. Kłos, B. Kędzia // *J. Apicult. Research.* – 2009. – Vol. 48, № 3. – P. 168–175.

154. Krylov V. N. Specific pain-appeasing activity of new medical preparations with bee venom / V. N. Krylov, O. P. Shilova, S. B. Parin // *The XXXIV International apicultural congress.* – Bucarest : Apimondia Publishing Hous, 1995. – P. 400.

155. Marion R. Responses of purified phospholipases A2 to phospholipase A2 activating protein (PLAP) and melittin / R. Steiner Marion, John S. Bomalaski, Mike A. Clark // *Biochim. Bioph. Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism.* – 2003. – Vol. 1166, №1. – P. 124–130.

156. *Martindale: the complete drug reference* / ed. by S. C. Sweetman. – 33-rd ed. – London : BPharm, MRPharmS, 2002. – 3694 p.

157. *Martindale: the complete drug reference* / ed. by S. C. Sweetman. – 36-rd ed. – London : Pharmaceutical Press, 2009. – 3694 p.

158. *Millipore: BioPharmaceutical Catalogue, 2002 – 2003.* – USA, 2002. – 304 p.

159. *Millipore: Life Science Catalogue, 2002 – 2003.* – USA, 2002. – 256 p.

160. Moisture sorption behavior of selected bulking used in lyophilized products / M. G. Fakes, M. V. Dali, T. A. Haby et al. // *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. – 2000. – Vol. 54, № 2. – P. 144–149.

161. Monitoring, control and optimisation of freeze-drying process / A. A. Barresi, Pisano R., Rasetto V. et al. // *Proceedings of the European Drying Conference AFSIA 2007, Biarritz, France, May 24–25, 2007. Cahier de l'AFSIA*. – №. 22. – P. 78–79.

162. Novicle O. Nucleic acid and protein synthesis in reconstituted lyophilized *Escherichia coli* exposed to air / O. Novicle, E. Isnaeli, A. Kohn // *J. Appl. Bacteriology*. – 1992. – Vol. 35, № 2. – P. 185–191.

163. Optimization of the freeze-drying cycle: a new model for pressure rise analysis / P. Chouvenc, S. Vessot, J. Andrieu et al. // *Drying Technology*. – 2004. – Vol. 22. – P. 1577–1601.

164. Patapoff T. W. The Importance of Freezing on Lyophilization Cycle Development / T. W. Patapoff, D. E. Overcashier // *BioPharm*. – 2002. – March. – P. 16–21.

165. PD fluids contain high concentrations of cytotoxic GDPs directly after sterilization / M. Erixon, T. Linden, P. Kjellstrand, O. Carlson et al. // *Perit. Dial. Int.* – 2004. – Vol. 24, № 4. – P. 392–398.

166. Phase transitions in frozen systems and during freeze-drying: quantification using synchrotron X-ray diffractometry / D. B. Varshney, P. Sundaramurthi, S. Kumar et al. // *Pharm. Res.* – 2009. – Vol. 26. – P. 1596–1606.

167. Pitt A. V. The nonspecific protein binding of polymeric microporous membrane / A. V. Pitt // *J. Parent. Set. Technol.* – Vol. 41, № 3. – 1987. – P. 110–113.

168. Preston J. *Handbook of clinical psychopharmacology for therapists* / J. Preston, J. O'Neal, M. Talaga. – Oakland : New Harbinger Pubns. Inc., 2002. – 250 p.

169. Rybak-Chmielewska E. HPLC study of chemical composition of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom / E. Rybak-Chmielewska, T. Szczesna // *J. Apicult. Sci.* – 2004. – Vol. 48, №2. – P. 103–110.

170. Sadikoglu H. Freeze-drying of pharmaceutical products: research and development needs / H. Sadikoglu, M. Ozdemir, M. Seker // *Drying Technology.* – 2006. – Vol. 24, № 7. – P. 849–861.

171. Scheer F. A. Operating Rooms With Laminar-Flow Ceilings / F. A. Scheer, K. Fitsner // *Proceedings 13th Int. Symp. on Contamination Control.* – The Hague, 1996. – P. 599–606.

172. Schicht H. H. Die internationalen Normen der Reinraumtechnik – der Stand heute / H. H. Schicht // *Swiss Pharma.* – 2001. – Vol. 23, № 5. – P. 5–7.

173. Schicht H. H. Isolator technology in aseptic manufacturing / H. H. Schicht // *Pharm. Technol. J.* – 1995. – Vol. 16. – P. 1–47.

174. Searles J. A. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf / J. A. Searles, J. F. Carpenter, T. W. Randolph // *J. Pharm. Sci.* – 2001. – Vol. 90. – P. 872–887.

175. Shier J. Filtration characteristics of prefilters for cleanroom systems / J. Shier // *Swiss Contamination Control.* – 1990. – Vol. 3, № 4b. – P. 87–89.

176. 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 : abstracts of international scientific and practical conference of young scientists and student, April 23, 2015.* – Kh. : Publishing Office NUPh, 2015. – P. 223.

