

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» лютого 2024 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» лютого 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: «Біотехнології трипептидів з антиоксидантними властивостями»

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 2

ЯНИК Юлія Миколаївна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник ПЕНЧУК Юрій Миколайович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент Юлія ЦЕЙСЛЕР

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Я як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач

(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь магістр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології
і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

« 30 » жовтня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ЯНИК Юлії Миколаївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи: «Біотехнології трипептидів з антиоксидантними властивостями»

керівник роботи ПЕНЧУК Юрій Миколайович, к.т.н., доц.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від Облистопада 2023 року №913-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 05.02.2024

3. Вихідні дані до роботи штам *Saccharomyces cerevisiae* для отримання лікарського засобу з антиоксидантними властивостями для лікування хвороби Паркінсона

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Реферат, Вступ, РОЗДІЛ 1. Огляд літератури РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування вибору лікарського засобу. РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів. РОЗДІЛ 4. Специфікація обладнання отримання субстанції. РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції. РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва субстанції для лікарського засобу. РОЗДІЛ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу. РОЗДІЛ 8. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 9. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу. РОЗДІЛ 10. Опис лікарського засобу згідно АНД.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна та апаратурна схеми отримання цільового продукту глутатіон у форматі А₂ та технологічна й апаратурна схеми отримання готового лікарського засобу в таблетованій формі у форматі А₁

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	02.11.23р.- 15.11.23р	
	РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування вибору лікарського засобу.	15.11.23р.- 19.11.23р.	
	РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів	19.11.23р.- 22.11.23р.	
	РОЗДІЛ 4. Специфікація обладнання отримання субстанції.	22.11.23р.- 27.11.23р.	
	РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції.	27.11.23р.- 31.11.23р.	
	РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва субстанції для лікарського засобу.	31.11.23р- 02.12.23р.	
	РОЗДІЛ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу.	02.12.23р.- 12.12.23р.	
	РОЗДІЛ 8. Специфікація обладнання.	12.12.23р.- 17.12.23р.	
	РОЗДІЛ 9. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу.	17.12.23р.- 22.12.23р	
	РОЗДІЛ 10. Опис лікарського засобу згідно АНД.	22.12.23- 29.12.23р.	
	Оформлення апаратурних та технологічних схем	29.12.23р- 11.01.24р	
	Оформлення вступу та реферату	11.01.24- 14.01.24р.	

Здобувач

_____ Юлія ЯНИК
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ Юрій ПЕНЧУК
(підпис) (ім'я та прізвище)

Реферат

Кваліфікаційна робота присвячена виробництву препарату «Глутатіон», що являє собою трипептид з антиоксидантними властивостями та створений на основі штаму *S. cerevisiae* Sa-07346. Механізм роботи полягає в нейтралізації токсичних речовин, що реалізується за рахунок прямого контакту з активними формами кисню, які є причиною виникнення та розвитку окиснювального (оксидативного) стресу. Як наслідок, виявляється беззахисність організму перед низкою інфекцій. Подоланню цих інфекцій сприяють препарати на основі глутатіону, що використовуються при лікуванні й профілактиці багатьох захворювань, серед яких: синдром хронічної втоми, хронічні інфекції, захворювання нирок, печінки, астма, артрит, хвороба Паркінсона, хвороба Альцгеймера, онкологічні захворювання.

Розрахована потужність даного виробництва становить 205 кг/рік.

Технологічна схема отримання препарату «Глутатіон» складається з допоміжних робіт : зберігання та попередня обробка КР; відділення біомаси; концентрування та очищення глутатіону; сушіння; подрібнення; просіювання; пакування, маркування, відвантаження та знешкодження й переробка відходів.

Апаратурна схема отримання глутатіону включає: ділянки зберігання та підготовки КР; відділення біомаси що включає центрифугування та обробку КР 0,15 М розчином натрій хлориду, трихлороцтвовою кислотою та активованим вугіллям; ділянка концентрування та очищення що являє собою ультра- та мікрофільтраційну установки з подальшим сушінням та фасування й пакування. Ферментер обрано об'ємом 1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,65.

Кваліфікаційну роботу викладено на 167 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, десяти розділів, списку використаної літератури, 18 таблицок, 17 рисунків та графічної частини (4 креслень форматом А1).

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, глутатіон, окисно-відновлювальний стрес, біосинтез, поживне середовище, хвороба Паркінсона.

Abstract

The qualification work is devoted to the production of the drug "Glutathione", which is a tripeptide with antioxidant properties and was created on the basis of the strain *S. cerevisiae* Sa-07346. The mechanism of work consists in the neutralization of toxic substances, which is realized due to direct contact with active forms of oxygen, which are the cause of the occurrence and development of oxidative (oxidative) stress. As a result, the body becomes defenseless against a number of infections. Glutathione-based drugs, used in the treatment and prevention of many diseases, help to overcome these infections, including: chronic fatigue syndrome, chronic infections, kidney and liver diseases, asthma, arthritis, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and cancer.

The estimated capacity of this production is 205 kg/year.

The technological scheme of obtaining the drug "Glutathione" consists of auxiliary works: storage and preliminary processing of KR; separation of biomass; concentration and purification of glutathione; drying; grinding; screening; packaging, labeling, shipping and waste disposal and processing.

The equipment scheme for obtaining glutathione includes: areas of storage and preparation of KR; separation of biomass, which includes centrifugation and treatment of KR with a 0.15 M solution of sodium chloride, trichloroacetic acid and activated carbon; the concentration and purification section, which is an ultra- and microfiltration unit with further drying and filling and packaging. The fermenter was selected with a volume of 1 m³ with a filling factor of 0.65. The qualification work is presented on 167 pages of printed text, consists of an introduction, ten chapters, a list of used literature, 18 plates, 17 figures and a graphic part (4 drawings in A1 format).

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, glutathione, redox stress, biosynthesis, nutrient medium, Parkinson's disease.

Зміст

Вступ	7
1. Огляд літератури	9
1.1. Пептиди з антиоксидазною активністю в живих системах	12
1.2. Біотехнологічні особливості одержання глутатіону	19
1.3. Використання глутатіону в медичній практиці та косметології .	31
2. Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу	42
2.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу, галузей використання, потреби у ньому	42
2.2 Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу	45
2.2.1 Обґрунтування форми випуску лікарського засобу	45
2.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки лікарського засобу	53
2.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання субстанції	54
2.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині	60
3. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів	64
4. Специфікація обладнання отримання субстанції	73
5. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції	75
6. Контроль виробництва субстанції для лікарського засобу	79
7. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу	84
7.1. Розрахунок річної потужності виробництва лікарського засобу та кількості серій на рік	84
7.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовки персоналу, дезинфікуючих засобів, вентиляційного	

повітря)	87
7.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки	92
7.4. Обґрунтування вибору підготовки води	93
7.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання	95
8. Специфікація обладнання	123
9. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу	128
10. Опис лікарського засобу згідно АНД	142
Список використаних джерел	152

ВСТУП

Глутатіон (γ -глутаміл-цистеїніл-гліцин; GSH) є найпоширенішим низькомолекулярним тіолом, а GSH/дисульфід глутатіону є основною окисно-відновною парою в клітинах тварин. Синтез GSH з глутамату, цистеїну та гліцину каталізується послідовно двома цитозольними ферментами, γ -глутамілцистеїнсинтетазою та GSH-синтетазою. Переконливі докази показують, що синтез GSH регулюється головним чином активністю γ -глутамілцистеїнсинтетази, наявністю цистеїну та інгібуванням GSH зворотного зв'язку. Дослідження на тваринах і людях демонструють, що адекватне білкове харчування має вирішальне значення для підтримки гомеостазу GSH. Крім того, ентерально або парентерально вводять цистин, метіонін, *n*-ацетил-цистеїн і L-2-оксотіазолідин-4-карбоксилат є ефективними попередниками цистеїну для тканинного синтезу GSH.

Ризик розвитку хронічної гіпертонії зростає з віком. Серед інших факторів підвищений окислювальний стрес є загальновизнаним етіологічним фактором розвитку гіпертензії. Одночасне виникнення окисного стресу та гіпертензії може статися внаслідок зниження активності системи антиоксидантного захисту або підвищеного утворення активних форм кисню. Глутатіон є основним внутрішньоклітинним тіол-дисульфідним окисно-відновним буфером, який служить кофактором для багатьох антиоксидантних ферментів. Параметри, пов'язані з глутатіоном, змінюються при гіпертонії, що свідчить про наявність зв'язку між пов'язаною з глутатіоном окисно-відновною системою та гіпертензією. У цьому огляді ми надаємо механістичні пояснення того, як глутатіон підтримує артеріальний тиск. Більш конкретно, ми обговорюємо роль глутатіону в боротьбі з окислювальним стресом і підтримці біодоступності оксиду азоту шляхом утворення нітрозотіолів і нітрозогемоглобіну.

Тіольна група є потужним відновником, що робить GSH найпоширенішим внутрішньоклітинним маломолекулярним тіолом, що досягає мілімолярних

					НУХТ БТЕК 02.02.23 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Яник Ю.М.			Вступ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.					6	167
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

концентрацій у деяких тканинах. Як важливий антиоксидант, GSH відіграє важливу роль у детоксикації різноманітних електрофільних сполук і пероксидів за допомогою каталізу глутатіон-S-трансферазами (GST) і глутатіонпероксидазами (GPx). Важливість GSH очевидна завдяки широкому використанню в рослинах, ссавцях, грибах і деяких прокариотичних організмах [1]. Окрім детоксикації, GSH відіграє важливу роль в інших клітинних реакціях, включаючи систему гліоксалази, відновлення рибонуклеотидів до дезоксирибонуклеотидів, регуляцію експресії білка та генів через реакції обміну тіол:дисульфід [2].

Низькомолекулярні тіоли беруть участь у низці біологічних функцій, включаючи антиоксидантний захист, а також клітинну передачу сигналів і модуляцію імунної системи в еукаріот [1, 2]. У бактерій низькомолекулярні тіоли можуть сприяти формуванню та виживанню в несприятливих умовах, таких як протидія окислювальному стресу, а також модулюванню патогенезу [3], [4], [5]. Хоча роль низькомолекулярних молекул традиційно розглядається як регулятори окислювально-відновного процесу в бактеріях, спостерігається повільне, але постійне збільшення повідомлень, які вказують на те, що низькомолекулярні тіоли можуть змінювати бактеріальний патогенез більш прямими шляхами. Переважаючим низькомолекулярним тіолом у грамнегативних бактеріях є глутатіон (GSH; L-γ-глутаміл-L-цистеїніл-гліцин) з концентраціями в мілімолярному діапазоні [6]. Лише кілька грампозитивних бактерій, таких як *Listeria monocytogenes* і *Streptococcus agalactiae*, продукують GSH [7, 8].

Актуальність. Глутатіон відіграє важливу роль в антиоксидантному захисті, метаболізмі поживних речовин і регуляції клітинних подій (включаючи експресію генів, синтез ДНК і білка, клітинну проліферацію та апоптоз, передачу сигналу, продукцію цитокінів та імунну відповідь, а також глутатіонілування білка). Дефіцит глутатіону сприяє окислювальному стресу, який відіграє ключову роль у старінні та патогенезі багатьох захворювань (включаючи квашіоркор, судоми, хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона, захворювання печінки, муковісцидоз, серповидно-клітинну анемію, ВІЛ, СНІД, рак, серцевий напад, інсульт та діабет).

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Активні форми кисню (АФК), такі як гідроксильні радикали, супероксид-аніони та перекис водню, можуть спричинити окисне пошкодження клітинних біомолекул і перекисне окислення ліпідів у харчовій промисловості, коли АФК утворюються в надлишку або не виводяться після утворення [1, 2, 3]. В останні роки антиоксидантні пептиди з 2–6 амінокислотними залишками, такі як карнозин, глутатіон тощо, були зареєстровані як нові антиоксиданти для застосування у зміцненні здоров'я людини та переробці харчових продуктів [4, 5]. Антиоксидантні пептиди захищають клітини від окислювального стресу шляхом поглинання внутрішньоклітинних ROS [6], гасіння вільних радикалів [7], хелатування перехідних металів [8, 9] безпосередньо, а також покращення активності внутрішньоклітинних антиоксидантних ферментів, таких як супероксиддисмутаза, каталази, глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази тощо [10, 11, 12].

На даний момент сотні антиоксидантних пептидів були отримані та ідентифіковані з різних дієтичних джерел [13, 14, 15], але зв'язок між антиоксидантними властивостями та структурними характеристиками антиоксидантних пептидів досі не повністю вивчений. Дослідники зазвичай вважали, що деякі відновлюючі амінокислотні залишки в пептидах, такі як His, Met, Tyr, Cys або Trp, можуть безпосередньо очищати ROS [16]. Чен та ін. виявлено, що Pro-His-His була найактивнішою амінокислотою послідовністю серед 28 синтезованих антиоксидантних пептидів [17]. Сайто та ін. вважали, що трипептиди, що містять залишки Trp або Tyr на С-кінці, мають сильну активність поглинання радикалів [18]. Оскільки кількісні співвідношення структура-активність широко використовувалися для прогнозування високоактивних пептидів, таких як протимікробні пептиди, інгібуючі ангіотензин перетворювальний фермент, кілька дослідників виконали двовимірні або тривимірні моделі для розуміння структурних факторів, що контролюють

					НУХТ БТЕК 02.02.23 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.	Яник Ю.М.				Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ					
Перевір.	Пенчук Ю.М.							Літ.	Арк.	Акрушів
Реценз.									8	167
Н. Контр.								Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.									

активність антиоксидантних пептидів. Лі та ін. використав метод часткових найменших квадратів для побудови моделі антиоксидантних трипептидів із шістьма наборами дескрипторів амінокислот; вони дійшли висновку, що розділені дескриптори оцінки фізико-хімічних властивостей як дескриптори амінокислот є кращими, ніж гідрофобні, електронні, стеричні та водневі, вектори гідрофобних, стеричних та електронних властивостей, молекулярно-зважені цілісні інваріантні молекулярні, ізотропна площа поверхні–індекс електронного заряду і Z -шкала. Вони також виявили, що N-кінцева амінокислота трипептидів має бути високогідрофобною та низькоелектронною амінокислотою [19]. В іншій статті вони зібрали антиоксидантні пептиди з вільнорадикальних систем і використали математичні методи для виконання моделі. Вони виявили, що C-кінцеві регіони є більш важливими, ніж N-кінцеві регіони для прогнозування антиоксидантної активності, а C-кінцеві регіони з об'ємними гідрофобними амінокислотами пов'язані з антиоксидантною здатністю [20]. В даний час багато інших хемометричних методів, таких як штучні нейронні мережі, аналіз головних компонентів, випадковий ліс і машина опорних векторів, були використані для створення моделей біоактивних пептидів [21]. Наскільки нам відомо, є кілька повідомлень про застосування цих методів для розробки моделей для антиоксидантних пептидів.

Існують різні аналізи антиоксидантів *invitro* для оцінки активності пептидів. Ці аналізи приблизно поділяються на дві категорії на основі хімічних реакцій: одна – реакція переносу одного електрона, а інша – реакція переносу атома водню [5]. Активність поглинання радикалів 1,1-дифеніл-2-пікрилгідразилу, аналіз еквівалентної антиоксидантної здатності тролокса і аналіз антиоксидантної сили, що зменшує іони заліза, можна віднести до реакцій та інгібування низької щільності аутокислення ліпопротеїнів, здатність до поглинання кисневих радикалів і антиоксидантний параметр загального захоплення радикалів повинні належати до реакцій переносу атома водню. Існують також інші методи *invitro* для оцінки антиоксидантної здатності пептидів, такі як аналіз клітинної антиоксидантної активності [22, 23]. Проте реакція

переносу одного електрона є найбільш широко використовуваним методом оцінки антиоксидантної активності пептидів через її зручність і точність.

1.1. Пептиди з антиоксидазною активністю в живих системах

У більшості клітин два ферменти синтезу глутатіону кодуються окремими генами, які називаються *gshA* і *gshB* у прокариотів і *gsh1* і *gsh2* в еукаріотів [24]. Еволюційна історія генів біосинтезу глутатіону складна тим, що два гени на цьому шляху були отримані незалежно [25]. Ген, що кодує γ -глутаміл-цистеїнлігазу, швидше за все, виник у ціанобактерій і згодом був переданий іншим бактеріям і еукаріотам [26]. Потім еукаріоти та більшість бактерій, очевидно, залучили білок із суперсімейства ферментів, що захоплюють АТФ, для синтезу глутатіону з γ -глутаміл-цистеїну та гліцину [27]. У багатьох організмах активність γ -GCS (GshA), яка є лімітуючою стадією на шляху біосинтезу глутатіону, піддається інгібуванню за допомогою зворотного зв'язку глутатіон, щоб уникнути надмірного накопичення глутатіону [28].

Глутатіон життєво важливий для багатьох організмів, включаючи дріжджі [29], мишей [30], рослини [31] і ціанобактерії [32], але не для *Escherichiacoli* [33].

Мутанти *E. coli*, позбавлені глутатіону, не виявляють підвищеної чутливості до окисного стресу (H_2O_2 , гідропероксидкумолу, іонізуюче (гамма) випромінювання) у експоненціально зростаючій культурі [34], але культури стаціонарної фази більш чутливі до H_2O_2 , ніж дикого типу [35]. Проте штам *E. coli*, який надлишково продукує глутатіон, є більш стійким до гамма-опромінення, ніж відповідний штам дикого типу, не лише тому, що він має вищий вміст глутатіону сам по собі, а тому, що він має підвищену здатність синтезувати глутатіон під час опромінення [36]. Було також показано, що *E. coli* та *Salmonellatyphimurium* накопичують відновлений глутатіон у ростовому середовищі під час експоненціальної фази [37] для захисту клітин від зовнішніх токсичних сполук, таких як H_2O_2 , N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин, йодацетамід і важкі метали [38]. У мікробних системах (бактерії та дріжджі) існує

специфічний процес поглинання глутатіону для порятунку глутатіону з клітин, що лізують [39].

У дріжджів *S. cerevisiae* *gsh1* мутанти ростуть повільніше, ніж штам дикого типу в багатому середовищі, і можуть рости в мінімальному середовищі лише в присутності екзогенного глутатіону [20]. Навпаки, мутанти *gsh2* добре ростуть за відсутності GSH і не особливо чутливі ні до H_2O_2 , ні до *t*-бутилгідропероксиду. Ці результати вказують на те, що γ -глутаміл-цистеїн, який накопичується в штаммах *gsh2*, має деякі антиоксидантні властивості GSH [20].

У рослинах, де повна відсутність глутатіону викликає смерть на ембріональній стадії [40], мутанти з менш серйозним зниженням вмісту глутатіону життєздатні, але більш чутливі до багатьох біотичних і абіотичних стресів, включаючи Cd і Zn [41]. Біосинтез γ -глутаміл-цистеїну, який каталізується глутаматцистеїновою лігазою, відбувається в хлоропластах [39], які, ймовірно, походять від ціанобактерій [42], тоді як утворення глутатіону, яке каталізується глутатіонсинтетазою, може відбуватися як у хлоропластах, так і в цитозолі. Потім глутатіон транспортується до мітохондрій і ядра. У рослинах [43] і деяких ціанобактеріях [44] глутатіон також полімеризується у фітохелатин для хелатування металів, які координуються його численними тіоловими групами. Крім того, рослини, ціанобактерії та багато інших організмів [45] використовують багатий цистеїном білок металотіонеїн для хелатування металів.

У людей низькі рівні глутатіону і високі рівні ROS пов'язані з ВІЛ, цукровим діабетом і/або нейродегенеративними захворюваннями [46]. Ракові клітини з високим рівнем глутатіону (і активністю глутатіонредуктази, див. нижче) стійкі до деяких методів лікування, що викликають окислювальний стрес. Глутатіон також може реагувати з біоактивним газом оксиду азоту (NO) з утворенням S-нітрозоглутатіону (GSNO), форми зберігання цього газоподібного радикалу в тканинах [47]. Реакція NO з O_2^- з утворенням пероксинітриду (ONOO⁻) переносить утворений GSNO NO у позаклітинну рідину. Цей процес контролює фізіологічні рівні цієї сигнальної молекули в тканинах [48]. Ці властивості, ймовірно, пояснюють NO-подібні вазодилатаційні властивості GSNO, які

поділяють інші фармакологічні донори NO [49]. На додаток до глутатіону, клітини людини захищені від металевого стресу шляхом синтезу металозв'язуючого білка металотіонеїну [50], як і багато інших організмів.

Деякі грампозитивні бактерії, зокрема *Actinobacilluspleuropneumoniae* [51], *Listeriamonocytogenes* [52], *Pasteurellamultocida* [53], а також *Streptococcusagalactiae* та *Streptococcus thermophilus* [54], містять нещодавно відкритий біфункціональний фермент, названий GshF, який володіє обома Діяльністю GshA та GshB. N-кінцева послідовність GshF подібна до послідовності *E. coli*GshA, але C-кінцева послідовність більше схожа на D-Ala, D-Ala лігазу, ніж на будь-який відомий GshB [125]. Цікаво, що глутатіон не пригнічує ні активність GshA, ні активність GshB, і активність GshA/GshF є вищою порівняно з іншими організмами, і вона не інгібується GSH [55]. Понад 20 бактерій, переважно грампозитивних, мають *gshF* -подібний ген. Нещодавно ген *gshF* *S. thermophilus* був надмірно експресований у рослинах тютюну, кишковій паличці та дріжджових клітинах, щоб збільшити вироблення ними GSH, що становить біотехнологічний інтерес [56].

Завдяки його критичній ролі в антиоксидантній, детоксикації ксенобіотиків та шляхах імунної регуляції глутатіону широко використовується в харчовій, косметичній та фармацевтичній промисловості [57]. Поки глутатіон комерційно виробляється переважно штамми *Saccharomyces cerevisiae*, які загалом визнані безпечними. Попередні дослідження були зосереджені на надмірному виробництві GshA та GshB, але вихід і титр глутатіону у таких штаммах *Saccharomyces cerevisiae* залишаються низькими через інгібування GshA за принципом зворотного зв'язку [58]. Щоб подолати це обмеження, біфункціональний фермент GshF з грампозитивних бактерій був отриманий у *S. cerevisiae*, оскільки GshF нечутливий до інгібування за зворотним зв'язком. Отриманий штам продукував 240 мг/л глутатіону і виходом 4,3% і 25,6 мг_{глутатіону}/г_{глюкози} відповідно [59]. Однак це виробництво глутатіону *S. cerevisiae* конкурує з потребами в глюкозі інших галузей і призводить до високих витрат на виробництво [60]. Щоб заощадити витрати на виробництво, ми вважаємо, що цей

підхід використання GshF для виробництва глутатіону слід перевірити на ціанобактеріях, оскільки вони можуть виробляти високоцінні хімікати з сонячного світла та CO₂ замість глюкози.

Замість самого глутатіону деякі організми використовують його попередники або похідні [61], такі як γ -глутаміл-цистеїн у галобактерій і галофільних архей або трипанотіон у кінетопластидних паразитів [62]. Вони також можуть використовувати інші тіоли, наприклад, бацилітіол у грампозитивних Firmicutes [63] або мікотіол у багатьох актинобактеріях, таких як патоген людини *Mycobacterium tuberculosis* [64].

У деяких організмах, таких як мікобактерії [65], γ -глутамілцистеїновий пептид також використовується для синтезу ерготіонеїну, незвичайної тіогістидинбетаїнової амінокислоти (також відомої як 2-меркаптогістидинтриметилбетаїн), яка має потужні антиоксидантні та цитопротекторні дії [66]. Отже, в мікобактеріях існує конкуренція між ерготіонеїном і біосинтезом глутатіону. Ерготіонеїн має як тіолову (антиоксидантну), так і тіонову форму [67], причому останній таутомертіону є переважаючим при фізіологічному рН, що робить ерготіонеїн надзвичайно стійким до окислення молекулярним O₂ [68]. Його середній потенціал, +0,06 В, надзвичайно високий порівняно з типовими тіолами, включаючи GST (від -0,2 до -0,4 В) [69]. Ерготіонеїн може служити відновником через одноелектронну реакцію або як нуклеофільний реагент через двоелектронний обмін. Дослідження *invitro* показали, що ерготіонеїн може поглинати АФК, такі як синглетний кисень, гідроксильний радикал і, повільніше, перекис водню H₂O₂. Коли ерготіонеїн діє як прямий антиоксидант (відновник), він окислюється в дисульфід ерготіонеїну, сульфенову або сульфїнову кислоту ерготіонеїну, залежно від умов (рН та/або присутність тіолів, сила окислювачів тощо) [70]. EGT-сульфїнова кислота нестабільна і необоротно розкладається на L-герцинін або окислюється до сульфенової кислоти EGT [71]. EGT також може брати участь у хелатуванні двовалентних металів (Co, Cu, Hg, Se, Pt) і в радіаційних реакціях шляхом фізичної дезактивації високоенергетичних молекул через передачу енергії [72].

