ТЕХНОЛОГІЯ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

Рекомендована д.ф.н., професором О.І.Павлієм

УДК 615.032:615.277.3:612.396.17:612.398.145.3:582.717.7

ТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ІН'ЄКЦІЙНОЇ ЛІКАРСЬКОЇ ФОРМИ ПРОТИПУХЛИННОГО ПРОТЕОГЛІКАНУ З ЛИСТЯ СМОРОДИНИ

А.В.Мартинов, В.С.Кисличенко, О.Ю.Ткаченко, О.В.Вінник

Національна фармацевтична академія України
Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України

Представлені результати дослідження стабільності ін'єкційної лікарської форми суми протеогліканів з листя смородини чорної до осадоутворення та фотоокислення протягом часу. Підібраний оптимальний загущувач-стабілізатор та його концентрація. Визнаний найбільш стабільною формою розчин білково-полісахаридної фракції, загущений 45% гліцерину. Розчин, що містив 15%-45% ПЕО-400, був нестабільним та швидко окислювався. Встановлена мінімальна концентрація діючої речовини, що призводить до загибелі 91% ракових клітин, яка коливалася від 0,0065% до 0,008% препарату в розчині. Дані можуть бути використані для розрахунку ефективної дози і подальших фармакологічних досліджень.

Серед добре вивчених лікарських рослин, які здавна використовувалися у народній медицині, слід виділити смородину чорну [2, 9, 10]. Ця рослина містить багато лікарських речовин [8, 11], зокрема вітамінів [1].

У результаті досліджень речовин з листя смородини була встановлена антиалергічна та протипухлинна активність різних фракцій [3]. Антиалергічні властивості добре досліджені у білково-полісахаридної фракції (БПФ), на основі якої був розроблений малотоксичний препарат "Глюкорибін"[6]. Але стабільна ін'єкційна лікарська форма та засоби аналізу розроблені не були. Розробка лікарської форми ускладнюється неповною розчинністю фракції у воді з утворенням опалесцюючого розчину.

Метою роботи було дослідження стабільності pH, стійкості до світла, стійкості до осадоутворення згідно з умовами чинної АНД [4] та ефективності різних варіантів ін'єкційної форми протеогліканів із смородини на асцитній аденокарциномі Ерліха. В наступному повідомленні ми маємо навести аналітичні методи, які будуть включені до фармакопейної статті.

Матеріали та методи

У зв'язку з тим, що у суміші протеогліканів через деякий час утворюється осад, необхідно було підібрати стабілізатор, який би гальмував окислення та осадоутворення. Також необхідно було підібрати концентрацію ефективного стабілізатора та дослідити ефекти лікарської форми на живих ракових клітинах. Дослідження найбільш стабільної форми на предмет прояву протипухлинних властивостей необхідно було провести у зв'язку з тим, що тільки частина БПФ розчиняється у воді. При цьому було невідомо, яка конкретно з фракцій — розчинна чи нерозчинна — відповідає за протипухлинні властивості.

Як загущувачі-стабілізатори використовували ПЕО-400 та гліцерин. Ці речовини дозволені для використання як допоміжні речовини в ін'єкційних розчинах згідно з міжнародною фармакопеєю.

Готували по 10 мл 2% розчину БПФ з листя смородини на дистильованій воді, осад відфільтровували, а до розчину додавали відповідні речовини, вказані вище, до концентрацій 15% та 45%. При подальшому підвищенні концентрації стабілізатора з розчину випадає осад, тому збільшення концентрації стабілізаторів вище 45% недоцільне. При використанні ПЕО-400 та гліцерину найбільша концентрація, допустима без утворення осаду та без загущення розчину, — це 45%.

Здатність до окислення із зміною pH вивчали в двох системах: у темряві та на світлі. В останньому випадку спільно — під ультрафіолетовою лампою та під лампою накалювання протягом 4 місяців по 8 годин на день. Через кожні 10 днів брали ампулу та встановлювали pH розведеного 1:10 розчину на pH-метрі. Результати дослідження наведені на рис. 1.