177. Stability of drug additives in peritoneal dialysis solutions in a new container / M. Voges, D. Faict, G. Lechien, M. Taminne // *Perit. Dial. Int.* – 2004. – Vol. 24, № 6. – P. 590–595.

178. Sundaramurthi P. Trehalose crystallization during freeze-drying: implications on lyoprotection / P. Sundaramurthi, R. Suryanarayanan // *J. Phys. Chem.* – 2010. – Vol. 1. – P. 510–514.

179. Sznitowska, M. The physical characteristic of lyophilized tablets containing a model drug in different chemical form and concentration / M. Sznitowska, M. Pjaczek, M. Klunder // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research.* – 2005. – Vol. 62, № 1. – P. 25–29.

180. Tang X. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice / X. Tang, M. J. Pikal // *Pharmaceutical Research.* – 2004. – Vol. 21, № 2. – P. 191–200.

181. Teagarden D. L. Practical aspects of lyophilization using non-aqueous co-solvent systems / D. L. Teagarden, D. S. Baker // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2002. – Vol. 15, № 2. – P. 115–133.

182. 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 et al. – Kharkov : News of Pharmacy, 2013. – P. 37–42.

183. Todrin A. F. Thermophysical properties of cryoprotective agents. III. Density, kinematic viscosity and surface tension of some cryoprotective agents, their solutions and mixtures / A. F. Todrin, L. I. Popivnenko // *Problems of Cryobiology.* – 2010. – Vol. 20, № 4. – P. 416–435.

184. Todrin A. F. Thermophysical properties of cryoprotective agents. III. Dynamic viscosity of some cryoprotective agents, their solutions and mixtures / A. F. Todrin, L. I. Popivnenko // *Problems of Cryobiology.* – 2010. – Vol. 20, № 3. – P. 266–281.

185. Wei W. Issues in Freeze Drying of Aqueous Solutions / W. Wei, C. Mo, C. Guohua // *Chinese Journal of Chemical Engineering.* – 2012. – Vol. 20, № 3. – P. 551–559.

186. Whyte W. Microbiological contamination models for use in risk assessment during pharmaceutical production / W. Whyte, T. Eaton // *Eur. J. of Parent. and Pharm. Sci.* – 2004. – Vol. 9, № 1. – P. 11–15.

ДОДАТКИ

Додаток А.1

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА ВИНАХІД

№ 111273

ЛЮФІЛІЗОВАНИЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на винаходи 11.04.2016.

В.о. Голови Державної служби
інтелектуальної власності України



А.А.Малін



Продовження Додатку А.1

(11) 111273

(19) UA

(51) МПК (2016.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 35/00

(21) Номер заявки: а 2014 11344

(22) Дата подання заявки: 17.10.2014

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: 11.04.2016(41) Дата публікації відомостей
про заявку та номер
біюлетеня: 25.02.2015,
Бюл. № 4(46) Дата публікації відомостей
про видану патенту та
номер біюлетеня: 11.04.2016,
Бюл. № 7(72) Винахідники:
Тихонов Олександр
Іванович, UA,
Алмакаєва Людмила
Григорівна, UA,
Скрипник-Тихонов
Ростислав Ігорович, UA(73) Власники:
Тихонов Олександр
Іванович,
вул. Червоноармійська, 8/10-а,
ка. 55, м. Харків, 61052, UA,
Алмакаєва Людмила
Григорівна,
вул. Аерофлотська, 11, кв. 44,
м. Харків, 61031, UA

(54) Назва винаходу:

ЛІОФІЛІЗОВАНИЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

(57) Формула винаходу:

Ліофілізований препарат для ін'єкцій, що містить бджолину отруту, який відрізняється тим, що додатково містить манітол, натрію хлорид, лідокаїну гідрохлорид та воду для ін'єкцій, при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

бджолина отрута	0,05-0,3
манітол	1,0-4,0
натрію хлорид	0,6-1,0
лідокаїну гідрохлорид	0,01-0,05
вода для ін'єкцій	решта

Додаток А.2



Продовження Додатку А.2

(11) 97105

(19) UA

(51) МПК (2015.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 35/00
A61K 35/56 (2015.01)

(21) Номер заявки:	u 2014 11347	(72) Винахідники:	Тихонов Олександр Іванович, UA, Алмакаса Людмила Григорівна, UA, Скрипник-Тихонов Ростислав Ігорович, UA
(22) Дата подання заявки:	17.10.2014	(73) Власники:	Тихонов Олександр Іванович, вул. Червоноармійська, 8/10-а, кв. 55, м. Харків, 61052, UA, Алмакаса Людмила Григорівна, вул. Аерофлотська, 11, кв. 44, м. Харків, 61031, UA
(24) Дата, з якої є винятком права на корисну модель:	25.02.2015		
(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня:	25.02.2015, Бюл. № 4		

(54) Назва корисної моделі:

ЛІОФІЛІЗОВАНИЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ІНЪЕКЦІЙ

(57) Формула корисної моделі:

Ліофілізований препарат для ін'єкцій, що містить бджолину отрату, який відрадіається тим, що додатково містить мантол, натрію хлорид, натрію гидрохлорид та воду для ін'єкцій, при наступному співвідношенні звичайність мас. %:

бджолина отрата	0,05-0,3
мантол	1,0-4,0
натрію хлорид	0,6-1,0
натрію гидрохлорид	0,01-0,05
вода для ін'єкцій	решта.

