

МЕМБРАННЫЕ МИКРОФИЛЬТРЫ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ АПИРОГЕННОЙ ВОДЫ И ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

- **А.В. Тарасов**, ООО НПП «Технофильтр»
- **А.Г. Ситников**, ООО НПО «ЛАЛ-Центр»
- **В.В. Демидова**, ООО НПО «ЛАЛ-Центр»
- **Е.С. Яворская**, ОАО «НИИмедполимер»

Исследования последних лет показали, что ни монодистилляция, ни фильтрация водопроводной воды на обратноосмотических мембранах не могут гарантировать получение важнейших фармацевтических субстанций - «воды для инъекций» и высокоочищенной воды для производства парентеральных препаратов с требуемым минимальным содержанием в ней бактериальных эндотоксинов (пирогенов).



Эндотоксины (БЭ) представляют собой агрегаты липополисахаридов (ЛПС) – веществ, из которых состоят клеточные стенки грамотрицательных бактерий. По сравнению с белками, бактериальные эндотоксины очень стабильны. Их стабильность сохраняется при высоких значениях температур и в широком диапазоне pH. Благодаря своей молекулярной структуре ЛПС устойчивы к физическим воздействиям и практически не подлежат инактивации, так, они выдерживают автоклавирование в течение 3 часов при 121°C.

ЛПС отрицательно заряжены в слабокислой, нейтральной и щелочной среде благодаря фосфатным группам, входящим в гликозидные остатки. Это свойство используют для их удаления. Так, до 70-х годов прошлого столетия с задачей удаления БЭ из парентеральных растворов хорошо справлялся асбестоцеллюлозный картон, который решал одновременно несколько задач - осветление, тонкую очистку, стерилизацию и депирогенизацию (благодаря положительно заряженным асбестовым волокнам) растворов. После того как была доказана канцерогенность наночастиц асбеста, для этой цели начали применять активированный уголь, ионообменные смолы (в том числе специально синтезированные для этой цели), хроматографию с гидрофобным взаимодействием (используя средство к гидрофобному фрагменту ЛПС) и глубокие целлюлозные материалы, наполненные диатомитом (также изначально положительно заряженным).

В свою очередь разработчики мембран для решения этой проблемы предложили использовать мембранные нанофильтры с порогом отсека 10 кДа (например, в виде плоскорамных и спиральных фильтроэлементов) и сорбирующие мембранные микрофильтры.

Присутствие бактериальных эндотоксинов в препаратах, в особенности применяемых для внутривенного введения, представляет собой огромную проблему. Хотя сами по себе эндотоксины не являются токсическими веществами, их попадание в организм негативно активирует иммунную систему, что может привести к необратимым последствиям.

Для оценки безопасности лекарственных препаратов установлен показатель «содержание бактериальных эндотоксинов», который не должен превышать 0,25 ЕЭ/мл.

Исходная вода, используемая для производства инъекционных растворов, должна характеризоваться существенно более низкими показателями, а именно:

- «операционная норма» (предпочтительная рабочая норма) менее 0,03 ЕЭ/мл
- «уровень тревоги» от 0,03 до 0,06 ЕЭ/мл (уровень, при котором надо с повышенным вниманием следить за содержанием БЭ)
- «уровень действия» от 0,06 до 0,125 ЕЭ/мл (уровень, при котором необходимо предпринимать корректирующие действия).

При использовании нанофильтрационных мембран действуют те же ограничения по молекулярной массе, что и при удалении вирусов – разделение возможно, если сам полезный продукт меньше 10 кДа. Это могут быть буферы, растворы солей, нуклеотиды, аминокислоты, пептиды.

В современной фармацевтической практике наибольшее распространение получили **сорбирующие мембранные микрофильтры** на основе депирогенизирующих полимерных мембран, которые, с целью придания им сорбционных свойств модифицированы поверхностью.

Положительно заряженные мембранные микрофильтры – относительно новый класс мембранных материалов. В мембранном сорбенте основная функциональная нагрузка ложится не на межструктурные пространства (поры), ответственные за эффективность удержания частиц по размерам, а на сами структурные элементы, а именно, на их поверхность.

Доставка сорбата к мембранному сорбенту осуществляется вязким потоком жидкости, в то время как в классической колоночной хроматографии на смолах сорбат достигает активные центры преимущественно путем диффузии в гранулы сорбен-

та. Это обстоятельство обеспечивает существенно более высокие скорости процесса массообмена при сорбции на мембранах по сравнению с сорбцией на ионообменных смолах.

