

Practice [Elektronnyi resurs]: postanovlenie M-va zdravookhraneniia Resp Belarus' 27 dek 2006 g № 120 : s izm i dop : postanovlenie M-va zdravookhraneniia Resp Belarus' 23 fevr 2021 g № 14. V: Natsional'nyi tsentr pravovoi informatsii Respubliki Belarus'. Minsk, RB; 2021. (In Russ.)

8. Shelf life of medicinal products (OFS.1.1.0009.15). V: Ministerstvo zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13-e izd. T. 1. Moskva, RF; 2015. s. 192-206. (In Russ.)

9. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Pharmacy Compounding of Human Drug Products Under Section 503A of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act [Electronic resource]: guidance. 2016. Mode of access: <https://www.fda.gov/media/94393/download>. Date of access: 04.05.2021

10. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Hospital and Health System Compounding Under the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act [Electronic resource]: guidance for Industry. 2016. Mode of access: <https://www.fda.gov/media/97353/download>. Date of access: 04.05.2021

11. Tsentр ekspertiz i ispytaniі v zdravookhraneniі. State Register of Medicines of the Republic of Belarus [Elektronnyi resurs]. Rezhim dostupa: <https://www.rceth.by/Refbank>. Data dostupa: 04.05.2021. (In Russ.)

12. Proskurnin M, Loginova E, Volkov D. Analysis of water-soluble polymers—polyvinylpyrrolidone and polyethyleneimine—by FTIR-spectroscopy. Agilent Partner Lab, Moscow State University. 2015. doi: 10.13140/RG.2.2.25148.23687

13. Sokhar SA, Dragun GV. External therapy in dermatology: ucheb-metod posobie dlia studentov 3 kursa lecheb, mediko-diagnost fak medits vuzov, vrachei-stazherov, klinich ordinatorov. Gomel', RB: Gomel'skii gos medits un-t; 2016. 72 s. (In Russ.)

14. Directory of medicines and goods in the pharmacy range of radar [Elektronnyi resurs]. Rezhim dostupa: <https://www.rlsnet.ru>. Data dostupa: 04.05.2021. (In Russ.)

15. USP Revisions for Compounding Nonsterile Medicines [Electronic resource] // The Compliance Team. 2019. Mode of access: <https://thecomplianceteam.org/usp-revisions-for-compounding-nonsterile-medicines/>. Date of access: 04.05.2021

16. Skorobogatova AI, Smekhova IE, Kotova NI. Extemporaneous Manufacturing Regulations in the United States, Canada, the European Union, and Russia. V: Innovatsii v zdorov'e natsii. Sb materialov V Vseross nauch-prakt konf s mezhdunarod uchastiem; 2017 Noiab 08-09; Sankt-Peterburg. Sankt-Peterburg, RF: S-Peterb gos khimiko-farmatsevt akad; 2017. s. 366-69. (In Russ.)

17. Pharmaceutical Inspection Cooperative System (PIC/S) Guide on Good Manufacturing Practice for Medicinal Products in Healthcare Facilities [Elektronnyi resurs]. PharmAdvisor. 2020. Rezhim dostupa: <https://pharmadvisor.ru/document/tr3946/>. Data dostupa: 04.05.2021. (In Russ.)

Адрес для корреспонденции:

220005, Республика Беларусь,
г. Минск, ул. В. Хоружей, 11,
РУП «БЕЛФАРМАЦИЯ»,
e-mail: ya.ceny2012@yandex.by,
Кирилюк А.А.

Поступила 28.05.2021 г.

УДК 615.014.24:615.076:615.33

DOI: <https://doi.org/10.52540/2074-9457.2021.3.53>

Е. А. Салий¹, А. Ю. Гончарук¹, О. В. Гетало², А. В. Тарасенко¹

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО ПОРОШКА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ НА ОСНОВЕ ДОКСИЦИКЛИНА

¹Киевский национальный университет технологий и дизайна, г. Киев, Украина

²Киевский международный университет, г. Киев, Украина

Ассортимент лекарственных средств доксициклина на фармацевтическом рынке Украины очень ограничен и представлен твердыми формами (капсулы и таблетки), тогда как быстрый эффект и максимальную биодоступность препарата можно обеспечить при парентеральном способе введения. Объектом исследования является ле-

картвенное средство доксициклина гиклат в форме лиофилизата для приготовления раствора для инъекций. При разработке препарата учитывали, что водный раствор доксициклина является рН зависимым и имеет тенденции к смещению рН раствора при длительном хранении. Поэтому в состав были введены такие вспомогательные вещества, как стабилизатор и антиоксидант, которые обеспечивают буферные свойства и стабильность раствора. По результатам исследований выбран оптимальный состав лиофилизированного порошка, разработана технология производства со стадией обработки раствора активированным углём, что позволило получить лиофилизированный порошок с хорошо сформированной пористой массой без сколов, изломов и трещин, устойчивый к встряхиванию, а приготовленный раствор для парентерального введения стабильный по показателю «Цветность» при ускоренном режиме хранения.

Установлено, что доксициклина гиклат в форме лиофилизата проявляет широкий спектр антибактериальной активности. Проведенные сравнительные исследования *in vitro* для двух лекарственных средств доксициклина гиклата в форме лиофилизата для приготовления инъекций и твердых желатиновых капсул по 100 мг доксициклина гиклата подтверждают эквивалентность их бактериостатического действия в отношении бактерий-возбудителей инфекционных заболеваний человека.

