

ГРАНУЛИРОВАНИЕ КОМПОНЕНТОВ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

Комиссаров А.В., Еремин С.А., Задохин С.Н., Шульгина И.В., Лобовикова О.А.,
Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Ливанова Л.Ф., Никифоров А.К.

ФКУЗ РосНИИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия (410005, Саратов, ул. Университетская, 46), e-mail: rusrap@microbe.ru

Показана возможность применения новых вспомогательных веществ, для готовой лекарственной формы вакцины холерной бивалентной химической таблетированной, позволяющих проводить гранулирование компонентов вакцины методом «псевдооживленного слоя» с верхней подачей связующего вещества. В результате проведения полного факторного эксперимента 2^3 определены оптимальные значения таких технологических параметров гранулирования, как расход связующего вещества; давление воздуха, подаваемого на форсунку для распыления связующего вещества; расход поступающего воздуха для псевдооживления, позволяющие снизить потери таблеточной смеси при таблетировании. Проверены показатели качества вакцины, при этом показано, что они соответствуют требованиям фармакопейной статьи на препарат. Проведенные исследования позволили уточнить значения показателей «средняя масса таблетки» и «рН растворенного препарата» для готовой лекарственной формы вакцины.

Ключевые слова: вакцина холерная, таблетка, гранулирование, технология.

GRANULATION OF CHEMICAL CHOLERA VACCINE COMPONENTS

Komissarov A.V., Eremin S.A., Zadokhin S.N., Shulgina I.V., Lobovikova O.A.,
Vasin Y.G., Klokova O.D., Livanova L.F., Nikiforov A.K.

Rospotrebnadzor Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia (410005, Saratov, Universitetskaya St., 46), e-mail: microbe@san.ru

Demonstrated is the possibility of introduction of the new additive agents into the formulation of tableted chemical bivalent cholera vaccine that allow for fluid bed granulation with top feeding of adhesive material. Based on the results of complete factorial experiment 2^3 identified are the optimum values of such technological parameters as adhesive matter consumption; air pressure supplied to the spray dissemination nozzle; inflow air discharge, used for pseudo fluidization, providing for pharmaceutical mixture loss reduction during the process of palletizing. Validated are the vaccine quality indicators. It is shown that they comply with the requirements specified in pharmacopeial description to the preparation. All in all the performed investigations have made it possible to refine the values for both “mean weight of a tablet”, and “pH of the dissolved preparation” as concerns final dosage form (FDF) of the vaccine.

Keywords: cholera vaccine, tablet, granulation, manufacturing technology.

Введение

Холерная вакцина представляет собой фармацевтическую композицию в форме таблеток, содержащая в качестве лекарственной субстанции смесь лиофилизированных холерогенанатоксина и О-антигенов, полученных из инактивированных формалином бульонных культур холерных вибрионов О1 серогруппы – *Vibrio cholerae* 569. В классического биовара серовара Инаба и *V. cholerae* М-41 классического биовара серовара Огава (6-19 массовых %) и в качестве вспомогательных веществ следующие компоненты при их соотношении, массовых %: сахароза – 57-38; крахмал – 27; тальк – 4-6; кальций стеарат – 4-6; кишечнорастворимое покрытие из целлацефата (ацетилфталилцеллюлозы) – 2-4.

Для получения таблетки в смеситель загружают сахарную пудру, тальк, крахмал и перемешивают в течение 10 мин. Таблеточную смесь увлажняют в смесителе добавлением 2,5 %

раствора крахмального клейстера небольшими порциями (капельно) при постоянном перемешивании в течение 10 мин. Затем добавляют стеарат кальция и специфические фракции (лиофилизированные холероген-анатоксин и О-антигены, полученные из инактивированных формалином бульонных культур холерных вибрионов О1 серогруппы – *V. cholerae cholerae* 569В классического биовара серовара Инаба и *V. cholerae* М-41 классического биовара серовара Огава) в рассчитанных количествах, тщательно перемешивают в течение 10 мин. Полученную смесь помещают в термостат и высушивают при помешивании при температуре (35 ± 2) °С в течение 30–60 мин. Затем смесь таблетуют на таблеточной машине. Недостатком данного способа получения являются большие потери таблеточной смеси при таблетировании, возникающие за счет того, что при ее недосушивании она прилипает к пунсонам, а при пересушивании она плохо прессуется и часть смеси после формирования таблетки в виде порошка высыпается из нижнего пунсона. При этом потери составляют от 10 до 30 %.