Додаток Б.1

УКРАЇНА



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА

ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ

СВІДОЦТВО

про реєстрацію авторського права на твір

№ 59985

Навчальний посібник "Практикум з ангічної технології ліків"
(назва твору)

Автор(и) Тихонів Олександр Іванович, Тихонова Світлана Олександрівна,
 Шпичак Олег Сергійович

(повне ім'я, повноформ (за наявності))

Дата реєстрації

04.08.2015



Голова Державної служби
 інтелектуальної
 власності України
 А.Г. Жарінова

Додаток Б.2

УКРАЇНА



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ

СВІДОЦТВО
про реєстрацію авторського права на твір

№ 59988

Монографія "Яд очелиний в фармації и медицине"
(вид, назва твору)

Автор(и) Тихонов Олександр Іванович, Скрипник-Тихонов Ростислав Ігоревич
(повне ім'я, пов'язаним (за наявності))

Дата реєстрації 04.06.2015

Голова Державної служби
інтелектуальної
власності України
А.Г. Жарінова





Додаток Б.3

УКРАЇНА



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

СВІДОЦТВО
про реєстрацію авторського права на твір

№ 64435

Брошура "ТЕХНОЛОГІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ЕКСТЕМПОРАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ АНШРЕПАРАТІВ І ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ В ФАРМАЦІЇ, МЕДИЦИНІ ТА КОСМЕТОЛОГІЇ. Методичні рекомендації"

(назва, мовою твору)

Автор(и) Тихонов Олександр Іванович, Яриш Тетяна Григорівна, Гизалова Світлана Олександрівна, Башура Олександр Геннадійович, Шивчак Олег Сергійович, Бондаренко Лариса Олександрівна, Кудрик Богдан Тарасович, Скрипник-Тихонов Ростислав Ігорович, Богдан Наталія Степанівна, Бобри Світлана Геннадіївна, Коношевич Людмила Володимирівна

(повне ім'я, поодинокі (за наявності))

Дата реєстрації 10.03.2010



Голова Державної служби інтелектуальної власності України
В.о. Голови А.А. Милиш



Додаток Б.4

УКРАЇНА

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

СВІДОЦТВО
про реєстрацію авторського права на твір

№ 59987

Брошура "Методичні рекомендації "Інструкція по лікуванню бджолиного отруту"

(вид, назва твору)

Автор(и) Тихонов Олександр Іванович, Тихонова Світлана Олександрівна, Скрипник-Тихонов Ростислав Ігорович, Шничак Олег Сергійович

(повне ім'я, походження (за наявності))

Дата реєстрації 04.06.2015

Голова Державної служби інтелектуальної власності України

 А.Г. Жарінова



Додаток Б.5

УКРАЇНА



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

СВІДОЦТВО
про реєстрацію авторського права на твір

№ 60550

Методичні рекомендації "ІННОВАЦІЙНІ ПІДХОДИ В АНТИБІОТІ"
(вид, назва твору)

Автор(и) Тихонов Олександр Іванович, Тихонова Світлана Олександрівна,
Скрипник-Тихонов Ростислав Ігорович, Шпичак Олег Сергійович
(власні імена, по батькові (за наявності))

Дата реєстрації 07.07.2015

Голова Державної служби інтелектуальної власності України
А.Г. Жарінова





Додаток В

ПРОЕКТ

ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК», м. Харків

«УЗГОДЖЕНО»

Заступник начальника
З наукової роботи
Української військово-медичної
академії

О.М. Власенко

«__» _____ 20__ р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Голова правління
ПАТ «БІОЛІК», м. Харків

Шарій С.Н.

«__» _____ 20__ р.

ТЕХНОЛОГІЧНИЙ РЕГЛАМЕНТ

ТІР 64-01973452-016-2010

на виробництво лікарського засобу Апікаїн-Р, ліофілізат для
приготування розчину для ін'єкцій по 1 мг

Додаток Д

ПРОЕКТ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Уповноважена Особа
ПАТ «БІОЛІК», м. Харків



Рибовол О. В.
2010р.

- Заявник, країна:** Українська військово-медична академія
Міністерства оборони України, м. Київ, Україна
- Виробник, країна:** ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК», м. Харків,
Україна

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

АРІСАІН-Р

АПІКАІН-Р

ліофілізат для приготування розчину для ін'єкцій по 1 мл

Додаток 3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Голова правління
 ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-
 БІОЛІК», м. Харків


 Шарій С. Н.
 « 27 » _____ 2010 р.