Деякі інші організми, такі як ціанобактерії (див. нижче) і певні гриби (*Neurosporacrassa*, дріжджі, що діляться, і плодові тіла грибів), здатні синтезувати ерготіонеїн [73], на відміну від рослин і тварин, які отримують його через ґрунт і їх раціон, відповідно [74]. Ерготіонеїн стабільний в організмі протягом тривалого часу після прийому, і розглядається як захист центральної нервової системи від захворювань [75]. Тварини виробили для нього високоселективний транспортер, спочатку відомий як транспортер карнітину (OCTN1) [76], а також званий транспортером ерготіонеїну через його в 100 разів більшу спорідненість до ерготіонеїну [77]. Генетичний аналіз мікобактерій [78] і споживання ерготіонеїну у ссавців показав, що ерготіонеїн захищає клітини від окисного [79], металевого та УФ [80] стресу. Таким чином, регуляторні органи визнали ерготіонеїн безпечним і можуть мати цінність як нутрицевтик і антиоксидант [81].

Повертаючись до глутатіону, деякі з його гомологів не мають залишку цистеїну і, отже, не мають відновних властивостей, наприклад офтальмат (L- γ -глутаміл-L- α -амінобутирил-L-гліцин) і норофтальмат (L- γ -глутаміл-L- аланіл-L-гліцин). Офтальмат (далі ОРН) і норофтальмат (НОРН) спочатку були виявлені в різних органах тварин (кришталік, мозок і печінка) [82], де вони розглядаються як біомаркери виснаження глутатіону, викликаного окисним стресом [83]. Було також виявлено, що ОРН накопичувався в стресових рослинах, дріжджах, бактеріях (*E. coli*) і ціанобактеріях (*Synechocystis* PCC 6803) [84]. Як і глутатіон, як ОРН, так і НОРН синтезуються ферментами GshA та GshB [85].

Ціанобактерії містять високу концентрацію внутрішньоклітинного глутатіону (2–10 мМ), головним чином у відновленій формі, і вони можуть накопичувати глутатіон, коли їм надходять амінокислоти-попередники синтезу (Glu, Cys або Gly), особливо Cys. [86], подібно до того, що спостерігалось в дріжджах *Saccharomyces cerevisiae* [87]. Такі ціанобактеріальні клітини з більш високим вмістом GSH були більш толерантними до тепла [88]. Подібним чином, одноклітинна модель *Synechococcus elongatus* PCC 7942, яка містить більше GSH, ніж інша одноклітинна модель *Synechocystis* PCC 6803, більш стійка до хромату, ніж остання ціанобактерія [89].

Активність GshA з модельних ціанобактерій *Anabaena* PCC 7120 [90] і *Synechocystis* PCC 6803 [6], а також GshB з *Synechococcus elongatus* PCC 7942, була підтверджена після їх виробництва в *E. coli*. Було виявлено, що GshA пригнічується як глутатіон, так і 1-бутіонінсульфоксиміном, як і більшість ферментів GshA. GshA, швидше за все, виник у ціанобактеріях і згодом був переданий іншим бактеріям та еукаріотам, які потім рекрутували GshB для синтезу глутатіону, як ціанобактерії [5, 6, 59, 60]. Підтримуючи цю гіпотезу, як гени *gshA*, так і *gshB* виявилися важливими в моделі ціанобактерії *Synechocystis* PCC 6803. Крім того, було показано, що мутант, збіднений GshB, чутливий до O₂ [61] і фотоокислювального стресу, кадмію і антибіотика гентаміцину [91].

Через його важливість для харчової, косметичної та фармацевтичної промисловості [92], глутатіон комерційно виробляється в основному шляхом ферментації *Saccharomyces cerevisiae*, що призводить до надмірного виробництва як GshA, так і GshB [93], або більш активного біфункціонального ферменту GshF [94]. Однак це виробництво глутатіон конкурує з потребами інших галузей промисловості в глюкозі. Щоб заощадити витрати на глюкозу, ми пропонуємо надмірне виробництво GshF в ціанобактеріях, щоб виробляти глутатіон із сонячного світла та CO₂. Для цієї мети особливо цікаві види *Arthrospira* (комерційна назва *Spirulina*), оскільки вони загальноновизнані безпечними.

Відповідно до збереження системи глутатіон від ціанобактерій до вищих еукаріотів, ціанобактерії можуть полімеризувати глутатіон у фітохелатин ((γ -Glu-Cys)₂₋₁₁-Gly) для хелатування металів на його тіолових групах [95], як рослини [109]. Ціанобактерії також синтезують багатий на цистеїн металохелатний білок металотіонеїн, як і багато інших організмів, включаючи рослини і люди [96].

Було також виявлено, що ціанобактерії синтезують γ -глутаміл-пептиди без тіолів (γ -глутаміл-Ala, γ -Glu-2-амінобутирил, γ -Glu-Leu, γ -Glu-iLeu, γ -Glu-Met, γ -Glu-Phe, γ -Glu-Thr), у відповідь на окислювальний стрес або інші умови уповільненого росту, які розглядаються як резервуари амінокислот у ціанобактеріях. Такі γ -глутамілдіпептиди, які відрізняються від γ -Glu-Cys, були ідентифіковані в еукаріотах, таких як *Saccharomyces cerevisiae* і мишах [98], що

підтверджує уявлення про те, що система глутатіону була еволюційно консервативною від ціанобактерій до вищих еукаріоти. У ссавців ці γ -глутамілові пептиди вважаються корисними для споживання людиною [99], але також беруть участь у запаленні, окисному стресі та/або метаболізмі глюкози, що призводить до кардіометаболічних захворювань та/або діабету [100].

Безтіольні аналоги глутатіону, γ -Glu-Ala-Gly (NOPH) і γ -Glu-2-aminobutyryl-Gly (OPH), накопичуються в ціанобактеріях, викликаних метаболічним і окислювальним стресом, викликаним глюкозою [61]. Було також виявлено, що OPH накопичується в стресових бактеріях, дріжджах і рослинах [101]. Було виявлено, що синтез OPH і NOPH в ціанобактерії *Synechocystis* PCC 6803 залежить від GshA і GshB [61], як це спостерігалось у ссавців. У ссавців OPH і NOPH розглядаються як печінкові та серцеві маркери виснаження глутатіону, викликаного окисним стресом [102]. Клітини ціанобактерій, які страждають від глюкози, накопичують не тільки OPH і NOPH, а й глутатіону. Таким чином, OPH і NOPH, ймовірно, утворюються в результаті виснаження цистеїну (а не глутатіону як такого), спричиненого його прискореним включенням у глутатіоні, щоб впоратися зі збільшеною потребою глутатіоні для детоксикації окислювачів і катаболітів глюкози.

Багато ціанобактерій синтезують велику кількість антиоксиданту ерготіонеїну, і риби, які певною мірою харчуються ціанобактеріями, таким чином забезпечуються великою кількістю EGT [103]. Це відкриття є цікавим, оскільки існує зростаючий попит на ерготіонеїн, а його вилучення та хімічний синтез із їстівних грибів має високу вартість і низький вихід. Біосинтез ерготіонеїну добре вивчений у *Mycobacterium* [104-110]. SAM-залежна метилтрансфераза EgtD перетворює гістидин в гістидинбетаїн. EgtA, глутаматцистеїнова лігаза, синтезує γ -Glu-Cys. EgtB додає тіолову групу γ -Glu-Cys до бічного ланцюга гістидинбетаїну, який перетворюється EgtC у метаболіт гістидинбетаїнцистеїнсульфоксиду. Цей проміжний продукт потім перетворюється на ерготіонеїну за допомогою EgtE, піридоксаль-5'-фосфат-залежного ферменту десульфуризації цистеїну [111]. Усі мікобактеріальні гени

синтезу ерготіонеїну були надмірно експресовані в *E. coli*, що призвело до виробництва EGT [112].

У ціанобактерій, що продукують ерготіонеїну, які обов'язково мають усі гени синтезу EGT, *egtB*, *egtC* і *egtD*, але не *egtE*, були ідентифіковані шляхом гомології послідовності з їх мікобактеріальними ортологами [113], і ми спостерігали в модельному виді *Synechocystis* PCC 6803 що саме глутатіону, а не його попередник γ -Glu-Cys, служить для синтезу EGT [114]. Ми пропонуємо використовувати *Synechocystis* PCC 6803 для ідентифікації можливо невідомих генів синтезу ерготіонеїну, а також молекулярної ролі та селективності/надмірності ерготіонеїну, глутатіону, ОРН та NORН у передачі сигналів та/або детоксикації окисного та метаболічного стресів. Крім того, ми пропонуємо збільшити експресію всіх генів синтезу ерготіонеїну як спробу створити ціанобактеріальну фабрику для дешевого, високого рівня виробництва ерготіонеїну із сонячної енергії та CO₂.

1.2. Біотехнологічні особливості одержання глутатіону

Глутатіон є основним представником коротколанцюгових пептидів, які характеризуються антиоксидантними властивостями. Віт також є важливою біоактивною речовиною, яка широко використовується у фармацевтичній та харчовій промисловості. Через сильне інгібування продукту на шляху біосинтезу глутатіон важко досягти високих рівнів внутрішньоклітинного вмісту, урожайності та продуктивності глутатіон. Нещодавно було виявлено, що нова біфункціональна глутатіон-синтетаза менш чутлива до глутатіон.

Для одержання глутатіону можна використовувати як рекомбінантні штами, так і штами одержані за допомогою мутацій. Наприклад, рекомбінантний штам кишкової палички *gshF* кодує біфункціональну глутатіонсинтетазу, а *Streptococcus thermophilus* був сконструйований саме для виробництва глутатіону. В технологіях одержання антиоксидантних пептидів велику роль відіграє наявність кисню в середовищі, а також правильна комбінація джерела живлення та ростових факторів. Наприклад, процес культивування *Saccharomyces cerevisiae* був оптимізований шляхом контролю розчиненого кисню, додавання амінокислот

і подачі глюкози. 36,8 мМ (11,3 г/л), що дозволило отримати швидкість продукції глутатіону на рівні 2,06 мМ/год, при додаванні амінокислотних попередників (75 мМ кожен).

Для виробництва глутатіону можна використовувати різні мікроорганізми: *S. cerevisiae*, *Candida utilis*, *Escherichia coli*.

S. cerevisiae і *C. utilis* є перспективними продуцентами, оскільки їх внутрішньоклітинний вміст глутатіону є відносно високим, і вони були детально вивчені та застосовані в промислових масштабах. Вміст глутатіону у штамів дикого типу зазвичай становить 0,1–1,0 %. Щоб посилити синтез глутатіону без генетичної модифікації, попередні дослідження були зосереджені на розведенні мутантів та оптимізації біопроектів.

Відома робота, в якій використовували *E. coli* Trans1-T1 для розмноження та маніпуляції з рекомбінантною ДНК. В даному дослідженні *S. cerevisiae* W303-1b (MAT α ade2-1 лей2-3, 112 його3-11,15 ура3-1 трп1-1) використовувався як штам-продуцент, який трансформувався для експресії рекомбінантних генів. Дріжджові трансформанти вирощували при 30° С у середовищі YPD. Таке середовище містить дріжджовий екстракт, пептон, двічі дистильовану воду та декстрозу 10 г/л дріжджового екстракту, 20 г/л триптоні та 20 г/л глюкози [115].

Три позитивні колонії з кожної сконструйовані *S. cerevisiae* штам культивували при 30° С у качалочних колбах, що містять 20 мл рідкого середовища YPD при перемішуванні при 250 об/хв протягом 18–24 год для первинної культури. Отриману культуру потім інокулювали у колбах 750 мл, що містили 50 мл рідкого середовища YPD, до оптичної густини на рівні значення 0,2 при 600 нм. Культури інкубували при 30° С при перемішуванні при 250 об/хв протягом додаткових 48 годин. Для подальшого збільшення виробництва глутатіону одноразово додавали амінокислотні попередники (5 мМ глутамінової кислоти, 5 мМ цистеїну та 5 мМ гліцину). Вони вносились після 36-годинного культивування. Сконструйований штам W303-1b/FGP, вирощений на чашці з агаром YPD, інокулював у рідке середовище YPD і культивував при 30° С із

перемішуванням при 250 об/хв протягом 18–24 годин. 10 % (об./об.) посівних культур переносили у ферментер.

В наступній роботі було використано такий продуцент як *C. utilis* ССТСС М 209298, ефективний штам, що продукує глутатіон. Штам культивували на поживному середовищі з 10 г/л дріжджового екстракту, 20 г/л пептону, 20 г/л глюкози та 20 % (в/в) гліцерину [116].

Зразки відбирали з ферментаційного бульйону кожні 3 години, а після центрифугування при 8000 г протягом 10 хв, супернатант і дріжджові клітини розділяли для подальшого визначення. Суху масу клітин визначали шляхом висушування вологих клітин при 70° С до постійної маси. Глутатіон екстрагували з вологих клітин на 40 % (в/в) етанолом при 30° С протягом 2 год. Потім суспензію центрифугували при 8000 г протягом 15 хв, а супернатант використовували для аналізу глутатіону методом ферментативної рециркуляції. Внутрішньоклітинний рН вимірювали з використанням 5-(6-карбоксіфлуоресцеїн діацетату сукцинімідилового ефіру як флуоресцентного зонда.

При використанні в якості продуцента рекомбінантного штаму *E. Coli* середовищем для первинних і вторинних посівних культур було середовище Лурія–Бертані (LB): триптон 10 г/л, дріжджовий екстракт 5 г/л, NaCl 10 г/л. Середовище для періодичного культивування з живленням містило: Na₂HPO₄ 15,12 г/л, KH₂PO₄ 3 г/л, MgSO₄ 0,2 г/л, CaCl₂ 0,01 г/л, NH₄Cl 3 г/л, глюкоза 8 г/л, 1 % (маса/об'єм) тіамін 0,5 мл/л і розчин мікроелементів 0,5 мл/л. Розчин мікроелементів містив у 3 М HCl: FeSO₄*7H₂O 80 г/л, NaMoO₄*2H₂O 2,0 г/л, MnSO₄*H₂O 2,0 г/л, AlCl₃*6H₂O 10 г/л, ZnSO₄*7H₂O 2,0 г/л, CuCl₂*2H₂O 1,0 г/л, CoCl₂ 4,0 г/л та H₃BO₄ 0,5 г/л. Концентрація подачі глюкози для періодичної культури з підживленням становила 500 г/л [117].

Первинну посівну культуру готували шляхом перенесення 1 мл вихідного гліцерину в 30 мл середовища LB у колбі на 250 мл та інкубували протягом 6 годин при 37° С і 220 об/хв. Вторинну посівну культуру проводили в 500-мл колбі, що містила 140 мл середовища, інокульованого 10 % (мас./об.) первинної

посівної культури та інкубували протягом 9 год при 37° С і 220 об/хв. Культивування з періодичним підживленням проводили в 5-літровому біореакторі, що містить 2,5 л середовища для періодичної культури з підживленням, інокульованим 140 мл вторинної посівної культури. Температуру та рН контролювали на рівні 37° С та 7,0 відповідно. Розчинений кисень підтримували на різних рівнях шляхом регулювання швидкості аерації та перемішування. Протягом перших 6,5 год ферментацію проводили періодично. Після вичерпання глюкози додавали концентрований розчин глюкози, щоб зберегти питому швидкість росту на рівні 0,3 год.⁻¹ щоб уникнути накопичення ацетату.

Також відома технологія, що передбачала використання як продуценту глутатіону молочнокислих бактерій. Наприклад, було використано як продуцент *Lactococcus lactis* NZ9000 використовувався як продуцент для експресії кількох ключових ферментів. *E. coli* MC1061 виступала донором плазмиди. Її культивували при 37° С у бульйоні LB, що містить 10 мкг/мл хлорамфеніколу, в аеробних умовах. *L. lactis* штами культивували в бульйоні M17, що містив 0,5 % глюкози в анаеробних умовах. Ферментаційне середовище також містило 0,2 М K₂HPO₄ з доведенням рН до 6,8 за допомогою 2 М розчину NaOH. Для виробництва глутатіону середовище було доповнено 10 мМ глютаміновою кислотою, L-цистеїном і L-гліцином, відповідно. Для біосинтезу глутатіону додатково подавався з 1 г/л L-метіонін. Штам *L. lactis* культивували в середовищі GM17, що містить 10 мг/мл хлорамфеніколу, при 30° С. Попередньо культуру клітин засівали у кількості 4 % в 100 мл свіжого середовища та культивували до досягнення оптичної щільності 0,4. Експресія генів була індукована за допомогою 1 нг/мл низину. Потім клітини додатково інкубували протягом 4 годин при 30° С для експресії глутатіону. Клітини збирали центрифугуванням при 10000 g протягом 5 хв, і осад ресуспендували в 50 мМ натрій-фосфатному буфері (рН 7,0).

Ще одне дослідження передбачало використання *C. Utilis* як продуценту глутатіону. У цьому дослідженні використовувався штам дріжджів з високою продукцією глутатіону *C. utilis* WSH 02–08. Посівну культуру, вирощували на

поживному середовищі, що містить, г/л: глюкозу - 20, пептон - 20 і дріжджовий екстракт 10 при рН 6,0. Культивування здійснювали в колбі на качалці при 200 об/хв при 30° С протягом 20 год. Середовище для культури у колбі містило, г/л: глюкоза - 30, сульфат амонію - 8, KH_2PO_4 - 3 і безводний MgSO_4 - 0,25.

Посівну культуру готували в колбі на 250 мл, що містила 50 мл середовища, протягом 20 год. Експерименти з культивуванням у колбах проводили у колбах на 250 мл, кожна з яких містила 50 мл середовища, після інокуляції 10 % (об'єм/об'єм) посівної культури. Умови культивування температури, швидкості перемішування та періоду росту були зафіксовані на рівні 30° С, 200 об/хв та 30 годин відповідно.

Середовище для періодичної культури містило, г/л: глюкоза - 30, дріжджовий екстракт 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 10, KH_2PO_4 - 3 і безводний MgSO_4 - 0,25. 10 % (об'єм/об'єм) посівної культури вносили у ферментер об'ємом 7 л з робочим об'ємом 5 л. рН автоматично підтримували на рівні 5,5 шляхом додавання 3 моль/л 3 М розчином NaOH . Швидкість аерації становила 5 л за хвилину, а швидкість перемішування регулювалася на рівні 300 об/хв [118].

Відомий спосіб культивування *C. utilis* з високою щільністю клітин для посиленого виробництва глутатіону. Була проведена серія періодичних ферментацій глутатіону, і було встановлено, що оптимальна початкова концентрація глюкози становить приблизно 26 г/л. Потім для посилення виробництва глутатіону із загальною концентрацією глюкози 150 г/л було використано анаеробне культивування з підживленням за різноманітних режимів підживлення. У цьому дослідженні використовувався штам *C. utilis* SZU 07-01, який був відібраний і сконструйований у лабораторії промислової мікробіології. Штам первинно підрощувався на поживному середовищі, складу: 20 г/л глюкози, 10 г/л дріжджового екстракту та 20 г/л пептону, рН 6,0. Посівну культуру вирощували в колбах на 500 мл з перегородкою для струшування 50 мл посівного середовища на качалці при 200 об/хв і 30° С протягом 20 год. Потім культуру використовували для виробничого культивування, і співвідношення посівної культури до ферментаційного середовища встановлювали на 10 % (об./об.) [28].

Біосинтез глутатіону здійснювали періодичним способом в анаеробних умовах з підживленням в 5-літровому ферментері з перемішуванням (Minifors 5 L, Швейцарія) з коефіцієнтом заповнення 0,6. Поживне середовище містило, г/л: глюкозу - 30, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ - 8, KH_2PO_4 - 3 і MgSO_4 - 0,25, FeSO_4 - 0,01, MnSO_4 - 0,01, ZnSO_4 - 0,003 та CuSO_4 - 0,001.

Ферментер був оснащений датчиками для контролю температури, рН і концентрації розчиненого кисню. Параметри культивування були наступні: 30° С і рН 5,5. Рівень рН автоматично підтримувався шляхом додавання 3 М NaOH. Концентрацію розчиненого O_2 підтримували на рівні 35 % від насичення, регулюючи вручну швидкість перемішування (300-900 об/хв); швидкість аерації та початкову швидкість перемішування підтримували на рівні 1,67 vvm та 300 об/хв відповідно. Періодичне культивування з підживленням розпочинали так само, як і періодичне культивування, за винятком того, що концентроване середовище подавалося, починаючи з 12 години. Кінцева сумарна кількість глюкози, що вносились, становила 600 г/л.

Експоненціальне підживлення є ще одним простим, але перспективним методом, який дозволяє клітинам рости з постійною питомою швидкістю росту. Порційне підживлення *S. utilis* SZU 07-01 проводили з експоненційним підживленням глюкозою після 12 год періодичної ферментації. Глюкоза повністю споживалася дріжджами за трьох конкретних темпів росту, і клітини росли майже експоненціально зі споживанням глюкози. Концентрація глутатіону зросла в культуральній рідині, а вміст внутрішньоклітинного глутатіону зменшився, що супроводжувалося покращенням біомаси. Серед трьох специфічних темпів росту кращий ріст клітин і виробництво глутатіону були досягнуті через 0,10 год⁻¹, а максимальна концентрація глутатіону досягла 672,6 мг/л, що було вищим, ніж через 0,08 год⁻¹ і 0,14 год⁻¹ [119].

Редагування геному *S. cerevisiae* для підвищення виходу глутатіону дозволило отримати штам *S. cerevisiae* YS86. Цей штам вирощували на поживному середовищі дріжджового екстракту з пептон-декстрозою (YPD): 10 г/л дріжджового екстракту, 20 г/л пептону, 20 г/л глюкози та рН 6,0.

Ферментаційне середовище містило, г/л: глюкозу - 30, дріжджовий екстракт - 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5, KH_2PO_4 - 6, K_2SO_4 - 3,6, MgSO_4 - 1,5, FeSO_4 0,008 і MnSO_4 - 0,008, а рН доводили до 6,0. Усі середовища стерилізували в автоклаві при 115 °С протягом 30 хв.

Для виробництва глутатіону штам *S. cerevisiae* тричі послідовно переносили на чашки з агаром YPD перед інокуляцією в посівне середовище. Одну колонію кожного штаму інокулюють у 15 мл рідкого YPD (а саме посівного середовища) у колб на 50 мл, а потім культивують при 25° С з перемішуванням при 180 об/хв протягом 12 год. Експерименти з культурою в колбах проводили в колбах об'ємом 250 мл, кожна з яких містила 200 мл рідкого середовища YPD після інокуляції 1 % об'єму посівної культури для досягнення оптичної щільності 0,5 при 600 нм.

Умови культивування під час біосинтезу були наступні: температура 25° С, швидкість перемішування 150 об/хв та період росту 36 год. Концентрацію глутатіону вимірювали з інтервалом 4 год протягом 36 год. Крім цього, культивування проводили в біореакторі на 20 л з коефіцієнтом заповнення 0,5.

