

Є. М. Круглов¹, Г. І. Борщевський²

¹ Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України

² АТ «Фармак», Україна

Особливості процесу фільтрації ліпосомальної емульсії для виготовлення очних крапель на основі пептидного комплексу

Ліпосоми все більше досліджують та впроваджують як системи доставляння ліків у формі очних крапель. Важливим етапом у виробництві ліпосомального препарату у формі очних крапель є процес стерилізаційної фільтрації перед наповненням лікарського засобу в контейнер для кінцевого дозування. Передбачають, що компоненти ліпосом взаємодіють з мембраною та закупорюють її через свої унікальні фізико-хімічні властивості. Отже, треба глибше розуміти стерилізаційну фільтрацію ліпосом, щоб ухвалити відповідні рішення щодо вибору фільтрів для стерилізації. Розраховані з рівняння Дарсі значення опору та пропускної здатності добре підходять для порівняння різних фільтрувальних мембран або параметрів процесу.

Мета роботи – обґрунтувати вибір оптимальних марок фільтрувальних мембран та параметрів процесу фільтрації ліпосомальної емульсії для виготовлення очних крапель на основі пептидного комплексу.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження була ліпосомальна емульсія для виготовлення очних крапель на основі пептидного комплексу. Для фільтрації використовували приготувану ліпосомальну емульсію очних крапель на основі пептидного комплексу та мембранні фільтри різних марок. Випробування фільтрації здійснювали на приладі з масштабування Zero-T виробництва фірми Sartorius, Німеччина. Для всіх вимірювань вагу фільтрату контролювали за допомогою ваг. Оцінювали експерименти з фільтрації з використанням програмного забезпечення Zero-T 2.0 фірми Sartorius Stedim Biotech, Німеччина. На першому етапі записані дані результатів зберігали у файлі. За отриманими даними за допомогою табличного процесора Excel розраховували потік фільтрації J° , початковий опір мембрани R°_{zag} і пропускну здатність \check{V} відповідно до визначеного часу вимірювання – початок T10 % та кінець T80 %.

Результати та їх обговорення. За отриманими результатами визначено оптимальні марки стерилізувальних мембран та з'ясовано, що шляхом збільшення перепаду тиску об'ємна пропускну здатність значно покращується – більш ніж у 18 разів (від 0,7 до 4,1 бар), а в іншому експерименті – більш ніж у 10 разів (від 0,3 до 2,1 бар). Крім того, виявлено користь використання більш високого перепаду тиску на фільтрацію ліпосом крізь різні стерилізувальні мембрани.

Висновки. Отримані значення початкового опору мембрани засвідчили, що геометричні аспекти і властивості матеріалу марок мембран Supor® (Pall) та Sartopore 2® (Sartorius) мають меншу здатність до блокування мембрани під час фільтрації та забезпечення ресурсу фільтрації за рахунок більшої пропускної здатності. Також доведено, що використання більш високого перепаду тиску збільшує продуктивність процесу.

Ключові слова: ліпосоми; ліпосомальна емульсія; очні краплі; стерильна фільтрація

Ye. M. Kruglov¹, G. I. Borschevskiy²

¹ National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine

² JSC Farmak, Ukraine

Peculiarities of the filtration process of liposomal emulsion for the production of eye drops based on a peptide complex

Liposomes are increasingly being studied and implemented as drug delivery systems in the form of eye drops. An important stage in the production of a liposomal preparation in the form of eye drops is the stage of sterilization filtration before filling the medicinal product into a container for final dosage. It is assumed that liposome components interact with the membrane and clog it due to their unique physicochemical properties. Therefore, a deeper understanding of the sterilization filtration of liposomes is needed to make appropriate decisions regarding the choice of filters for sterilization. Resistance and permeability values calculated from the Darcy equation are well suited for comparing different filter membranes or process parameters.

Aim. To substantiate the choice of optimal brands of filter membranes and parameters of the liposomal emulsion filtration process for the production of eye drops based on a peptide complex.