Ключевые слова: доксициклина гиклат, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, бактериостатическая активность, минимальная ингибирующая концентрация (МИК), тест-штаммы микроорганизмов.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время глобальный рост резистентности возбудителей к широко используемым антибиотикам требует возврата к практике использования некоторых классических препаратов с сохраненной активностью по соответствующим показателям [1]. Доксициклин – бактериостатический антибиотик широкого спектра действия, который применяется для лечения инфекционных заболеваний мочевыводящих, дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и является препаратом первого выбора при таких клещевых заболеваниях, как болезнь Лайма и риккетсиозные инфекции [2, 3]. В период распространения коронавирусной болезни COVID-19 для начальной терапии пневмонии пероральным антибиотиком первого выбора рекомендуется доксициклин, поскольку он является нетрадиционным антибиотиком с установленным профилем безопасности, потенциальной эффективностью в отношении вирусных возбудителей, таких как лихорадка денге и чикунгунья, и может регулировать пути, важные при начальной инфекции, репликации и системной реакции на тяжелый острый респираторный синдром SARS CoV-2 [4, 5].

На украинском фармацевтическом рынке ассортимент лекарственных препаратов на основе доксициклина гиклата очень ограничен и представлен только твердыми пероральными лекарственными

формами – таблетками и капсулами, поэтому поиск альтернативных путей доставки доксициклина является актуальным направлением современных фармацевтических технологий [6]. Известно, что парентеральная терапия доксициклином показана только тогда, когда пероральная терапия невозможна, при этом дозировка и частота приема доксициклина для инъекций (от 100 до 200 мг/день) отличается от других тетрациклинов (от 1 до 2 г/день) и соответствует дневной дозе при приеме оральных твердых форм [2]. Инъекционный путь введения исключает проблемы горького вкуса и замедленного высвобождения доксициклина, которые присутствуют при пероральном применении. Но водные растворы на основе доксициклина гиклата, приготовленные общепринятым способом, имеют проблемы со стабильностью при длительном хранении, а именно: изменение окраски препарата, сдвиг рН раствора, образование некоторых примесей, которые могут привести к возникновению токсических, побочных эффектов и составляют скрытую опасность для клинической практики [7]. Для обеспечения стабильности парентеральных лекарственных форм доксициклина актуальным направлением является разработка лиофилизированных порошков для инъекционного применения. Благодаря процессу сублимационной сушки можно достичь стабильной и быстрорастворимой формы доксициклина гиклата, а также обеспечить гарантирован-

ные качество и эффективность лекарственного средства.

Целью работы является разработка состава и оценка антибактериального действия лиофилизированного порошка для приготовления раствора для инъекций на основе доксициклина гиклата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разработку состава раствора для получения лиофилизата проводили с применением активного фармацевтического ингредиента (АФИ) доксициклина гиклата (ДГ) производства «Yangzhou Liberty Pharamceutical Co. Ltd.», Китай.

Поскольку в Украине отсутствуют зарегистрированные лекарственные средства в форме лиофилизированных порошков с ДГ, то для обоснования оптимального состава изучали литературные данные о коммерческих препаратах на рынках и при формировании матрицы составов анализировали рецептуры лекарственных средств DOXY 100™ (Fresenius Kabi LLC, США) и Доксициклин-Ферейн® (ОАО «Брынцалов-А», Россия).

При разработке состава лекарственной формы применяли вспомогательные вещества, которые выполняют функции стабилизаторов и регуляторов кислотности раствора для инъекций: натрия метабисульфит («Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH», Германия), трилон Б («Kirsch Pharma GmbH», Германия), калия метабисульфит («Shandong Fousi Chemical Co., Ltd.», Китай), натрия сульфит («BASF Societas Euroraea», Германия), натрия гидросульфит («Zhengzhou San Techchem Co., Ltd.», Китай), магния хлорид тетрагидрат («Weifang Xinchang Chemical Co., Ltd.», Китай), магния сульфат безводный («Laizhou Guangcheng Chemical Co., Ltd.», Китай), натрия дигидрофосфат («Hebei Henghe Import & Export Trading Co., Ltd.», Китай), кислота аскорбиновая («United Pharma Industries Co., Ltd.», Китай), вода для инъекций.

Опытные серии образцов получали с использованием оборудования: промышленная лиофильная сушилка GLZY-15B (Shanghai Pudong Freeze Drying Equipment Co., Ltd., Китай) в условиях фармацевтического предприятия, стерильный шприцевой фильтр с микропористой мембраной 0,45 мкм, мембранные фильтры с разме-

ром пор 0,22 мкм, лабораторная установка для стерилизующей фильтрации (Sartorius, Германия).

Оценку результатов испытаний при выборе оптимального состава лиофилизата для приготовления раствора для инъекций на основе доксициклина гиклата проводили визуальным методом (описание, время растворения, цветность), весовым методом (однородность дозированных единиц), физико-химическими методами (вода, рН), спектрофотометрическим методом (цветность), микробиологическим методом (стерильность) [8]. Количественное содержание доксициклина гиклата определяли методом жидкостной хроматографии (ГФУ, 2.2.29) [9].

Опытные серии образцов получали по следующей технологии: в воде для инъекций растворяли вспомогательные вещества, доксициклина гиклат, обрабатывали активированным углем, фильтровали, расфасовывали в стеклянные флаконы, закупоривали резиновыми пробками для лиофилизации и загружали в лиофильную сушилку. Программа лиофилизации состояла из следующих стадий.