АКТ

апробації проектів технологічного регламенту і методів контролю якості на ліофілізат для приготування розчину для ін'єкцій по 1 мг «Алікаїн-Р»

На базі ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК», м. Харків з 2009 р по 2010 р було проведено апробацію технології отримання лікарського препарату «Алікаїн-Р», ліофілізат для приготування розчину для ін'єкцій по 1 мг у флаконах та методів його контролю якості на дослідних серіях.

Внаслідок проведеної роботи, встановлено повну відтворюваність технології викладеної в проекті технологічного регламенту у виробничих умовах ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК» на промисловому обладнанні, а виготовлені зразки ліофілізату «Алікаїн-Р» відповідають вимогам розробленого проекту методів контролю якості (МКЯ) на даний препарат.

Від виробника:

Главный технолог
 ПАТ «Фармстандарт-Біолік»


 Начальник цеху



« _____ » _____ 20 _____ р.

Від розробника:

Здобувач Скрипник-Тихонов Р.І


 Науковий керівник, проф. Сярова П.С.

« _____ » _____ 20 _____ р.

Додаток Ж

ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК», м Харків

АКТ
АПРОБАЦІЇ ПРОМИСЛОВОЇ ТЕХНОЛОГІЇ

На базі ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК», м. Харків з 2009 р по 2010 р було проведено апробацію технології у промислових умовах на послідних серіях лікарського препарату «Апикаїн-Р», діофілізат для приготування розчину для ін'єкцій по 1 мг у флаконах, склад та технологію якого розроблено співробітниками кафедри військової фармації Української військово-медичної академії – здобувачем Скрипник-Тихоновим Р.І. та професором Сиротою П.С.

Голова правління
ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК»



С.М. Шарий

Додаток К

ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК», м. Харків
Фармстандарт

ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК»
 61070, Україна, м. Харків, Помірки
 тел./факс: +38 (057) 704-87-34
 e-mail: office@biolik.com.ua
 ЄДРПОУ 01973452

№ 158/40 від 15.01.2016
 На № _____ від _____

Голові спеціалізованої
 вченої ради Д 26.613.04
 при Національній медичній
 академії післядипломної освіти
 ім. П.Л. Шупика
 д.ф.н., проф. Пономаренку М.С.

Вельмишановний Микола Семенович!

Доводимо до Вашого відому, що виробництво лікарського препарату «Алікаїн-Р», ліофілізат для приготування розчину для ін'єкцій по 1 мг, що був розроблений на кафедрі військової фармації Української військово-медичної академії спільно з ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК», м. Харків, включено до перспективного плану промислового випуску виробництва препарату.

З повагою,
 Голова правління
 ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК»



С.М. Шарій

Шляховий листок

Інформаційний лист є документом ліцензії наукової (науково-технічної) продукції, що належить до Переліку наукових (науково-технічної) продукції, проважених для промислового дослідницького (науково) марку у сфері охорони здоров'я (Наказ МОЗ України та НАН України від 13.11.2013 №969/97 «Про затвердження промислового дослідницького марку у сфері охорони здоров'я, зареєстрований в Міністерстві Інтелектуальної Власності України (№ 12.2013 за № 2108/24600)).

МОЗ УКРАЇНИ

**УКРАЇНСЬКИЙ ЦЕНТР НАУКОВОЇ МЕДИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ
ТА ПАТЕНТНО-ЛІЦЕНЗІЙНОЇ РОБОТИ
(УКМІНЦЕНТРАІНФОРМ)**

**ІНФОРМАЦІЙНИЙ
ЛІСТ**

Про наукову (науково-технічну) продукцію, отриману за державною підтримкою, котрою-інтелектуальної власності підприємств, установ, організацій (національної діяльності підприємств, установ, організацій) України, Національної академії медичних наук України промислового дослідницького (науково) марку у сфері охорони здоров'я

Інформаційний лист спрямований для використання керівниками структурних підрозділів (відомого профіль) закладів охорони здоров'я України для моніторингу перевідних технологій діяльності та лікування з подальшим їх запровадженням у практику. (Наказ МОЗ України від 14.03.2011 №142 «Про затвердження державної адресності закладів охорони здоров'я»)

st. Київ

Продовження Додатку Л

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
Українська центральна науково-методична інформація
за пацієнто-орієнтованою інформацією
(Українська інформація)
(Українська інформація)

ІНФОРМАЦІЙНИЙ ЛИСТ

(про новий метод в сфері охорони здоров'я)

№125-2015

Випуск 9 з професійно-
«Формати»
Підстав: рішення ПК
«Формати»
Протокол № 89 від 18.02.2015 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
З ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
ЗАСОБИ, ГОДИНИ
ІНСТРУМЕНТИ І КОНТРОЛЬ
ЗАСОБИ В ОБ'ЄКТАХ
ТА ІН. КУРСУ

ЗАПОВІДАНО НА ПОРЯДОК ДІЯ
ДЛЯ РОЗРОБКИ ІНСТРУМЕНТІВ
ФАРМАЦЕВТИЧНОГО НАВЧАННЯ
ЗАСОБИ, НАВЧАННЯ ІНСТРУМЕНТІВ
УСТАНОВИ

ТЕХНОЛОГІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ЛЮБІМАНОВОГО
ПРЕПАРАТУ ДЛЯ ІН'ЕКЦІЇ

УСТАНОВА-РОЗРОБНИК

ІНСТИТУТ

ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ МОУ ЗУЖАЛІН

УНІВЕРСИТЕТ

МОУ ЗУЖАЛІН

А В Т О Р И

А.А. К. ПРОВА, ПРОВОД. О.І.
СЕРВІНІК, ПРОВОД. А.І.