Materials and methods. The study object was a liposomal emulsion for the production of eye drops based on a peptide complex. A prepared liposomal emulsion of eye drops based on a peptide complex and membrane filters of various brands were used for filtration. Filtration tests were performed on a Zero-T scaling unit manufactured by Sartorius, Germany. For all measurements, the filtrate weight was controlled using a balance. Filtration experiments were evaluated using Zero-T 2.0 software from Sartorius Stedim Biotech, Germany. At the first stage, the recorded data of the results was saved to a file. Based on the data obtained using the Excel table processor, the filtration flow J° , the initial resistance of the membrane R°_{zag} and the throughput \check{V} were calculated according to the calculated measurement time: the beginning of T10 % and the end of T80 %.

Results and discussion. According to the results obtained, the optimal brands of sterilizing membranes were determined; it was shown that by increasing the pressure drop, the volumetric throughput was significantly improved

by more than 18 times (from 0.7 to 4.1 bar), and in another experiment – by more than 10 times (from 0.3 to 2.1 bar). In addition, the benefit of using a higher pressure drop to filter liposomes through various sterilizing membranes was shown.

Conclusions. The obtained values of the initial resistance of the membrane showed that the geometrical aspects and properties of the material of the Supor® (Pall) and Sartopore 2® (Sartorius) membrane brands have a lower ability to block the membrane during filtration and provide the filtration resource due to greater throughput. It has been also shown that the use of a higher pressure drop increases the productivity of the process.

Key words: liposomes; liposomal emulsion; eye drops; sterile filtration

Вступ. Ліпосоми все більше досліджують і впроваджують як системи доставляння ліків у формі очних крапель. Вони мають безліч переваг: подовжують час перебування лікарського засобу на поверхні рогівки, пролонгують його вивільнення і збільшують біодоступність [1-4]. Важливим етапом у виробництві ліпосомального препарату у формі очних крапель є процес стерилізаційної фільтрації перед наповненням лікарського засобу в контейнер для кінцевого дозування. Однак через розміри ліпосом та їхні фізико-хімічні властивості це може бути складним завданням, зокрема для стерилізаційних фільтрів номіналом 0,2 мкм. Дослідження фільтрів з ліпосомами засвідчили більшу ймовірність передчасного блокування фільтра й проникнення бактерій проти інших типів парентеральних препаратів [5].

У літературі майже не можна знайти досліджень фільтрації щодо продуктивності мембрани, тому й інформації про причини її блокування дуже мало. Передбачають, що компоненти ліпосом взаємодіють з мембраною та закупорюють її через свої унікальні фізико-хімічні властивості [6]. Ці властивості зумовлені поверхневою активністю ліпідних молекул, зарядом ліпосоми або плинністю подвійного шару: негативно заряджені ліпосоми можуть проявляти відштовхувальні взаємодії одна з одною та з матеріалом мембрани. Текучість подвійного шару впливає на жорсткість ліпосомних сфер. Ймовірно, обидві властивості сприяють блокуванню мембрани [7]. Отже, треба глибше розуміти стерилізаційну фільтрацію ліпосом, щоб ухвалити відповідні рішення щодо вибору фільтрів для стерилізації.

Типова стерильна фільтрувальна мембрана 0,2 мкм має потік води приблизно 18-25 мл/(хв·см²·бар). Припустивши, що пори мембрани – це прямі трубки з внутрішнім діаметром d_i і площею поперечного перерізу $S_{\text{пор}}$, можна оцінити число Рейнольдса для потоку води через мембрану, використовуючи таке рівняння [8]:

$$Re = \frac{J^{\circ} \cdot \rho \cdot d_i}{S_{\text{пор}} \cdot N \cdot \eta} = \frac{21 \frac{\text{мл}}{\text{хв} \cdot \text{см}^2} \cdot 1 \frac{\text{кг}}{\text{л}}}{3 \cdot 10^8 \text{ см}^{-2} \cdot \pi \cdot 0,1^2 \text{ мкм}^2 \cdot 1 \text{ мПа} \cdot \text{с}} = 7 \cdot 10^{-3} \ll 1$$

Характеристиками мембрани, які можуть впливати на забруднення фільтра, є геометричні аспекти (розмір пор, пористість і рельєф поверхні) і властивості матеріалу (гідрофільність і поверхневий заряд).