Розчинений кисень контролювали на рівні 10 % від насичення за допомогою швидкості мішалки (200 об/хв). Температуру встановлювали на рівні 25° С, а рН підтримували на рівні 6 за допомогою 2 моль/л NaOH. Використовуваний буферний розчин називався, який містив сахарозу 171,14 г/л, $\text{MgCl}_2 \cdot 4,07$ г/л і малеїнову кислоту 2,32 г/л,

Також використовується періодичний процес із високою щільністю клітин *S. cerevisiae* у поєднанні з високоефективним включенням цистеїну для над синтезу глутатіону. Тому для забезпечення високої біомаси (96,1 г/л) була застосована стратегія живлення, заснована на дихальному коефіцієнті. Крім того, досліджували оптимальну концентрацію цистеїну та час додавання цистеїну. Низькі концентрації цистеїну на пізніх фазах бродіння призвели до відносно високого виходу включення близько 0,4 моль/моль і підтримували фізіологію культивованих дріжджів. Змінивши подачу цистеїну зі стандартного одноразового введення на безперервне додавання, можна запобігти часто спостережуваній

специфічній клітинній токсичності, викликаній високими концентраціями цистеїну, і збільшити вихід цистеїну до 0,54 моль/моль і вміст глутатіону до 1650,7 мг/л. були максимізовані відповідно. Розроблений процес був переведений з лабораторії в масштаб пілотної установки. Крім того, знижена клітинна специфічна токсичність дозволила розробити повторювану процедуру періодичної підживлення з відповідною продуктивністю щодо виходу включення цистеїну 0,40 моль/моль, біомаса 84,2 г/л і вміст глутатіону 1304,7 мг/л [120].

При такому способі культивування склад поживного середовища був наступний, г/л: NH_4Cl - 2,8, міоїнозит - 0,075, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,25, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,55. Крім того, додавали 4 мл/л розчинів вітамінів та 1 мл/л розчинів мікроелементів, г/л: розчин вітамінів (біотин - 0,625, кальцієва сіль пантотенової кислоти - 12,5, нікотинова кислота - 2,5, піридоксину гідрохлорид - 7,6, тіаміну гідрохлорид - 2,50), розчин мікроелементів в 0,01 М EDTA ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,10, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,50, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,50, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,10, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,175). Кінцеві концентрації глюкози та моногідрату мононатрієвої солі глутамінової кислоти становили, г/л: 50 та 10 відповідно. Рівень рН середовища регулювали за допомогою 40 мл/л 0,5 М калій- фосфатного буфера (рН 6,8) (K_2HPO_4 , KH_2PO_4). Це середовище також використовувалося як періодичне середовище, але містило 20 г/л глюкози та додатково 11 г/л дріжджового екстракту. Для поживного середовища концентрації солі, вітамінів і мікроелементів були збільшені в 6 разів, щоб забезпечити високу біомасу. Вміст калій-фосфатного буфера збільшили вдвічі, концентрацію глюкози та дріжджового екстракту довели до 400 г/л і 15 г/л відповідно. Мононатрієва сіль глутамінової кислоти не додавалась.

Штам і попередні культури *S. cerevisiae* Sa-07346 був отриманий від OrganobalanceGmbH в Берліні, Німеччина. Для приготування першої попередньої культури 0,1 мл кріосонови переносили у качалочну колбу та інкубували в WMIX протягом 24 год при 30° С і 180 об/хв. Другу генерацію культури висівали з оптичною щільністю 0,1 та інкубували за тих же умов.

Ферментацію з підживленням проводили в біореакторах об'ємом 5 л. Прикладну схему живлення для періодичного культивування з підживленням було розроблено з використанням керування зворотним зв'язком із замкнутим циклом на основі коефіцієнту дихання, щоб запобігти утворенню побічних продуктів, таких як гліцерин, етанол або ацетат, відомих як ефект Кребтрі, і гарантувати високий вихід біомаси. Спожиті компоненти поживного середовища контролювали впродовж всього періоду культивування. Розроблений режим харчування забезпечував культивування з високою щільністю клітин і використовувалася в усіх наявних періодичних культиваціях із живленням незалежно від аналізатора вихідних газів і без нього. Живлення починали при зниженні рівня глюкози. Протягом 48 год періодичного культивування з живленням рН регулювали до $5,5 \pm 0,1$ 25 % H_3PO_4 і 20 % аміаку відповідно, температуру встановлювали 30 ± 1 °С і насичення киснем було встановлено на 30 ± 5 % від насичення, по-перше, регулюється через швидкість мішалки, а по-друге, у разі додаткової потреби, через подачу чистого кисню [121].

Описується покращення біосинтезу окисленого глутатіону за допомогою інженерії окислювально-відновного метаболізму тіолу в *S. cerevisiae*.

Так *S. cerevisiae* YPH499 (ABC1193/NBRC 10505) (MATa *ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1*) був використаний як вихідний штам для генетичної трансформації. Кишкову паличку, як донора генетичного матеріалу, вирощували в середовищі Лурії–Бертані (10 г/л триптон, 5 г/л дріжджового екстракту та 5 г/л хлориду натрію) з додаванням 100 мкг/мл ампіциліну.

Дріжджові трансформанти культивували в дріжджовому екстракті-пептондекстрозі (YPD) (10 г/л дріжджового екстракту, 20 г/л бактопептону та 20 г/л глюкози) або YPD з додаванням 0,5 мкг/мл ауреобазидину А.

S. cerevisiae трансформанти культивували в 5 мл рідкого середовища YPD при 30° С зі струшуванням при 200 об/хв протягом 16–24 годин. Адекватний об'єм кожної культури інокулював у 20 мл рідкого середовища YPD для досягнення початкової ОП 600 значення 0,03. Потім культури вирощували при 30 °С зі струшуванням при 150 об/хв протягом 24 або 48 годин. Усі середовища для

культивування штамів, створених із штаму GCI, містили 0,5 мкг/мл ауреобазидину А [122].

Виробництво глутатіону дріжджами *S. cerevisiae* було спрямоване на дослідження найкращих умов біотрансформації для підвищення рівня внутрішньоклітинного глутатіону у зразках дріжджів використовуючи комерційно доступні пресовані та висушені форми.

Зразки хлібопекарських товарних дріжджів *S. cerevisiae* у пресованому вигляді, ідентифікований як Zeus (ZeusIndustriaBiologicaAlimentareSpa, Флоренція, Італія), і в висушеному вигляді, ідентифікований як Fermipanred (GB Ingredients, Casteggio, Pavia, Італія) були використані в дослідженні. Клітини дріжджів суспендували (5 % dsw) у розчині для біотрансформації, поміщеному у водопровідну воду, що містить глюкозу, цитрат натрію, сульфат амонію, K_2HPO_4 , сульфат магнію, цистеїн, гліцин, глутамінова кислота і в деяких випадках серин, по-різному комбіновані відповідно до детальної організації кожного експерименту, описаного нижче.

Дослідження біотрансформації проводили в колбах Ерленмейєра на 100 мл, кожна з яких містила 10 мл реакційної суміші, інкубували при 28° С і 200 об/хв. Аліквоти зразків збирали через 0 і 24 год.

Дріжджі пекарські пресовані зберігали при 48° С до закінчення терміну придатності (термін придатності 35–40 днів при охолодженій температурі) і біотрансформації, проведені на зразках дріжджів того ж віку, тобто 1, 10, 20 і 30 днів. З іншого боку, сухі дріжджі вважаються стабільними протягом одного року при кімнатній температурі, а проби відбирали протягом перших двох місяців терміну придатності.

S. cerevisiae є одним з найбільш вивчених мікроорганізмів, а разом з *S. utilis* є найбільш часто використовуваним мікроорганізмом у промислових масштабах для ферментативного виробництва глутатіону. Дотепер застосовувалося багато стратегій для підвищення виходу глутатіону, але всі використовували живі клітини дріжджів. Натомість це дослідження було спрямоване на дослідження найкращих умов для підвищення рівня

внутрішньоклітинного глутатіону у зразках пекарських дріжджів із застосуванням уже вирощених клітин у процедурі біотрансформації [123].

В роботі вказана середня оптимізація на основі елементного складу дріжджів для виробництва глутатіону в *S. cerevisiae*. У цьому дослідженні було досліджено оптимальний темп зростання виробництва глутатіону через *S. cerevisiae* Sa-07346. Для подальшого вдосконалення процесу бродіння таким чином, щоб він не залежав від партій, було вивчено вплив різних композицій середовища WMIX на виробництво біомаси та глутатіону. При цьому середовище бродіння регулювалося залежно від елементного складу дріжджів. Отримане ферментаційне середовище з певним хімічним складом призвело до високої щільності клітин у партіях із підгодівлею. Таким чином, він має потенціал для успішного застосування для інших процесів бродіння дріжджів з високою клітинною щільністю. Оскільки цистеїн є ключовим компонентом для виробництва глутатіону, були вивчені різні стратегії додавання цистеїну, і, нарешті, безперервне живлення цистеїном було застосовано на пізній стадії бродіння. Таким чином, концентрація глутатіону 1459 мг/л була досягнута безперервним введенням цистеїну. Склад поживного середовища був наступним, г/л: NH_4Cl - 2,8, міо-інозит - 0,075, MgCl_2 - 0,25, CaCl_2 - 0,1, MgSO_4 - 0,55. Крім того, асептично додавали 4 мл/л розчину вітамінів та 1 мл/л розчину мікроелементів, а саме: (біотин - 0,625, кальцій пантотенової кислоти сіль - 12,50, кислота нікотинова - 2,50, піридоксину гідрохлорид - 7,60, тіаміну гідрохлорид - 2,50), розчин мікроелементів в 0,01 М ЕДТА.

Кінцеві концентрації глюкози та моногідрату мононатрієвої солі глутамінової кислоти становили (г/л) 50 та 10 відповідно. рН середовища регулювали за допомогою 40 мл/л 0,5 М калій-фосфатного буфера (рН 6,8) (K_2HPO_4 , KH_2PO_4).

Це середовище також використовували як періодичне середовище, але воно містило 20 г/л глюкози та додатково 11 г/л дріжджового екстракту. Для кормового середовища концентрації солі, вітамінів і мікроелементів були збільшені в 6 разів, щоб забезпечити високу біомасу. 14 г/л цитрату спочатку

додавали для комплексоутворення Mg^{2+} та Ca^{2+} катіони. Крім того, додавання цитрату призводить до збільшення внутрішньоклітинного вмісту АТФ, що може бути корисним для АТФ-залежного генерування GSH. Вміст калій-фосфатного буфера подвоїли; концентрацію глюкози доводили до 400 г/л і використовували 15 г/л дріжджового екстракту, тоді як мононатрієву сіль глютамінової кислоти не враховували. Для подальшого покращення середовища з економічної точки зору потреба дріжджів у поживних речовинах була розрахована на основі наближених середніх значень елементного складу пекарських дріжджів, що є звичайним підходом для середнього розвитку.

Ці усереднені значення залежать від складу середовища, а також від віку клітин і швидкості росту, і, таким чином, служать орієнтовними значеннями. Для розрахунку компонентів середовища кінцева суха маса клітини була прийнята 100 г/л [124].

На основі цієї оцінки потреб дріжджів було застосовано скориговане поживне середовище, яке містило наступні солі, г/л: цитрат - 14, $(NH_4)_2SO_4$ - 70, міо-інозит - 0,45, $CaCl_2$ - 0,6, $MgSO_4$ - 3,6. Крім того, 24 мл/л розчину вітаміну B_6 - 6 мл/л розчину мікроелемента і 400 г/л глюкози додавали асептично, як зазначено вище. РН середовища регулювали за допомогою 120 мл/л 0,5 М калій-фосфатного буфера (рН 6,8). Додатково 2 мл 40 г/л $Fe(II)SO_4$ -розчин додавали асептично [125].

Трансформацію дріжджів проводили шляхом електропорації. Кишкова паличка DH5 вирощували при $37^\circ C$ середовищі LB, доповненому ампіциліном (60 мг/л), якщо необхідно. Дріжджові трансформанти відбирали на середовищі YPD, доповненому 150 мг G418/л, 125 мг Нуг/л або як 150 мг G418/л, так і 125 мг Нуг/л, і інкубували при $28^\circ C$ протягом 2–3 днів. Дріжджі культивували на середовищі, що містило (на літр): глюкози 35 г, дріжджового екстракту 10 г, $(NH_4)_2 SO_4$ - 2 г, KH_2PO_4 - 1,5 г, $MgSO_4$ - 0,5 г і біотин - 0,1 мг. Культивування проводили у 250 мл у качалочних колбах, що містять 100 мл середовища. Культури інокулювали 10 % 24-годинною культурою, приготовленою в

середовищі YPD, а потім інкубували при 30° С на роторному шейкері (200 об/хв) протягом 24 годин [126].

1.3. Використання глутатіону в медичній практиці та косметології

Великі дослідження в різних спеціальностях показали, що багато захворювань людини пов'язані з низьким рівнем глутатіону. Ці стани та причини включають емфізему, астму, алергічні розлади, токсичність ліків, метаболічні розлади, рак, хіміотерапію та синдром імунодефіциту, набутого вірусом імунодефіциту людини, серед іншого [127, 128]. Дослідження ролі добавок глутатіону при цих захворюваннях обмежені. Більшість досліджень було проведено для аутизму та муковісцидозу. [129, 130]

Меланін у шкірі людини є полімером різних індольних сполук, синтезованих з L-тироzinу шляхом меланогенезу Рапера-Мейсона, причому тирозиназа є ферментом, що обмежує швидкість. Співвідношення двох різних типів меланіну, які містяться в шкірі, чорно-коричневого еумеланіну та жовто-червоного феомеланіну, визначає колір шкіри [140]. Збільшення частки феомеланіну пов'язане зі світлішим кольором шкіри.

Вплив ультрафіолетового випромінювання є найважливішим фактором, що викликає небажану гіперпігментацію. Вирішальною клітинною подією є посилення активності тирозинази. Вплив ультрафіолетового випромінювання призводить до утворення в клітинах надмірної кількості активних форм кисню та азоту[141]. Пероральні антиоксиданти частково зменшують меланогенез, пригнічуючи ці вільні радикали.

Одним із найдавніших доказів зв'язку між тілами та шкірою є вплив екстракту людської шкіри, який містить активну сульфгідрильну сполуку. Він запобігає утворенню меланіну шляхом інгібування тирозинази. Гіперпігментація спостерігалася, коли ця сполука окислювалася та інактивувалася під впливом таких факторів, як тепло, радіація та запалення, з подальшою втратою інгібуючого ефекту на тирозиназу. Халпрін і Окавара надали фізичні та біохімічні докази того, що ця «сульфгідрильна сполука» була глутатіоном[142].

Роль глутатіону як агента, що освітлює шкіру, була випадковим відкриттям, коли освітлення шкіри було помічено як побічний ефект великих доз глутатіону[143]. Були запропоновані різні механізми гіпопігментного ефекту глутатіону, з яких найбільш важливим є інгібування тирозинази. Глутатіон може зменшити активність тирозинази трьома різними способами. Тирозиназа безпосередньо пригнічується через хелатування мідного сайту тіоловою групою.

По-друге, глутатіон перешкоджає клітинному переносу тирозинази до премеланосом, необхідної умови для синтезу меланіну [144].

По-третє, інгібування тирозинази здійснюється опосередковано через її антиоксидантну дію. Глутатіон зміщує меланогенез від еумеланіну до синтезу феомеланіну шляхом реакцій між тіоловими групами та допахіноном, що призводить до утворення кон'югатів сульфгідрил-допа[145].

Глутатіон має потужні антиоксидантні властивості. Ефект поглинання вільних радикалів глутатіону блокує індукцію активності тирозинази, спричинену пероксидами. Було показано, що глутатіон поглинає активні форми кисню, викликані ультрафіолетовим випромінюванням, що утворюються в клітинах епідермісу [146]. Недавнє дослідження пацієнтів з мелазмою відзначило значно вищі рівні ферменту глутатіонпероксидази у пацієнтів порівняно з контрольною групою, підтверджуючи роль окислювального стресу в мелазмі. [147] Виходячи з цих спостережень, потенціал глутатіону в лікуванні мелазми та гіперпігментації здається вірогідним [148].

Введення глутатіону: фармацевтичні препарати

Глутатіон в основному доступний у формі пероральних форм (таблеток, розчинів, сублінгвальних таблеток, сиропів і спреїв) і парентеральних форм (внутрішньовенних і внутрішньом'язових). Його також вводили інтраназальним і внутрішньобронхіальним шляхами. Для освітлення шкіри використовуються три основні шляхи введення: місцеве (креми, засоби для вмивання обличчя), пероральне (капсули та сублінгвальні/буккальні таблетки) та внутрішньовенні ін'єкції.

Глутатіон комерційно доступний у вигляді засобів для миття обличчя та кремів. Рандомізоване, подвійне сліпе, плацебо-контрольоване клінічне дослідження, проведене за участю 30 здорових філіппінських жінок віком 30–50 років, надало деякі докази на користь ефективності місцевого лосьйону 2% GSSG для тимчасового освітлення шкіри. Пацієнти були рандомізовані для застосування глутатіону у вигляді 2% лосьйону GSSG і лосьйону плацебо за протоколом розділеного обличчя двічі на день протягом десяти тижнів. GSSG було віддано перевагу перед глутатіоном, оскільки глутатіон нестабільний у водних розчинах. GSSG зрештою генерує глутатіон після шкірного всмоктування. Об'єктивно оцінювали зміни меланінового індексу, вологості рогового шару, гладкості шкіри, еластичності шкіри та утворення зморшок. Зменшення індексу меланіну за допомогою глутатіону було статистично значущим порівняно з плацебо. Області, оброблені глутатіоном, також мали значне покращення інших параметрів. Побічних ефектів препарату не повідомлялося. Глутатіон також став доступним у формі мила, засобів для миття обличчя та кремів [149]. Нещодавно був запущений хімічний пілінг на основі глутатіону. Незважаючи на відсутність доказів ефективності, виробники заявляють про покращення мелази, гіперпігментації та старіння шкіри [150].

Незважаючи на відсутність опублікованої літератури щодо ефективності та методології використання розчину глутатіону як мезотерапії, він широко практикується дерматологами для лікування мелази та інших меланозів обличчя. Він використовується як монотерапія або в комбінації з аскорбіновою кислотою, вітаміном Е, транексамовою кислотою тощо [151]. Хоча результати вважаються дуже хорошими, використання глутатіону як мезотерапії потребує більше доказів і опублікованих даних.

Пероральний глутатіон: фармакокінетика та метаболізм перорального глутатіону

Оральний глутатіон отримують з дріжджів (*Candida utilis*). Він продається як харчова або дієтична добавка, окремо або в поєднанні з вітаміном С, альфа-ліпоєвою кислотою та іншими антиоксидантами.

Долю перорально введеного глутатіону вивчали на моделях тварин і на людях-добровольцях. Основним місцем всмоктування є верхній відділ порожньої кишки. Циркулюючий глутатіон в основному очищається нирками [152]. Старші дослідження показали, що глутатіон всмоктується з кишечника без змін. Це ґрунтується на спостереженні відсутності подібного підвищення рівнів глутатіону в плазмі після введення складових амінокислот глутатіону порівняно з введенням капсул глутатіону [153]. Після всмоктування в плазму глутатіон повинен бути розщеплений на амінокислоти та повторно синтезований внутрішньоклітинно. Показано, що введення багатих на цистеїн попередників глутатіону, особливо N-ацетилцистеїну, підвищує рівень внутрішньоклітинного глутатіону [154].

Біодоступність перорального глутатіону у людей є суперечливим питанням. Дослідження одноразової дози, проведене *Witschima in.* у семи здорових добровольців повідомили про відсутність значного підвищення рівня глутатіону в плазмі протягом 270 хв. Проте Хаген і Джонс повідомили про підвищення рівня глутатіону в плазмі у чотирьох із п'яти суб'єктів після одноразової пероральної дози 15 мг/кг маси тіла. У цьому дослідженні рівень глутатіону в плазмі підвищився до 300% вихідного рівня через одну годину, а потім знизився приблизно до 200 % вихідного рівня протягом наступних трьох годин [155]. Неадекватне засвоєння глутатіону у людей порівняно з щурами пояснюється вищою активністю гамма-глутамілтрансферази в печінці людини. Це призводить до посиленого гідролізу глутатіону з низькими рівнями в сироватці крові.

Рандомізоване, подвійне сліпе, плацебо-контрольоване дослідження прийому пероральних добавок глутатіону (500 мг двічі на день протягом чотирьох тижнів) за участю 40 здорових дорослих добровольців не виявило жодних істотних змін у рівнях глутатіону в сироватці крові [156]. Інше рандомізоване, подвійне сліпе, плацебо-контрольоване дослідження було проведено за участю 54 дорослих, які застосовували пероральний глутатіон протягом шести місяців у дозі 250 мг або 1000 мг на день. Результати показали постійне підвищення рівня глутатіону порівняно з базовим рівнем. Були вищі рівні в групі високих доз

(збільшення на 30–35% проти 17% збільшення в групі низьких доз). Підвищені рівні повернулися до початкового рівня після місячного періоду вимивання [157]. В іншому дослідженні одноразовий прийом глутатіону в дозі 50 мг/кг маси тіла призвів до значного підвищення рівня зв'язаного з білком глутатіону в плазмі, але не депротейнізованої фракції, вимірної після двох годин прийому добавки [158]. Оскільки внутрішньоклітинні рівні глутатіону можуть підвищуватися лише після того, як його амінокислотні компоненти транспортуються через клітинну мембрану після депротейнізації, результати цього дослідження залишаються неоднозначними.

Таким чином, дослідження на людях, проведені до 2018 року, показали, що безрецептурні пероральні добавки глутатіону мають незначний вплив на підвищення рівня плазми у людей. Важливо взяти до відома той факт, що в обох дослідженнях використовувалася конкретна марка глутатіону, виготовлена компанією, що фінансувала дослідження [159, 160]. Таким чином, докази клінічно ефективної біодоступності перорального глутатіону у людей залишаються рідкісними та суперечливими.

Виробництво таблеток глутатіону з високими дозами є технічно складним, оскільки глутатіону має дуже високий електростатичний заряд, що дуже ускладнює обробку та інкапсуляцію глутатіону з високою силою [161]. Додавання кристалічної аскорбінової кислоти розсіює цей електростатичний заряд і дозволяє упаковувати таблетки до 750 мг препарату. Однак пероральні препарати можуть містити комбінацію вітаміну С, вітаміну Е, альфа-ліпоєвої кислоти, N-ацетилцистеїну, екстракту виноградних к162. Дозування та тривалість перорального прийому глутатіону не були стандартизовані з різними дозами, «рекомендованими» різними виробниками [163]. Ці рекомендації виробника не мають чіткої наукової основи. Пероральний глутатіон також доступний у вигляді сублінгвальних таблеток і розчинів. У той час як сублінгвальні препарати містять дуже низькі дози (50–100 мг), пероральні суспензії та розчини мають неприємний сірчаний смак і їх потрібно свіжоприготувати.

Таким чином, суперечки щодо ефективності перорального глутатіону продовжують створювати виклик для тих, хто його призначає.

Пероральні дієтичні добавки на основі глутатіону отримали статус «Загальноновизнаних безпечних» відповідно до розділу 201(s) федерального закону про харчові продукти, ліки та косметику Управління з контролю за продуктами й ліками США. [164] Немає обмежень щодо його доступності в США, Філіппінах і Японії. Нещодавно це стало доступним і в Індії.

Ефективність глутатіону як засобу для освітлення порожнини рота

Переглядаючи літературу, ми змогли знайти лише два дослідження, які оцінювали ефективність перорального глутатіону як засобу для освітлення шкіри. Рандомізоване, подвійне сліпе, плацебо-контрольоване дослідження з двома групами, проведене серед населення Таїланду, вивчало вплив перорально введеного глутатіону на індекс меланіну шкіри у шістдесяти здорових студентів-медиків. Суб'єкти були рандомізовані для отримання капсул глутатіону в дозі 500 мг/день у двох розділених дозах або плацебо протягом чотирьох тижнів. Основною досліджуваною кінцевою точкою було зниження індексів меланіну в шести різних місцях. Через чотири тижні індекси меланіну послідовно знижувалися на всіх шести ділянках у групі глутатіону. Було статистично значуще зниження в двох місцях у групі плацебо, а саме на правій стороні обличчя та на лівому передпліччі, яке опромінюється сонцем. Толерантність до глутатіону була відмінною. Обмеження цього дослідження включають короткий період дослідження, відсутність подальшого спостереження, відсутність вимірювання рівня глутатіону в сироватці крові та вибір когорти, яка складалася з молодшої та здорової популяції. Незважаючи на ці недоліки, це дослідження було першим, що продемонструвало сприятливий вплив перорального глутатіону на освітлення шкіри [165]. Інше відкрите дослідження, у якому використовували пастилки, що містять глутатіон, повідомило про покращення індексу меланіну шкіри, вимірюваного мексаметром. Вони використовували буккальні льодяники замість капсул, щоб підвищити та забезпечити постійну біодоступність. На нашу думку, сублінгвальний або букальний шлях, ймовірно, підвищить

біодоступність глутатіону краще, ніж пероральні таблетки або капсули. Порівняльне дослідження між цими двома шляхами введення є єдиним способом надати надійні докази в цьому відношенні.

