



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **64260** (13) **U**
(51) **МПК (2011.01)**
A61K 39/00
A61L 2/00
C02F 1/02 (2006.01)
G01N 33/18 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЗНИЖЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ БАКТЕРІЙНИХ ЕНДОТОКСИНІВ У ВОДІ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ ТА ФІЗІОЛОГІЧНИХ РОЗЧИНАХ

1

2

(21) u201015438

(22) 20.12.2010

(24) 10.11.2011

(46) 10.11.2011, Бюл.№ 21, 2011 р.

(72) КОЦЮМБАС ІГОР ЯРОСЛАВОВИЧ, КУШНІР ІГОР МИХАЙЛОВИЧ, ДІЛАЙ НАДІЯ ВОЛОДИМИРІВНА, КОСЕНКО ЮРІЙ МИХАЙЛОВИЧ, СИДОРУК НАДІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА

(73) ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ КОНТРОЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА КОРМОВИХ ДОБАВОК

(57) Спосіб зниження концентрації бактерійних ендотоксинів у воді для ін'єкцій та фізіологічних

розчинах, що передбачає проведення стерилізації води для ін'єкцій та фізіологічних розчинів автоклавуванням за температури 121 °С протягом 15 хв. з подальшим проведенням контролю на бактерійні ендотоксини, який **відрізняється** тим, що для забезпечення виробництва води для ін'єкцій та фізіологічних розчинів з допустимим рівнем бактерійних ендотоксинів (вода для ін'єкцій - менше 0,25 МО/мл, фізіологічні розчини - менше 0,5 МО/мл) продукцію із перевищеним рівнем ендотоксинів повторно стерилізують у паровому автоклаві за температури 132 °С протягом 20 хв.

Корисна модель належить до ветеринарної медицини та фармації, зокрема до способів зниження концентрації бактерійних ендотоксинів у ін'єкційних та інфузійних лікарських засобах (ЛЗ).

Ін'єкційні лікарські засоби, зокрема вода для ін'єкцій та фізіологічні розчини, повинні бути безпечними і відповідати вимогам Державної фармакопеї України (ДФУ) [1, 2].

Основними показниками якості води для ін'єкцій та фізіологічних розчинів є відсутність у них ендотоксинів та пірогенних речовин.

Ендотоксини це ліпополісахариди (ЛПС) зовнішньої клітинної оболонки грамнегативних бактерій (ентеробактер, синьогнійна паличка, клебсієлла), які утворюються при руйнуванні цих бактерій і володіють пірогенними властивостями. Ендотоксини грамнегативних бактерій залишаються біологічно активними молекулами і після руйнування бактерій. Молекула ендотоксину термостабільна і легко витримує цикл стерилізації в автоклаві. Малі розміри молекул ендотоксинів дозволяють їм проходити через мембрани, які використовуються для стерилізації розчинів (0,22 мкм). Тому ендотоксини можуть бути в готових ЛЗ, виготовлених в асептичних умовах навіть після кінцевої стерилізації [3].

Пірогенними речовинами (від грецького слова руг вогонь, латинського generatio - народження)

називають продукти життєдіяльності і розпаду мікроорганізмів, токсини, загиблі мікробні клітини.

Причиною пірогенних токсичних реакцій макроорганізму є ендотоксини грамнегативних бактерій. Біологічна активність ендотоксинів значно вища за активність більшості пірогенних речовин небактерійного походження. Пірогени хімічної природи мають різну структуру, і на відміну від бактерійних ендотоксинів менш активні, а частина з них може бути визначена різними якісними методами. Як правило, відсутність бактерійних ендотоксинів у лікарських засобах (ЛЗ) означає відсутність пірогенних компонентів у цілому [1, 2].

Тому для виготовлення лікарських засобів, зокрема, води для ін'єкцій та фізіологічних розчинів, стерилізація розглядається як невід'ємний етап технологічного процесу отримання цих лікарських засобів.

Державна фармакопея України визначає стерилізацію як процес убивання в об'єкті або видалення з нього мікроорганізмів всіх видів, що знаходяться на будь-яких стадіях розвитку.