Наприклад, відомо, що мембрана з гідрофільною поверхнею має низькі адсорбційні властивості, тоді як адсорбція сильніша для гідрофобних поверхонь [9, 10].

В експерименті з фільтрацією треба контролювати мінімум два параметри. Це, по-перше, трансмембранний тиск системи; і по-друге, або сукупна вага m , яку вимірюють за допомогою ваг, або масовий потік фільтрату m , або витрата J .

Швидкість потоку рідини через пористий мембранний фільтр можна описати рівнянням Дарсі для фільтрації.

Рівняння Дарсі – це емпіричне рівняння, яке пізніше було пояснено як рішення рівняння Нав'є-Стокса. У випадку малих чисел Рейнольдса можна застосувати рівняння Дарсі, і опір описаного компонента є постійною величиною [11]. В'язкість фільтрувального середовища є обов'язковим параметром моделі, який необхідно виміряти. Для висококонцентрованих білкових фільтрів в'язкість зазвичай перевищує 1 мПа·с. Відповідно до закону Дарсі опір мембрани $R^{\circ}_{\text{заг}}$ можна розрахувати за допомогою трансмембранного тиску P і в'язкості розчину η :

$$R^{\circ}_{\text{заг}} = \frac{P \cdot S_{\text{mem}}}{\eta \cdot J}$$

Початковий опір є специфічним для фільтра значенням, бо він нормується параметрами процесу (тиск фільтрації P , фільтраційний потік J), властивостями середовища (в'язкість η) і площею мембрани S_{mem} . Під час фільтрації відбувається забруднення мембрани. Таке забруднення можна спостерігати як зниження потоку за фільтрації з постійним тиском і як підвищення тиску під час фільтрації з постійним потоком. Опір мембрани підвищується в обох випадках за рахунок утворення шару, що поростає. Отже, значення опору та пропускної здатності добре підходять для порівняння різних площ мембрани або параметрів процесу.

Метою роботи було обґрунтувати вибір оптимальних марок фільтрувальних мембран та параметрів процесу фільтрації ліпосомальної емульсії для виготовлення очних крапель на основі пептидного комплексу.

Матеріали та методи. Для фільтрації використали приготувану ліпосомальну емульсію очних крапель на основі пептидного комплексу. Для виготовлення ліпосом використовували ліпіди виробництва Lipoid, ФРН. Гліцин кристалічний, динатрію едетат, натрію хлорид, натрію гідроксид, кислоту хлористоводневу використовували виробництва фірми Sigma-Aldrich, США.

Випробування фільтрації здійснювали на приладі з масштабування Zero-T виробництва фірми Sartorius,

Таблиця

Результати дослідження процесу фільтрації

Марка стерилізувальної мембрани (виробник)	Матеріал	Перепад тиску на мембрані (P), бар	Об'ємна пропускна здатність (\check{V}), л/(хв × см ²)		Початковий опір мембрани, (R°заг), 10 ¹⁰ × м ⁻¹
			T10 %	T90 %	
Supor® (Pall)	Поліетерсульфон	0,3	0,28	0,21	29
		2,1	2,72	2,22	59
Sartopore 2® (Sartorius)	Поліетерсульфон	0,3	0,31	0,24	27
		2,1	3,74	2,58	43
Ultipor® N66 (Pall)	Нейлон	0,7	0,15	0,05	59
		4,1	1,62	0,9	72
Fluorodyne II® (Pall)	Полівініліденфторид	0,7	0,17	0,06	56
		4,1	1,44	1,16	75

Німеччина. Для всіх вимірювань вагу фільтрату контролювали за допомогою ваг. Для розрахування об'єму фільтрату використовували густину фільтраційного середовища. Тиск контролювали весь час, температуру – перед початком досліду лише через обмеження налаштувань. Фільтрувальні диски та пристрої попередньо змочували водою для ін'єкцій. Фільтрувальні диски встановлювали в мембранотримачі з ідентичними опорами, картриджі – в корпуси з неіржавкої сталі. Системи фільтрації, які містять фільтрувальні диски, промивали досліджуваним розчином для видалення повітря.