Внутрішньовенне введення глутатіону

Через низьку біодоступність перорального глутатіону пропагуються внутрішньовенні ін'єкції для забезпечення бажаних терапевтичних рівнів у крові та шкірі та для «миттєвого» освітлення шкіри. Цікаво, що внутрішньовенні ін'єкції глутатіону використовуються роками, але немає жодного клінічного дослідження, яке б оцінювало його ефективність. Виробники внутрішньовенних ін'єкцій глутатіону рекомендують дозу 600–1200 мг для освітлення шкіри, яку слід вводити один-два рази на тиждень. Тривалість, протягом якої вони мають тривати, не уточнюється. Очікується, що внутрішньовенне введення забезпечить 100 % біодоступність глутатіону, що набагато більше, ніж при пероральному введенні. Однак досліджень, які б підтверджували цю гіпотезу, немає. Хоча внутрішньовенний глутатіон забезпечує набагато вищу терапевтичну дозу, що підвищує його ефективність, він також забезпечує менший запас безпеки через можливість токсичності передозування.

Немає доступних даних щодо ефективності внутрішньовенного введення глутатіону для освітлення шкіри. Дані про безпеку доступні, але їх небагато. У дослідженні на тваринах не було зареєстровано значних побічних ефектів у собак, яким вводили до 300 мг глутатіону на кг маси тіла щодня протягом 26 тижнів [166]. Дослідження на людях, у яких парентерально вводили глутатіон для лікування чоловічого безпліддя (600 мг/день глутатіону внутрішньом'язово протягом двох місяців) або вводили для посилення секреції інсуліну людям із порушенням толерантності до глюкози, не повідомляли про будь-які суттєві побічні ефекти [167]. Однак побічні ефекти внутрішньовенного введення глутатіону були задокументовані на Філіппінах, одному з провідних споживачів глутатіону. Управління з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів Філіппін оприлюднило позиційний документ із публічним попередженням щодо безпеки використання ін'єкцій глутатіону не за призначенням і побічних реакцій,

про які повідомляється при застосуванні внутрішньовенного глутатіону для освітлення шкіри [168]. Прихильники внутрішньовенного введення глутатіону припускають, що ці побічні ефекти можна віднести до інших добавок, присутніх у флаконах для ін'єкцій глутатіону, і ризик мінімізується, якщо замість нього використовується чистий глутатіон.

Ще однією проблемою, пов'язаною з чистим і якісним розчином глутатіону для внутрішньовенного введення, є надзвичайно висока вартість. Дешевші версії можуть бути підробленими, що може спричинити загрозу для життя. Враховуючи численні обмеження внутрішньовенного введення глутатіону, доцільно, щоб дерматологи утримувалися від введення таких ін'єкцій для освітлення шкіри, доки подальші випробування та дослідження високої якості не встановлять сприятливе співвідношення користі та ризику, яке виправдовує його використання. Нещодавній сплеск внутрішньовенного введення глутатіону в Індії спонукав ЗМІ та органи охорони здоров'я поширити обізнаність про його можливі ускладнення, хоча законодавча заборона залишається невловимою.

Інші можливі побічні ефекти глутатіону

Оскільки глутатіон є компонентом клітинного метаболізму людини, очікується, що побічні ефекти, які спостерігаються при прийомі пероральних добавок, будуть помірними, подібними до високих доз вітамінних добавок. Побічні ефекти внутрішньовенного введення глутатіону спекулятивно виникають через пряме надходження величезної кількості молекули в кровообіг. Інші потенційні несприятливі наслідки високих доз і тривалого прийому глутатіону включають:

- освітлення кольору волосся: логічно очікуваний ефект, оскільки колір волосся залежить від кількості та типу меланіну, який може бути змінений добавками глутатіону. Цей побічний ефект ще не був клінічно зареєстрований;
- після 10–12 доз внутрішньовенних ін'єкцій практикуючі лікарі спостерігали гіпопігментовані плями, особливо на ділянках, які опромінюються сонцем (неопубліковані спостереження). Їхній досвід свідчить про те, що

плямиста гіпопигментація, як правило, зникає після 30-40 доз завдяки рівномірному ефекту освітлення шкіри;

- виснаження природних запасів глутатіону в печінці: гіпотетично тривалий прийом будь-якої зовнішньої синтетичної сполуки може спонукати організм припинити власне виробництво, що призведе до залежності від синтетичних добавок [39]. Зменшення рівня глутатіону в печінці (місце зберігання глутатіону) може бути руйнівним для здоров'я. Цей гіпотетичний побічний ефект, хоча клінічно не повідомлялося досі, аналогічний пригніченню гіпоталамо-гіпофізарної осі, що спостерігається при тривалому застосуванні системних кортикостероїдів;

- загострення пептичних виразок, пов'язаних з *Helicobacter pylori*. Відомо, що *H. pylori* харчується макрофагами та нейтрофілами, які у великій кількості знаходяться в місці запалення, викликаного виразкою. Оскільки глутатіон може підвищити кількість і активність макрофагів, пептична виразка може загостритися [169];

- підвищена сприйнятливість до меланоми: теоретично тривале введення системного глутатіону перетворює еумеланін на феомеланін і може підвищити сприйнятливість до розвитку меланоми в довгостроковій перспективі [170].

Глутатіон як засобу для освітлення шкіри

Хоча немає опублікованих даних щодо внутрішньовенного введення глутатіону, результати трьох рандомізованих контрольованих досліджень, згаданих вище, надали докази ступеня 1b і 2b на користь ефекту освітлення шкіри місцевого та перорального глутатіону без значних побічних ефектів. Однак для отримання додаткової кількості доказів необхідні більш масштабні та довгострокові дослідження.

На даний момент немає публікацій, які підтверджують поліпшення будь-якого конкретного розладу гіперпигментації при застосуванні місцевого або перорального глутатіону. Новомодна концепція рекомендації глутатіону як допоміжного засобу (перорально, місцево або як мезотерапія) при мелазмі,

веснянках і постзапальнійгіперпігментації базується на його депігментуючих властивостях, детально описаних у. У дослідженні, проведеному для оцінки ролі окислювального стресу в мелазмі, рівні активності ферменту глутатіонпероксидази та інших прооксидантних параметрів були значно вищими в крові пацієнтів порівняно з контрольною групою. Це підтвердило роль окисного стресу в патогенезі мелазми[170]. Глутатіонпероксидаза знижує рівень глутатіону в сироватці крові та клітинах. Таким чином, логічно очікується, що добавки глутатіону пригнічуватимуть регуляцію меланогенезу та покращуватимуть мелазму. На основі поточного рівня доказів інші автори також запропонували використовувати пероральний або місцевий глутатіон як допоміжну терапію меланозу обличчя. Крім того, композиції для місцевого застосування, що містять S-ацилглутатіон (приблизно 0,1–10% за вагою) або S-пальмітоїлглутатіон (приблизно 3–9% за вагою), були змішані з іншими депігментуючими та антиоксидантними речовинами. підготовлений. Вони очікують на отримання патенту від Управління з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів США для використання для лікування мелазми, веснянок, лентиґінів і постзапальноїгіперпігментації. Однак слід зазначити, що глутатіон в основному впливає на меланінові індекси та ультрафіолетові плями на сонячних ділянках. Він впливає лише на новий меланогенез, а не на вже існуючу пігментацію [170].

Вважається, що зниження рівня глутатіону в клітинах і сироватці крові пов'язане з патогенезом аутоімунних і запальних дерматозів, які включають псоріаз, вітіліго, гніздову алопецію, поліморфні світлові висипання, вульгарні вугри тощо. Крім того, є достатньо доказів, що демонструють важливість рівня глутатіону в генезі меланоми та пов'язаних з нею пухлин шкіри.

Ліпосомальнийглутатіон складається з молекули, інкапсульованої у воді всередині жирової кульки з наміром «обдурити» травну систему інтерпретувати її як жирову клітину. Це запобігає його гідролізу, таким чином дозволяючи йому потрапляти в кров. Однак відсутність випробувань на людях, швидке розкладання ліпосом і проблеми з безпекою соєвого лецитину (ліпосомальний компонент) є перешкодою для його поточного використання.

S-ацетил-глутатіон складається з орального глутатіону, приєднаного до атома сірки. Він поглинається неушкодженим хіломікронами в кишечнику. Ацетильна група запобігає його окисленню і підвищує його плазmostійкість. Дослідження, проведені на мишах і фібробластах крайньої плоті людини, показали, що молекули S-ацетил-глутатіону поглинаються безпосередньо клітинами з подальшим перетворенням на глутатіон шляхом розщеплення ацетильного зв'язку всередині клітини. Це призводить до підвищення рівня внутрішньоклітинного глутатіону. Відомо також, що S-ацетил-глутатіон має противірусні та імуномодулюючі властивості [171]. Однак немає даних про людину, які підтверджують перевагу S-ацетил-глутатіону над звичайним глутатіоном щодо ефекту освітлення шкіри.

2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

2.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу, галузей використання, потреби у ньому

У системі обміну глутатіон бере участь у реалізації низки найважливіших фізіологічних процесів: детоксикації, біохімічних перетворень вітамінів С, Е, ліпоєвої кислоти та убіхінону, у регуляції тіол-дисульфідної рівноваги. Також приймає участь у процесі транспорту амінокислот, у регуляції вуглеводного, ліпідного, білкового та нуклеїнового обмінів. Глутатіон забезпечує підтримання гемоглобіну еритроцитів у відновленому стані та оптимального стану і функцій біологічних мембран, у регуляції клітинної проліферації, в обміні ряду ейкозаноїдів – простагландинів і лейкотрієнів. Він виступає, як резерв цистину в клітині, бере участь у регуляції функціональної активності лімфоцитів і забезпеченні імунної відповіді [71].

Він складається з амінокислот, а вони за своїми фізико-хімічними властивостями є кристалічними речовинами з високою температурою плавлення понад 250°C. Плавлення супроводжується розкладанням речовини. Амінокислоти добре розчинні у воді й нерозчинні в органічних розчинниках, чим подібні до неорганічних сполук [72].

Трипептидглутатіону представляє собою безбарвні кристали, температура плавлення 190 ° С, розчинний у воді, не розчинний в етанолі і ефірі. При кип'ятінні у воді утворює піролідин карбонову кислоту, цистеїн та гліцин, при взаємодії з нітропрусидом натрію в лужному середовищі дає червоне забарвлення. [73].

Глутатіон широко використовується у галузі виноробства, так як впливає на органолептичні показники рожевих винматеріалів та дозволяє знизити дозу внесеного діоксида сірки і тому сприяє отриманню рожевих вин з різними відтінками кольору [74].

					НУХТ БТЕК 02.02.23 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Яник Ю.М.			Розділ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ					
Перевір.		Пенчук Ю.М.						Літ.	Арк.	Акрушів
Реценз.									39	167
Н. Контр.								41		
Затверд.		Стабніков В.П.						Кафедра БТМ		

На основі глутатіону створений цілий ряд синтетичних антиоксидантів для захисту клітин від окисного стресу у вигляді біологічно активних добавок до їжі (БАД). Також глутатіон необхідний для ефективного захисту від рослинних патогенів, таких як *Pseudomonassyringae* і *Phytophthorabrassicae* [75].

В організмі людини нестача глутатіону веде до виникнення багатьох хвороб, таких як хвороба Паркінсона, тирозинемія I типу, отруєння алкоголем та інші. Експерименти *invivo* і *invitro* показали, що нестача глутатіону може привести до пошкодження мітохондрій і загибелі клітин, викликаних збільшенням числа токсичних форм кисню, що призводять до підвищення кількості вільних радикалів. Глутатіон здатний запобігати пошкодженню клітин за допомогою з'єднання з токсичними речовинами або їх метаболітами [76].

Механізм роботи полягає в нейтралізації токсичних речовин, що реалізується за рахунок прямого контакту з активними формами кисню або завдяки активації ферментів – глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази. Основними активними кисневими формами, які можуть ушкоджувати клітини організму, є: супероксид аніон (O_2^-), гідроксильна група (ОН), оксид азоту (NO), перекис водню (H_2O_2), вони становлять приблизно 5% всього кисню, який потрапляє до клітини. Інші 95% проходять процес окисного фосфорилування в мітохондріях.

Причиною утворення активних форм кисню та розвитку окиснювального (оксидативного) стресу може бути: забруднення навколишнього середовища, погане харчування, різні інфекції, лікарські препарати, вплив важких металів, травми, стреси. Як наслідок, виявляється беззахисність організму перед низкою інфекцій. Подоланню цих інфекцій сприяють препарати на основі глутатіону, що використовуються при лікуванні й профілактиці багатьох захворювань, серед яких: синдром хронічної втоми, хронічні інфекції, захворювання нирок, печінки, астма, артрит, хвороба Паркінсона, хвороба Альцгеймера, онкологічні захворювання [77].

На сьогоднішній день в Україні, згідно даних статистики, виготовляється препарат, який містить у своєму складі глутатіон «ГлутоксимR». Даний препарат

здатен проявляти антиоксидантну та детоксикаційну активність. Але невеликий вміст глутатіону у його складі зумовлює вузький спектр застосування при лікуванні та профілактиці багатьох захворювань в порівнянні з іншими препаратами, вміст глутатіону в яких значно вищий [72].

Також слід відзначити, що Україна ще являється імпортером препаратів на основі глутатіону *табл. 2.1*.

Таблиця 2.1

Препарати глутатіону на ринку України

Назва препарату	Форма випуску	Виробник товару	Вартість товару, грн.	Застосування
Glutathione	таблетки	США «SourceNaturals»	834,58	1 раз в день [78]
Glutathione (ТАД 600)	ін'єкційний розчин	Італія "BiomedicaFoscama"	2200	1-2 рази в день [79]
Мега-Глутатіон	капсули	«Мега ФармасьютикалЛтд», Німеччина	785,6	1 раз в день [80]
Гепавал	ін'єкційний розчин	Лаб. «ІтальяноБіохімікоФарма», Італія	938,41	1 раз в день [81]

Дані препарати володіють значною фармакологічною дією і застосовуються при профілактиці і лікуванні захворювань різної етіології, а особливо неврологічних (хвороба Паркінсона). Але, оскільки собівартість закордонних препаратів на основі глутатіону є досить високою, тому є необхідним скорочення його імпорту. Таким чином, можна вважати, що Україна повинна бути 100 % виробником субстанції глутатіон.

Проаналізувавши дані статистично-аналітичного довідника МОЗ України

(2020) слід зазначити, що найпоширенішими хворобами в Україні є неврологічні захворювання, розповсюдженість яких в останні роки зросла (4 913 890 хворих). А це свідчить про наявність в 11% населення країни неврологічної патології. За останні роки хвороба Паркінсона і синдром паркінсонізму стали чи не найпоширенішими формами рухової патології людини, що вражає понад 1% популяції людей віком понад 60 років. В Україні серед дорослого населення зареєстровано 22 470 хворих з цією патологією, що становить на 100 тис. населення – 58,1 випадків [82].

Для розрахунку приймаємо, що лише для 10% хворих населення України на хворобу Паркінсона, призначають глутатіонвмісний препарат, так як для профілактики та лікування цього захворювання застосовують й препарати іншого складу.

Узагальнені дані про потребу у препараті Глутатіон наведено у *табл. 2.2.*

Таблиця 2.2

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в Глутатіоні

Захворювання (профілактика)	Доза препарату на добу, мг	Кількість хворих	Річна к-сть препарату на 1 людину, кг	Загальна річна к-сть препарату, кг	Джерело інформації
Лікування хвороби Паркінсона	250	2247	0,0912	205	[2,10]

Примітка.* Статистику наведено станом на вересень 2020 р.

Враховуючи дані *табл. 2.2* вираховуємо кількість препарату, необхідну для хворих України протягом року. Оскільки одній хворій людині протягом року необхідно 0,0912 кг препарату, то загальна річна кількість Глутатіону для підтримання сталості організму при хворобі Паркінсона складатиме 205 кг.

Таким чином, для забезпечення хворих на хворобу Паркінсона в Україні Глутатіоном необхідно 205 кг препарату($G_{ГП}$).

2.2 Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу

2.2.1 Обґрунтування форми випуску лікарського засобу та допоміжних речовин

Лікарська форма — проміжний стан лікарських і допоміжних речовин у процесі виготовлення ЛЗ, який забезпечує оптимальний (з погляду фармакокінетики) терапевтичний ефект при мінімальній побічній дії та зручність при його застосуванні та зберіганні.

Існує декілька лікарських форм глутатіону як ЛЗ. В Розділі 1 було представлено такі форми як: таблетки, капсули та ін'єкційний розчин.

Таблетки (лат. *tabuletta*) — тверда лікарська форма, яка містить одну або більше дозу діючих речовин, одержана пресуванням певного об'єму часток та призначена для вживання всередину. Деякі таблетки ковтають цілими, деякі попередньо розжовують, інші розчиняють або диспергують у воді перед застосуванням чи залишають у роті, де діючі речовини вивільнюються та всмоктуються. Їх частки складаються з однієї чи більше діючих і допоміжних речовин, які зв'язують, розпушують, зволожують, забарвлюють, ароматизують тощо або змінюють «поведінку» лікарської форми у ШКТ. Зазвичай таблетки мають вигляд правильних круглих циліндрів, верхня і нижня поверхні яких плоскі чи випуклі, краї поверхонь можуть бути скошені, на поверхні можуть бути нанесені штрихи, риси для поділу, написи та інші позначення. Для вживання всередину можуть бути класифіковані як: без оболонки, покриті оболонкою, шипучі, розчинні, дисперговані, кишково-розчинні, з модифікованим вивільненням, для розсмоктування [1].

Переваги:

- міцність та довговічність;
- чіткість дозування;
- в одній таблетці може бути більш висока дозування;
- деякі таблетки можна жувати;
- їх можна розділити на кілька частин;

- таблетки значно дешевші у виробництві.

Недоліки:

- з моменту попадання таблетки в рот і рухаючись стравоходом, на неї впливає ціла низка руйнівних факторів. Тому частина поживних частин може просто не дійти шлунка;
- найчастіше таблетки мають неприємний смак або післясмак;
- повільно діють;
- передозування більш ймовірно таблетками [2].

Капсули (лат. *capsula* — букв. футляр, ящик). У фармації капсули — це тверда лікарська форма з м'якою чи твердою оболонкою, що містить одну дозу однієї або більше діючих речовин.

Оболонку капсули виготовляють з желатину чи інших речовин, які можуть утворювати плівку з певними властивостями. До складу додають допоміжні речовини, що виконують різні функції: пластифікатори, антимікробні консерванти, стабілізатори, барвники, ароматизатори та ін. Капсули призначені для перорального, рідше для ректального, вагінального та інших шляхів уведення. Залежно від місця дії капсули поділяються на: сублінгвальні, шлунково-розчинні, кишково-розчинні, ректальні, вагінальні. Окрему групу становлять капсули з регульованою швидкістю і повнотою вивільнення активної субстанції.

Капсули з модифікованим вивільненням мають у складі вмісту чи оболонки (або в обох одночасно) спеціальні допоміжні речовини, призначені для зміни швидкості або місця вивільнення діючих речовин. Вони можуть бути виготовлені покриттям твердих або м'яких капсул кислотостійкою оболонкою або наповнені гранулами чи частками, покритими оболонками.

Також капсули бувають тверді (лат. *capsulaeduraeoperculatae*) або м'які (лат. *capsulaemolles*). Оболонка твердих складається з двох попередньо виготовлених частин, в яку інкапсулюють діючу речовину (речовини) зазвичай у твердому стані. Тверді капсули заповнюють після того, як цілком пройде весь технологічний процес формування, вони набудуть відповідної пружності й

стануть твердими. М'які капсули одержали свою назву тому, що наповнювач вміщується у м'яку, ще еластичну оболонку в процесі їх виготовлення. Потім їх піддають подальшим технологічним процесам, у результаті яких початкова еластичність оболонки може втрачатися частково або повністю. Такі капсули мають цілісну (суцільну) оболонку, що буває еластичною або жорсткою. Іноді до складу оболонки м'яких капсул входить діюча речовина.

Так, за кордоном серед дозованих ЛП промислового виробництва препарати в капсулах займають 3-тє місце після таблеток і ампулованих розчинів.

Інтерес до желатинових капсул пояснюється їх високою біодоступністю і цілою низкою переваг: вони мають гарний зовнішній вигляд; легко проковтуються; проникні для травних соків; лікувальна дія вмісту виявляється через 5–10 хв після введення; оболонка з желатину непроникна для летких рідин, газів, кисню повітря (що дуже важливо для зберігання засобів, які легко окиснюються); вміщення в оболонку зручне для відпуску речовин, що мають фарбувальний ефект або неприємний смак і запах, оскільки її руйнування і вивільнення діючих речовин відбувається в певному відділі травного тракту. Тому така лікарська форма ЛЗ дуже перспективна для застосування в педіатрії та геронтології. Різноманітний асортимент капсульованих препаратів виготовляють за кордоном. Капсулюють лікарські речовини різної хімічної природи і спрямованості дії, включаючи препарати рослинного походження, вітаміни, антибіотики та їх суміші в різноманітних комбінаціях з іншими речовинами, снодійні, протисудомні, транквілізатори, антигельмінтні, проносні, діуретики, анальгетики, складні комбінації вітамінів з мікроелементами. Особливо багато комбінацій ацетилсаліцилової кислоти з різними речовинами (аскорбіновою кислотою, атропіном, барбітуратами, камфорою, фенацетином, ефедрином та ін.). Крім ЛП, у К. інкапсулюють різні харчові добавки, препарати для ветеринарії, косметичні засоби (ароматизатори для ванн, олії тощо).

Різновидом капсул є спансула — тверда капсула для внутрішнього застосування, яка може містити суміш гранул, мікродраже, мікрокапсул різного типу, здатних розчинятися у певному середовищі з різним часом вивільнення

діючої речовини (речовин). В Україні номенклатура капсульованих препаратів знаходиться на стадії розвитку, розширюючись з кожним роком.

Ректальні капсули (лат. *capsulae rectales*) — дозована лікарська форма, що складається з діючих і допоміжних речовин, вміщених у м'яку оболонку, і призначена для ректального застосування. Особливе місце серед лікарських форм ректального призначення займають желатинові капсули ректальні, які мають високу біодоступність. Ректальні капсули мають форму витягнутої краплі об'ємом 0,6–1,8 мл і складаються з тонкого шару желатину, поверхня якого при змочуванні водою ослизнюється, що полегшує їх застосування. Такі капсули, на відміну від жирових супозиторіїв, стійкі в умовах підвищених температур (45–50 °С), значно швидше вивільняють лікарські речовини, не спричиняючи подразливої дії на слизову оболонку кишечника. Желатинова оболонка захищає лікарські речовини від впливу факторів навколишнього середовища і має переваги перед супозиторіями, оскільки в ній можуть капсулюватися масляні розчини, суспензії, рослинні екстракти і т.д. Вивільнення лікарської речовини відбувається швидше і легше, ніж із супозиторіїв, оскільки під впливом слабоосновного секрету (рН 7,3–7,6) прямої кишки желатинова оболонка набухає й у такому стані навіть слабкої перистальтики стінки прямої кишки достатньо для її розриву у місці шва і вивільнення вмісту [3].

Капсули дають змогу відмінно вирішити проблему створення складних продуктів із модифікованим вивільненням. Шляхом змішування різних гранул або мінітаблеток з покриттям можна отримати безліч складних та точних моделей вивільнення лікарського засобу.

Порівняно з іншими твердими пероральними лікарськими формами капсули також пропонують найпростіший спосіб отримання комбінацій фіксованих доз несумісних лікарських речовин. Без проблем стабільності.