Наиболее значимая область применения мембранных микрофильтрационных сорбентов в фармбиотехнологии – удаление бактериальных эндотоксинов.

ООО НПП «Технофильтр» – российский производитель микрофильтрационных мембран и фильтроэлементов разработал и серийно производит микрофильтрационные мембраны марки **ММПА+** с размером пор 0,2 мкм, 0,45 мкм и 0,65 мкм и фильтроэлементы на их основе. Мембраны **ММПА+** изготовлены из полиамида (nylon66+6) с положительно заряженными функциональными группами. Эта особенность обеспечивает эффективное удаление за счет сорбции отрицательно заряженных эндотоксинов, включая бактерии, эндотоксины, вирусы.

Мембраны **ММПА+** устойчивы к механическим, химическим и термическим нагрузкам, биологически инертны. Благодаря природной гидрофильности быстро смачиваются водой и различными водными растворами, устойчивы в водных средах со значениями pH от 2 до 13, а также

в большинстве органических растворителей.

Одна из областей применения данных мембран - депирогенизации воды и водных растворов ЛС в фармбиотехнологии.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕПИРОГЕНИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ МЕМБРАН МАРКИ ММПА+ И МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОЭЛЕМЕНТОВ НА ИХ ОСНОВЕ

Первоначально авторами была исследована способность сорбировать мембранами модельный сорбат, а именно отрицательно заряженный краситель «Бромфеноловый синий», водный раствор которого при pH>2,4 имеет сине-фиолетовую окраску. Оказалось, что исследованные полиамидные мембраны **ММПА+** сорбируют БФС в дистиллированной воде в статическом и динамическом режиме, в количестве примерно 40 мкг/см² мембраны.

Незаряженные мембраны из поливинилиденфторида, нитроцеллюлозы, полиэфирсульфона краситель не сорбируют.

Если представить, что БФС однозначно моделирует БЭ, то простой расчет показывает, что 40 мкг/см² соответствует 4 10⁵ ЕЭ/см², что достаточно много.

Затем были проведены работы на натурном препарате – дистиллированной воде, содержащей БЭ, с целью



25-летний опыт в области разработки и производства микрофильтрационных мембран и фильтрующих элементов



ТЕХНОЛОГИИ МИКРОФИЛЬТРАЦИИ

НПП «Технофильтр» – ведущий российский производитель систем фильтрации для фармацевтических и биотехнологических процессов

ОСНОВНЫЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

- Препараты парентерального питания, кровезаменители.
- Офтальмологические растворы.
- В производствах биопрепаратов, вакцин, сывороток крови.
- Галеновые препараты.
- Фильтрация воды очищенной, воды для инъекций.
- Технологический воздух, пар, газы.

Фильтрационное оборудование

- Стерилизующие фильтры (мембранные фильтропатроны и капсулы) для жидких и газообразных сред.
- Фильтры для защиты стерилизующих мембран (глубинные и мембранные фильтропатроны и капсулы).
- Приборы для тестирования целостности мембранных фильтров Technoshek и Technoshek-mini.
- Корпуса-фильтродержатели для патронных фильтров.
- Фильтрационные установки.
- Лабораторное оборудование для фильтрации и концентрирования.

Система менеджмента качества сертифицирована. ГОСТ ISO 9001-2011 (ISO 9001:2008)

НПП «ТЕХНОФИЛЬТР» | Россия, 600016, г. Владимир, ул. Б. Нижегородская, 77
Тел.: +7 (4922) 47-47-41 | +7 (4922) 47-09-25 | E-mail: technofilter@mail.ru
www.technofilter.ru



придания этой воде фармакопейного статуса «воды для инъекций» и возможности рекомендации ее в качестве высокоочищенной воды для приготовления парентеральных препаратов.

В серии экспериментов, проведенных в ООО НПО «ЛАЛ-Центр» на модельных растворах высокой концентрации БЭ (препарат «пирогенал») в дистиллированной воде, было показано, что мембранный капсульный микрофильтр марки **КФМ.К+-0.2-К-60** (на основе мембраны ММПА+) с площадью 1440см², задерживал по меньшей мере 2х10⁶ ЕЭ, что составляет в пересчете около 103 ЕЭ/см² мембраны.

Другая серия экспериментов была проведена на реальной дистиллированной воде без специальной добавки БЭ.

Дистиллированную воду фильтровали через образцы положительно заряженных полиамидных мембран **ММПА+** в виде дисков диаметром 47 мм в течение нескольких суток до исчерпания гидродинамического ресурса мембраны и определяли содержание БЭ в воде до и после фильтрации.