А. Ковал

Додаток М.1



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Інформаційний лист «Технологія виготовлення ліофілізованого препарату для ін'єкцій».

2. Ким запропоновано, адреса виконавця:

Національний фармацевтичний університет, кафедра технології парфумерно-косметичних засобів, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.
Українська військово-медична академія, кафедра військової фармації.
04655, м. Київ, вул. Мельникова, 24.

3. Укладачі:

Академік Української ЛН, проф. Тихонов О.І., здобувач Скрипник-Тихонов Р.І.

Джерело інформації:

Тихонов О.І. Технологія виготовлення ліофілізованого препарату для ін'єкцій / О.І. Тихонов, Р.І. Скрипник-Тихонов // Інформ. лист Укрмеднагентінформ МОЗ України. – К., 2015. – Вип. 9. – з проблеми «Фармація». – № 125-2015. – 4 с.

4. Ким і коли впроваджено:

ТОВ «Аптека № 9», м. Харків – листень 2015 р.

5. Ефективність впровадження:

Запропонований склад і технологія ліофілізованого препарату для ін'єкцій дозволить розширити асортимент лікарських препаратів та забезпечити можливість якісного приготування лікарського препарату у умовах аптек.

6. Зауваження, пропозиції:

Побажання щодо впровадження розробки екстемпоральної рецептури з формі рідких лікарських форм.

Відповідальний за впровадження:
Зам. директора ТОВ «Аптека № 9»,
с.фарм.н., доц.

О.С. Смірнова

Додаток М.2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Голова Правління
 Приватного акціонерного товариства
 «Аптеки Запоріжжя»
 « 24 » « 12 » 2015 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Назва пропозицій для впровадження:**
Інформаційний лист: Технологія виготовлення ліофілізованого препарату для ін'єкцій
2. **Установа, її адреса, виконавці:**
 Національний фармацевтичний університет, кафедра технології парфумерно-косметичних засобів. 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.
 Академік Української АН, проф. Тихонов О.І.
 Військова частина А4615, м. Дніпропетровськ.
 Здобувач Скрипник-Тихонов Р.І.
3. **Джерело інформації:** Тихонов О.І. Технологія виготовлення ліофілізованого препарату для ін'єкцій / О.І. Тихонов, Р.І. Скрипник-Тихонов // Інформ. лист Укрмедпатентінформ МОЗ України. – К., 2015. – Вип. 9. – з проблеми «Фармація». – № 125-2015. – 4 с.
4. **Впроваджено:** У виробничий процес аптек з екстемпоральним виготовленням лікарських засобів Приватного акціонерного товариства «Аптеки Запоріжжя».
5. **Термін впровадження:** з 23.11 по 21.12 2015 р.
6. **Ефективність впровадження:**

Показники	За даними	
	Розробників	Установи, що впроваджують
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелі інформації.		
Результати наукових досліджень використовуються у екстемпоральному виготовленні стерильних лікарських засобів.		

7. **Зауваження, пропозиції – немає.**

Відповідальний за впровадження: _____

Додаток Н.1



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозицій для впровадження:

Розробка складу та технології розчину для ін'єкцій отрути бджолиної.

2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:

61002 м. Харків, вул. Пушкінська, 53

Кафедра технології парфумерно-косметичних засобів

Національного фармацевтичного університету, м. Харків

Військової частини а 4615, м. Дніпропетровськ

акад. УАН, д.фарм.н., проф. Тихонов О.І., здобув. Скрипник-Тихонов Р.І.

3. Джерела інформації:

- Скрипник-Тихонов Р.І., Тихонов О.І., Юр'єва Г.Б. Дослідження по розробці технології ін'єкційного лікарського препарату отрути бджолиної / Р.І. Скрипник-Тихонов, О.І. Тихонов, Г.Б. Юр'єва // мат. IV з'їзду апітерapeutів України «Апітеріapia: сьогодні та завтра». М. Київ, 12-13 травня 2011 р. – С.157-162.
- Tikhonov A.I., Vashura O.G., Yarnykh T.G., Tikhonova S.A., Skrypnik-Tikhonov R.I. The problem of development of the direction for creation and manufacture of medicines with bee prop / Res. by d.o.p., prof. Gladukh Ye.V. – Kh.: NUoPh, - № 4 (76), – 2013. – 37-42 p.

4. Де і коли впроваджено:

Кафедра промислової фармації Національного фармацевтичного університету.

Загальна кількість спостережень – 5.