Це дуже актуально для пацієнтів, яким призначають комплексне лікування, що потребує введення кількох активних фармацевтичних інгредієнтів. Комбіновані препарати значно підвищують прихильність пацієнтів до лікування». Основним обмеженням щодо капсул є їх розмір, оскільки вищі

доза комбінованих ліків потребують формування великих капсул. На щастя, капсули, як правило, гладкі і мають подовжену форму, тому навіть більшого розміру їх відносно легко проковтувати порівняно з деякими традиційними твердими лікарськими формами.

Проте деякі пацієнти вважають, що великі капсули важко ковтати. Це може створити проблеми із дотриманням пацієнтом режиму лікування. Вирішення цього питання — поточний виклик для вчених.

Ще одним недоліком є те, що традиційно виробництво капсул було трохи дорожчим, ніж таблеток. Це пов'язано з вартістю оболонки капсули та трохи повільнішим процесом виробництва порівняно з таблетками. Однак наповнення капсул поступово стає дедалі ефективнішим. У свою чергу, деякі етапи виробництва таблеток, такі як грануляція і покриття, також можуть займати досить багато часу. У результаті в дедалі більшій кількості випадків капсули стають більш економічним рішенням, ніж таблетки.

Важливий аспект полягає й у тому, що капсули, як правило, більш чутливі до високої температури і більш високої вологості порівняно з таблетками. Однак ця проблема вирішується з появою нових матеріалів для їх оболонки, які менш сприйнятливі до таких проблем і допомагають максимально збільшити термін придатності» [4].

Переваги:

- як правило, капсули менші за розміром, що полегшує їх ковтання;
- мають гарний вигляд;
- швидко розчиняються та діють;
- не мають неприємного смаку та запаху;
- мають більш високу абсорбцію;
- за бажанням капсулу можна розкрити і витягти порошкоподібну «начинку». Вона також не має ні смаку, ні запаху, що полегшує її прийом.

Недоліки:

- капсули мають менший термін придатності;

- для досягнення найбільшої дози або широкого складу виробники змушені збільшувати розмір капсули, що завжди зручно під час прийому;
- містять нижчі дози ліків;
- мають вищу вартість [2].

Наступною лікарською формою глутатіону є ін'єкційний розчин.

Ін'єкційні лікарські засоби - це стерильні розчини, емульсії або суспензії. Розчини для ін'єкцій повинні бути прозорими і практично вільними від частинок. Емульсії для ін'єкцій не повинні виявляти ознак розшарування. Суспензія для ін'єкцій при збовтуванні повинна бути досить стабільною для того, щоб забезпечити необхідну дозу при введенні.

Класифікація ін'єкційних розчинів

Лікарські засоби для парентерального застосування класифікуються таким чином:

- ін'єкційні лікарські засоби;
- внутрішньовенні інфузійні лікарські засоби;
- концентрати для ін'єкційних або внутрішньовенних інфузійних лікарських засобів;
- порошки для ін'єкційних або внутрішньовенних інфузійних лікарських засобів;
- імпланти.

Внутрішньовенні інфузійні лікарські засоби - це стерильні водні розчини або емульсії з водою як дисперсійна середа; повинні бути вільні від пирогенов і звичайно ізотоничні крові. Призначаються для застосування у великих дозах, тому не повинні містити ніяких антимікробних консервантів.

Концентрати для ін'єкційних або внутрішньовенних інфузійних лікарських засобів - це стерильні розчини, призначені для ін'єкцій або інфузій. Концентрати розводять до вказаного об'єму і після розведення отриманий розчин повинен відповідати вимогам, що пред'являються до ін'єкційних лікарських засобів.

Порошки для ін'єкційних лікарських засобів являють собою тверді стерильні речовини, вміщені в контейнер. При струшуванні з вказаним об'ємом відповідної стерильної рідини вони швидко утворюють або прозорий, вільний від частинок розчин, або однорідну суспензію. Після розчинення вони повинні відповідати вимогам, що пред'являються до ін'єкційних лікарських засобів .

Імпланти являють собою стерильні тверді лікарські засоби, що мають відповідні для парентеральної імплантації розміри і форму, і вивільнюють діючі речовини протягом тривалого періоду часу. Вони повинні бути упаковані в індивідуальні стерильні контейнери.

Переваги:

- забезпечення швидкого терапевтичного ефекту;
- можливість виготовлення ліків для конкретного хворого з урахуванням ваги, віку, зростання і т. д. по індивідуальних прописах;
- можливість точно дозувати лікарська речовина;
- лікарські речовини, що вводяться поступають в кров'яне русло, минуя такі захисні бар'єри організму, як шлунково-кишковий тракт і печінка, здатні змінювати, а іноді і руйнувати лікарські речовини;
- можливість ввести лікарські речовини хворому, що знаходиться в несвідомому стані;
- стислість часу між приготуванням і використанням лікарського засобу;
- можливість створення великих запасів стерильних розчинів, що полегшує і прискорює їх відпуск з аптек;
- відсутність необхідності корекції смаку, запаху, кольору лікарської форми;
- більш низька вартість в порівнянні з препаратами промислового виробництва.

Недоліки:

- при введенні рідин через пошкоджене покривало шкіри в кров легко можуть потрапити патогенні мікроорганізми;

- разом з розчином для ін'єкцій в організм може бути введений повітря, зухвале емболію судин або розлад серцевої діяльності;
- навіть незначні кількості сторонніх домішок можуть вплинути шкідливий чином на організм хворого;
- психоемоціональний аспект, пов'язаний з хворобливістю ін'єкційного шляху введення;
- ін'єкції ліків можуть здійснюватися тільки кваліфікованими фахівцями [5].

Хвороба Паркінсона є досить специфічною та потребує особливого догляду за пацієнтом. Сучасна медицина не дає точної відповіді як зупинити хворобу Паркінсона, лікування як такого немає. Але є низка заходів щодо запобігання, профілактики, поліпшення стану та уповільнення прогресії. При захворюванні уражається екстрапірамідна система, чорна речовина і базальні ядра, а також деякі інші ділянки головного мозку, що призводить до безповоротної загибелі нейронів мозку.

Супроводжується такими симптомами:

- Тремор;
- Порушення, ускладнення та уповільнення рухової активності та здібностей пацієнта;
- Підвищений тонус тіла та ригідність мускулатури;
- Порушення рівноваги;
- Зміна мови та міміки;
- Депресія;
- Деменція, порушення пам'яті, неухважність уваги;
- Порушення режиму сну;
- Проблеми зі шлунково-кишковим трактом;
- Загальне зниження працездатності та можливості до самообслуговування.

Оскільки дана категорія пацієнтів має проблеми з пам'яттю та тремор кінцівок, то ін'єкційний розчин не підходить саме для домашніх умов, оскільки

тут потрібна допомога спеціального медичного персоналу. Не всі пацієнти мають можливість такого обслуговування. Дана хвороба на сьогоднішній день невиліковна, тому в основному пацієнти перебувають на домашньому лікуванні.

Що стосується таблеток чи капсул то більша перевага надається саме таблеткам, тому що діюча речовина не втрачає свої лікувальні властивості на шляху до шлунково-кишкового тракту, оскільки оболонка захищає від подразників. Таблетка втрачає певний відсоток діючої речовини, що говорить про те, що навіть при тому, що капсула має менше дозування – обидві форми ЛЗ виходять на однаковий рівень. Виробництво капсул дорожче, ніж таблетована форма і розмір таблеток можна регулювати, чого не можна сказати про капсули. З огляду на фізіологічні особливості пацієнтів формою ЛЗ для виробництва глутатіону обрано саме таблетки.

2.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки лікарського засобу

Вторинне фасування таблеток – це пакування готових препаратів та БАДів в блістери, баночки, контейнери і флакони.

Медичне пакування використовують для зберігання сухих, рідких, сипких, гранульованих, в'язких речовин. Тара має бути виготовлена з екологічно чистих матеріалів, у яких не міститься шкідливих чи небезпечних для життя та здоров'я людини домішок. Вибирати упаковку необхідно виходячи з хімічного складу препаратів, які будуть у ній.

Завдання упаковки — протягом тривалого часу зберегти лікувальні якості фармацевтичних препаратів, захистити від впливу вологи, температурних змін, механічної дії. У тих випадках, коли лікарський препарат є чутливим до ультрафіолетового випромінювання, його упаковка повинна бути підібрана таким чином, щоб не пропускати світло. Не менш важливою є зручність користування і те, яким чином лікарський препарат буде витягнутий. Тому, крім кришок, пляшечки та флакони постачають спеціальними піпетками, крапельницями, дозувальними ложками, стаканчиками. Важливо, щоб тара, в якій зберігаються

фармацевтичні препарати, закривалася герметично, тому в ковпачках до пляшечок, баночок та флаконів є спеціальні вкладиші та прокладки.

Тара із пластику та скла оптимально підходить для зберігання медичних препаратів. І той, і інший матеріал відповідає санітарним нормам та гігієнічним вимогам [6].

Пропонується 3 варіанти фасування:

- **Жорстке:** Контейнери та флакони зі скла, полімеру. Підходять для пакування твердих ліків, порошків, таблеток, капсул, рідин. Це найнадійніший варіант фасування, що не боїться транспортування і зберігання в практично будь-яких умовах. Верхня частина твердих упаковок закривається кришками з механізмом закручування або на засувках. Таблетки не запаковуються окремо, що дозволяє досягти компактного зберігання великих партій. Флакони можуть додатково упаковуватися в коробочки.

- **Напівжорстке:** Робиться із пластику, картону, фольги. Напівжорстка упаковка являє собою блістери з окремими комірками для кожної таблетки або капсули. Картонні або пластикові задні частини щільні, додатково захищаються шаром фольги. Їх легко надірвати, щоб дістати потрібне дозування ліків. Лицьова частина блістерів з прозорого пластика, за нею відстежується кількість прийнятих таблеток. Блістери з напівжорсткої упаковки фасуються в коробки з назвою та маркуванням препарату.

- **М'яке:** Для фасування використовується м'який пластик або папір. Часто застосовується в пакуванні рослинних засобів, БАДів. Лицьова і задня частини виконуються з однакового непрозорого матеріалу, для розпакування він надривається, ліки легко вивільнюються.

Розглянемо пакування у блістери.

Блістерне пакування ґрунтується на властивості полімерів ставати еластичними після нагрівання. Цей вид пакування набув великого поширення порівняно з такими матеріалами як: скло, картон, папір, пластик тощо. *Основними особливостями полімерного пакування є:*

- не токсичний, нешкідливий для препаратів та здоров'я людини, використовується в фармацевтичній та харчовій промисловості;
- є одним із найпопулярніших матеріалів;
- захищає від впливу світла та повітря, механічних пошкоджень;
- здатний набувати різних форм, що робить його універсальним матеріалом;
- полімерне пакування може бути як прозорим, так і кольоровим, що дозволяє уникати потрапляння прямих сонячних променів.

Пакування БАДів у блістер здійснюється за допомогою такого способу пакування, як блістерування під приварювання, яке має такі характеристики:

- складається з двох основних частин: плівки, з якої отримують комірки, та основи для заклеювання осередків після заповнення їх таблетками;
- блістери стандартного розміру здатні вмістити різний обсяг БАДів та таблеток від 2 до 24, залежно від форми виробу та бажання замовника;
- висока продуктивність устаткування дозволяє пакувати великі обсяги продукції в максимально стислі терміни.

Переваги:

- забезпечує безпеку БАДів та таблеток, захищаючи від контакту із зовнішнім середовищем, таке пакування максимально герметично;
- допомагає вести облік прийому препарату, кожна капсула може бути відділена, не торкнувшись інших, що створює комфортні умови для прийому БАДів як окремо, так і в комплексі;
- вартість такого пакування дешевша порівняно з іншими способами;
- блістер легкий, займає дуже мало місця, що зручно для споживача, можна завжди носити з собою;
- презентабельний зовнішній вигляд, упаковка таблеток в блістер дозволяє розглянути продукт з усіх боків, що часто стає вирішальним під час прийняття рішення про купівлю товару;

- можливість розмістити на звороті блістера рекламні матеріали, логотип Вашої компанії, інструкцію із застосування, дозування, штрих-код або іншу корисну інформацію;
- відсутня можливість відкриття продукції без пошкодження упаковки [7].

Далі розглянемо скляну тару для медичних препаратів.

У багатьох випадках скляні флакони та пляшечки витіснили пластикові аналоги. Але є безліч фармацевтичних препаратів, які необхідно зберігати тільки в упаковці зі скла. В якості основи для виготовлення медичної тари використовується безбарвне (cl) або темне (br) боросилікатне скло. Також є варіанти виготовлені з вапняно-натрієвого скла, що має 3 клас гідролітичної стійкості.

Переваги:

- хороша хімічна стійкість і поєднання з переважною більшістю лікарських засобів;
- висока термічна стійкість, можливість стерилізації;
- висока чистота та прозорість;
- можливість дезінфекції;
- гарні показники герметичності;
- певна механічна стійкість.

Крім цього, тара з темного скла використовується в тих випадках, коли фармацевтичні препарати необхідно захистити від дії сонячного світла.

Зі скла *виготовляють таку упаковку*: баночки та пляшечки з широким горлом, у яких зберігаються порошкові, гранульовані речовини, мазі, крему, гелі, як зовнішнього, так і внутрішнього застосування.

Флакони *та пляшки* для рідких, мало та середньо в'язких речовин, сиропів, спиртових настоянок. В окремих випадках додатково така тара може бути оснащена пластиковими мірними стаканчиками або ложками для правильного дозування.

Флакони для інфузійних розчинів з гумовою та/або металевою кришкою для максимальної герметичності.

Пляшки для отоларингологічних, офтальмологічних крапель. Як правило, до такої тари додатково йдуть піпетки зі скла або пластику з гумовим наконечником для зручного дозування. Піпетка часто є частиною кришки, якою закривається флакон. Як правило, такі флакони виготовляються з темного скла.

Ампули, які виготовляють із спеціального нейтрального скла, з низькою температурою плавлення.

Однією з переваг скляної продукції можна назвати екологічність та здатність до переробки. Скло добре миється і піддається стерилізації. Тому після використання лікарського препарату, пляшечку, флакон чи баночку можна помити та здати на переробку.

Наступною розглянемо пластикову тару.

Пластикова тара — легка, міцна та стійка до механічного впливу, ударам відіграє важливу роль у медичній та фармацевтичній галузях. З полімерів: полістиролу блочного, ударостійкого полістиролу, поліпропілену, поліетилену низького тиску та інших, виготовляють тару медичного призначення. Це може бути:

- баночки;
- флакони;
- пляшки;
- туби;
- пакети;
- пачки;
- ампули.

Переваги пластикової тари:

- герметичні;
- довговічні;
- стійкі до атмосферних впливів та перепадів температур;
- мають низьку теплопровідність;

- мають високі показники ударостійкості.

Крім виділених переваг, тара із пластику також має деякі особливості експлуатації. Незважаючи на хорошу хімічну інертність, є низка реактивів та речовин, які не можна зберігати в такій упаковці. У зв'язку з цим застосування пластикової тари для зберігання медичних та фармацевтичних препаратів суворо регламентується певними законами.

Тара з полімерної сировини представлена широким модельним рядом, тому вибрати необхідний варіант необхідно в залежності від призначення та вмісту.

Баночки та пляшечки з широкою горловиною використовуються для зберігання капсул, таблеток, лікарських засобів порошкоподібної та гранульованої форми. Щоб усередині не утворювалася волога, у баночку поміщають силікагелевий мішечок. Також у тарі з широкою горловиною можливі варіанти зберігання мазей та гелів зовнішнього застосування та різних в'язких, гелевих субстанцій внутрішнього застосування.

Пляшечки з вузькою горловиною використовують для зберігання різних речовин з низькою в'язкістю, сиропів і препаратів, як зовнішнього застосування (наприклад, перекис водню), так і внутрішнього (сироп від кашлю). У цьому випадку пляшечка може мати дозатор або додатково оснащена мірною ложкою, стаканчиком.

Кожна пластикова тара (за винятком дифузійних пакетів) оснащена кришкою, яка також виконана з полімерних матеріалів. Кришка повинна герметично закриватися, утримуючи вміст усередині та захищаючи його від зовнішнього впливу.

Роблячи висновок, напевно, не можна визначити, що краще — скло або пластик, оскільки кожен із цих матеріалів має свої особливості та призначений для зберігання окремих категорій препаратів. Тому вибір має ґрунтуватися виходячи з того, що буде всередині тари.

У деяких випадках матеріал, з якого виготовлена упаковка не відіграє вирішальної ролі, тому вибрати можна виходячи з особистих переваг, ціни, зовнішнього вигляду або необхідного обсягу [7].

2.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання субстанції

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація продукту, г/л	Тривалість культивування, год	Особливості процесу біосинтезу	Література
<i>S. cerevisiae</i> Sa-07346	NH ₄ Cl - 2,8, мію-інозит - 0,075, MgCl ₂ - 0,25, CaCl ₂ - 0,1, MgSO ₄ - 0,55.	1,459	24	Культуру інкубували протягом 24 годин при 27°C і зберігали при 4°C.	124
<i>S. cerevisiae</i> YPH499	10 г/л дріжджового екстракту, 20 г/л бактопептону 20 г/л глюкози	1,44	48	Дріжджівирощували при 30 °C зі струшуванням при 150 об/ хв протягом 24 або 48 годин	122
<i>C. utilis</i> SZU 07-01	Глюкоза - 30, дріжджовий екстракт - 5, (NH ₄) ₂ SO ₄ - 5, KH ₂ PO ₄ - 6, K ₂ SO ₄ - 3,6, MgSO ₄ - 1,5, FeSO ₄ 0,008 і MnSO ₄ - 0,008	0,672	36	температура 25° C, швидкість перемішування 150 об/хв та період росту 36 год.	119

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>S. cerevisiae</i> Sa-07346	NH ₄ Cl - 2,8	50,0	0,14	1
	мію-інозит - 0,075	300,0	0,0225	2
	MgCl ₂ - 0,25	490,0	0,1225	3
	CaCl ₂ - 0,1	95,0	0,0095	4
	MgSO ₄ - 0,55	465,0	0,25575	5
	Глюкози - 20	150,0	3	6
	дріжджовий екстракт - 5	13362,3	66,81	7
Вартість 1 л середовища – 69,75 грн				

<i>S. cerevisiae</i> УРН499	20 г/л глюкози	150,0	3	6
	10 г/л дріжджового екстракту	13362,3	133,62	7
	20 г/л бактопептону	5284,42	105,68	8
	Вартість 1 л середовища – 241,0 грн			
<i>C. utilis</i> SZU 07-01	Глюкоза - 30	150,0	4,5	6
	дріжджовий екстракт - 5	13362,3	66,81	7
	(NH ₄) ₂ SO ₄ - 5	133,3	0,665	9
	KH ₂ PO ₄ - 6	465,0	2,79	10
	K ₂ SO ₄ - 3,6	200,0	0,72	11
	MgSO ₄ - 1,5	465,0	0,6975	5
	FeSO ₄ 0,008	56,7	0,0004536	12
	MnSO ₄ - 0,008	789,0	0,006312	13
	Вартість 1 л середовища – 76,18 грн			

Примітка. Джерела цін на компоненти живильного середовища:

- <https://ukrchemgroup.com/ua/p1049090469-sulfat-ammoniyammonij-sernokislyj.html>
- https://rozetka.com.ua/ua/354444006/p354444006/?gclid=CjwKCAiAleOeBhBdEiwAfgmXf4cYIxx3SSsVsXtLmPBpyRwjXzlhjH3qyK012e1A2_x7spJePpqCxoC-QUQAvD_BwE
- https://rozetka.com.ua/ua/345786679/p345786679/?gclid=CjwKCAiAleOeBhBdEiwAfgmXf4qWPdKHZiqVceyYECC1s4g74xa5UbVBM_xDFeiv73mEnhTcMEUCHhoCqtIQAvD_BwE
- https://rozetka.com.ua/ua/330483979/p330483979/?gclid=CjwKCAiAleOeBhBdEiwAfgmXf4wyRkBhdPaU6qIwYpg0GQAtuXLY_3vABkXNHnHBqfMdpZppJqjzexoCbZMQAvD_BwE
- <https://ukrchemgroup.com/ua/p783600334-sulfat-magniyamagnij-sernokislyj.html>
- https://mendeleev-shop.com.ua/p1033372046-kaliya-monofosfat-mkr.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAiAleOeBhBdEiwAfgmXf81Cpj-6X_KzBwELpMZRfTtdM8EbV2XU0EkBQk7uBTf0p4tjy95t8hoCegoQAvD_BwE
- https://rozetka.com.ua/ua/364703550/p364703550/?gclid=CjwKCAiAleOeBhBdEiwAfgmXf7WR_L5TFggddH8uTjHZanefulc-ydMo3z1q44e8FbbkE0CX2SqYwxoCOkEQAvD_BwE
- <https://shop.hlr.ua/trisgidroksimetilamino metan-99-dlya-biohimii-thermo-fisher-scientific-1-kg-242207.html>
- <https://prom.ua/p3619555-hlorid-kobalta-kobalt.html>
- https://rozetka.com.ua/ua/266429521/p266429521/?gclid=CjwKCAiAleOeBhBdEiwAfgmXf4k3aX-z3WQRtL1UGJbZFgKajn9bBFCWdefHZI2D3d-u3oLpqQg4bXoCuvqQAvD_BwE
- <https://shop.hlr.ua/ua/drojje-vo-y-ekstrakt-granul-dlya-mikrobiologii-500-g-234100.html>;
- <https://shop.hlr.ua/agar-tripton-soevyy-500-g-cond-138894.html>
- <https://ukranalitika.com.ua/goods/reaktyv/glyukoza-farmatsevticheskaya>

Висновок. Виходячи з даних, наведених у таблиці 2.1 та таблиці 2.2, найкращим бактеріальним продуцентом вочевидь є *S. cerevisiae* Sa-07346, адже даний продуцент синтезує більшу кількість глутатіону при меншій тривалості культивування та нижчій вартості поживного середовища.

2.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині

Для забезпечення хворих жителів України препаратом Глутатіон, потрібно

одержати 205 кг продукту(G_{HT}).

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{РД}$) 300, тоді кількість продукту на добу ($G_{HTД}$) становитиме:

$$G_{HTД} = G_{HT} / T_{РД} = 205 / 300 = 0,68 \text{ кг/добу.}$$

Кількість продукту на добу з урахуванням втрат за виробничий цикл (40 %):

$$G_{ПД} = G_{HTД} / (1 - E_B) = 0,68 / (1 - 0,4) = 1,13 \text{ кг/добу}$$

Кількість глутатіону за цикл:

$$G_{ЦК} = G_{ПД} \times T_{ЦФ} / 24 = 1,13 \times 58,5 / 24 = 2,75 \text{ кг/цикл}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за один виробничий цикл:

$$V_{КР} = (K_1 \times G_{ЦК} \times C_{РГП}) / P_{КР} = (1,1 \times 2,75 \times 0,95) / 3,2 = 0,9 \text{ м}^3/\text{цикл,}$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$); $T_{ЦФ}$ – цикл роботи ферментера, який включає виробничий біосинтез цільового продукту (48 год) та час підготовки ферментера до роботи (10,5 год).

Підготовка ферментера включає: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Визначаємо кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{Ц} = G_{HT} / G_{ЦК} = 342 / 2,75 = 124,4 \approx 125 \text{ циклів.}$$

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15 %.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб1} = V_{Ф} = V_{КР} / (1 - E_{Ф}) = 0,9 / (1 - 0,1) = 1 \text{ м}^3,$$

де $E_{Ф}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом 2 м^3 .

1 м^3 культуральної рідини ($V_{\text{кр}}$) можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_{\text{ГФ}} = V_{\text{Ф}} / K_{\text{зап}} = 1 / 0,6 = 1,66 \text{ м}^3,$$

де $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

У додатку 4 (технічні характеристики ферментерів) знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{\text{НФ}} = 2 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{Ф}} / V_{\text{НФ}} = 1 / 2 = 0,5.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5 – 0,65), отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

Після ферментаційних процесів культуральна рідина містить залишки поживного середовища, продукти метаболізму та клітини продуцента у капсулі яких знаходиться цільовий продукт.

Виділення та очищення глутатіону включає такі етапи:

- попередня обробка культуральної рідини;
- відділення глутатіону;
- очищення та концентрування глутатіону;
- сушка.