Випробування за постійного тиску здійснювали з посудиною 6 л. Систему використовували для фільтрувальних дисків 14,1 см². Досліджували фільтри комерційно доступних марок: Supor® (Поліетерсульфон виробництва Pall), Sartopore 2® (Поліетерсульфон виробництва Sartorius), Ultipor® N66 (Нейлон виробництва Pall), Fluorodyne II® (Полівініліденфторид виробництва Pall). Усі тримачі мембрани для фільтрувальних дисків були оснащені однаковою мембранною опорою.

Оцінювали експерименти з фільтрації з використанням програмного забезпечення Zero-T 2.0 фірми Sartorius Stedim Biotech, Німеччина. На першому етапі записані дані результатів зберігали у файлі. За отриманими даними за допомогою табличного процесора Excel розраховували потік фільтрації J°, початковий

опір мембрани R°заг і пропускну здатність \check{V} відповідно до визначеного часу вимірювання – початок T10 % та кінець T80 % [хв].

Результати та їх обговорення. За отриманими результатами визначено оптимальні марки стерилізувальних мембран та з'ясовано, що шляхом збільшення перепаду тиску об'ємна пропускна здатність значно покращується – більш ніж у 18 разів (від 0,7 до 4,1 бар), а в іншому експерименті – більш ніж у 10 разів (від 0,3 до 2,1 бар). Крім того, виявлено користь використання більш високого перепаду тиску на фільтрацію ліпосом через різні стерилізувальні мембрани. Результати досліджень наведено в табл.

Висновки та перспективи подальших досліджень

1. Отримані значення початкового опору мембрани засвідчили, що геометричні аспекти (розмір пор, пористість і рельєф поверхні) і властивості матеріалу мембрани марок Supor® (Pall) та Sartopore 2® (Sartorius) мають меншу здатність до блокування мембрани під час фільтрації та забезпечення ресурсу фільтрації за рахунок більшої пропускної здатності, ніж мембрани марок Ultipor® N66 (Pall) та Fluorodyne II® (Pall).

2. Процес фільтрації варто здійснювати, використовуючи більш високий перепад тиску, що збільшує продуктивність процесу за рахунок кращої пропускної здатності мембрани.

Конфлікт інтересів: відсутній.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

- Dieter D., Suwan L., Sabine D., Chan K J., Gregor S., Wanda M. Comparative study of treatment of the dry eye syndrome due to disturbances of the tear film lipid layer with lipid-containing tear substitutes. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 2006. Vol. 223. P. 974-983.
- Mishra G. P., Bagui M., Tamboli V., Mitra A. K. Recent Applications of Liposomes in Ophthalmic Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery.* 2011. Vol. 2011. DOI: 10.1155/2011/863734.
- Liposomal Drug Delivery: A Versatile Platform for Challenging Clinical Applications / A. Madni et al. *J Pharm Pharm Sci.* 2014. Vol. 17 (3). P. 401-426. DOI: 10.18433/j3cp55.
- Liposomes in topical ophthalmic drug delivery an update / R. Agarwal et al. *Drug Deliv.* 2016. Vol. 23 (4). P. 1075-1091. DOI: 10.3109/10717544.2014.943336.
- Folmsbee M., Moussourakis M. Sterilizing filtration of liposome and related lipid containing solutions: Enhancing successful filter qualification. Accepted for review, PDA. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology.* 2012. Vol. 66 (2). P. 161-167. DOI: 10.5731/pdajpst.2012.00771.
- Food and Drug Administration. Liposome Drug Products – Guidance for Industry. *Pharm. Qual. Revision.* 2015. Vol. 1. P. 1-13.
- Brendzel A. M., Miller I. F. Effects of lipid-soluble substances on the thermotropic properties of liposome filtration. *Biochim. Biophys. Acta.* 1980. Vol. 601. P. 260-270. DOI: 10.1016/0005-2736(80)90531-3.