Проблема вибору і режиму стерилізації лікарських форм ґрунтується, з одного боку, на різноманітні видів мікроорганізмів і їх високої життєздатності, з іншої - неможливістю проведення термічної стерилізації через термостабільність

(19) **UA** (11) **64260** (13) **U**

багатьох лікарських речовин і форм або неможливості використання інших методів стерилізації. При застосуванні будь-якого методу стерилізації переслідуються мета збереження структури і властивостей лікарських форм при повному звільненні їх від мікроорганізмів. Існують різні методи стерилізації лікарських засобів і допоміжних матеріалів: 1. Фізичні, які ґрунтуються на дії високої температури, ультрафіолетових променів, струмів високої частоти, іонізуючих випромінювань, що викликають загибель мікроорганізмів; 2. Механічні, такі, що полягають у відділенні мікробів фільтруванням рідин через мікропористі фільтри, які затримують мікроби у своїх порах; 3. Хімічні, які ґрунтуються на бактерицидності різних хімічних речовин.

У технології лікарських форм використовують такі основні методи стерилізації: термічна стерилізація, стерилізація фільтруванням, стерилізація ультрафіолетовою радіацією, радіаційна стерилізація, хімічна стерилізація.

При виробництві води для ін'єкцій та фізіологічних розчинів в основному використовують термічну стерилізацію, зокрема, стерилізацію паром під тиском (автоклавування). Автоклавування найбільш надійний спосіб стерилізації водних розчинів стійких до дії високих температур лікарських засобів.

Згідно із Державною фармакопеею України стерилізацію води для ін'єкцій та фізіологічних розчинів проводять автоклавуванням. Цей спосіб передбачає автоклавування за температури 121 °C протягом 15 хв. з подальшим проведенням контролю на бактерійні ендотоксини, рівень яких повинен становити у воді для ін'єкцій менше 0,25 МО/мл, у фізіологічних розчинах - менше 0,5 МО/мл. Проте, після стерилізації цим способом, при проведенні контролю на бактерійні ендотоксини виявляють частину продукції з перевищеним допустимим рівнем бактерійних ендотоксинів, яка утилізується, що призводить до значних матеріальних втрат.

Нами пропонується новий Спосіб зниження концентрації бактерійних ендотоксинів у воді для ін'єкцій та фізіологічних розчинах, із проведенням повторного циклу стерилізації води для ін'єкцій та фізіологічних розчинів, у яких були виявлені перевищені допустимі рівні бактерійних ендотоксинів після проведення автоклавування згідно з ДФУ (за температури 121 °C протягом 15 хв.).

В основу корисної моделі покладено завдання розробити спосіб зниження концентрації бактерійних ендотоксинів у воді для ін'єкцій та фізіологічних розчинах, який дозволив би забезпечити виробництво води для ін'єкцій та фізіологічних розчинів з допустимим рівнем бактерійних ендотоксинів і уникнути утилізації частини продукції з перевищеним допустимим рівнем бактерійних ендотоксинів, що призводить до зменшення затрат при виробництві лікарських засобів.

Технічний рівень, який полягає в отриманні при виробництві води для ін'єкцій та фізіологічних розчинів з допустимим рівнем бактерійних ендотоксинів, досягають тим, що проводять повторний цикл стерилізації води для ін'єкцій та фізіологічних розчинів, у яких були виявлені перевищені допустимі рівні бактерійних ендотоксинів після прове-

дення автоклавування згідно з ДФУ (за температури 121 °C протягом 15 хв.).

Спосіб зниження концентрації бактерійних ендотоксинів у воді для ін'єкцій та фізіологічних розчинах, який заявляється, полягає у тому, що для отримання продукції із допустимим рівнем бактерійних ендотоксинів (вода для ін'єкцій - менше 0,25 МО/мл, фізіологічні розчини - менше 0,5 МО/мл), досягають тим, що проводять стерилізацію автоклавуванням за температури 121 °C протягом 15 хв. з подальшим проведенням контролю на бактерійні ендотоксини, продукцію із перевищеним рівнем ендотоксинів повторно стерилізують у паровому автоклаві за температури 132 °C протягом 20 хв. Повторна стерилізація дозволяє знизити рівень ендотоксинів у 25 разів у воді для ін'єкцій та у фізіологічних розчинах, що дозволить отримати продукцію з допустимим рівнем бактерійних ендотоксинів і уникнути утилізації частини продукції з перевищеним допустимим рівнем бактерійних ендотоксинів після першої стерилізації.