Попередня обробка культуральної рідини

Оскільки цільовий продукт (глутатіон) знаходиться у цитоплазмі продуцента, тому необхідною умовою є відділення клітини. В таких цілях і проводять попередню обробку культуральної рідини, що також дає змогу спростити процес очистки полісахариду.

Як правило найпопулярнішими реагентами для попередньої обробки культуральної рідини є етанол, ізопропанол, щавлева кислота та ін. Використання щавлевої кислоти для осадження дріжджів у культуральній рідині не є доцільним, оскільки, як правило, нею осаджують низькомолекулярні сполуки.

Даний процес також допускає використання етилового спирту, але розчинність в ньому багатьох органічних речовин менша ніж в ізопропіловому. І до того ж ізопропіловий спирт є дешевшим розчинником, а також дає змогу повністю осадити та відділити усі високомолекулярні сполуки з культуральної рідини. Тому для попередньої обробки культуральної рідини і осадження високомолекулярних сполук обираємо ізопропіловий спирт у зв'язку із його більшою ефективністю та рентабельністю[5].

					НУХТ БТЕК 02.02.23 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Яник Ю.М.			Розділ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.					61	167
Реценз.						63		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Обґрунтування вибору способу відділення біомаси

Після обробки спиртом глутатіон на відміну від інших високомолекулярних сполукам не випадає в осад. Тому наступним етапом є відділення фази з високомолекулярними сполуками від фази ізопропанолу.

Для розділення цих фаз можна застосовувати такі процеси, як фільтрування, центрифугування, відстоювання, флотацію тощо (рис 3.1).

Фільтрування за допомогою вакуум-фільтрів бактеріальних суспензій є досить складним і трудомістким процесом, оскільки клітини продуцента мають досить малі розміри, а сама суспензія має досить високу в'язкість та велику кількість домішок різного розміру. Тому, як правило, перед фільтруванням суспензію попередньо доводиться обробляти для того, щоб відбулась максимально можлива коагуляція клітин і домішок в частинки більшого розміру, які будуть легше фільтруватись. Але у випадку із глутатіоном використовувати коагуляцію неможливо, оскільки зарахунок цього цільовий продукт буде ще більше забруднюватись і втрачати свої властивості. А фільтрування на вакуум-фільтрі без попередньої обробки буде не доцільно, оскільки буде відбуватись закупорювання пор у фільтрі. Таке використання допоміжних речовин при фільтруванні (перліт, діатоміт і т.д.) може шкідливо впливати на якість цільового продукту.



а)



б)

Рис. 3.1. Установки для відділення бактеріальних клітин

а) вакуумфільтр, б) центрифуга

Тому при виробництві глутатіону найбільш доцільним буде застосування методу центрифугування. Хоча цей метод є більш дорогим, але притому він являється більш швидким, оскільки суспензія фільтрується досить повільно. А також основною задачею є отримання максимально звільнену від ізопропілового спирту фракцію із цільовим продуктом, який після центрифугування повністю віділиться з клітин продуцента, чого за допомогою фільтрації досягнути неможливо. Центрифугування проводимо зі швидкістю 5000 об/хв протягом 15 хв, для збереження властивостей продукту. А оскільки процес проводимо при досить великій швидкості, тому для того, щоб запобігти само розігріву проводимо процес при 4°C.[5, 17,31].

Для центрифугування культуральної рідини обираємо горизонтальну центрифугу з вирізним ножем EHL 503 (рис. 3.2), яка являється ефективною машиною з високим ступенем розділення. Основною особливістю є здатність центрифуги до високої швидкості потоку (до 3 000 об/хв (регулюється)), можливість регулювання температурного режиму та ефективним відділенням осаду від рідини. Повне відкриття барабана відкриває повний доступ в внутрішній простір і дає можливість для простого сервісу, інспекції, очищення та перевірки.

Окрема конструкція рамки дозволяє гнучку установку з низькими вимогами висоти приміщення і невеликою площею; з цього випливає відповідна економія часу при установці механізму [42].



Рис. 3.2. Центрифуга горизонтальна EHL503(компанії «Біотехно»)

Для зменшення в'язкості осаду його можна обробити водою, розчином хлориду натрію, або ж кислотами. Воду у даному випадку застосувати не можливо оскільки вона лише розбавить осад, але зменшить його в'язкість досить незначно. А у випадку використання кислот є ймовірність того, що вони зможуть згубно вплинути на властивості цільового продукту. Тому найдоцільніше розчинити осад в хлориді натрію, щоб зменшити в'язкість та концентрацію осажденного глутатіону, оскільки у порівнянні з іншими хімічними розчинниками хлорид натрію буде забезпечувати ще й ізотонічність розчину, що досить важливо для виділення полісахариду [4].

Після центрифугування необхідно промити вивантажений осад. Для зменшення в'язкості осаду його можна обробити водою, розчином хлориду натрію, або ж кислотами. Воду у даному випадку застосовувати неможливо, оскільки вона лише розбавить осад, але зменшить його в'язкість досить незначно. А у випадку використання кислот є ймовірність того, що вони зможуть згубно вплинути на властивості цільового продукту. Тому найдоцільніше розчинити осад в хлориді натрію, щоб зменшити в'язкість отриманого осаду та концентрацію глутатіону ньому [4].

Після зниження в'язкості та концентрації цільового продукту необхідно позбутись від залишків клітин продуцента, білків та нуклеїнових кислот. Для даного процесу як правило застосовують термообробку, або ж обробку трихлороцтовою кислотою. У випадку використання термообробки є загроза того, що під дією високої температури глутатіон може втратити свої властивості (оскільки глутатіон є термолабільною речовиною). Тому на даному етапі доцільніше проводити обробку трихлороцтовою кислотою, оскільки вона не знижує рН, що в свою чергу сприяє осадженню та вилученню залишків клітини [3, 5,6].

Далі розчин необхідно додатково обробити для видалення залишків баластних білків та забарвлених сполук. Найчастіше таку обробку здійснюють хлорпохідними, або ж активованим вугіллям. Оскільки хлорпохідні сполуки можуть негативно вплинути на властивості глутатіону, тому обробку проводимо

активованим вугіллям, яке адсорбує залишки білків та забарвлених сполук без шкоди цільовому продукту [4,5].

Оскільки після попередніх процесів у розчині будуть присутні залишки активованого вугілля, клітин продуцента тощо, то необхідно відділити та вилучити дані сполуки від розчину глутатіону. Як вже було вище зазначено, для відділення даних сполук можна застосовувати такі процеси, як фільтрування, центрифугування, відстоювання, флотацію тощо. Оскільки ми вже попередньо проводили центрифугування для відділення осаду від рідини, тому і даний процес будемо проводити за допомогою фільтрувальної центрифуги СЕРА GZ (компанії «Біотехно») (рис.3.3). Яка ефективно і швидко відділить фазу залишків клітин та вугілля від розчину глутатіону.

А оскільки головною задачею є отримання максимально звільненого розчину глутатіону від додаткових речовин, то процес проводимо при швидкості 7000об/хв. Протягом 30 хв. І, відповідно, для того, щоб запобігти само розігріву проводимо процес при 4°C.



Рис.3.3.Центрифуга СЕРАGZ (компанії «Біотехно»)

Обґрунтування способу концентрування та очищення глутатіону

Як правило виділяють два основні способи концентрування речовин – упарювання розчинів та фільтрація до якої відносять ще ультрафільтрацію. Хоча випарювання є досить вигідним процесом ,оскільки він простий та швидкий,

проте для виділення глутатіону буде зовсім не доцільним, оскільки даний продукт під дією високих температур буде втрачати свої властивості [5, 4].

Тому для виділення глутатіону обираємо мікрофільтрацію (УМФ (рис 3.4)) з подальшою ультрафільтрацією. Оскільки завдяки великому числу пор на одиниці поверхні мембрани (кількість пор досягає 70—80% загального об'єму мембрани) процес фільтрації протікає з достатньо високою швидкістю. Процес фільтрації проводять при різниці тиску 0,1—0,2 МПа через пори з діаметром 0,45 мкм з п'ятикратним розведенням фільтрату водою для того, щоб не відбувалось забивання пор при ультрафільтрації.



Рис.3.4. УМФ «Альтаїр»

На відміну від вакуум упарювання процес ультрафільтрації має ряд переваг, оскільки проходить у «м'яких» умовах, що забезпечують збереження властивостей глутатіону. Крім того, таке концентрування супроводжується очисткою від баластних низькомолекулярних домішок та дозволяє отримати високо очищений глутатіон.

Тому, для концентрування фільтрату пропонується стандартизована установка ультрафільтрування в режимі діалізу ContiStar компанії Bucher Uniprektin AG, Швейцарія із ультрафільтраційною касетою Sartocoon® PESU з поліефірсульфону (рис. 3.5) [43].



Рис.3.5. Загальний вид ультра фільтраційної установки Bucher UniprektinAG, Швейцарія з PESU мембранною.

Оскільки в подальшому готовий продукт будуть використовувати у фармацевтичній промисловості, тому обов'язковим є після очистки позбутись від усіх баластних білків, що могли ще залишитись у розчині. Для даного процесу допустимо використовувати етиловий та ізопропіловий спирти. Але оскільки ізопропіловий спирт є дешевшим та ефективнішим розчинником, ніж етиловий, тому обираємо саме ізопропанол. І, відповідно, розчин, що містить зразок глутатіону будемо концентрувати до початкового об'єму (1: 3 об / об) для повного видалення баласних білків.

Обґрунтування вибору способу сушіння

Найбільш поширеним методом при зневодненні продуктів біосинтезу є сушіння. Для висушування використовують вакуумні, пневматичні, аерофонтанні, вальцові, сублимаційні сушарки, а також сушарки із псевдо зрідженим шаром та ін. (рис 3.6).



Рис.3.6. Види сушарок (1–розпилювальна; 2–сублимаційна)

При виборі способу сушіння потрібно чітко розуміти властивості даного продукту, оскільки є продукти, які при зневодненні вимагають збереження життєдіяльності мікроорганізмів або високої активності препаратів (антибіотики, засоби захисту рослин, ферменти, полісахариди) і продукти, які після висушування вимагають збереження високої поживної цінності (кормові дріжджі, харчовий білок і ін.).

Тоді, оскільки глутатіон – це пептид, який після стадії сушіння має повністю

зберігати свої властивості, то доцільно у промислових масштабах використовувати саме вакуумні сушарки.

Перевагою вакуум–сушарок у порівнянні з конвективними атмосферними сушарками є більш інтенсивне сушіння при низьких температурах, що важливо для речовин, які не витримують високої температури (термолабільних). Випаровування з поверхні однакової величини для вакуумного сушіння теоретично повинне відбуватися в 2–3 рази швидше, ніж для атмосферного. Вакуумне сушіння вимагає меншої витрати теплоти внаслідок (майже) відсутності втрат з повітрям, що викидається з сушарки. Наприклад, на 1 кілограм води, що випаровується при температурі 40°C, потрібно 2570 кДж теплоти у вакуумній сушарці, а в атмосферній сушарці 3440 і 3860 кДж, якщо повітря виходить з відносною вологістю відповідно 75 і 50 %. Перевагою вакуум–сушарок є можливість проведення процесу в стерильних умовах. Герметичність сушильної камери дає гарантію проти забруднення продукту пилом з навколишнього середовища й окислювання його киснем повітря.

При сушінні під вакуумом є можливість більш повного вловлювання цінних чи шкідливих парів. Замість дорогої абсорбційної установки, що застосовується для поглинання таких парів при атмосферному сушінні, у вакуум–сушарці застосовується більш дешевий і радикальний засіб вловлювання парів шляхом конденсації (до 95% таких летких розчинників, як етиловий спирт, ацетон тощо). Нарешті, при вакуумному сушінні менші втрати продукту й менша пожежна небезпека [10,11,12].

Тому для сушіння глутатіону обираємо промислову вакуум сушильну шафу серії СВП-500, яка підходить для використання у промислових масштабах а також має функцію підключення до СІР-мийки. Камера зі сталі марки AISi 316 дозволяє використовувати сушильну шафу в закладах з високими вимогами до санітарно-гігієнічних умов. Ідеально гладка обробка камери та полиць полегшує чистку після закінчення роботи. Силіконові ущільнювачі на двері забезпечують герметичність закривання. Деякі виготовлені зварним способом і не мають щілин, що дозволяє повністю витягувати висушений матеріал. Це особливо важливо,

коли субстанції дорогі. Так само деякі можуть бути перфорованими для кращої конвекції розподілу температури повітря по всьому об'єму камери [14].

Обґрунтування стадії пакування цільового продукту

При виборі упаковки необхідно враховувати властивості самого цільового продукту та умови його зберігання. Необхідно обирати таку тару, яка захищала б цільовий продукт від пошкоджень, сприяла безпечному транспортуванню, збереженню та продажу. Для упаковки глутатіону обираємо пакети з фольги, так як даний пакувальний матеріал володіє наступними перевагами: термоізоляція; непроникність вологи та повітря, що дає змогу зберегти властивості продукту; зручність при транспортуванні.

4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
361	Збірник для зберігання культуральної рідини	1	Збірник оснащений кришкою, нижнім спуском, паровою сорочкою, перемішувачим пристроєм. Об'єм 1,5 м ³ ; н/сталь AISI 304.
Н2 Н4 Н9	Насос відцентровий для відкачування розчинів	3	Технологічний насос з насосною головкою 701 RE елементом LoadSure Витрата до 33 л/хв
363	Збірник для розведення культуральної рідини ізопропанолом	1	Збірник оснащений кришкою, нижнім спуском, перемішувачим пристроєм. Об'єм 5 м ³ ; н/сталь AISI 304.
Ц5	Центрифуга	1	Горизонтальну центрифугу з вирізним ножом EMBL 503, зі шв.об. 3000 об/хв. [15].
366	Збірник для розведення розчину КР натрій хлоридом, до децилсульфату натрію кислотою та адсорбції активованим вугіллям	1	Збірник оснащений кришкою, нижнім спуском, перемішувачим пристроєм, н/сталь AISI 304.
367	Збірник для приготування розчину натрій хлориду	1	Збірник оснащений кришкою, нижнім спуском, перемішувачим пристроєм, н/сталь AISI 304.
368	Збірник для приготування розчину трихлороцтової кислоти	1	Збірник оснащений кришкою, нижнім спуском, перемішувачим пристроєм, н/сталь AISI 304.
Ц10	Центрифуга	1	Центрифуга SEPA GZ. Продуктивність центрифуги складає 100-2000 л/год, обороти – 7000 об/хв. [9].
МФ11	Мікрофільтраційна установка	1	УМФ «Альтаір» Фільтрації проводять при різниці тиску 0,1—0,2 МПа а через пори з діаметром 0,45 мкм [16]

НУХТ БТЕК 02.02.23 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Яник Ю.М.			Розділ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.					70	167
Реценз.						12		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

УФ12	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка BucherUniprektionAG, Швейцарія з PESU мембраною. Продуктивність –0,1м ³ /годину під тиском 0,1МПа
E13 E5	Ємність для вивантаженого осаду	1	Ємність на колесах н/сталь AISI304.[14]
ВСШ14	Вакуумсушильна шафа	1	Апарат марки СВП-500обсягом 500 л. Камерасушильної шафи виготовленаз високоміцної нержавіючої сталі марки AISI304. Оснащений силіконовими ущільненнями на дверях, а також системою програмного керування[17]
ДК15	Дробарка	1	Колоїдний млин з надтонким Подрібненням частинок
Ф16	Фільтр для просіювання готового порошку	1	Вібраційне сито
ФП17	Фасувально-пакувальний апарат	1	Фасувально-пакувальнийапарат для сипких матеріалів для пакування в скляні флакони по 250 г, маркування та відвантаження. Продуктивність: 85фл/хв. Точність дозування–1%. Виробник НВП«Техноаги», Україна[16]

5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ

ДР1. Зберігання культуральної рідини

Після закінчення процесу культивування зупиняють усі технологічні процеси та за допомогою шестеренчастого насоса, культуральну рідину перекачують у проміжний збірник (ЗБ36) для її зберігання. Збірник оснащують мішалкою, щоб запобігти певним розшаруванням суспензії, підтримувати однорідність, кількість обертів мішалки становить 50об/хв. Культуральну рідину зберігають при кімнатній температурі 18-22 °С, так як така температура не чинитиме негативних впливів на глутатіон.

ДР2. Попередня обробка культуральної рідини

Попередню обробку культуральної рідини проводять з метою спрощення виділення і очистки глутатіону. Тому культуральну рідину попередньо обробляють ізопропіловим спиртом для осадження клітин продуцента і руйнування клітин для вивільнення глутатіону.

ДР2.1. Обробка КР розчином ізопропілового спирту

Біомасу (1300 л) зі збірника з культуральною рідиною (ЗБ-36) об'ємом 1500 л за допомогою насоса (Н-37) подають до збірника (ЗБ-38) об'ємом 10 м³. За допомогою об'ємно – вагового дозатора подають 3,9м³ ізопропілового спирту.

ТПЗ.Відділення біомаси

ТПЗ.1.Центрифугування культуральної рідини

Суспензія зі ЗБ-38 подається в центрифугу (Ц-40). Тверда фаза осідає на стінки центрифуги під дією відцентрових сил, в той час як рідка фаза видаляється до зливу. Стадія центрифугування триває 15 хв.

					НУХТ БТЕК 02.02.23 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Яник Ю.М.						
Перевір.		Пенчук Ю.М.					72	167
Реценз.						74		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Осад легко видаляється з центрифуги шляхом роз'єму кришки і корпусу і вивантаженні осаду на пересувну ємність (Е-41).

Відходи фільтрату (ізопропіловийс пирт) відправляють на регенерацію.

ТПЗ.2. Обробка фільтрату 0,15 М розчином натрій хлориду

Відфільтрований осад від Ц-40 подається у ЗБ-42 в якому його розводять 0,15М розчином натрій хлориду до зменшення в'язкості суспензії.

ТП 3.3. Обробка фільтрату 0,1% розчином три хлороцтової кислоти

У ЗБ-42 після зменшення в'язкості подають розчин 0,1% три хлороцтової кислоти. Додають кислоту до моменту, поки рН знизиться від 6 до 2.

ТПЗ.4.Обробка активованим вугіллям

За допомогою об'ємно-вагового дозатора зважують 10 кг активованого вугілля і через гребінку подають до Зб-42 для адсорбування залишки білків та забарвлених сполук.

ТПЗ.5. Центрифугування

Після зниження рН до 2 розчин від ТП 3.4 перекачують до Ц - 46. Суміш подається в нижню частину ротора за допомогою відцентрового (Н-45) насосу. Всередині ротора кожна фракція речовин розташовується пошарово, відповідно до своєї щільності, за рахунок чого навіть найдрібніші домішки швидко і надійно осідають в роторі. Центрифугат піднімається через центр ротора до його вершині, після чого виходить очищеним. Відцентрифугований розчин направляється в окрему ємність для збору.

Центрифугування проводять протягом 30 хв при температурі 4 °С зі швидкістю 7000 об/хв.

ТП 4. Концентрування та очищення глутатіону.

ТП4.1. Мікрофільтрація

Центрифугат від Ц-46 подається до стандартизованої мікрофільтраційної установки (МФ-47), через полівінілхлоридову мембрану з діаметром пор 0,45мкм і тиском в межах від 0,1 – 0,2 МПа. Під час процесу мікрофільтрації

проводять п'ятикратну промивку фільтрату дистильованою водою для унеможливлення забивання пор при подальшій ультрафільтрації.

ТП4.2. Ультрафільтрація

За допомогою вмонтованих в ультрафільтраційну установку насосів відфільтрована попередньо рідина надходить до попереднього фільтру й далі до ультра фільтраційного модуля (мембрани з поліефірсульфону (PESU)). Пермеат виводиться з установки до каналізації, а концентрат вивантажується на пресувну ємкість (Є-49).

Продуктивність процесу ультрафільтрації складає 0,1 м³/год під тиском 0,1 МПа. Рідкі відходи надходять до стадії знещодження рідких відходів (ЗВ7.2).

ТП5. Сушіння.

З пресувної ємності фільтрат подається до вакуумної сушильної шафи (ВСС-50). Концентрат зі стадії ТП 4.2 завантажують на полиці вакуум-сушильної шафи рівномірним тонким шаром. Апарат щільно закривають дверцятами. Нагрівання шафи здійснюють парою під тиском 0,4МПа. Висушування продукту відбувається при температурі близько 30-40°С.

Процес закінчують, коли матеріал матиме певну залишкову вологість, після чого готовий сухий матеріал вивантажують. Перед подачею висушеного порошку на стадію ПМВ 14, його направляють на дробарку (ДК-51) та фільтра (Ф-52) для просіювання, тому що після сушіння на деках матеріал збивається в грудки.

ПМВ 6. Пакування, маркування, відвантаження готового продукту

Висушений в вигляді порошку глутатіон поступає на пакування до фасувальної машини (ФП-53), де завантажується в пакети з фольги масою 2 кг. Після чого на них наноситься етикетка (УМ-54) і вони згруповуються по 20 штук у картонні коробки (ПК-55).

ЗВ7. Знещодження та переробка відходів.

ЗВ 7.1. Знещодження твердих відходів.

Тверді відходи від подаються на утилізацію.

ЗВ7.2. Знешкодження рідких відходів.

Рідкі відходи подаються на переробку. Для знешкодження рідких відходів воду обробляють дезієфікувальним розчином, а потім спрямовують на локальні очистні споруди (система біологічних ставків). Для цього створюється система неглибоких біологічних ставків, в котрих іде змішування стічних вод з мулом, що утворився при попередньому окисленні стічних вод. В активному мулі багато мікроорганізмів, які завершують знешкодження стоку.

ЗВ7.3. Знешкодження газоподібних відходів.

Газоподібні відходи від ТП 7.3 подаються на переробку. Застосовується метод каталітичного опалювання. Суть його полягає у прокачуванні відпрацьованого повітря при температурі 320–350⁰ С через комбінований каталізатор, що складається із шарів піролюзиту та паладієвого каталізатора. Ступінь знешкодження повітря досягає 87–98,5%.

6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кх 1.1 Підготовка розчину натрій хлориду	Концентрація розчину натрій хлориду та рН	Хімічний метод	Після приготування розчину	M = 0,15 рН= 2
Кх1.2.Підготовка розчину до децилсульфату натрію	Концентрація розчину додецилсульфату натрію	Хімічний метод	Після приготування розчину	C= 0,1%
Кт2.Зберігання культуральної рідини	Кількість обертів мішалки, температура	Тахометр, термометр технічний	Протягом процесу зберігання	w=50 об/хв; t=17-20 °C
Кт 4.5. Центрифугування культуральної рідини	Частота обертів барабана, час, температура	Візуально на дисплеї центрифуги, термометр, годинник	Визначається під час центрифугування	w=7000 об/хв; τ= 30 хв, t = 4°C
Кт5.1.Мікрофільтрація	Тиск	Манометр технічний	Під час проведення процесу мікрофільтрації	P=0,1– 0,2 МПа
Кт5.2. Ультрафільтрація	Продуктивність процесу, тиск	Візуально на дисплеї, манометр технічний	Під час проведення процесу ультрафільтрації	Π=0,1м ³ /год, P=0,1МПа

НУХТ БТЕК 02.02.23 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Яник Ю.М.			Розділ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.					76	167
Реценз.						78		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Кт 6. Сушіння у вакуум-сушильній шафі	Температура, тиск	Термометр технічний, манометр технічний	Протягом процесу сушіння	t=30-40°C; P=0,4МПа
Кт 7.1 Пакування готового продукту у первинну упаковку	Маса запакованого продукту	Ваги електронні	Після процесу пакування	m=250г
Кт 7.2. Маркування готового продукту	Текст на первинній упаковці	Візуальний контроль	Після процесу маркування	Відповідність тексту на первинній упаковці заданому макету

Визначення глутатіону

Для аналізу беруть 20 мл зразку селективно осаджують за допомогою етанолу (3:1), потім відбирають 10 г осаду і центрифугують протягом 10хв і після центрифугування осад розчиняють в 1,5 М NaCl (1:1). Даний процес (селективну преципітацію) виконують двічі в однакових умовах, але після центрифугування осад із глутатіоном розчиняють у дистильованій воді та визначають концентрацію методом описаним Blumenkrantz and Asboe-Hansen (1973) з модифікацією, запропонованою Murado, Vázquez, Montemayor, Cabo and González (2005).