5. Результати застосування методу за період з 28.11.2013 р.:

Позитивні (кількість спостережень) – 5

Негативні (кількість спостережень) – немає

Незвичайні (кількість спостережень) – немає

6. Ефективність впровадження:

Результати досліджень з розробки складу та технології лікарських апітерapeutів, що наведено у вищевказаних джерелах, впроваджені до початкового процесу з виготовлення «Промислової технології лікарських засобів».

7. Зауваження, пропозицій – немає.**Відповідальний за впровадження:**

Завідувач кафедри промислової фармації


Національного фармацевтичного університету

д.фарм.н., професор

Є.В. Гладух

Додаток Н.2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Запорізького Державного Медичного
університету, д.мед.н.,
проф.  В.О. Тумницький
« 15 » « 09 » 2015 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозицій для впровадження:**
Розробка складу та технології розчину для ін'єкцій отрути бджолиної.
2. **Ким запропоновано, адреса, виконавці:**
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53
Кафедрою технології парфумерно-косметичних засобів
Національного фармацевтичного університету, м. Харків
Військовою частиною а 4615, м. Дніпропетровськ
акад. УАН, д.фарм.н., проф. Тихонов О.І., здобув. Скрипник-Тихонов Р.І.
3. **Джерела інформації:**
Скрипник-Тихонов Р.І., Тихонов О.І., Юр'єва Г.Б. Дослідження по розробці технології ін'єкційного лікарського препарату отрути бджолиної / Р.І. Скрипник-Тихонов, О.І. Тихонов., Г.Б. Юр'єва // мит. IV з'їзду апітерapeutів України «Апітеріapia: сьогодні та майбутнє». М. Київ, 12-13 травня 2011 р. - С. 157-162.
Tikhonov, O. I.; Bashura, O. G.; Yamykh, T. G.; Tikhonova, S. O.; Skrypnik-Tikhonov, R. I. The problem of development of the direction for creation and manufacture of medicines with bee products in Ukraine / O. I. Tikhonov, O. G. Bashura, T. G. Yamykh, S. O. Tikhonova, R. I. Skrypnik-Tikhonov // News of Pharmacy - 2013, - № 4, - P. 37-42.
4. **Де і коли апробовано:**
Кафедра технології ліків Запорізького державного медичного університету
Загальна кількість спостережень – 5
5. **Результати застосування метода за період з 15.09.2014 р. по 15.09.2015 р.**
Позитивні (кількість спостережень) – 5
Негативні (кількість спостережень) – немає
Неозначені (кількість спостережень) – немає
6. **Ефективність впровадження:**
Розробка складу та технології розчину для ін'єкцій отрути бджолиної, що наведені у виведених джерелах, впроваджені до навчального процесу курсу технології ліків.
7. **Зауваження, пропозиції** – немає.

Завідувач кафедри технології ліків ЗДМУ
доктор фарм. наук, професор



В.В. Гладнийев

Додаток Н.3



1. **Назва пропозиції для впровадження:**
Інструкція по лікуванню бджолиною отрутою: методичні рекомендації
2. **Установа, її адреса, виконавці:**
Національний фармацевтичний університет, кафедра аптечної технології ліків ім. Д.П. Сала. 61002, м. Харків, вул. Пушкіньська, 53.
Академія Української АН, проф. Тихонов О.І., к.ф.н., доц. Шпичак О.С., здобувач Скрипник-Тихонов Р.І.
3. **Джерело інформації:**
Інструкція по лікуванню бджолиною отрутою: методичні рекомендації / О.І. Тихонов, С.О. Тихонова, Л.В. Соколова, К.І. Бодня, О.С. Шпичак, О.О. Пащенко, Ю.М. Солоденко, Т.П. Гарник, Р.І. Скрипник-Тихонов, В.І. Здибський. / Х. – 2014. – 31 с.
(Затверджено Проблемною комісією «Фармація» МОЗ та НАМН України (протокол № 87 від 23.10.2014 р.).
4. **Впроваджено:** в науково-педагогічний процес кафедри контролю якості і стандартизації лікарських засобів на циклі тематичного удосконалення «Наукові основи та сучасні засоби фітотерапії»
5. **Термін впровадження:** 22.04-10.06.2015 р., 3.09-19.10.2015 р.
6. **Ефективність впровадження:** слухачі циклу – лікарі різного фаху з цікавістю сприйняли нову методику по лікуванню бджолиною отрутою
7. **Завваження, пропозиції:** включити інформацію у навчання інших послів, спрямованих на підготовку лікарів які практикують фітотерапевтичні методи лікування та апітерапію

Відповідальний за впровадження
 Зав. кафедри контролю якості і
 стандартизації лікарських засобів
 професор

Вепотієва Наталія Олександрівна

» 24 « 09 » 2015 р.