При проведенні патентно-інформаційного пошуку заявником знайдено технічне рішення стерилізації води для ін'єкцій та фізіологічних розчинів автоклавуванням, який передбачає автоклавування за температури 121 °C протягом 15 хв. з подальшим проведенням контролю на бактерійні ендотоксини (ДФУ), у якому є спільні суттєві ознаки із заявленим рішенням (автоклавування за температури 121 °C протягом 15 хв. з подальшим проведенням контролю на бактерійні ендотоксини). Однак, цих суттєвих ознак недостатньо для одержання очікуваного технічного результату, який полягає у забезпеченні виробництва води для ін'єкцій та фізіологічних розчинів з допустимим рівнем бактерійних ендотоксинів і уникненні утилізації частини продукції з перевищеним допустимим рівнем бактерійних ендотоксинів, що призводить до зменшення затрат при виробництві лікарських засобів.

Заявлений спосіб зниження концентрації бактерійних ендотоксинів у воді для ін'єкцій та фізіологічних розчинах передбачає проведення стерилізації води для ін'єкцій та фізіологічних розчинів автоклавуванням за температури 121 °C протягом 15 хв. з подальшим проведенням контролю на бактерійні ендотоксини (ДФУ), і повторної парової стерилізації продукції (автоклавування) за температури 132 °C протягом 20 хв., у якій після проведення першої стерилізації при проведенні контролю були виявлені перевищені допустимі рівні бактерійних ендотоксинів (вода для ін'єкцій - більше 0,25 МО/мл, фізіологічні розчини - більше 0,5 МО/мл).

У результаті проведення ряду досліджень і аналізу відомих способів автоклавування нами пропонується проведення повторної стерилізації води для ін'єкцій та фізіологічних розчинів автоклавуванням за температури 132 °C протягом 20 хв. [5].

Проведення повторної стерилізації за температури 132 °C протягом 20 хв. дозволяє знизити концентрації бактерійних ендотоксинів у воді для ін'єкцій та фізіологічних розчинах у 25 разів.

Використання цього способу дає можливість ефективно зменшувати рівень бактерійних ендотоксинів.

токсинів у готових лікарських засобах, покращувати якість та безпечність готової продукції і зменшувати матеріальні затрати при виробництві лікарських засобів.

Ефективність запропонованого способу зниження концентрації бактерійних ендотоксинів у воді для ін'єкцій та фізіологічних розчинах доводиться прикладами проведених досліджень.

Приклад 1. Зниження концентрації бактерійних ендотоксинів у воді для ін'єкцій способом автоклавування за температури 121 °С протягом 15 хв. (ДФУ).

З метою визначення зниження рівня ендотоксинів у воді для ін'єкцій автоклавування за температури 121 °С протягом 15 хв. використовували воду для ін'єкцій, в яку вносили різні концентрації стандартного бактерійного ендотоксину *E. coli* O 133:H10. Визначення бактерійних ендотоксинів

проводили з використанням наборів реактивів «Associates of Cape Cod Inc.» (США): ЛАЛ-реактив Pyrotell (заявлена чутливість - 0,0625 МО/мл), ЛАЛ-води Pyroclear (заявлена чистота - 0,001 МО/мл). Для розведення використовували апірогенні наконечники та пробірки 13×75 мм та 10×75 мм. Інкубацію реакційної суміші проводили за температури 37±1 °С упродовж 60±2 хв. у сухо повітряному термоблоці «PYROTHERM» (фірма «OPULUS», Угорщина).