Охлаждение. Температуру камеры опускали до уровня не выше $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и выдерживали 5 ч. За 45–75 мин. до начала сушки устанавливали вакуум на уровне 7–8,5 Па. После снижения давления до уровня менее 10 Па включали активный подогрев.

Первичное высушивание. В течение 1 часа полки нагревали до температуры $-18 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, выключали активный нагрев и выдерживали лиофилизат при этой температуре до полного высушивания свободного льда около 25 часов. Завершение процесса освобождения от свободного льда считали моментом достижения одинаковой температуры продукта, максимально близкой к температуре полок ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Для достижения однородного высушивания всей серии лекарственного средства с доксициклина гиклатом температуру поддерживали на заданном уровне до конца этапа (180–300 мин.) с постоянным мониторингом вакуума на уровне до 13 Па. Затем температуру увеличивали до $26 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ и выдерживали около 14 часов. Для повышения однородности сушки на показателе $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ осуществляли запрограммированную остановку нагрева на 60 мин.

Вторичное высушивание. Препарат

выдерживали до 6 часов при температуре 26 ± 1 °С. Процесс лиофилизации заканчивали, если температура материала на всех полках оставалась стабильной в течение 2 часов. Через стерильный воздушный фильтр с размером пор 0,2 мкм в камеру лиофильной сушилки подавали сжатый азот с давлением до 300 Па и закупоривали флаконы путем опускания плиты.

Исследование антимикробной активности лиофилизованного порошка проводили *in vitro*, в качестве тест-культур использовали 5 музейных штаммов: грамположительные микроорганизмы *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus suis* ATCC 10234 и грамотрицательные культуры *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 6017, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Уровень бактериостатической активности препарата устанавливали путем определения МИК доксициклина луночно-диффузионным методом в соответствии с методикой «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» на эталонных штаммах микроорганизмов [10]. Бактериостатические свойства лиофилизованного порошка, содержащего 100 мг ДГ, сравнивали с активностью препарата «Доксициклин-Дарница» в твердых желатиновых капсулах по 100 мг ДГ, производства ЗАО «Фармацевтическая фирма «Дарница», поскольку переход от внутривенного на пероральный путь введения показан при возможности проведения пероральной терапии.

Для приготовления суспензий использовали суточные культуры микроорганизмов, выращенные на неселективной твердой питательной среде – соево-казеиновом агаре (СКА) производства HiMedia Laboratories Pvt Ltd., Индия. Отбирали однотипные, четко изолированные колонии и петлей переносили в пробирку со стерильным фосфатно-солевым буфером, с помощью денситометра McFarland units DEN-1 (BioSan, Латвия) доводили плотность до 0,5 по стандарту МакФарланда, что соответствовало $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл.

Инокуляцию осуществляли способом посева сплошным «газоном». Для этого пипеткой наносили по 1–2 мл суспензии микробных клеток на поверхность чашки Петри с соево-казеиновым агаром и равномерно распределяли, после чего удалили избыток инокулюма. Приоткрытые чашки

подсушивали при комнатной температуре в течение 10–15 мин.

Приготовили 3 раствора доксициклина гиклата в концентрации 1000,0 мкг/мл из субстанции доксициклина гиклата, лиофилизованного порошка и капсульной массы твердых желатиновых капсул.

Навески для получения растворов рассчитывали по формуле (1):

$$m_{ДГ_{теор.}} (мг) = \frac{C(мкг/мл) \times V_{теор.}(мл)}{A(содержание ДГ в мкг/мл)} \quad (1)$$

где $m_{ДГ_{теор.}}$ – расчетная (теоретическая) навеска доксициклина гиклата (ДГ);

C – необходимая концентрация ДГ;

$V_{теор.}$ – объем воды для инъекций, необходимый для растворения теоретической навески;

A – активность ДГ (количество ДГ, содержащегося в субстанции).

Необходимое количество растворителя (воды для инъекций) рассчитывали по формуле (2):

$$V_{прат.} (мл) = \frac{m_{ДГ_{прат.}}(мг) \times V_{теор.}(мл)}{m_{ДГ_{теор.}}(мг)} \quad (2)$$

где $V_{прат.}$ – объем воды для инъекций, необходимый для растворения практической навески;

$m_{ДГ_{прат.}}$ – полученная навеска ДГ;

$m_{ДГ_{теор.}}$ – расчетная (теоретическая) навеска ДГ;

$V_{теор.}$ – объем воды для инъекций, необходимый для растворения теоретической навески.

Из каждого из 3 приготовленных растворов с помощью контроллера для пипеток VITLAB pipeo (VITLAB, Германия) готовили кратные разведения растворов ДГ с конечными концентрациями: 12 мкг/мл, 8 мкг/мл, 4 мкг/мл, 2 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 0,25 мкг/мл. Конечные концентрации определяли в зависимости от уровня чувствительности тест-штаммов микроорганизмов к ДГ.

На чашках Петри с СКА формировали по 7 лунок и с помощью пипет-дозатора переменного объема VITLAB micropipette (VITLAB, Германия) вносили по 0,020 мл рабочих разведений приготовленных концентраций так, чтобы препарат не выливался из ячеек. Чашки Петри помещали в термостат и инкубировали при темпера-

туре 35 °С в течение 18–24 ч. После инкубации чашки помещали вверх дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом 45°.