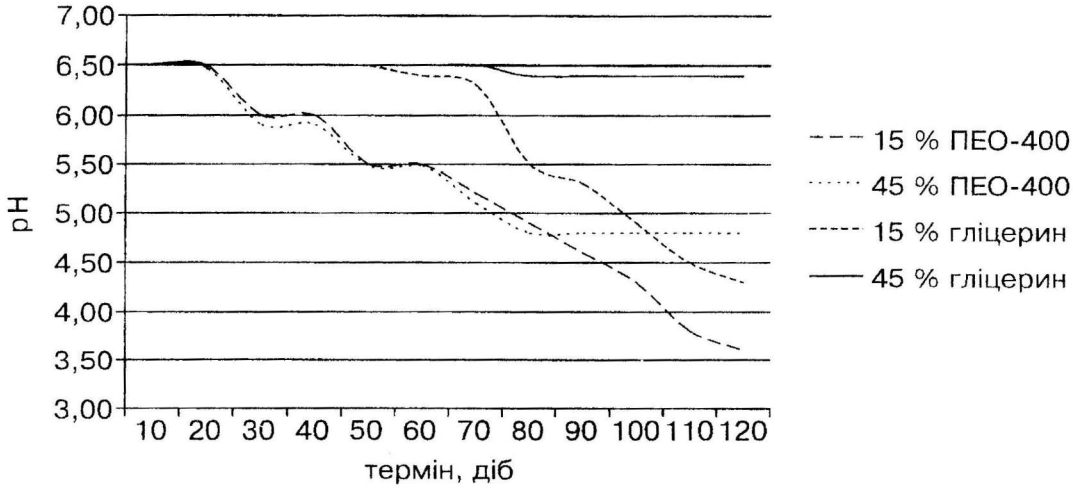

Рис. 1. Залежність кислотності розчину протеоглікану з листя смородини чорної від впливу світлового опромінення.

Також контролювали осадоутворення в ампулах протягом часу шляхом встановлення мутності розчину за світлопоглинанням на приборі ФЕК-КФК-2-УХЛ-4.2 при розведенні 1:10 проти контролю (оригінального водного розчину в тій же концентрації). Результати наведені в таблиці.

Ефективність найбільш стабільного варіанту лікарської форми досліджували in vitro методом В.АЧернова [5], для чого асцитну рідину неінбредних мишей, хворих на асцитну аденокарциному Ерліха, змішували із розчином з ампули і 0,9% розчином натрію хлориду у відповідних співвідношеннях (див. табл.) Суміш інкубували в термостаті протягом 2-4 годин. Після цього асцитну рідину змішували з 2% розчином еозину та встановлювали відсоток пошкоджених (зафарбованих) клітин. Результати наведені в таблиці.

Таблиця

Залежність кількості загиблих клітин від концентрації протеоглікану з листя смородини у розчині

№ досліду	Концентрація препарату, %	Загиблі клітини, %	Клітини з перфорацією мембрани, %
1	0,0005	0,5±0,1	0,5±0,1
2	0,0010	3,0±0,2	2,8±0,2
3	0,0015	3,7±0,4	3,5±0,4
4	0,0020	5±0,5	4,5±0,6
5	0,0025	5,7±0,5	5,5±0,6
6	0,0030	7,0±0,5	6,0±0,6
7	0,0035	12,0±0,6	10,0±0,6
8	0,0040	25,5±0,6	25,0±0,7
9	0,0045	30,5±0,6	30,0±0,7
10	0,0050	43,5±0,7	40,2±0,9
11	0,0055	56,0±0,9	53,2±1,1
12	0,0060	68,0±1,1	60,0±1,3
13	0,0065	70,0±1,3	74,0±1,9
14	0,0070	80,0±1,5	65,0±2,4
15	0,0075	91,0±2,0	65,0±2,5
16	0,0080	91,0±2,3	65,0±2,5