8. Verein Deutscher Ingenieure. VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen (GVC). 10th ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2006.
9. Mahler H.-C., Friess W., Grauschopf U., Kiese S. Protein Aggregation: Pathways, Induction Factors and Analysis. *J. Pharm. Sci.* 2009. Vol. 98. P. 2909–2934. DOI: 10.1002/jps.21566.
10. Pitt A.M. The nonspecific protein binding of polymeric microporous membranes. *J. Parenter. Sci. Technol.* 1987. Vol. 41. P. 110–113.
11. Discacciati M. D., Quarteroni A. Q. Navier-Stokes/Darcy Coupling : Modeling, Analysis, and Numerical Approximation. *Rev. Mat. Complut.* 2009. Vol. 22. P. 315–426. DOI: 10.5209/rev_REMA.2009.v22.n2.16263.

REFERENCES

1. Dieter, D., Suwan, L., Sabine, D., Chan, K. J., Gregor, S., Wanda, M. (2006). Comparative study of treatment of the dry eye syndrome due to disturbances of the tear film lipid layer with lipid-containing tear substitutes. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 223, 974-983.
2. Mishra, G. P., Bagui, M., Tamboli, V., Mitra, A. K. (2011). Recent Applications of Liposomes in Ophthalmic Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery*, 2011. doi: 10.1155/2011/863734.
3. Madni, A., Sarfraz, M., Rehman, M., Ahmad, M., Akhtar, N., Ahmad, S. et al. (2014). Liposomal Drug Delivery: A Versatile Platform for Challenging Clinical Applications. *J Pharm Pharm Sci.*, 17 (3), 401-426. doi: 10.18433/j3cp55.
4. Agarwal, R., Iezhitsa, I., Agarwal, P., Abdul Nasir, N. A., Razali, N., Alyautdin, R., Ismail, N. M. (2016). Liposomes in topical ophthalmic drug delivery an update. *Drug Deliv*, 23 (4), 1075–1091. DOI: 10.3109/10717544.2014.943336.
5. Folmsbee, M., Moussourakis, M. (2012). Sterilizing filtration of liposome and related lipid containing solutions: Enhancing successful filter qualification. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 66 (2), 161-167. doi: 10.5731/pdajpst.2012.00771.
6. Food and Drug Administration. (2015). Liposome Drug Products – Guidance for Industry. *Pharm. Qual. Revision*, 1, 1–13.
7. Brendzel, A. M., Miller, I. F. (1980). Effects of lipid-soluble substances on the thermotropic properties of liposome filtration. *Biochim. Biophys. Acta*, 601, 260–270. doi: 10.1016/0005-2736(80)90531-3.
8. Verein Deutscher Ingenieure. (2006). *VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen (GVC)*. (10th ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
9. Mahler, H.-C., Friess, W., Grauschopf, U., Kiese, S. (2009). Protein Aggregation: Pathways, Induction Factors and Analysis. *J. Pharm. Sci.*, 98, 2909–2934. doi: 10.1002/jps.21566.
10. Pitt, A. M. (1987). The nonspecific protein binding of polymeric microporous membranes. *J. Parenter. Sci. Technol.*, 41, 110–113.
11. Discacciati, M., Quarteroni, A. Q. (2009). Navier-Stokes/Darcy Coupling : Modeling, Analysis, and Numerical Approximation. *Rev. Mat. Complut.*, 22, 315–426. doi:10.5209/rev_REMA.2009.v22.n2.16263.

Відомості про авторів:

Круглов Є. М., аспірант кафедри технології ліків, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України.
E-mail: evgeniy.kruglov@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6697-8077>

Боршевський Г. І., доктор фармац. наук, начальник лабораторії розробки технологій фармацевтичних препаратів, АТ «Фармак».
E-mail: g.borshevskiy@farmak.ua

Information about authors:

Kruglov Ye. M., postgraduate student of the Department of Technology of Drugs, National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine. E-mail: evgeniy.kruglov@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6697-8077>

Borshchevskiy G. I., Doctor of Pharmacy (Dr. habil), head of the Laboratory of Technology Development of Pharmaceuticals, PJSC “Farmak”.
E-mail: g.borshevskiy@farmak.ua

Надійшла до редакції 12.12.2022 р.