Учет результатов проводили путем измерения зоны подавления роста микроорганизмов в миллиметрах (с точностью до 1 мм), включая диаметр лунок. При измерении зон задержки роста ориентировались на зону полного подавления видимого роста. Результаты оценивали по критериям:

– отсутствие зон задержки роста микроорганизмов вокруг лунки и зону диаметром до 10 мм оценивали как нечувствительность микроорганизмов к образцу;

– зоны диаметром 10–15 мм оценивали как умеренную чувствительность культуры к концентрации исследуемого действующего противомикробного вещества;

– зоны задержки роста диаметром 15–25 мм – штамм микроорганизма, чувствительный к исследуемому образцу;

– зоны задержки роста, диаметр которых превышал 25 мм, свидетельствовали о высокой чувствительности микроорганизмов к исследуемому образцу.

МИК определяли по наименьшей концентрации ДГ, которая ингибировала видимый рост бактериальных колоний.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка состава лиофилизированного порошка доксициклина гиклата

При разработке состава препарата учи-

тывали, что водный раствор доксициклина является рН зависимым и имеет тенденции к смещению рН раствора при длительном хранении. Представленные на рынке коммерческие препараты имеют в составе антиоксидант и/или маннитол в качестве среды для высушивания и стабилизатор, поэтому нами в рамках научного поиска в состав были введены вспомогательные вещества – стабилизаторы и регуляторы рН, которые обеспечивают буферные свойства и стабильность раствора.

Так, натрия дигидрофосфат использован для регулирования рН. Для повышения стабильности водных растворов исследовали ряд вспомогательных веществ: калия метабисульфит, натрия сульфит, натрия гидросульфит, кислоту аскорбиновую и др., которые выполняют функцию прямых антиоксидантов; магния хлорид и сульфат включены в состав с целью стабилизации для образования хелатов магния-доксициклина.

Качественный и количественный составы экспериментальных образцов лиофилизатов и препаратов сравнения приведены в таблице 1.

Полученные опытные растворы по физико-химическим свойствам представляли собой прозрачные растворы желтого цвета с рН в пределах от 1,8 до 3,3. Поскольку растворы имели интенсивную окраску, что является переменным фактором при длительном хранении, то для достижения однородности и интенсивности окраски

Таблица 1. – Качественный и количественный составы экспериментальных образцов лиофилизатов и препаратов сравнения

Составляющие	DOXY 100™	Доксициклин-Ферейн®	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4
Доксициклина гиклат в пересчете на доксициклин	115 мг 100 мг	115 мг 100 мг	115 мг 100 мг	115 мг 100 мг	115 мг 100 мг	115 мг 100 мг
Натрия метабисульфит	-	6 мг	-	-	-	-
Трилон Б	-	0,02 мг	0,02 мг	0,02 мг	0,02 мг	0,02 мг
Маннитол	300 мг	-	-	-	-	-
Калия метабисульфит	-	-	6 мг	-	-	-
Натрия сульфит	-	-	-	6 мг	-	-
Натрия гидросульфит	-	-	-	-	6 мг	-
Магния хлорид тетрагидрат	-	-	136 мг	-	-	120 мг
Магния сульфат безвод.	-	-	-	-	97 мг	-
Натрия дигидрофосфат	-	-	105 мг	-	36 мг	83 мг
Кислота аскорбиновая	480 мг	-	-	-	-	150 мг
Вода для инъекций	до 1,6 мл	до 1,6 мл	до 1,6 мл	до 1,6 мл	до 1,6 мл	до 1,6 мл

лиофилизированного порошка была применена обработка активированным углем и исследовано влияние на полученные показатели качества [11].

К приготовленным растворам добавляли 0,25 г измельченного активированного угля и перемешивали в течение 15 мин, после чего оставляли на полчаса (в процессе адсорбции в образце № 2 наблюдалось образование пузырьков). Очистку от сорбента осуществляли с помощью шприцевых мембранных фильтров с размером пор 0,45 мкм. Полученные растворы оценивали по методикам «Определение степени окраски жидкостей (ГФУ, 2.2.2.)» и «Оптическая плотность (ГФУ, 2.2.25)». Приготовленные растворы были разлиты в стеклянные флаконы R6 по 1,6 мл приготовленного

раствора доксициклина и загружены в лиофильную сушилку.

На рисунках 1 и 2 (см. обложку журнала) представлен внешний вид образцов № 1–3 в виде приготовленных растворов, обработанных и необработанных активированным углем.

После завершения цикла лиофилизации были получены экспериментальные серии лиофилизированных порошков, которые приведены на рисунках 3 и 4 (см. обложку журнала).

Результаты сравнительных исследований цветности растворов стандарта и растворов экспериментальных образцов, не обработанных активированным углем (I) и обработанных активированным углем (II), представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. – Оценка цветности растворов экспериментальных образцов до и после выдерживания при температуре 40 °С в течение 24 часов

Опытные образцы		Допустимые пределы	Цветность раствора	
			После приготовления	После выдерживания при 40 °С в течение 24 часов
Образец 1	I	Цветность раствора должна быть не интенсивнее, чем эталона Y ₃	Не соответствует (Y ₂)	Не соответствует (B ₂)
	II		Соответствует (Y ₃)	Не соответствует (B ₃)
Образец 2	I		Соответствует (Y ₃)	Не соответствует (GY ₃)
	II		Соответствует (Y ₄)	Соответствует (Y ₃)
Образец 3	I		Не соответствует (Y ₂)	Не соответствует (B ₂)
	II		Не соответствует (GY ₃)	Не соответствует (B ₃)
Образец 4	I		Не соответствует (B ₄)	Не соответствует (B ₂)
	II		Соответствует (Y ₄)	Не соответствует (B ₄)