Додаток Н.4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з навчально-методичної роботи Північного Київського медичного університету УАНМ

М.М. Матвійчук
2015 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:
Інноваційні підходи в апітеріалі: методичні рекомендації. Видання 2-ге доповнене та перероблене.
2. Установа, її адреса, виконавці:
Національний фармацевтичний університет, кафедра інтегрованої медицини ім. Д.П. Сала, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. Академік Української АН, проф. Тихонов О.І., к.ф.н. доц. Шинкаренко Світлана Сергіївна, Скрипник-Тихонов Р.І.
3. Джерело інформації: Інноваційні підходи в апітеріалі: методичні рекомендації / О.І. Тихонов, Т.Г. Ярних, К.І. Бодя [та ін.]; за ред. О.І. Тихонова. – Вид. 2-ге, доповн. та переробл. – Київ, 2015. – 80 с. (Утверджено Департаментом медичної допомоги МОЗ України від 25.03.2015 р.).
4. Впроваджено: кафедра фітотерапії, гомеопатії та біоенергетичної інформаційної медицини Північного Київського медичного університету УАНМ
5. Термін впровадження: з 2013р. – 2015 р.
6. Ефективність впровадження:

Показники	За даними	
	Розробників	Установи, що впровадили
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним з джерела інформації.		
Результати наукових досліджень анкористовуються у навчально-діагностичному процесі професорсько-викладацьким колективом кафедри		

7. Зауваження – немає.
8. Пропозиція – виробляється у діяльовий процес при відновленні реалізаційної інформації.

Відповідальний за впровадження:

І.М. Кошменко
к.ф.н., доц.
УАНМ
ЗАТВЕРДЖЕНО
НАЧО
2015.03.04



І.М. Кошменко

Додаток Н.5

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з навчально – методичної
роботи ПВНЗ «Київський медичний
університет УАНМ»
д.мед.н., проф. М.М.Матяш



2015 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- Назва пропозиції для впровадження:
Інструкція по лікуванню бджолою отрутою: методичні рекомендації
- Установа, її адреса, виконавці:
Національний фармацевтичний університет, кафедра інтенсивної токсикології ліків ім. Д.П. Сала, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.
Академік Української АН, проф. Тихонов О.І., к.ф.н., доц. Шпичак (ЗС),
здобувач Скрипник-Тихонов Р.І.
- Джерело інформації: Інструкція по лікуванню бджолою отрутою: методичні рекомендації / О.І. Тихонов, С.О. Тихонова, Л.В. Сенькінова, А.Болня, О.С. Шпичак, О.О. Пашенко, Ю.М. Солоденко, Т.П. Гарига, Р.І. Скрипник-Тихонов, В.І. Здібський. / Х. – 2014. – 31 с.
(Затверджено Проблемною комісією «Фармація» МОЗ та НАМН України (протокол № 87 від 23.10.2014 р.).
- Впроваджено: кафедра фітотерапії, гомеопатії та біосинергизації фармації медицини ПВНЗ «Київський медичний університет УАНМ»
- Термін впровадження: з 2014 р. – 2015 р.
- Ефективність впровадження:

Показники	За даними	
	Розробників	Установи, що впроваджують

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним у джерелі інформації.

Результати наукових досліджень використовуються у навчальному та лікувальному процесі професорсько-викладацьким колективом кафедри

- Зауваження – немає.
- Пропозиції – впроваджувати в реабілітаційні та відповідні методи лікування згідно методичних рекомендацій.

Відповідальний за впровадження:

ВІСНУК П., доц
ЗАСНІАЧУВ
НАЧАЛЬНИК

Т.М.Козименко

Додаток Н.6



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назначення пропозицій для впровадження:

Розробка складу та технології розчину для ін'єкцій отрути бджолиної.

2. Ким запропоновано, адреса, виконавець:

61002 м. Харків, вул. Пушкінська, 53

Кафедрою технологій парфумерно-косметичних засобів

Національного фармацевтичного університету, м. Харків

Військово-частині в 4615, м. Дніпропетровськ

акад. УАН, д.фарм.н., проф. Тихонов О.І., здобув. Скрипник-Тихонов Р.І.

3. Джерела інформації:

► Скрипник-Тихонов Р.І., Тихонов О.І., Юр'єва Г.Б. Дослідження по розробці технології ін'єкційного лікарського препарату отрути бджолиної / Р.І. Скрипник-Тихонов, О.І. Тихонов, Г.Б. Юр'єва // мат. IV з'їзду антірапевтів України «Антірапевтика: сьогодення та майбутнє». М. Київ, 12-13 травня 2011 р. – С.157-162.

► Tikhonov A.I., Bashura O.G., Yaryukh T.G., Tikhonova S.A., Skrypnik-Tikhonov R.I. The problem of development of the direction for creation and manufacture of medicines with bee prop / Rec. by d.o.r., prof. Gladukh Ye.V. – Kh.: NUoFPh, – № 4 (76), – 2013. – 37-42 р.

4. Де і коли впроваджено:

Кафедра технологій ліків Національного фармацевтичного університету

Загальна кількість спостережень – 5.

5. Результати застосування метода за період з 28.11.2013 р.:

Позитивні (кількість спостережень) – 5

Негативні (кількість спостережень) – немає

Неозначені (кількість спостережень) – немає

6. Ефективність впровадження:

Результати досліджень з розробки складу та технології лікарських антірапевтів, що наведено у вилучених джерелах, впроваджені до навчального процесу з дисципліни «Технологія ліків».