Устранить указанные изъяны возможно предварительным гранулированием таблеточной смеси. Кроме того, к недостаткам состава фармацевтической композиции холерной химической вакцины можно отнести повышенное содержание стеарата кальция (до 6 %) и талька (до 6 %), хотя Государственная Фармакопея (издание 11 выпуск 2) рекомендует содержание данных компонентов не более 1 и 3 % для стеарата кальция и талька соответственно.

Материалы и методы

Гранулирование осуществляли на аппарате, работающем по принципу «псевдооживленного слоя» GPCG 2 фирмы GLATT (Германия). Последующее таблетирование смеси проводили на таблеточном прессе MiniTabT фирмы LUXNER (Германия). Взвешивание таблеток проводили на весах Ohaus Pioneer PA-213 (США) с точностью до 0,001 г.

Определение концентрации формалина, содержания ионов аммония и сульфат-ионов, водородных ионов, потери в массе при высушивании осуществляли по методикам, представленным в «Методических указаниях...» (МУК 4.1/4.2.588-96) [5]. Испытания по тестам «микробиологическая чистота» и «токсичность» осуществляли в соответствии с ГФ XII [3].

Установление иммуногенной и антигенной активности, токсичности, специфической безопасности, распадаемости и растворимости проводили по методам, изложенным в фармакопейной статье предприятия на вакцину холерную бивалентную химическую таблетированную [2].

Результаты и обсуждение

Анализ отечественного и зарубежного рынков производства грануляционного оборудования показал, что по необходимой для производства холерной химической вакцины производительности выпускаются только грануляторы, работающие по принципу влажной грануляции в псевдооживленном слое. Оборудование данного типа установлено на аппаратурно-

технологической линии получения вакцины холерной бивалентной химической таблетированной, в связи с чем, стоит задача эффективного его ввода в производство. Можно выделить основные параметры, влияющие на протекание процесса влажной грануляции в псевдооживленном слое. Параметры, определяемые гранулируемой массой: площадь испарения влаги – форма, структура и размер гранулируемых частиц; растворимость ингредиентов; сорбция / десорбция влаги ингредиентами гранулируемой массы. Параметры входящего воздуха: расход входящего в колонну воздуха, влажность входящего воздуха и его температура. Параметры капель распыляемого связующего раствора увлажнителя: размер капель увлажняющего раствора и соотношение в капле влаги и связующего вещества в момент контакта ее с гранулируемыми частицами, которые определяются составом исходного раствора, а также давлением воздуха, подаваемого на форсунку и обеспечивающего дисперсность капель и угол их распыления [6].

От правильного выбора перечисленных составляющих в наибольшей степени и зависит эффективность процесса грануляции. Поэтому исследования, направленные на обоснование оптимальных технологических параметров данного процесса, являются актуальными.

Проведенные исследования по получению гранул с существующим составом фармацевтической композиции, к сожалению, не дали положительных результатов.

Нами предложена новая фармацевтическая композиция в форме таблеток, содержащая в качестве лекарственной субстанции смесь лиофилизированных холерогена-анатоксина и О-антигенов, полученных из инактивированных формалином бульонных культур холерных вибрионов О1 серогруппы – *V. cholerae* 569В классического биовара серовара Инаба и *V. cholerae* М-41 классического биовара серовара Огава (6-19 массовых %), отличающаяся тем, что она содержит в качестве вспомогательных веществ следующие компоненты при их соотношении, массовых %: лактозы моногидрат – 44,3–36,3; целлюлоза микрокристаллическая – 44,3–36,3; поливинилпироллидон (пласдон К-90) – 0,4–0,8; кишечнорастворимое покрытие Acryl-eze – 5–8.

Лактоза моногидрат, целлюлоза микрокристаллическая и поливинилпироллидон (пласдон К-90) описаны в качестве вспомогательных веществ в Европейской и Британской Фармакопеях.

С целью подбора оптимальных технологических режимов процесса гранулирования был спланирован и реализован полный факторный эксперимент 2^3 . В качестве основных факторов, влияющих на проведение процесса, были выбраны: расход связующего вещества (поливинилпироллидона – 10 % водный раствор); давление воздуха, подаваемого на форсунку; расход поступающего воздуха для псевдооживления.