Таблица 3. – Сравнительные исследования оптической плотности экспериментальных образцов до и после выдерживания при температуре 40 °С в течение 24 часов

Опытные образцы		Допустимые пределы	Оптическая плотность растворов	
			После приготовления	После выдерживания при 40 °С в течение 24 часов
Образец 1	I	Оптическая плотность должна быть не более 0,07 при длине волны 490 нм	0,09 (не соответствует)	0,27 (не соответствует)
	II		0,07 (соответствует)	0,20 (не соответствует)
Образец 2	I		0,06 (соответствует)	0,10 (не соответствует)
	II		0,04 (соответствует)	0,06 (соответствует)
Образец 3	I		0,08 (не соответствует)	0,25 (не соответствует)
	II		0,10 (не соответствует)	0,19 (не соответствует)
Образец 4	I		0,17 (не соответствует)	0,24 (не соответствует)
	II		0,05 (соответствует)	0,15 (не соответствует)

Внешний вид растворов образцов № 1–3 после выдерживания при температуре 40 °С в течение 24 часов изображен на рисунках 5 и 6 (см. обложку журнала).

Как видно из полученных результатов, применение стадии обработки сорбентом для обесцвечивания значительно улучша-

ет внешний вид лекарственной формы и позволяет получить осветленный продукт стандартного цвета.

Оценка показателей качества опытных образцов лиофилизатов с доксициклина гиклатом представлена в таблице 4.

На основании полученных данных

Таблица 4. – Сравнительная характеристика показателей качества исследуемых образцов лиофилизированных порошков

Показатели качества	Допустимые пределы	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4
Описание	Сухая пористая масса светло-желтого цвета	Сухая пористая масса светло-желтого цвета, очень хрупкая (не соотв.)	Сухая пористая масса светло-желтого цвета, однородная (соотв.)	Сухая пористая масса кремового цвета, есть сколы (не соотв.)	Сухая пористая масса желтого цвета (не соотв.)
Прозрачность	Должен быть прозрачным по сравнению с водой <i>P</i>	Прозрачный (соотв.)	Прозрачный (соотв.)	Мутный (не соотв.)	Мутный, есть пена (не соотв.)
Цветность	Окраска не интенсивнее эталона Y_3	Y_3 (соотв.)	Y_4 (соотв.)	GY_3 (не соотв.)	Y_4 (соотв.)
pH	От 1,8 до 3,3	$2,95 \pm 0,04$	$2,37 \pm 0,04$	$3,21 \pm 0,04$	$3,27 \pm 0,04$
Время растворения	Легко растворим в 1 мл за 1 мин	16 сек (соотв.)	12 сек (соотв.)	19 сек (соотв.)	15 сек (соотв.)
Вода	Не более 3,0%	$2,8 \pm 0,02$ (соотв.)	$1,8 \pm 0,02$ (соотв.)	$2,5 \pm 0,02$ (соотв.)	$2,8 \pm 0,02$ (соотв.)
Количество содержания доксициклина	От 95,0 до 105,0 мг/мл	$104,1 \pm 0,01$ (соотв.)	$103,0 \pm 0,01$ (соотв.)	$100,8 \pm 0,01$ (соотв.)	$101,9 \pm 0,01$ (соотв.)
Содержание сухих веществ	Не более 13%	$36,2 \pm 0,04$ (не соотв.)	$12,1 \pm 0,04$ (соотв.)	$25,4 \pm 0,04$ (не соотв.)	$79,0 \pm 0,04$ (не соотв.)
Однородность дозированных единиц	Для 10 единиц препарата приемлемое число должно быть не более 15,0 (L_1)	$6,6 < L_1$ (соотв.)	$1,7 < L_1$ (соотв.)	$16,0 < L_2$ (соотв.)	$5,4 < L_1$ (соотв.)
Стерильность	Стерильный	Стерильный (соотв.)	Стерильный (соотв.)	Стерильный (соотв.)	Стерильный (соотв.)

установлено, что опытные образцы № 1 и № 3, несмотря на достаточный остаток сухих веществ, имеют очень хрупкую сухую пористую структуру, которая разрушается при приложении усилий и может образовывать сколы при встряхивании и/или транспортировке лекарственного средства. Увеличение доли сухих веществ в составе образцов не обеспечивало получения прочно сформированной пористой массы, что ведет за собой необходимость подбора оптимальных режимов заморозки и сушки, а также усовершенствования рецептуры для обеспечения устойчивости качественных характеристик лекарственного средства в течение срока годности.

Опытный образец № 4 имеет более устойчивую к встряхиванию пористую массу, но при растворении наблюдалось

пенообразование, что может влиять на полноту дозы при наборе в шприце.

Опытный образец № 2 характеризуется хорошо сформированной пористой массой без сколов, изломов и трещин лиофильной «таблетки», отсутствием пенообразования при растворении и стабильностью показателя «Цветность» при ускоренном режиме хранения, имеет устойчивую к встряхиванию пористую массу.

Поэтому для дальнейших исследований выбран состав № 2. Действующее вещество доксициклина гиклат введено в состав лиофилизата для приготовления инъекций в концентрации 100 мг в 1,6 мл в пересчете на 100% сухого вещества. В качестве стабилизатора применен натрия сульфит, его концентрация составляет 3,75 мг/мл. Трилон Б выполняет роль антиоксиданта и комплексообразователя, он связы-

вают ионы железа и меди, которые находятся в воде для инъекций или попали в нее во время производства из оборудования и сырья. Определено, что необходимое количественное содержание трилона Б составляет 0,0125 мг/мл. В качестве растворителя использовали воду для инъекций.