ЛАЛ-тест проводили згідно з ДФУ 2.6.14. «Бактеріальні ендотоксини», напівкількісне випробування (Метод В). Концентрацію бактерійних ендотоксинів визначали до і після автоклавування за температури 121 °С упродовж 15 хв. [4]. Результати досліджень подано у таблиці 1.

Таблиця 1

Зниження концентрації ендотоксинів у воді для ін'єкцій після стерилізації

Концентрація БЕ до стерилізації, МО/мл	Розведення	Концентрація БЕ після стерилізації, МО/мл	Утворення гелю, +/-	Зниження БЕ, рази
130000	1:2080000	<130000	-	1
	1:208000	<13000	-	10
	1:20800	>1300	+	
13000	1:208000	<13000	-	1
	1:20800	<1300	-	10
	1:2080	>130	+	
1300	1:20800	<1300	-	1
	1:2080	<130	-	10
	1:208	>13	+	

Як видно з даних, наведених у таблиці 1, після стерилізації (автоклавування за температури 121 °С упродовж 15 хв.) води для ін'єкцій, контамінованої бактерійним ендотоксином *E. coli* O 133:H10 у концентрації 130000 МО, спостерігали зниження рівня ендотоксинів у 10 разів.

Приклад 2. Зниження концентрації бактерійних ендотоксинів у воді для ін'єкцій після повторної стерилізації

З метою визначення зниження рівня ендотоксинів у воді для ін'єкцій після повторної стерилізації проводили дослідження води для ін'єкцій, у

якій були виявлені ендотоксини після проведення стерилізації автоклавуванням за температури 121 °С протягом 15 хв. (ДФУ). Досліджувану воду для ін'єкцій повторно стерилізували автоклавуванням за температури 132 °С протягом 20 хв.

Для визначення ендотоксинів до і після повторної стерилізації проводили ЛАЛ-тест згідно з ДФУ 2.6.14. «Бактеріальні ендотоксини», напівкількісне випробування (Метод В). Результати досліджень наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Зниження концентрації ендотоксинів у воді для ін'єкцій після повторної стерилізації

Концентрація БЕ до повторної стерилізації, МО/мл	Розведення	Концентрація БЕ після повторної стерилізації, МО/мл	Утворення гелю, +/-	Зниження БЕ, рази
1300 МО/мл	1:20800	<1300	-	1
	1:2080	<130	-	10
	1:1664	<104	-	12,5
	1:823	<52	-	25
130 МО/мл	1:2080	<130	-	1
	1:208	<13	-	10
	1:166,4	<10,4	-	12,5
	1:82,3	<5,2	-	25
	1:41,6	>2,6	+	

Як видно з даних, наведених у таблиці 2, після повторної стерилізації (автоклавування за температури 132 °С протягом 20 хв.) води для ін'єкцій спостерігали зниження концентрації ендотоксинів у 25 разів.

Приклад 3. Зниження концентрації бактерійних ендотоксинів у фізіологічному розчині після стерилізації способом автоклавування за температури 121 °С протягом 15 хв. (ДФУ).

З метою визначення зниження рівня ендотоксинів у фізіологічному розчині автоклавування за температури 121 °С протягом 15 хв. використовували фізіологічні розчини, в які вносили різні концентрації стандартного бактерійного ендотоксину *E. coli* O 133:H10 аналогічно Прикладу 1.

Результати досліджень наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Зниження концентрації ендотоксинів у фізіологічному розчині після стерилізації

Концентрація БЕ до стерилізації, МО/мл	Розведення	Концентрація БЕ після стерилізації, МО/мл	Утворення гелю, +/-	Зниження БЕ, рази
100000 МО/мл	1:1600000	<100000	-	1
	1:160000	<10000	-	10
	1:16000	>1000	+	
10000 МО/мл	1:160000	<10000	-	1
	1:16000	<1000	-	10
	1:1600	>100	+	
1000 МО/мл	1:16000	<1000	-	1
	1:1600	<100	-	10
	1:160	>10	+	

Як видно з даних, наведених у таблиці 3, після стерилізації фізіологічного розчину (автоклавування за температури 121 °С упродовж 15 хв.) спостерігається зниження концентрації ендотоксинів, як і у випадку із водою для ін'єкцій у 10 разів.