Неисследуемыми факторами, которые были постоянны во всех вариантах проведения эксперимента, являлись: масса таблеточной смеси – 2,2 кг (из расчета одной загрузки коутера); температура гранулируемой смеси – 24-26 °С. Критерий оптимизации – потери при таблетировании, %.

В начале исследований провели эксперименты при значениях факторов, соответствующих так называемому «нулевому» уровню. Смесь удовлетворительно подвергалась гранулированию, однако потери при таблетировании составили до 8 %, что не является, на наш взгляд, удовлетворительным показателем.

Уровни варьирования факторов и матрица планирования полного факторного эксперимента с его результатами представлены в таблицах 1,2.

Таблица 1 – Уровни варьирования факторов

Наименование факторов	Основной уровень (нулевой)	Интервал варьирования	Верхний уровень (+)	Нижний уровень (-)
X ₁ – расход связующего вещества (поливинилпироллидона), мл/мин	15,0	10,0	25,0	5,0
X ₂ – давление воздуха, подаваемого на форсунку, бар	0,8	0,4	1,2	0,4
X ₃ – расход поступающего воздуха для псевдоожижения, м ³ /час	60	30	90	20

Таблица 2 – План многофакторного эксперимента и его результаты

Номер варианта	Факторы			Потери при таблетировании, %
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	+	+	+	1,0
2	-	+	+	1,23
3	+	-	+	4,0
4	-	-	+	4,23
5	+	+	-	10,3
6	-	+	-	12,0
7	+	-	-	13,6
8	-	-	-	15,0

В результате обработки данных проведенного эксперимента было получено следующее уравнение регрессии:

$$Y=7,67-0,445X_1-1,5375X_2-5,055X_3-0,0375X_{1,2}+0,0375X_{2,3}+0,33X_1X_3+0,0375X_{1,2,3} \quad (1)$$

Проведенная дальнейшая обработка уравнения (1) при вероятности P=95 %, показала, что коэффициенты регрессии для факторов X_{1,2}; X_{2,3}; X_{1,2,3} не являются значимыми и вышеперечисленные факторы можно «отбросить». Таким образом, уравнение (1) можно записать как:

$$Y=7,67-0,445X_1-1,5375X_2-5,055X_3+0,33X_1X_3 \quad (2)$$

Проведенная дальнейшая обработка полученного уравнения регрессии с использованием критерия Фишера при вероятности $P=95\%$, показала, что полученное уравнение адекватно описывает процесс гранулирования.

Для оценки возможности «отбросить» двойное взаимодействие X_1X_3 вычислили по формуле (3) дисперсию неадекватности модели, значение которой было равно 0,303:

$$S^2_{ад} = \frac{\sum (Y_{расч} - Y_{опр})^2}{N - n - 1}, \quad (3)$$

где n – число отброшенных парных и т.д. взаимодействий,

N – число вариантов проведенного эксперимента,

$Y_{расч}$ – рассчитанные значения, определенные по формуле (2) без учета парных и т.д. взаимодействий,

$Y_{опр}$ – значения, определенные в ходе проведения эксперимента.

Рассчитанный критерий Фишера, определенный по формуле (4) был равен 1,515:

$$F_{расч} = \frac{S^2_{ад}}{S^2(y)}, \quad (4)$$

где $S^2(y) = \frac{1}{N} \sum Y_{опр}$.

Табличный критерий Фишера F_m при вероятности $P=95\%$ равен 19,16 [1]. Так как выполняется условие $F_{расч} < F_m$, то можно отбросить парные и т.д. взаимодействия и окончательное уравнение регрессии будет иметь вид:

$$Y=7,67-0,445X_1-1,5375X_2-5,055X_3 \quad (5)$$

Коэффициенты при X_1 , X_2 и X_3 отрицательны. Это значит, что с увеличением этих факторов уменьшается значение параметра оптимизации, т.е. уменьшаются потери при таблетировании. Основываясь на том, что близкие к оптимуму значения параметров процесса нанесения покрытия определены в 1 варианте эксперимента (1,0%), было принято решение не проводить дальнейшую их оптимизацию по плану «крутого восхождения». Таким образом, технологические режимы процесса гранулирования, будут следующие: расход связующего вещества (поливинилпирролидона) – 25,0 мл/мин; давление воздуха, подаваемого на форсунку – 1,2 бар; расход поступающего воздуха для псевдооживления – 90 м³/час; масса таблеточной смеси – 2,2 кг; температура гранулируемой смеси – 24-26 °С.