Полученный лиофилизат имеет вид стабильной пористой массы однородного светло-желтого цвета.

Сравнительная оценка антибактериального действия лиофилизированного порошка доксициклина гиклата

Результаты сравнительных исследований эффективности разработанного антибактериального препарата относительно *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus suis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* приведены на рисунках 7–11 (см. обложку журнала) и в таблицах 5–6.

Таблица 5. – Уровень бактериостатической активности исследуемых препаратов

Эталонные штаммы микроорганизмов	Диаметры зон подавления роста при применении максимальной исследуемой концентрации антибиотика (C_{max}) и минимальной ингибирующей концентрации (МИК), мм			
	Лиофилизированный порошок для приготовления раствора для инъекций		Твёрдые желатиновые капсулы «Доксициклин»	
	C_{max}	МИК	C_{max}	МИК
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	14,0 ± 0,3 (умеренно чувств.)	10,2 ± 0,2 (умеренно чувств.)	13,7 ± 0,3 (умеренно чувств.)	10,0 ± 0,2 (умеренно чувств.)
<i>Streptococcus suis</i> ATCC 10234	27,1 ± 0,1 (высокая чувств.)	18,6 ± 0,2 (чувств.)	26,8 ± 0,1 (высокая чувств.)	17,0 ± 0,2 (чувств.)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	13,8 ± 0,2 (умеренно чувств.)	10,3 ± 0,1 (умеренно чувств.)	13,0 ± 0,2 (умеренно чувств.)	10,1 ± 0,3 (умеренно чувств.)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	21,2 ± 0,2 (чувств.)	11,2 ± 0,3 (умеренно чувств.)	19,5 ± 0,2 (чувств.)	12,4 ± 0,4 (умеренно чувств.)
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 6017	22,6 ± 0,3 (чувств.)	12,5 ± 0,2 (умеренно чувств.)	22,9 ± 0,3 (чувств.)	12,2 ± 0,2 (умеренно чувств.)

Таблица 6. – МИК исследуемых антибактериальных препаратов

Вид микроорганизмов	Штамм	Показатель МИК, (мкг/мл)	
		Лиофилизированный порошок для приготовления раствора для инъекций	Твердые желатиновые капсулы «Доксициклин»
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	4,0	4,0
<i>Streptococcus suis</i>	ATCC 10234	< 0,25	< 0,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	2,0	2,0
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	1,0	1,0
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC 6017	1,0	1,0

По результатам проведенных исследований выявлено, что доксициклина гиклат в форме лиофилизата проявляет широкий спектр антибактериальной активности.

Как видно из рисунков 7–8 (см. обложку журнала), отсутствие роста колоний вида *Staphylococcus aureus* установлено при использовании рабочих разведений 4,0 мкг/мл как для лиофилизированного порошка, так и для пероральной формы. При рабочем разведении 2,0 мкг/мл ДГ опреде-

лено, что *Klebsiella pneumoniae* проявляет умеренно выраженную чувствительность к антибиотику.

МИК лиофилизированного порошка относительно *Escherichia coli* и *Salmonella enterica* составляет 1,0 мкг/мл.

Из рисунка 11 (см. обложку журнала) видно, что наиболее чувствительным к препаратам на основе доксициклина является штамм *Streptococcus suis* (МИК < 0,25 мкг/мл), причем установлено, что диаметр

зон задержки роста ДГ из рабочих растворов лиофилизированного порошка значительно превышает диаметр зон задержки роста рабочего раствора ДГ из капсульной массы.

Уровень бактериостатической активности исследуемых препаратов относительно эталонных штаммов микроорганизмов приведен в таблице 5.

Показатели МИК исследуемых препаратов для эталонных штаммов микроорганизмов приведены в таблице 6.

Результаты проведенного эксперимента подтверждают наличие чувствительности тест-штаммов к действию разработанного препарата доксициклина гиклата в виде лиофилизированной формы: высокая чувствительность – *Streptococcus suis*; чувствительность – *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*; умеренная чувствительность – *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae*. Экспериментально установлено, что оба исследуемых образца в форме лиофилизата и твердых желатиновых капсул проявляют антибактериальную активность в МИК, но растворенное парентеральное средство позволяет значительно быстрее доставить активное вещество в системный кровоток по сравнению с медленным высвобождением и всасыванием пероральной формы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан оптимальный состав лиофилизированного порошка для приготовления раствора для инъекций с доксициклина гиклатом. Введение в рецептуру стабилизатора, антиоксиданта и применение технологического приема осветления раствора адсорбентом позволили получить лиофилизированный порошок с хорошо сформированной пористой массой без сколов, изломов и трещин, устойчивый к встряхиванию.

Установлено отсутствие пенообразования при приготовлении раствора лиофилизированного порошка доксициклина гиклата, приготовленный раствор стабильный по показателю «Цветность» при ускоренном режиме хранения.

Экспериментально установлено, что доксициклина гиклат в форме лиофилизата проявляет широкий спектр антибактериальной активности. Проведенные сравнительные исследования *in vitro* для

двух лекарственных средств доксициклина гиклата по 100 мг в форме лиофилизата для приготовления раствора для инъекций и твердых желатиновых капсул «Доксициклин-Дарница» подтверждают эквивалентность их бактериостатического действия в отношении бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний человека.

Результаты исследований технологических факторов, физико-химических показателей и бактериостатического действия препарата позволяют сделать вывод о пригодности разработанного состава лиофилизата для дальнейших доклинических исследований.