Все три испытанных типа мембран с порами в диапазоне 0,2-0,65мкм работали удовлетворительно, сохраняя предпочтительную операционную норму БЭ в дистиллированной воде ниже 0,03 ЕЭ/мл вплоть до исчерпания 84-86% гидродинамического ресурса мембраны **ММПА+-020**, 74% мембраны **ММПА+-045** и 60% ресурса мембраны **ММПА+-065**.

Следующая серия аналогичных дистиллированной воде экспериментов была проведена на деионизованной обратноосмотической воде, полученной на лабораторной установке «УВОИ-МФ» (НПК «Медиана-фильтр», производительностью около 15 л/час.

Было показано, что вода, полученная на установке «УВОИ-МФ» при регулярной, ежедневной работе оборудования, соответствует требованиям к воде для получения инъекционных препаратов. Однако незначительные простои в работе установки приводят к превышению нормативов по БЭ.

Для согласования работы капсулы и установки предварительно был проверен гидродинамический ресурс капсулы **КФМ.К+-020-К-60**, который составил не менее 1500л., что удовлетворительно, т.к. позволяет проводить замену капсулы одновременно с заменой ионообменной смолы в установке, т.к. именно при этом объеме очищенной воды рекомендуется ее замена. Гидродинамический ресурс капсул **КФМ.К+-045-К-60** с мембраной 0,45 мкм и **КФМ.К+-065-К-60** с мембраной 0,65 мкм по высокоочищенной ОО-воде составил уже 6000 и 9000л соответственно.

Далее были проведены исследования по проверке сорбции БЭ в обратноосмотической воде на капсуле **КФМ.К+-045-К-60** с мембраной 0.45 мкм, для чего был приготовлен модельный раствор с содержанием БЭ 0,995-1,100 ЕЭ/мл. Установка «УВОИ-МФ» с капсулой **КФМ.К+-045-К-60** работала в течение 5 месяцев почти ежедневно, кроме выходных, по 1-5 часов.

В начале работы «УВОИ-МФ» без капсульного микрофильтра содержание БЭ в воде составляло величину >0.03<0.06 ЕЭ/мл, соответствующую «уровню тревоги». После установки финишной капсулы содержание БЭ в воде существенно снизилось (0,01 ЕЭ/мл) и сохранялось на этом уровне вплоть до 1500 л.

В дальнейшем в работе «УВОИ-МФ» на уровне объема фильтрата 1500 л произошел незапланированный простой.

В течение 12 дней установка не работала (при допустимом по инструкции перерыве не более 5 дней). И вот результат – содержание БЭ составило величину более 5 ЕЭ/мл. Как же справилась с этой катастрофой капсула? Капсула снизила содержание БЭ до 0,17, т.е. более чем в 25 раз, тем самым выполнив полицейскую функцию в экстремальной ситуации.

Итак, в случае перерыва в работе обратноосмотической установки по техническим причинам микрофильтры с мембраной **ММПА+** снижают содержание БЭ в десятки раз, что позволяет не испортить препарат и выиграть время для проведения корректирующих действий.

ВЫВОДЫ

Микрофильтрационные заряженные мембраны марки ММПА+ с размером пор в диапазоне 0,2-0,65 мкм и фильтроэлементы на их основе эффективно снижают содержание БЭ в дистиллированной и высокоочищенной обратноосмотической воде до «операционной нормы» (менее 0,03ЕЭ/мл). В случае технического сбоя и значительного превышения содержания БЭ в ОО-воде мембраны выполняют «полицейскую» функцию, позволяя сохранить качество препарата и выиграть время для проведения корректирующих действий.

В случае необходимости получить стерильную апиrogenную воду целесообразно использовать фильтроэлементы (патроны или капсулы) со стерилизующей мембраной ММПА+-0.2 мкм.

Все мембраны марки ММПА+ и фильтроэлементы на их основе (марки ЭПМ.К+ и КФМ.К+) прошли с положительным результатом токсикологические испытания в аккредитованной лаборатории. Мембраны и фильтроэлементы не токсичны, апиrogenны.

Фильтроэлементы на основе мембраны ММПА+-0.2 мкм рекомендованы для стерилизующей фильтрации растворов с контролем пирогенности. Подтверждена стерилизующая способность фильтропатронов по отношению к тест-микроорганизму *Brevundimonas Diminuta* при нагрузке не менее 107 клеток бактерий на 1см². Результаты тестирования на удержание бактерий приведены в соответствии с результатами неразрушающих методов контроля целостности фильтроэлементов (Руководство по валидации ТЕХНОФИЛЬТР).