По предложенным технологическим приемам приготовлена серия вакцины и оценены ее свойства (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты исследования нормируемых свойств вакцины

Наименование показателя	Требования нормативной документации [2]	Значение показателя
1	2	3
Средняя масса таблетки	от 0,285 г до 0,315 г	0,322 г
Формалин	Не более 0,2%	0,013%
Ионы аммония и сульфат-ионы	Не допускается наличия ионов аммония и сульфат-ионов	отсутствуют
Распадаемость	Оболочка таблетки вакцины должна быть устойчива к действию децимолярного раствора соляной кислоты в течение 3 ч и распадаться в децимолярном растворе натрия гидроксида в течение 1 ч при температуре $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$	Устойчива к действию децимолярного раствора соляной кислоты в течение 3 ч и распадается в децимолярном растворе натрия гидроксида в течение 35 мин при температуре $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$
pH растворенного препарата	от 6,7 до 7,4.	6,1
Потеря в массе при высушивании	Не более 5%	1,15%
Микробиологическая чистота	Допускается не более 1000 колоний непатогенных микроорганизмов на одну таблетку. Вакцина не должна содержать патогенных и условно патогенных микроорганизмов	не содержит патогенных и условно патогенных микроорганизмов; непатогенных – 14 колоний
Специфическая безопасность	Вакцина должна быть специфически безопасной	специфически безопасна
Специфическая активность: антигенная активность по анатоксино-связыванию; содержание О-антигена;	Должна содержать $(100\ 000\pm 20\ 000)$ единиц связывания анатоксина (ЕС), не менее 2000 ус. ед. О-антигена штаммов <i>V. cholerae</i> O1	80000 12288

Данные таблицы показывают, что по всем параметрам, за исключением, средняя масса таблетки и pH растворенного препарата, соответствуют нормируемым требованиям. Увеличение массы таблетки происходит за счет применения нового кишечнорастворимого покрытие на водной основе Acryl-eze, что отражено в наших предыдущих исследованиях [4]. Снижение pH происходит вследствие низкого уровня данного показателя в таких вспомогательных веществах, как целлюлоза микрокристаллическая и лактозы моногидрат (pH этих веществ составлял 6,0 и 5,5 соответственно, что не противоречит данным Европейской и Британской Фармакопей – 5,0-7,5 и 3,0-7,0). Данное обстоятельство позволило уточнить значения показателей «средняя масса таблетки» и «pH растворенного препарата» для готовой ле-

карственной формы вакцины, которые предложены в ведомости изменений к фармакопейной статье на холерную химическую вакцину на уровне – от 0,285 г до 0,340 г и от 5,0 до 7,4 соответственно.

В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

- предложен новый состав фармацевтической композиции холерной химической вакцины;
- определены оптимальные технологические режимы процесса гранулирования таблеточной смеси;
- комплекс предложенных решений позволил минимизировать потери препарата вакцины;
- по проверенным показателям таблетки вакцины соответствовали требованиям нормативной документации.

Список литературы

1. Адлер Ю.П. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий / Ю.П. Адлер, Е.В. Маркова, Ю.В. Грановский. – М.: Наука, 1971. – 282 с.
2. Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, кишечнорастворимой оболочкой // Стандарт качества лекарственного средства. Фармакопейная статья предприятия ФСП 42-0020-0020-08.
3. Государственная Фармакопея Российской Федерации XII. Издание. Часть I // «Издательство «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704 с.
4. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Задохин С.Н., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Ливанова Л.Ф., Никифоров А.К. Экспериментальное обоснование внедрения пленочного покрытия на водной основе для готовой лекарственной формы холерной химической вакцины // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6; URL: www.science-education.ru/113-11114 (дата обращения: 16.02.2014).
5. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям: Методические указания МУК 4.1/4.2.588-96 – Утв. первым заместителем Председателя Государственного комитета санитарно-эпидемиологического надзора Российской Федерации 31.10.96 г. – М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998.
6. Могилюк В., Резцов Е. Практические аспекты трансфера технологии производства таблеток: влажная грануляция в псевдооживленном слое // Фармацевтическая отрасль. 2010. № 5 (22). С. 84-88.

Рецензенты:

Карпунина Л.В., д.б.н., профессор, профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, г. Саратов.

Голиков А.Г., д.х.н., доцент, декан фармацевтического факультета ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Саратов.