SUMMARY

E. A. Saliy, A. Yu. Honcharuk, O. V. Getalo, H. V. Tarasenko

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF LYOPHILIZED POWDER TO PREPARE SOLUTION FOR INJECTIONS BASED ON DOXYCYCLINE

The range of doxycycline drugs on the pharmaceutical market of the Ukraine is very limited and is represented by solid forms (capsules and tablets) while a rapid effect and maximum bioavailability of the drug can be provided by parenteral administration. The object of the study is the drug doxycycline hyclate in the form of lyophilisate to prepare solution for injections. During the development of the drug it was taken into account that aqueous doxycycline solution is pH dependent and tends to shift the solution pH during long-term storage. Therefore, excipients such as stabilizer and antioxidant providing buffering properties and stability of the solution were introduced into the composition. According to the research results an optimal composition of lyophilized powder was selected, the production technology with the stage of solution treatment with activated carbon was developed which allowed to obtain lyophilized powder with a well-formed porous mass without splits, cracks and fissures, resistant to shaking, and the prepared solution for parenteral administration is stable by the «Degree of coloration» quality indicator during accelerated storage regimen.

It was found that doxycycline hyclate in the form of a lyophilisate shows a wide range of antibacterial activity. Comparative studies *in vitro* for two drugs, in the form of lyophilisate with doxycycline hyclate for

injections and hard gelatin capsules with 100 mg of doxycycline hyclate, confirm equivalence of their bacteriostatic action against bacteria causing infectious diseases in humans.

Keywords. Doxycycline hyclate, lyophilisate for preparing solution for injections, bacteriostatic activity, minimum inhibitory concentration (MIC), test strains of microorganisms.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ventola, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats / C. L. Ventola // *Pharmacy and therapeutics*. – 2015. – Vol. 40, N 4. – P. 277–283.

2. Holmes, N. E. Safety and efficacy review of doxycycline / N. E. Holmes, P. G. P. Charles // *Clinical Medicine. Therapeutics*. – 2009. – Vol. 1. – P. 471–482.

3. Human Rickettsioses: Host Response and Molecular Pathogenesis / C. Schroeder [et al.] // *Rickettsiales: biology, molecular biology, epidemiology, and vaccine development* / ed. S. Thomas. – Switzerland: Springer, 2016. – P. 399–446.

4. COVID-19 rapid guideline: managing suspected or confirmed pneumonia in adults in the community [Electronic resource]: NICE guideline N 165. – Publ. date 03.04.2020. – Mode of access: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng165/resources/covid19-rapid-guideline-managing-suspected-or-confirmed-pneumonia-in-adults-in-the-community-pdf-66141902429125>. – Access date: 30.08.2021.

5. Doxycycline treatment of high-risk COVID-19-positive patients with comorbid pulmonary disease / P. A. Yates [et al.] // *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. – 2020. – Vol. 14.

6. Порівняльні дослідження профілів вивільнення доксицикліну хіклату з твердих желатинових капсул при зміні виробників діючої речовини / О. О. Салій [та інш.] // *Вісник Київського національного університету технологій та дизайну. Сер. Технічні науки*. – 2020. – № 3. – С. 165–174.

7. Influence of the solvent system on the stability of doxycycline solutions / M. Jutglar [et al.] // *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2018. – Vol. 159. – P. 60–65.

8. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків: Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів, 2015. – Т. 1. – 1128 с.

9. Доксицикліну хіклат // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «На-

уково–експертний фармакопейний центр». – 2-е вид. – Харків: Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів, 2014. – Т. 2. – С. 214–216.

10. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: методичні вказівки 9.9.5 – 143-2007 / Міністерство охорони здоров'я України. – Київ, 2007.

11. Preparation method of doxycycline hyclate freeze-dried powder injection: pat. CN201510495924.8A China / Fang Zhengyuan, Jiang Qiang, Jin Tao; applicant Hainan General Kang Li Pharmaceutical Co Ltd. – N 105078905; publ. date 13.08.2015.

REFERENCES

1. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*. 2015;40(4):277-83

2. Holmes NE., Charles PGP. Safety and efficacy review of doxycycline. *Clin Med Ther*. 2009;1:471-82. doi: 10.4137/CMT.S2035

3. Schroeder C, Chowdhury I, Narra H, Patel J, Sahni A, Sahni S. Human Rickettsioses: Host Response and Molecular Pathogenesis. In: Thomas S, editor. *Rickettsiales: biology, molecular biology, epidemiology, and vaccine development*. Switzerland: Springer; 2016. p. 399-446. doi: 10.1007/978-3-319-46859-4_19

4. COVID-19 rapid guideline: managing suspected or confirmed pneumonia in adults in the community [Electronic resource]: NICE guideline N 165. 2020 Apr 3. Mode of access: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng165/resources/covid19-rapid-guideline-managing-suspected-or-confirmed-pneumonia-in-adults-in-the-community-pdf-66141902429125>. Access date: 30.08.2021

5. Yates PA, Newman SA, Oshry LJ, Glassman RH, Leone AM, Reichel E. Doxycycline treatment of high-risk COVID-19-positive patients with comorbid pulmonary disease. *Ther Adv Respir Dis*. 2020;14. doi: 10.1177/1753466620951053.

6. Saliy OO, Kurishko GG, Ogerenko ZO, Getalo OV. Comparative studies of the release profiles of doxycycline hyclate from hard gelatin capsules when changing the manufacturers of the active substance. *Visnik Kiiv's'kogo natsional'nogo universitetu tekhnologii ta dizainu. Ser Tekhnichni nauki*. 2020;(3):165-74. doi:10.30857/1813-6796.2020.3.14 (In Ukr.)