7. Зауваження, пропозиції – немає.**Відповідальний за впровадження:**

Завідувач кафедри технологій ліків

Національного фармацевтичного університету

д.фарм.н., професор

Т.Г. Ярич

Додаток Н.7

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор
Науково-практичного медичного центру
Харківського національного
медичного університету
Резуленко Ю. К.
2015 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** положення методичних рекомендацій «Інноваційні підходи в анітерапії». – Вид. 2-ге, доповн. та переробл. – Київ, – 2015. – 55 с.
2. **Ким запропоновано, адреса виконавця:** Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.
3. **Укладачі (автори):** Тихонов О.І., Ярних Т.Г., Бодня К.І., Тихонова С.О., Бондаренко Л.О., Гарник Т.П., Пекліна Г.П., Шпичак О.С., Соловйов Ю.Г., Солоденко Ю.М., Скришник-Тихонов Р.І., Здибський В.І.
4. **Джерело інформації:** Інноваційні підходи в анітерапії : методичні рекомендації / О.І. Тихонов, Т.Г. Ярних, К.І. Бодня [та ін.] ; за ред. О.І. Тихонова. – Вид. 2-ге, доповн. та переробл. – Київ, 2015. – 55 с. // (Узгоджено Департаментом медичної допомоги МОЗ України від 25.03.2015 р.).
5. **Ким і коли впроваджено:** Науково-практичний медичний центр Харківського національного медичного університету, 2015 рік.
6. **Ефективність впровадження:** запропоновані методичні рекомендації в яких висвітлені питання, що стосуються теоретичних аспектів та практичних підходів до застосування анітерапії та анірефлексотерапії з використанням продуктів бджільництва та їх стандартизованих субстанцій, зокрема отрути бджоловіної, узагальнені результати експериментальних досліджень щодо науково обґрунтованих інноваційних підходів в анітерапії та бджоложачення через біологічно активні точки акупунктури, а також наглядний матеріал у формі додатки з графічними зображеннями проведення анірефлексотерапії при різних захворюваннях, були використані при розробці та удосконаленні нормативної документації, узгодженої Департаментом медичної допомоги МОЗ України, яка регламентує порядок проведення анітерапії та анірефлексотерапії.
7. **Зауваження та пропозиції:** висловлюємо побажання щодо продовження розробок у напрямку створення нормативної документації з анітерапії при дослідженні лікарських аніпрепаратів та анірефлексотерапії.

Відповідальний за впровадження:

Заступник директора
з медичної частини

Г. В. Паровіна 2015 р.

Г. В. Паровіна

Додаток П

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ
ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ЛІКАРСЬКИХ
ЗАСОБІВ І ВИРОБІВ МЕДИЧНОГО
ПРИЗНАЧЕННЯ

ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"НАУКОВО-ЕКСПЕРТНИЙ
ФАРМАКОПЕЙНИЙ ЦЕНТР"



MINISTRY OF HEALTH
OF UKRAINE
STATE SERVICE FOR
PHARMACEUTICALS AND
MEDICAL WARES
SCIENTIFIC AND EXPERT
PHARMACOPOEIAL CENTRE

61085, м. Харків - 85, вул. Астрономічна, 33. Тел. 199-605, 199-607 б/у., тел./факс: 199-383,
http://www.phukr.kharkov.ua. E-mail: phukr@phukr.kharkov.ua
Різнородок 26093301865757 в Держреєстрі вул. УАК ППБ м. Харкова, МФО 351395 Код 22617729
Індивідуальний податковий номер 226177220319, Свідоцтво № 28788768

Від 06.10.2009 № 11-4/2513
На _____ № _____

ДОВІДКА

Група авторів, яка приймала участь у розробці проекту загальної статті
«Методи приготування гомеопатичних базисних препаратів і потенціювання» з
метою її включення до Державної Фармакопеї України:

- Тихонов О.І. – завідуючий кафедри аптечної технології ліків Національного фармацевтичного університету, академік УАН доктор фармацевтичних наук, професор;
- Тихонова С.О. – доктор фармацевтичних наук, професор кафедри аптечної технології ліків Національного фармацевтичного університету;
- Скрипник-Тихонов Р.І. – член студентського наукового товариства кафедри аптечної технології ліків Національного фармацевтичного університету;
- Юр'єва Г.Б. – кандидат фармацевтичних наук, доцент кафедри аптечної технології ліків Національного фармацевтичного університету;
- Івйдукова О.О. – аспірант кафедри аптечної технології ліків Національного фармацевтичного університету;
- Сергєєва О.Ю. – Генеральний директор ТОВ «Арніка», м. Харків;
- Литовченко Р.Г. – завідувач аптекою ТОВ «Гомеопатична аптека», м. Харків.

Директор ДП «Український науковий
фармакопейний центр якості
лікарських засобів»
д. хім. н., проф.



О.І. Григор'єв