Результати та їх обговорення

Основним показником, що характеризує умови зберігання лікарських препаратів, характеристики тари та первинної упаковки, є здатність речовини змінювати свій хімічний склад під впливом світлового опромінення. Як відомо, багато речовин є фоточутливими та здатні окислюватися, утворювати нерозчинні продукти. Такі властивості у деяких речовин є безумовною перевагою — це засоби для фотодинамічної терапії раку [7]; але в інших лікарських засобах фоточутливість спричиняє скорочення термінів їх зберігання. Крім того, постає важливе питання про введення до розчину препарату стабілізатора і консерванта, які б гальмували активовані світлом руйнівні процеси в розчині препарату. Нами була досліджена залежність кислотності БПФ з листя смородини чорної від впливу світлового опромінення. Результати досліджень представлені на рис.1.

Як видно з рис. 1, до найменших змін схильний варіант лікарської форми, що був стабілізований 45% гліцерину. За 4 місяці pH цього розчину змінилася від 6,5 до 6,0, тоді як інші розчини окислювалися до менших значень pH та доходили до критичних значень 4,5 при стабілізації 15% ПЕО-400.

Ті ж розчини досліджували на наявність мутності. Результати досліджень представлені на рис 2.

Як видно з рис. 2, найменшу мутність має розчин, стабілізований 45% гліцерину, а найбільшу — стабілізований 15% ПЕО-400. Таким чином, нами був відібраний оптимальний варіант для дослідження — препарат, що містить 45% гліцерину.

Цей варіант, як концентрат для подальшого розведення перед використанням, був досліджений на предмет прояву протипухлинних властивостей. Препарат був досліджений у різних розве-

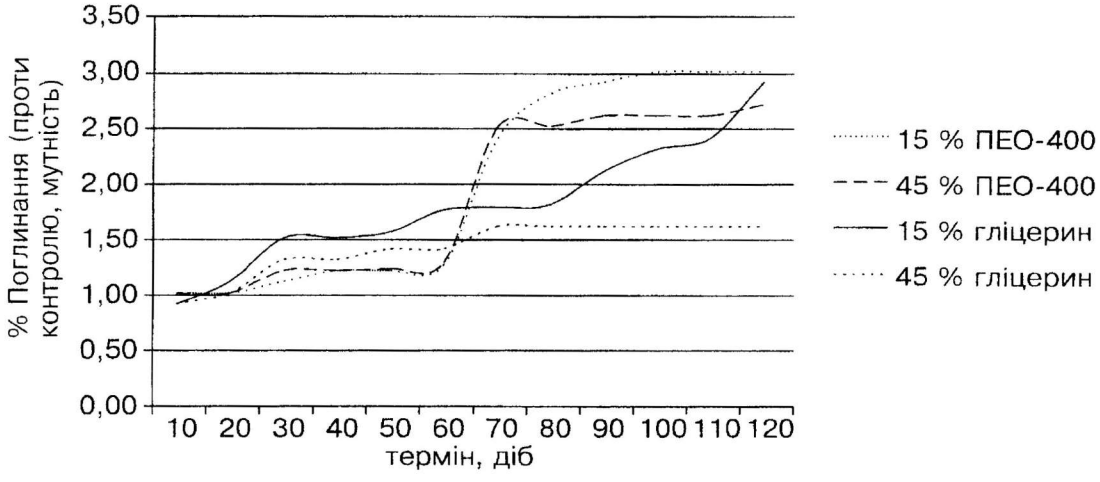

Рис. 2. Залежність осадоутворення в ампулах препарату від терміну зберігання.

деннях на моделі in vitro за здатністю викликати перфорацію мембран та загибель ракових клітин. Результати досліджень представлені в таблиці.

Як видно з таблиці, препарат у концентраціях від 0,007 до 0,008 % фактично не змінював відсоток клітин, що загинули від перфорації мембран. Таким чином, оптимальною є концентрація розчину суми полісахаридів від 0,0065 до 0,008 %.

ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень лікарської форми встановлений оптимальний стабілізатор — гліцерин у концентрації 45% та оптимальна концентрація полісахаридів, при якій спостерігається загибель 91% ракових клітин. Ця концентрація може бути використана для подальшого розрахунку ЕД100 у дослідженнях in vivo.

Гліцерин, який є біологічною речовиною та метаболітом нашого організму, може бути використаний як стабілізатор та консервант при розробці ін'єкційних рідких лікарських засобів, що містять полісахариди, глікопротеїди, лектини та білки.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Кисличенко В.С., Маркова В.М. // Вестник проблем биологии и медицины. — 1997. — №17. — С. 27-32.*
2. *Ковалев В.Н., Кисличенко В.С., Журавель И.А. и др. // Провизор. — 1998. — №22. — С. 39-40.*
3. *Мартинюв А.В., Кисличенко В.С., Смілянська М.В. та ін. // Клінічна фармація. — 1998. — Т. 2, №3. — С. 89-91.*
4. *ОСТ 42У-1-92 "Порядок разработки, согласования и утверждения нормативно-технической документации на лекарственные средства и лекарственное растительное сырье".*
5. *Чернов В. А. // Вопросы онкологии. — 1954. — №7. — С. 139-150.*
6. *Яковлєва Л.В., Авдєєва І.І., Весніна К.В. та ін. // Вісник фармації. — 1998. — №1 (17). — С. 103-107.*
7. *Berlin K., Jain R.K., Richert C. // Biotechnol. Bioeng. — 1998. — Vol. 61, №2. — P. 107-118.*
8. *Declume C. // J. Ethnopharmacol. — 1989. —Vol. 27. — P. 91-98.*
9. *Kemp R., Brennan R., Lanham P.G. et al. // Mol. Biotechnol. — 1997. — Vol. 7. — P. 99-102.*
10. *Tits M., Poukens P., Angenot L., Dierckxsens Y. // J. Pharm. Biomed. Anal. — 1992. — Vol. 10. — P. 1097-1100.*
11. *Viberg U., Ekstrom G., Fredlund K. et al. // Int. J. Food Sci. Nutr. — 1997. — Vol. 48. — P. 57-66.*

УДК 615.032:615.277.3:612.396.17:612.398.145.3:582.717.7

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИНЪЕКЦИОННОЙ ФОРМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРОТЕОГЛИКАНА ИЗ ЛИСТЬЕВ СМОРОДИНЫ

А.В.Мартынов, В.С.Кисличенко, О.Ю.Ткаченко, О.В.Винник

В работе представлены результаты исследования стабильности инъекционной лекарственной формы суммы протеогликанов из листа смородины черной к образованию осадка и фотоокислению. Подобран оптимальный стабилизатор и его концентрация. Наиболее стабильной формой был раствор белково-полисахаридной фракции, загущенный 45% глицерина. Раствор же, содержащий 15-45% ПЕО-400, был нестабильным и быстро окислялся. Установлена минимальная концентрация действующего вещества, которая приводит к гибели 91% раковых клеток, которая колеблется в пределах от 0,0065% до 0,008% препарата в растворе. Данные могут быть использованы для расчета эффективной дозы и в дальнейших фармакологических исследованиях.

UDC 615.032:615.277.3:612.396.17:612.398.145.3:582.717.7

TECHNOLOGICAL ASPECTS OF INJECTION FORM OF ANTINEOPLASTIC PROTEOGLICAN FROM LEAVES OF BLACK CURRANT

A.V.Martynov, V.S.Kislichenko, O.Y.Tkachenko, O.V.Vinnik

The article deals with the results of investigation of stability of injection medicinal form of proteoglicans from leaf of black currants to photooxidation and residue formation. We have found stabilizer and its concentration. The most stabile form was the solution of albumitinous-polycacharide fraction made too thick by 45% of glycerinum. The solution containing 15-45% PEG-400 has appeared to be unstable and was quickly oxidized. We have established that the minimum concentration of working substance, which killed 91% of cancer celler, is between 0,0065%-0,008% preparation in the solution. These data can be used for the effective dose calculation and for the future pharmacological researches.