7. Jutglar M, Foradada M, Caballero F, Hoogmartens J, Adams E. Influence of the solvent system on the stability of doxycycline solutions. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;159:60-5. doi: 10.1016/j.jpba.2018.06.054

8. Ukraïns'kii naukovii farmakopeinii tsentr iakosti likars'kikh zasobiv. State Pharmacopoeia of Ukraine: v 3 t. 2-e vid. Kharkiv, Ukraina: Ukraïns'kii naukovii farmakopeinii tsentr iakosti likars'kikh zasobiv; 2015. T. 1. 1128 s. (In Ukr.)

9. Ukraïns'kii naukovii farmakopeinii tsentr iakosti likars'kikh zasobiv. State Pharmacopoeia of Ukraine. 2-e vid. T. 2. Kharkiv, Ukraïna: Ukraïns'kii naukovii farmakopeinii tsentr iakosti likars'kikh zasobiv; 2014. Doxycycline hyclate; s. 214-16. (In Ukr.)

10. Ministerstvo okhoroni zdorov'ia Ukraïni. The value of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs: metodichni vkazivki 9.9.5 – 143-2007. Kiïv, Ukraïna; 2007. (In Ukr.)

11. Zhengyuan F, Qiang J, Tao J, inventors; Hainan General Kang Li Pharmaceutical Co Ltd, assignee. Preparation method of doxycycline hy-

clate freeze-dried powder injection. China patent CN201510495924.8A China. 2015 Aug 13

Адрес для корреспонденции:

01011, Украина,

г. Киев, ул. Немировича-Данченко, 2,

УО «Киевский национальный университет технологий и дизайна»,

тел.: +380 97 379 56 60,

e-mail: allagon4aruk@meta.ua,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6488-1490>,

Гончарук А. Ю.

Поступила 03.09.2021 г.

Рисунки к статье Е. А. Салий, А. Ю. Гончарук, О. В. Гетало, А. В. Тарасенко
 «Разработка и оценка лиофилизированного порошка для приготовления раствора для инъекций
 на основе доксициклина» (С. 53)



Рисунок 1. – Приготовленные растворы препарата, обработанные активированным углём



Рисунок 2. – Приготовленные растворы препарата, не обработанные активированным углём



Рисунок 3. – Лيوфилизированные порошки, полученные из обработанного активированным углём раствора доксициклина



Рисунок 4. – Лيوфилизированные порошки, полученные из не обработанного активированным углём раствора доксициклина



Рисунок 5. – Опытные растворы, обработанные активированным углём, после выдерживания при температуре 40 °С в течение 24 часов



Рисунок 6. – Опытные растворы, не обработанные активированным углём, после выдерживания при температуре 40 °С в течение 24 часов

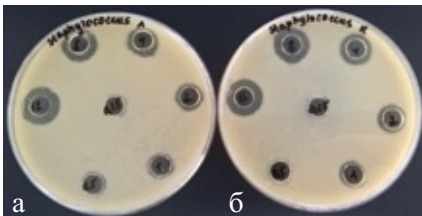


Рисунок 7. – Результаты определения чувствительности тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 к доксициклину гиклату в форме лиофилизата (а) и твёрдых желатиновых капсул (б)

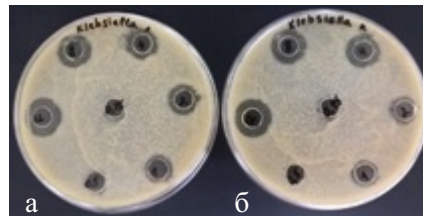


Рисунок 8. – Результаты определения чувствительности тест-штамма *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 к доксициклину гиклату в форме лиофилизата (а) и твёрдых желатиновых капсул (б)

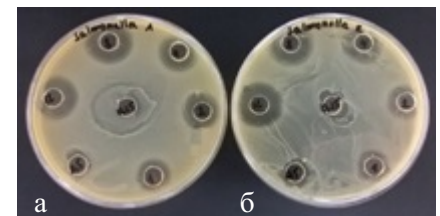


Рисунок 9. – Результаты определения чувствительности тест-штамма *Salmonella enterica* ATCC 6017 к доксициклину гиклату в форме лиофилизата (а) и твёрдых желатиновых капсул (б)

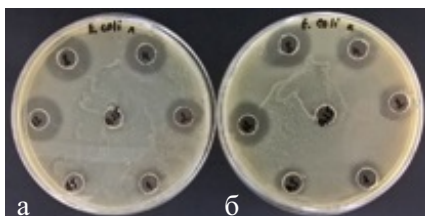


Рисунок 10. – Результаты определения чувствительности тест-штамма *Escherichia coli* ATCC 25922 к доксициклину гиклату в форме лиофилизата (а) и твёрдых желатиновых капсул (б)

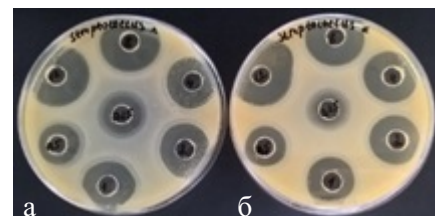


Рисунок 11. – Результаты определения чувствительности тест-штамма *Streptococcus suis* ATCC 10234 к доксициклину гиклату в форме лиофилизата (а) и твёрдых желатиновых капсул (б)