Приклад 4. Зниження концентрації бактерійних ендотоксинів у фізіологічному розчині після повторної стерилізації

З метою визначення зниження рівня ендотоксинів у фізіологічних розчинах після повторної стерилізації проводили дослідження фізіологіч-

них розчинів, у яких були виявлені ендотоксини після проведення стерилізації автоклавуванням за температури 121 °С протягом 15 хв. Досліджувані фізіологічні розчини повторно стерилізували автоклавуванням за температури 132 °С протягом 20 хв.

Для визначення ендотоксинів до і після повторної стерилізації проводили ЛАЛ-тест згідно з ДФУ 2.6.14. «Бактеріальні ендотоксини», напівкілісне випробування (Метод В). Результати досліджень наведені у таблиці 4.

Таблиця 4

Зниження рівня ендотоксинів у фізіологічному розчині після повторної стерилізації

Концентрація БЕ до стерилізації, МО/мл	Розведення	Концентрація БЕ після стерилізації, МО/мл	Утворення гелю, +/-	Зниження БЕ, рази
100000 МО/мл	1:1600000	<100000	-	1
	1:160000	<10000	-	10
	1:80000	<5000	-	20
	1:64000	4000	-	25
	1:20000	>1250	+	
10000 МО/мл	1:160000	<10000	-	1
	1:16000	<1000	-	10
	1:8000	<500	-	20
	1:6400	<400	-	25
	1:1600	>100	+	
1000 МО/мл	1:16000	<1000	-	1
	1:1600	<100	-	10
	1:800	<50	-	20
	1:640	<40	-	25
	1:160	>10	+	

Як видно з даних, наведених у таблиці 4, після повторної стерилізації фізіологічних розчинів

спостерігається зниження концентрації ендотоксинів у 25 разів.

Таким чином, при повторній стерилізації води для ін'єкцій та фізіологічних розчинів за температури 132 °С протягом 20 хв. у препаратах знижувалась концентрація бактерійних ендотоксинів у 25 разів.

Застосування заявленого способу зниження концентрації бактерійних ендотоксинів у воді для ін'єкцій та фізіологічних розчинах дозволяє знизити концентрацію ендотоксинів у 25 разів, що призводить до зниження матеріальних втрат при виробництві лікарських засобів. Економічна ефективність від використання повторної стерилізації фізіологічного розчину, розфасованого у ампули по 5 см³ по 10 ампул в упаковці розраховується наступним чином:

- собівартість виготовлення 1 тисячі упаковок становить 3984 грн.;
- об'єм 1 серії 9036 тис. упаковок;
- загальна собівартість 1 серії становить 35999424 грн.;
- затрати на повторну стерилізацію складають 236,16 грн.

Враховуючи повторну стерилізацію собівартість 1 серії становить 35999660,16 грн. Таким чином серія, що не відповідає показнику бакте-

рійні ендотоксини повинна бути утилізована, отже втрати становили б 35999424 грн.

Джерела інформації:

1. 2.6.14. Бактеріальні ендотоксини / Державна фармакопея України/ Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Харків: PIPEГ, 2001. - С. 127-138.

2. 2.6.14. Бактеріальні ендотоксини / Державна фармакопея України/ Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Доповнення 2. - Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. - С. 115-125.

3. Здоровенко Е. Л., Позу В. К., Кучеренко М. Є. Біологічна активність ліпополісахаридів грам негативних бактерій // Биополимеры и клетка. - 2000. Т. 16. № 2. С. 5-15.

Cooper J. F. // In: Nuclear Medicine (Ed. Hencin R. E., Boles M. A., et al. Mosby, 1996). / Chapter 34. «Microbiological Purity: Tests for Endotoxins and Sterility». P. 421-428.

4. Ситников А. Г., Травина Л. А., Багирова В. Л. ЛАЛ-тест. Современные подходы к определению пирогенности. - М., 1997. - 96 с.

5. ОСТ 42-21-2-85 Вироби з корозієстійкого металу, скла, текстильних матеріалів, гуми.