Використовувалися реактиви:

- (А) $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (1ммоль розводять у 1мл у сірчаній кислоті 96%,)
- (В) мета-гідроксидифеніл (1мг/1мл) у NaOH (0,0125 моль).

Реакцію проводили шляхом зливання 0,5 мл проби і 3,4 мл реагенту А при інтенсивному змішуванні, інкубують зразок протягом 5 хв у киплячій водянній бані з подальшим охолодженням при температурі 22°C. Після цього, 100 мкл реагенту В додаються з подальшим інтенсивним змішуванням.

Через 15 хв вимірювали оптичну щільність при довжині хвилі 520 нм проти зразка, що містив 0,5 мл дистильованої води. Калібрування проводилася з серійними розведеннями глутатіону (10–100мкг/1мл) [29,30].

Мікробіологічний контроль готового препарату

Відбір проб лікарського засобу треба проводити в суворо визначеному порядку. Порядок відбору проб залежить від розмірів серії, ступеня небезпеки для здоров'я, пов'язаної з мікробним забрудненням лікарського засобу вище допустимого рівня, характеристиками лікарського засобу й очікуваним рівнем мікробного забруднення. Якщо немає інших зазначень в окремій статті, для випробування використовують зразки по 10 г субстанції або готового лікарського засобу, відібрані з дотриманням застережних заходів. Зразки відбирають у випадковому порядку з контейнерів з готовим лікарським засобом. Якщо необхідно, при відборі однієї проби змішують вміст кількох контейнерів, для того щоб одержати зразок необхідної маси .

10 г випробовуваного лікарського засобу розчиняють буферним розчином із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0 або іншою підхожою рідиною. Як правило, використовують розведення 1:10. Якщо необхідно, допускається використання інших розведень відповідно до властивостей лікарського засобу. Готують подальші десятикратні серійні розведення, використовуючи той самий розчинник [4].

Визначення загальної кількості бактерій та загальної кількості грибів.

У чашки Петрі діаметром 9 см вносять від 15 до 20 мл розплавленого густого живильного середовища для вирощування бактерій (МПА) або розплавленого густого живильного середовища для вирощування грибів (агар Сабуро) із температурою від 45°C до 50°C і дають середовищу застигнути. 1 мл зразка підготованого вносять у пробірку стерильною піпеткою, що містить близько 4 мл розплавленого і охолодженого до температури не більше 45°C густого живильного середовища МПА або густого живильного середовища Сабуро. Швидко перемішують вміст пробірки і переносять у чашку Петрі з густим живильним середовищем МПА чи Сабуро, відповідно. Швидким погойдуванням чашки Петрі рівномірно розподіляють верхній шар поживного середовища. Для кожного розведення використовують не менше двох чашок

Петрі з кожним поживним середовищем. Після застигання середовища чашки перевертають й інкубують при температурі від 30°C до 35°C (від 20°C до 25°C для грибів) протягом п'яти діб. Обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній і визначають число колоніє утворюючих одиниць у грамі або мілілітрі [10].

Визначення родини *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Salmonella*) [4].

Відповідно 1 мл зразку лікарського засобу вносять у 10 мл поживного середовища №3 (середовище збагачення для бактерій роду *Enterobacteriaceae* і інкубують при температурі від 35°C до 37°C від 18 до 48 год. Якщо у середовищі з'явилися ознаки бродіння, помутніння середовища, то петлею роблять пересів на середовище №4 (Ендо) для ідентифікації *E. coli* та №5 для *Salmonella*) і інкубують при температурі від 35°C до 37°C від 18 до 48 год. Проводять кількісний підрахунок колоній, визначають середньоарифметичну кількість мікроорганізмів, мікроскопіюють окремі колонії.

Визначення бактерій *Staphylococcus aureus* *Pseudomonas aeruginosa* [10].

Відповідно 1 мл зразку лікарського засобу вносять у 10 мл поживного середовища Чистовича (середовище збагачення для бактерій *Staphylococcus aureus* *Pseudomonas aeruginosa*) і інкубують при температурі від 35°C до 37°C від 24 до 48 год. Після закінчення періоду інкубації, при появі мутності роблять пересівання петлею на чашку з густим поживним середовищем №10 для ідентифікації *S. aureus*, *P. aeruginosa* і інкубують при температурі від 35°C до 37°C від 24 до 48 год. Проводять кількісний підрахунок колоній, визначають середньоарифметичну кількість мікроорганізмів, мікроскопіюють окремі колонії

Технологічний контроль

Технологічний контроль виробництва полягає у постійному визначенні та регуляції основних показників процесів змішування, таблетування тощо. Такими технологічними показниками є: маса компонентів до і після просіювання, розмір

отворів сита, загальний час перемішування, частота обертів мішалки, час перемішування, швидкість обертання дозатора, швидкість обертання ротора, середня маса таблеток, маркування. Ці параметри під час виробництва таблеток постійно регулюються за допомогою спеціальних автоматизованих пристроїв, які встановлені практично на кожному апараті апаратурної схеми.

7. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

7.1. Розрахунок річної потужності виробництва лікарського засобу та кількості серій на рік

Хвороба Альцгеймера — одне з найпоширеніших дегенеративних захворювань нервової системи у літнього покоління. Вчені вважають, що від початку захворювання до прояву перших симптомів може пройти значна кількість часу.

Одним із перших видимих симптомів дисфункції центральної нервової системи є втрата пам'яті, надалі до неї підключаються порушення мови, проблеми з концентрацією уваги, втрата навичок здійснювати цілеспрямовані рухи, а також тривога, неуважність, розлади сну, апатія та інші прояви.

Хвороба Альцгеймера не залежить від кольору шкіри та фінансового благополуччя. Діагноз «хвороба Альцгеймера» був поставлений таким всесвітньо відомим людям, як Рональд Рейган (президент США), Маргарет Тетчер (прем'єр-міністр Великобританії), Шон Коннері (голівудський актор) та іншим не менш знаним особам.

Це захворювання зустрічається у 5% населення в категорії «60+», у людей у віці 85-ти та більше років хвороба Альцгеймера проявляється у 30-40%. Сьогодні це захворювання називають чумою 21 століття. І не безпідставно, про що свідчить статистика.

станом на 2015 рік кількість хворих перебувала на рівні позначки в 50 млн. людей. Згідно з прогнозами, щорічна частота постановки діагнозів «Хвороба Альцгеймера» буде збільшуватися. І до 2030 року складе 82 мільйони, а до 2050 — 152 мільйона чоловік, що більше в 3 рази від даних 2015 року.

Найбільш інформативними є статистичні дані в Європі. Так, серед людей в залежності від їх віку в європейських країнах статистика виглядає наступним

чином:

					НУХТ БТЕК 02.02.23 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Яник Ю.М.			Розділ 7. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ					
Перевір.		Пенчук Ю.М.						Літ.	Арк.	Акрушів
Реценз.									81	167
Н. Контр.								83		
Затверд.		Стабніков В.П.						Кафедра БТМ		

Вік	Поширеність захворювання,%
60-64	0,6
65-69	1,3
70-74	3,3
75-79	8,0
80-84	12,1
85-89	29,1
90+	40,8

Ця таблиця наочно демонструє прямопропорційну залежність поширеності постановки діагнозу «Хвороба Альцгеймера» від збільшення віку людини.

Кількісна статистика захворювання по країнах Європи виглядає наступним чином:

Топ-10 європейських країн з найбільшим кількістю захворювань	Загальна кількість захворювань в 2019 році	% від загального населення країни
Німеччина	1 585 166	1.91
Італія	1 279 366	2.12
Франція	1 227 558	1.83
Великобританія	1 031 396	1.56
Іспанія	852 741	1.83
Польща	525 084	1.38
Румунія	279 607	1.43
Нідерланди	256 532	1.49
Греція	213 678	1.99
Бельгія	192 926	1.69

При цьому загальна кількість людей з даним видом захворювання в Європі становить 9 780 678 осіб, або 1.57% від загальної кількості населення.

Частота хвороби Альцгеймера також має і гендерну залежність. Так у жителів європейських країн цей діагноз зустрічається більше у жінок, ніж у чоловіків. Кількість захворювань у європейських жінок за 2019 рік становить 6 650 228 осіб, а у чоловіків — 3 130 449 осіб, що менше в два рази, ніж у жінок.

На жаль, статистика кожної окремо взятої країни показує тенденцію до значного збільшення кількості захворювань цією формою слабоумства. За попередніми розрахунками та прогнозами кількість захворювань в Європі в 2025 році складе 11 379 701 (більше в 1,2 рази від даних 2019 роки) людей, в 2050 — 18 846 286 осіб (більше в 1,92 рази від даних 2019 року).

Ситуація в Україні не сильно відрізняється від ситуації в Європі та у світі в цілому. Так, хвороба Альцгеймера входить в десятку захворювань, при яких хворі потребують паліативної допомоги. При цьому, показник хвороби Альцгеймера серед поширеності причин смерті дорослого населення в Україні становить 0,3 на 100 000 чоловік населення. У той час, як у Великобританії цей показник становить 112 на 100 000 чоловік, США — 82, Франції — 76, Німеччини — 51.

Згідно з наведених даних ми можемо припустити, що відсоток захворюваності на Альцгеймер становить 2 % від населення.

Отже, розрахуємо кількість хворих. Населення України приймемо за 35000000 осіб.

$$X=35000000*2/100=700000 \text{ осіб.}$$

Середня тривалість курсу лікування – 1 місяць, курс можливо пройти повторно, зробивши перерву на 3–4 тижні. Тобто загальний курс два місяці.

$$700000*1*60=42000000 \text{ таблеток/р.}$$

Ми плануємо забезпечувати 10 % від потреби.

Це буде 42000000 таблеток/р, або 140000 таблеток на робочу зміну.

7.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря)

Обґрунтування стадії підготовки персоналу

Персонал є одним з джерел забруднення готового продукту як механічними частками, так і мікроорганізмами. Найбільша кількість мікроорганізмів виділяється з верхніх дихальних шляхів, волосся та шкіряних покривів.

Тому, до персоналу, що працює в “чистих” приміщеннях, ставляться наступні вимоги:

- слід мити голову не рідше 2-х раз на тиждень, рекомендується носити коротку стрижку;
- не допускаються до роботи особи з підвищеним виділенням лупи;
- забороняється носити бороду;
- перед роботою 2 рази на тиждень слід робити гігієнічний манікюр;
- не дозволяється надівати ювелірні вироби.

У виробничих приміщеннях забороняється палити та приймати їжу. Весь персонал, що зайнятий безпосередньо на виробництві, проходить регулярний медичний огляд. Про кожне захворювання (порізи, нариви, шкіряні та простудні захворювання) необхідно ставити до відома майстра цеху.

Персонал, що працює в “чистих” приміщеннях, одягнений в стерильний технологічний одяг з безворсової тканини. Комплект технологічного одягу містить халат (комбінезон), шапочку (хустинку), бахали та рукавиці.

Пересування персоналу всередині виробничих приміщень здійснюється у певному порядку в залежності від виконуваних виробничих операцій. Забороняється хаотичне, безцільне ходіння по приміщеннях під час роботи [33].

Отже, в першу чергу потрібно забезпечити навчанням персонал та провести інструктаж виробничого процесу, адже найбільша відповідальність за якість виробництва лікарського препарату залежить саме від нього.

Обґрунтування стадії підготовки технологічного одягу

Також головною стадією санітарної підготовки виробництва є підготовка технологічного одягу для персоналу, адже саме персонал є найпершим джерелом

забруднення на виробництві, тому кожна особа, яка входить у виробниче приміщення, повинна носити захисний одяг, що відповідає виконуваним нею операціям. Комплект одягу, призначений для роботи в певній зоні виробничого приміщення, може бути використаний тільки в цій зоні і повинен мати відповідну позначку, оскільки це може призвести до контамінації продукції.

Характерне значення має тканина, з якої виготовляється технологічний одяг. Вона володіє мінімальним ворсовиділенням, пилоємкістю, а також повітропроникністю та гігроскопічністю, не накопичує електростатичного заряду.

Одяг, призначений для роботи в приміщеннях різних класів чистоти, оглядається і зберігається до прання окремо. Прання, сушіння, термічну обробку та пакування одягу, призначеного для роботи в приміщеннях різних класів чистоти, проводиться окремо.

Одяг працюючих з живими культурами мікроорганізмів до прання піддається відповідній дезінфекційній обробці.

Обґрунтування стадії підготовки миючих та дезінфікуючих засобів.

Для санітарної обробки застосовують миючі, дезінфікуючі та миюче-дезінфікуючі засоби, які дозволені для застосування при митті та дезінфекції приміщень, тари, інвентарю, технологічного обладнання та інших об'єктів у хіміко-фармацевтичній промисловості. Обробка рук персоналу відіграє важливу роль у виробництві лікарських препаратів, оскільки це один із методів захисту від мікробіологічного забруднення.

Тому для санітарної підготовки персоналу використовують такі засоби як:

Октенідерм – засіб для гігієнічної дезінфекції шкіри рук виробництва фірми "Schulke&Mayr" (Німеччина). Октенідерм – це безбарвна прозора рідина, яка має помірний запах ізопропілового спирту.

Октенідерм є досить безпечним у використанні, належить до мало небезпечних речовин (4 клас небезпеки за ГОСТ 12.1.007) при введенні в шлунок. Не виявляє шкіряно-подразнюючих та сенсibiliзуючих властивостей при одно та багаторазовому нанесенні на шкіру. Гарантійний термін зберігання 5 років з дати

виготовлення. Октенідерм виявляє бактерицидні, віруліцидні та фунгіцидні властивості.

Цей засіб використовується для гігієнічної дезінфекції шкіри рук персоналу. Персонал повинен приступати до роботи після повного висихання октенідерму.

Перекис водню являє собою безбарвну прозору рідину. Перекис водню – негорюча рідина, сильний окислювач. Розкладається на воду та кисень, змішується з водою в будь-якому співвідношенні.

Перекис водню ушкоджує об'єкти з заліза, хрому, свинцю, срібла, марганцю, чавуна, міді, латуні, нелегірованих і низьколегірованих сталей.

Перекис водню відноситься до високонебезпечних речовин. Гарантійний термін зберігання 6 місяців з дати виготовлення. Зберігають у складських приміщеннях, які забезпечують захист від дії сонячних променів, при температурі не вище 30 °С. Перекис водню виявляє бактерицидні, віруліцидні та спороцидні властивості.

Використовується 3,0% розчини перекису водню для поточної дезінфекції технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю та внутрішньоцехової тари, а також 6,0% розчини перекису водню для дезінфекції технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю та внутрішньоцехової тари, які контаміновані споровими формами мікроорганізмів.

Етиловий спирт – безбарвна рідина з характерним запахом. Належить до легкозаймистих рідин. Під час виконання робіт зі спиртом етиловим повинні застосовуватись герметичні апарати, обладнання та герметична транспортна тара. Виявляє гермістатичні та герміцидні властивості щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій та деяких видів грибів. Не виявляє спороцидної дії.

Використовується 76% розчини для дезінфекції обладнання та антисептичної обробки рук персоналу.

Отже, вибрані дезінфікуючі та миючі розчини є оптимальними для санітарної підготовки виробництва, оскільки вони є менш шкідливими для людини, в них більший термін зберігання, є ефективними у боротьбі з мікроорганізмами.

Обґрунтування стадії підготовки приміщень

Приміщення, в яких відбувається виробничий процес, повинні представляти мінімальний ризик у плані контамінації вихідної сировини, матеріалів або продукції.

У даному проекті приміщення спроектовані таким чином, що забезпечують мінімум можливості забруднення готового продукту виробництва, тобто мінімум місць скупчення пилу, подачу повітря контрольованої чистоти, підтримка підвищеного тиску.

При необхідності в приміщенні підтримують визначену температуру і вологість. Такі приміщення називають «чистими». Важливою характеристикою «чистого» приміщення є його клас.

Клас «чистого» приміщення характеризується класифікаційним числом, що визначає максимально допустиму концентрацію аерозольних часток, визначеного розміру в 1 м³ повітря. «Чисте» приміщення може містити одну або декілька «чистих» зон. «Чисті» зони можуть бути і поза «чистим» приміщенням. «Чисті» зони можуть створюватися в локальних площах: ламінарні шафимодулі, ізолятори, блоки, укриття й ін.

Для досягнення класу чистоти D потрібна кратність повітрообміну, що враховує розмір приміщення, устаткування що знаходяться в ньому і персонал. Для підтвердження класу чистоти зон у функціонуючому стані в них періодично здійснюється мікробіологічний контроль з використанням методу седиментації на пластини, відбору проб повітря і з поверхонь. Додатково здійснюється мікробіологічний контроль, коли не проводяться технологічні операції.

Обґрунтування стадії підготовки обладнання та комунікацій

Обладнання, яке використовується для виробництва глутатіону, має гладку поверхню, виготовленого з нетоксичного, стійкого до корозії металу, який стійко витримує обробку дезінфікуючих розчинів і контакт з сировиною.

Всі деталі обладнання, які контактують з продуктами виробництва знімаються, для полегшення їх обробки дезінфікуючими розчинами чи стерилізації.

Обладнання розміщено так, щоб попередити забруднення продукту в процесі його виробництва, щоб полегшити мийку, обробку, експлуатацію і обслуговування обладнання.

Обладнання регулярно проходить профілактичний ремонт і огляд.

В підготовку обладнання до роботи входить мийка і стерилізація частин, що знімаються, обробка зовнішніх і внутрішніх частин м'якими і дезінфікуючими засобами, а саме перекис водню, аквідез.

Підготовку обладнання до роботи проводять до початку чи після проведення технологічного процесу в спецодезі.

В якості дезінфікуючих засобів застосовують розчини, які описані вище.

Дезінфікуючі розчини періодично (раз на два тижні) змінюють, щоб попередити появу стійких форм мікроорганізмів.

Для миття обладнання використовують поролонові губки, серветки з капронових або шовкових тканин з обробленими краями. Матеріали і інвентар зберігають окремо і використовують тільки за призначенням.

Після підготовки обладнання складають протокол готовності обладнання до роботи, в якому вказують результат перевірки, та вказують маркування, що відповідає готовності обладнання до роботи (“ Обладнання очищене ”).

Обґрунтування стадії підготовки стерильного технологічного повітря

Найважливішим фактором забезпечення чистоти в чистих приміщеннях, де відбувається виробництво лікарських засобів є очищення великих обсягів вентиляційного повітря відповідно до технологічних особливостей процесів, які проводяться у цих приміщеннях. Необхідний ефект досягається застосуванням декількох ступенів очищення.

Правильна організація потоків повітря є одним з вирішальних факторів, що визначають ефективність чистих приміщень. Повітряний потік повинний винести

з приміщення всі частинки, які виділяються людьми, устаткуванням і матеріалами. При цьому не повинно бути застійних зон з поганим обміном (циркуляцією) повітря. Потік повітря повинен обтікати всі поверхні в чистому приміщенні і видаляти частинки з прилеглого до цих поверхонь простору.

Існує два принципово різних види потоків повітря:

- ✓ однонаправлений (односпрямований) потік, що часто називають ламінарним, що не зовсім точно;
- ✓ неоднаправлений потік, який часто називають також турбулентним.

У даному проекті по виробництві глутатіону у чистих приміщеннях класу Д використовується неоднаправлений потік повітря.

Суттєвим елементом проектування системи підготовки повітря є вибір фільтрів. Фільтр – найважливіший компонент системи очистки повітря для чистих приміщень, оскільки з його допомогою остаточно встановлюється необхідний ступінь чистоти приміщення. Триступінчасте очищення повітря за допомогою фільтрів грубого, тонкого очищення на першому й другому ступені, відповідно, і мікрофільтрів або фільтрів абсолютно тонкого очищення на третьому ступені дозволяє досягти необхідного результату. Установа перед кожною фільтрувальною групою фільтрів більше низького щабля очищення у вигляді попереднього блоку очистки подовжує загальний термін служби основних фільтрів.

Згідно з стандартом фільтрувальні елементи підрозділяються на такі групи:

Група **G** - фільтри грубого очищення – фільтри попередньої очистки(coursedustfilters);

Група **F** - фільтри тонкої очистки (finedustfilters);

Група **H** - фільтри (HighEfficiencyParticularAirfilters) HEPA;

Група **U** - фільтри (UltraLowPenetrationAir) ULPA.

Класи фільтрів. Фільтрувальні елементи групи H і групи U класифікуються в залежності від своїх характеристик. Фільтри групи H

підрозділяються на п'ять класів(табл. 5.1): Н 10; Н 11; Н 12; Н 13; Н 14. Фільтри групи U підрозділяються на три класи: U 15; U 16; U 17;

Класифікація фільтрів HEPA і ULPA

Таблиця 7.1

Клас фільтра	Інтегральні значення		Локальні значення	
	Ефективність, %	Проникність, %	Ефективність, %	Проникність, %
Н 10	85	15	—	—
Н 11	95	5	—	—
Н 12	99,5	0,5	—	—
Н 13	99,95	0,05	99,75	0,25
Н 14	99,995	0,005	99,975	0,025
U 15	99,9995	0,0005	99,9975	0,0025
U 16	99,99995	0,00005	99,99975	0,00025
U 17	99,999995	0,000005	99,9999	0,0001

Основна функція фільтрів першого ступеню – видалення великих часток пилу для попередження пошкодження вентилятора. Для тонкого очищення повір'я використовують такі фільтри, для класу чистоти С/D фільтр групи **F**, для класу чистоти А/В використовують фільтри групи **H** (HEPA), а саме (H₁₁) – це фільтри, які видаляють частинки більше за 0,3 мкм, та (H₁₃) – це фільтри, які видаляють частинки менше за 0,3 мкм.

Порівнявши ці типи фільтрів, зроблено висновок, що на даному виробництві доцільнішим є використання фільтрів типу HEPA оскільки при виробництві нестерильних лікарських засобів допускаються мікроорганізми розмірами 0,5 мкм, а тому краще використовувати фільтри типу HEPA, які є дешевшими за фільтри надтонкого очищення ULPA.

7.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки

Вимоги, які висуваються до первинної упаковки лікарських засобів:

- безпечність матеріалів з яких вона виготовлена;

- сумісність матеріалів первинної упаковки і лікарського засобу;
- відсутність можливої взаємодії між ЛЗ і контейнером;
- захист ЛЗ від факторів зовнішнього середовища(вологи, світла, температури);
- забезпечення збереження якості ЛЗ до кінця терміну придатності (стабільність).

Упаковка глутатіону повинна захищати препарат від дії вологи, так глутатіон є гігроскопічною речовиною і швидко розкладається при відносній вологості більшій за 25 %. Тому кращою для цього є контурна чарункова оболонка типу алюміній-алюміній виготовлена з алюмінієвої фольги шляхом термосклеювання.

7.4. Обґрунтування вибору підготовки води

Однією з найважливіших частин виробництва будь-якого підприємства фармацевтичної промисловості є підготовка різних типів води. Це обумовлено широким спектром напрямків застосування.

На виробництві лікарських засобів використовується вода двох категорій:

- ✓ очищена вода;
- ✓ вода для ін'єкцій.

Для отримання води належної якості необхідно проводити обробку води питної, яка поступає на підприємство. При цьому вода питна повинна бути безпечна в епідеміологічному відношенні, не шкідлива по хімічному складу та мати добрі органолептичні властивості.

Водопідготовкою називається спосіб поліпшення якості води, що поступає з джерела водопостачання для виробничого використання.

Вода очищена (дистильована) може використовуватися безпосередньо в технологічному процесі отримання лікарських засобів, як на стадіях основного виробництва, так і для проведення ряду допоміжних робіт. Для отримання води очищеної використовують вугільні фільтри, які видаляють активний хлор, потім

відбувається пом'якшення води для видалення небажаних мінеральних забруднень.

Пом'якшення води проводиться двома основними способами: осадженням і іонним обміном.

Осадження. Спосіб полягає в переведенні іонів кальцію і магнію в малорозчинні з'єднання шляхом додавання до води розчинів розрахованих кількостей гідрату окису кальцію, їдкого натрію, кристалічного карбонату натрію та інше. Після декількох часів взаємодії сполук, що утворюють накип з вказаними реаكتивами утворюються осади, що потім видаляються відстоюванням або фільтруванням. Для фільтрування можливе використання пісчаних фільтрів.

Іонний обмін. Заснований на обміні катіонів кальцію і магнію на катіони натрію або водню, що містяться в практично нерозчинному у воді матеріалі – катіоніті.

Вода, яка пропущена через катіонітові фільтри, буде містити тільки натрієві солі або мінеральні кислоти, які добре розчинні і нездатні до утворення накипу в апаратах для дистиляції.

У даному проекті використовується іонний обмін, тому що він має ряд переваг перед осадженням: більш якісне усунення жорсткості води; проста конструкція і просте обслуговування апаратури; низька вартість водопідготовки; можливість одночасного видалення органічних речовин. До недоліків цього способу відноситься збільшення лужності і кількості деяких солей в пом'якшеній воді.

Наступним етапом очищення води є знесолювання (демініралізація) води (звільнення від присутності небажаних катіонів і аніонів) є продовженням циклу робіт по видаленню мінеральних забруднень після пом'якшення води і проводиться одним з двох способів – за допомогою іонного обміну або способом розділення через мембрану.

Іонний обмін заснований на використанні іонітів – сігчастих полімерів різної міри зшивки, з гелевою або мікропористою структурою, ковалентно пов'язаних з іоногенними групами. Дисоціація цих груп у воді або у розчинах дає

іонну пару – фіксований на полімері іон і рухомий противоіон, який обмінюється на іони однойменного заряду (катіони або аніони) з розчину.

Іонообмінна технологія забезпечує класичне знесолювання води і є економічною системою при одержанні очищеної води, яка використовується для виготовлення лікарських засобів. Але, при тривалому використанні іонообмінників можуть спонтанно виникнути проблема росту мікроорганізмів.

Мембранні способи одержання знесоленої води. Серед способів розділення через мембрану можна виділити: зворотний осмос, ультрафільтрацію, діаліз, електродіаліз, випаровування через мембрану. Ці методи засновані на використанні перегородок, що володіють селективною проникністю, завдяки чому можливе отримання води без фазових і хімічних перетворень.

У даному проекті використовується найефективніший, найуживаніший та найекономічніший на сьогоднішній день спосіб знесолення води це розділення через мембрану за допомогою зворотного осмосу (гіперфільтрація) – це перехід розчинника (води) з розчину через напівпроникну мембрану під дією зовнішнього тиску. Надлишковий робочий тиск сольового розчину набагато більше осмотичного. Рухомою силою зворотного осмосу називають різницю тиску по обидві сторони мембрани. Зворотний осмос – дуже тонкий рівень фільтрації. Зворотноосмотична мембрана діє як бар'єр для всіх розчинених солей, неорганічних молекул, органічних молекул з молекулярною масою понад 100, а також мікроорганізмів і пірогенних речовин.

Серед переваг зворотного осмосу слід зазначити простоту і незалежність від вмісту солі у вихідній воді. При здійсненні осмотичного процесу проблему представляє вибір мембран, що володіють відповідною однорідністю.

7.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

Обґрунтування вибору способу приготування таблетмаси та її таблетування.

Найбільш важливою і найбільш часто вживаною формою для орального введення лікарських засобів, що містять глутатіон, є таблетка або таблетка з

плівковим покриттям. До теперішнього часу відомі два способи виготовлення таблетки або таблетки з плівковим покриттям, а саме грануляція і безпосереднє формування таблеток.

Зазвичай в процесі грануляції дуже тонкоподрібнені, порошкоподібні, когезійні, несипкі і нестискувані фармацевтично активні агенти гранулюють з використанням багатостадійного процесу з отриманням крупнозернистих, сипучих і стисливих гранул. У такому процесі на першій стадії фармацевтично активні агенти змішують зі сполучним агентом, ущільнюють у вологому або сухому стані і потім на другій стадії гранулюють за допомогою сита. При використанні способу вологої грануляції здійснюють сушку гранул, що включає послідовне просіювання до отримання гранули остаточного розміру. При використанні способу сухої грануляції зазвичай після грануляції необхідно відокремити частинки, які є або занадто грубозернистими, або занадто дрібнозернистими. Отримані грануляти можуть бути змішані з необхідними для формування таблеток, переважно фармацевтично прийнятними допоміжними речовинами і спресовані в таблетки.

Грануляція зазвичай вимагає тривалого періоду часу і є енергоємною і дорогою і внаслідок цього може бути дуже неекономічною. Описані способи одержання таблеток вимагають використання великої кількості апаратури і є трудомісткими, і внаслідок великої кількості стадій виробництва існує багато джерел помилок.

Безпосереднє формування таблеток є істотно більш простим способом; фармацевтично активні агенти просто змішують з допоміжними речовинами (з носіями, сполучними агентами, змащувальними речовинами і т.д.) і з отриманої суміші формують таблетки. Однак до теперішнього часу не дивлячись на очевидні економічні переваги в порівнянні з грануляцією безпосереднє формування таблеток може використовуватися тільки в обмеженій мірі, оскільки воно зазвичай може проводитися тільки при наявності наступних умов, наприклад, таких: фармацевтично активні агенти самі по собі повинні мати достатню сипучість і стисливість, а вміст фармацевтично активних агентів в таблетці має

становити максимум 100 мг або 25%. За таких умов властивості хорошої сипучості і хорошої стисливості можуть бути досягнуті тільки при додаванні великих кількостей спеціальних допоміжних речовин (наприклад, *Tablettose*®, *Ludipress*® і т.д.).

Ці характеристики роблять практично неможливим здійснення способу безпосереднього формувань таблеток для глутатіону.

Таким чином, при виготовленні таблетки або таблетки з плівковим покриттям на основі глутатіону, як правило, повинна проводитися перша стадія грануляції з метою забезпечити отримання стисливої суміші з задовільними характеристиками сипучості і стисливості, а також з метою запобігти розкладанню діючих речовин. Однак внаслідок надзвичайно високої чутливості глутатіону до вологості волога грануляція з використанням водно-спиртових сумішей або розчинів сполучних агентів або з використанням чистої води, яка є в даний час загальноприйнятим методом отримання таблеток або пігулок з плівковим покриттям, не може бути здійснена, оскільки в процесі зволоження і подальшої грануляції порошку, а також у процесі подальшої сушки гранул глутатіон може розкладатися до неприйняттого рівня в результаті присутності води.

В даний час на практиці для виготовлення таблеток або пігулок з плівковим покриттям, що містять глутатіон, що володіють достатньою однорідністю, як правило, використовують тільки два альтернативні способи грануляції, обидва з яких можуть бути складними і дуже неекономічними і неекологічними і якими є наступні:

- волога грануляція з використанням безводних органічних розчинників.

Діюча речовина, а саме глутатіон, змішують на першій стадії зі сполучним агентом, суміш зволожують безводним органічним розчинником, гранулюють і сушать. Сполучний агент також можна додавати розчиненим у розчиннику. Отримані грануляти можна просівати з отриманням гранул кінцевого розміру і змішувати з допоміжними речовинами для формування таблеток (єднальні агенти, розпушувач і т.д.) до пресування в таблетки. Такий спосіб є неекономічним і

неекологічним, оскільки розчинник повинен піддаватися переробці для вторинного використання; існує необхідність у спеціальному обладнанні, виникають втрати розчинника і т.д.

- суха грануляція (ущільнення і формування брикетів)

Діюча речовина, а саме, глутатіон, як правило, змішують з допоміжними компонентами і ущільнюють в сухій формі. Ущільнення може проводитися шляхом пресування суміші фармацевтично активний агент / сполучний агент або за допомогою валкового ущільнювача, або за допомогою преса для таблетування, забезпеченого великими штампами для формування так званих "брикетів". Після грануляції, як правило, необхідно відокремити частинки, які є або занадто грубозернистими, або занадто дрібнозернистими, і переробити ці частинки для вторинного використання, при цьому грубозернисті частинки знову подрібнюють, а дрібнозернисті знову ущільнюють (формування брикету). Отримані таким шляхом грануляти можуть бути змішані з допоміжними речовинами, необхідними для формування таблеток (змащувальні речовини, розпушувачі і т.д.), які переважно є фармацевтично прийнятними, і суміш можна спресувати з отриманням таблеток. Частина змащувальних речовин або розпушувачів може бути включена (у суміші з діючою речовиною) до ущільнення / формування брикету.

Такий виробничий процес з використанням сухої грануляції може виявитися недоцільним у зв'язку з тим, що:

- він є дуже трудомістким;
- він є дорогим;
- втрати діючої речовини є практично неминучими;
- для нього може вимагатися велика кількість апаратури;
- для нього потрібно багато попередньої трудомісткої роботи;
- для нього може виявитися необхідним велика кількість виробничих стадій;
- існує багато джерел помилок.

Незважаючи на такі недоліки, зазначений спосіб застосовується для виготовлення таблеток з плівковим покриттям на основі глутатіону очевидно через відсутність альтернативних можливостей .

Інші джерела показують, що суміш фармацевтично активних агентів, що включає глутатіон і необов'язково містить допоміжні речовини, придатна для виготовлення таблетки (або таблетки з плівковим покриттям) шляхом прямого пресування.

Змішування глутатіону, можна проводити, наприклад, у змішувачі з примусовим перемішуванням потоків або в змішувачі з вільним перемішуванням. Допоміжні речовини, які переважно є фармацевтично прийнятними, наприклад, допоміжні речовини, зазвичай вживані в способах формування таблеток, такі як, наприклад, змащувальні речовини, наприклад стеарат магнію, агенти, сприяють відділенню від форми, наприклад тальк, зв'язують агенти або наповнювачі, наприклад полівінілпіролідон, мікрокристалічна целюлоза (Avicel), модифікований крохмаль (крохмаль типу 1500 J), розпушувачі, наприклад поперечно зшитий карбоксиметилцелюлоза (Ac-Di-Sol), поперечно зшитий карбоксиметілірованний крохмаль (Primojel) або поперечно зшитий полівінілпіролідон (PVPP), можуть бути присутніми в суміші агломератів глутатіону переважно в невеликих кількостях, оскільки було виявлено, що вимагаються тільки невеликі їх кількості.

Суміші, що містять агломерати глутатіону і необов'язково містять допоміжні речовини можна безпосередньо пресувати в таблетки з високою однорідністю вмісту діючих речовин і з високою однорідністю маси таблеток, задовільною механічною стабільністю і швидким вивільненням діючої речовини. Оскільки зволоження не потрібно під час всього процесу виготовлення таблеток, глутатіону не розкладається під дією вологи, що додатково забезпечує високу стабільність глутатіону в остаточній фармацевтичній композиції.

Обґрунтування вибору обладнання для змішування та опудрювання компонентів

Характеристика високошвидкісного змішувача- KSM - 600

Високошвидкісний міксер серії "KSM" – високопродуктивна, універсальна машина для змішування (рис 7.7). Котел відполірований зсередини, завдяки чому досягається рівне і поступове просування продукту. Синхронне обертання мішалки і ножа сприяє швидкому змішуванню. Ці операції можуть бути об'єднані в одну, що мінімізує час виконання операції. Для проведення операції змішування необхідно всього 3 хвилини. Навіть якщо порошок, що використовується, розрізняється з щільністю або має велику відмінність за розміром частинок, перемішування може бути здійснене протягом 15–17 хвилин. Всі частини конструкції, з якими контактує порошок, виготовлені з нержавіючої сталі. Машина відповідає вимогам GMP.



Рис. 7.7. Високошвидкісний змішувач KSM - 600

Потужність, кВт/год – 56

Продуктивність, кг/год – 200

Розміри (ширина × довжина × висота), мм – 2580 × 1650 × 2640

Вага, кг – 5500

Струм, В – 380

Швидкість обертання, об/хв – 3400

Матеріал – нержавіюча сталь

Відповідає стандарту GMP – так [48].

Змішувач для сухого змішування AZO

Короткий опис обладнання

Змішувач для сухого змішування AZO призначений для здійснення операції опудрювання таблеткових мас за допомогою змішування з опудрювальним агентом, а також для отримання гомогенної суміші декількох завантажень порошків з подальшим опудрюванням. Змішувач для сухого змішування AZO використовується разом з бінами компанії UCON Containersysteme, об'ємом 1200 літрів. Змішувач-гомогенізатор складається з базової структури і обертає раму, на яку встановлюється бін за допомогою виличного підйомника (ручного або електричного). Змішування компонентів, що знаходяться всередині біна, проводиться шляхом обертання біна. Під час обертання біна продукт безперервно знаходиться в стані змішування, завдяки чому досягається гомогенізація всього оброблюваного продукту.

Обертання біна здійснюється за допомогою електродвигуна, оснащеного частотним перетворювачем для регулювання швидкості обертання і плавного запуску / зупинки обертання. Система управління забезпечує зберігання програм з можливістю завантаження програми з панелі управління, причому в системі управління передбачено 3 рівні паролів доступу для операторів, технологічного і обслуговуючого персоналу.

Обертюва рама виконана з нержавіючої сталі AISI 304 (1,4301) з полірованою поверхнею і заполірованими зварними швами. Обертюва рама дозволяє розміщувати і закріплювати біни, що містять компоненти для змішування. Змішувач-гомогенізатор забезпечений системою фіксації біна, що складається з двох опор зі спеціальними кріпленнями (нижньої рухомої платформи і верхньої обмежувальної рами), одна з яких приводиться в рух за допомогою гідравлічного приводу. Рама змішувача обертається на рухомий опори (базова структура), яка дозволяє завантажувати біни в горизонтальному положенні.

Загальний вигляд Змішувач для сухого змішування AZO представлений нарис 7.8.



Рис.7.8. Загальний вигляд змішувача для сухого змішування AZO

Загальний вигляд органів управління змішувача-гомогенізатора представлений на рис 7.9.



Рис.7.9. Панель управління змішувача для сухого змішування AZO

Технічні дані змішувача

Ідентифікація устаткування

Характеристики змішувача для сухого змішування AZO представлені в таблиці 7.1:

Таблиця 7.1

Характеристика	Ідентифікація
Виробник	AZO GmbH
Модель	AZO MISCHER
Тип	513/702668

Енергоспоживання обладнання

Енергоспоживання установки представлено в таблиці нижче

Таблиця 7.2

Енергоресурс і його характеристика		Значення
Електроенергія	Споживана потужність, кВт:	
	- головна панель	1
	- головний двигун	7,5
	- двигун гідравлічного насоса	1,5
	Напруга В	380, 3 фази
	Частота, Гц	60

Змішувач-гомогенізатор CanguroTumbler ELT 1200

Короткий опис обладнання

Змішувач-гомогенізатор CanguroTumbler ELT 1200 призначений для здійснення операції опудрювання таблеткових мас за допомогою змішування з опудрювальні агентом, а також для отримання гомогенної суміші декількох завантажень порошків з подальшим опудрюванням. Змішувач-гомогенізатор CanguroTumbler ELT 1200 використовується разом з бінами компанії Zanchetta, тип PowderBinSeries 1200 Cap 1500 LT і Vima, тип Contenitore PHBIN 1500 LT, об'ємом 1500 літрів. Змішувач-гомогенізатор складається з базової структури і обертає раму, на яку встановлюється бін за допомогою вилючного підйомника (ручного або електричного). Змішування компонентів, що знаходяться всередині біна, проводиться шляхом обертання біна. Під час обертання біна продукт безперервно знаходиться в стані змішування, завдяки чому досягається гомогенізація всього оброблюваного продукту. Обертання біна здійснюється за

допомогою електродвигуна, оснащеного частотним перетворювачем для регулювання швидкості обертання і плавного запуску / зупинки обертання.

Роздруківка параметрів технологічного процесу, а також відхилень або аварійних станів здійснюється за допомогою вбудованого принтера. Система управління забезпечує зберігання до 100 програм з можливістю завантаження програми з панелі управління, причому в системі управління передбачено 4 рівні паролів доступу для операторів, технологічного і обслуговуючого персоналу. Обертова рама виконана з нержавіючої сталі AISI 304 з полірованою поверхнею і заполіруваними зварними швами. Обертова рама дозволяє розміщувати і закріплювати біни, що містять компоненти для змішування. Змішувач-гомогенізатор забезпечений системою фіксації біна, що складається з двох опор з куточками (нижній рухомої платформи і верхньої обмежувальної рами), одна з яких приводиться в рух за допомогою електричного приводу. Рама змішувача обертається на рухомій опорі (базова структура), яка дозволяє завантажувати біни в горизонтальному положенні, в той час як обертання біна відбувається при асиметричному моменті, за рахунок кута в 15 градусів по відношенню до самої бази змішувача-гомогенізатора для полішеного перемішування. Загальний вигляд змішувача-гомогенізатора Canguro Tumbler ELT 1200, s / n V0593.03 представлений на рис.7.10.



Рис 7.10. Загальний вигляд змішувача-гомогенізатора Canguro Tumbler ELT 1200, s / n V0593.03

Загальний вигляд органів управління смесітля-гомогенізатора представлений на рис. 7.11.



Рис. 7.11. Панель управління змішувача-гомогенізатора Canguro Tumbler ELT 1200

Роздруківка параметрів технологічного процесу і відхилень (якщо такі були) станів здійснюється за допомогою вбудованого принтера на панелі управління. На роздруківці вказується: дата і час; статус виконання процесу; номер серії продукту; код (назва) продукту; логін оператора; рівень доступу оператора; назва рецепта; встановлений час виконання процесу; фактичний час виконання процесу; встановлена швидкість обертання; номер звіту; місце для підпису оператора. Технічні дані змішувача-гомогенізатора

Ідентифікація устаткування

Характеристики змішувача-гомогенізатора CANGURO TUMBLER ELT 1200, представлені в таблиці 7.3:

Таблиця 7.3

Характеристика		Ідентифікація
Виробник		Zanchetta, Італія. Підрозділ RomacoS.p.A., Італія
Модель		CANGURO TUMBLER
Тип		ELT 1200
Массанетто, кг		3300
Діапазон швидкості обертання, об/хв.		4 – 20
Час обертання, хв.		1 – 99
Допустимі умови зовнішнього середовища (для роботи)	Температура, °С	0 – +40
	Відносна вологість, %	max. 80

Енергоспоживання обладнання

Енергоспоживання установки представлено в таблиці нижче. Енергоресурс і його характеристика		Значення
Електроенергія	Споживана потужність, кВт	18,5
	Напруга, В	400, 3 фази
	Частота, Гц	50
	Електроживлення панелі керування, В	24, -/~

Обґрунтування вибору обладнання для таблетування таблетмаси

Загальна характеристика таблетпреса FETTE, тип 2090

Короткий опис обладнання

Таблетпрес призначений для здійснення процесів таблетування порошкоподібних або гранульованих матеріалів.

Процес таблетування здійснюється шляхом синхронного руху ротора, з встановленими матрицями, і пуансонів, завдяки чому кожна пара пуансонів (верхній і нижній) потрапляє у відповідні заповнені порошком матриці. Вертикальне переміщення пуансонів відбувається за рахунок їх руху по копірах.

Для заповнення матриць нижній пуансон опускається в своє нижнє положення (при цьому робоча частина пуансона знаходиться в матриці) і далі таблетуєма маса подається в матриці з використанням спеціального пристрою наповнення безперервної дії. Остаточну кількість заповнення визначає нижній пуансон поверненням в заповнену порожнину матриці. Після наповнюючого пристрою в матрицю опускається верхній пуансон.

Застосовується пристрій наповнення примусового типу з трьома обертовими мішалками-лопатями, швидкість обертання яких змінюється з 10 до 120 об / хв з панелі управління, тим самим, регулюючи кількість фармацевтичної маси в зоні заповнення.

Наявність і достатній рівень порошку в завантажувальному бункері дозуючого пристрою безперервно контролюються системою управління з використанням спеціально призначеного датчика. Заповнені порошком матриці при обертанні ротора переміщуються до станції попереднього пресування. Верхні пуансони торкаються матричного отвору, занурюються в нього і здавлюють таблетуєму масу, при цьому відбувається витіснення повітря з таблетуємого матеріалу і дожимання за допомогою нижнього пуансона. Після цього матриця переміщається на станцію основного пресування, де власне і здійснюється процес таблетування. Верхній і нижній пуансони проходять під роликami основного пресування, відбувається збільшення зусилля пресування до необхідного значення, при якому відбувається остаточне пресування і формування таблетки із заданою висотою. Після цього верхні пуансони піднімаються, а нижні виштовхують таблетки з матриць.

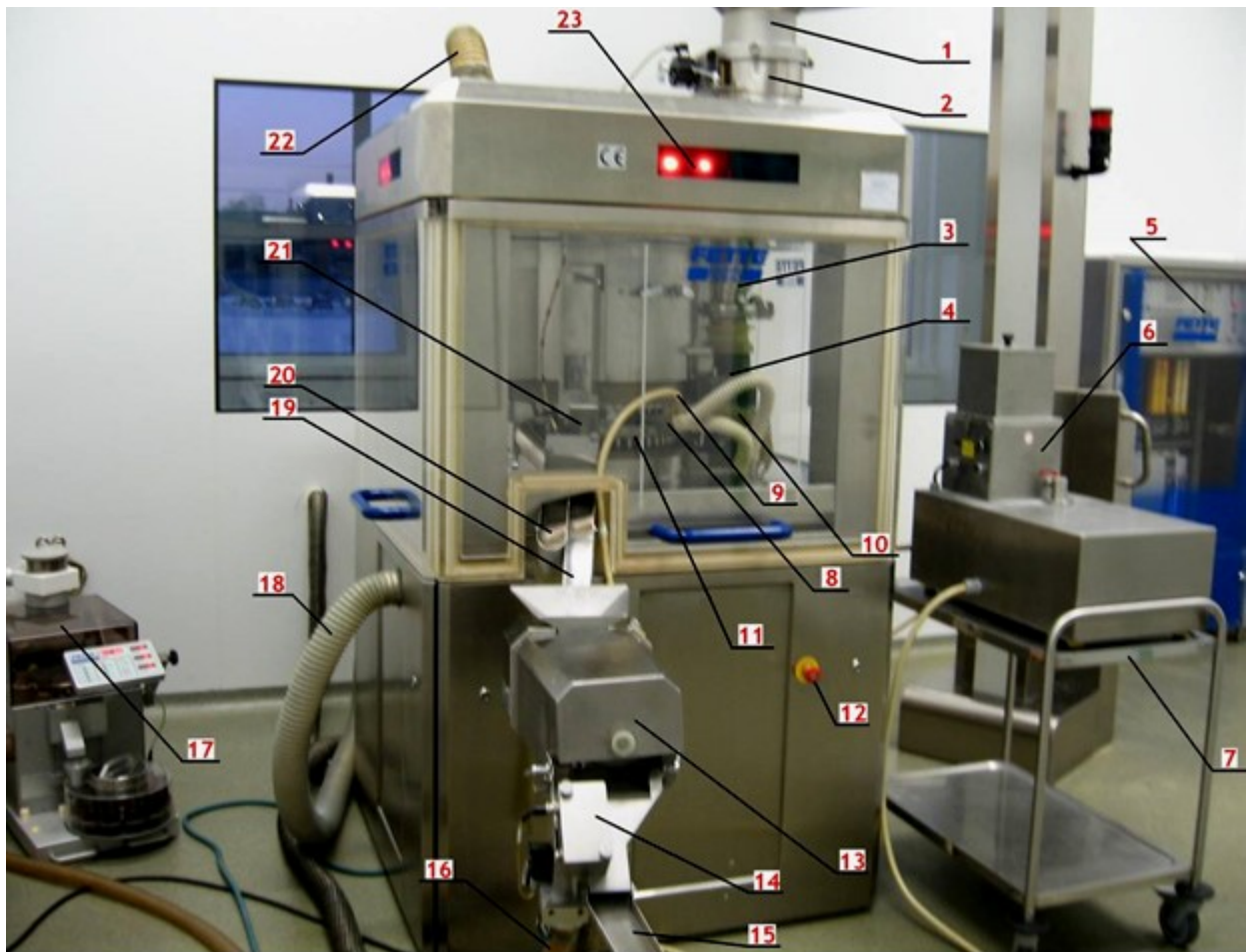


Рис.7.12. Загальний вигляд таблетпреса FETTE, тип 2090

1 - з'єднувальний патрубок для подачі фармацевтичної маси з біна;

2 - вузол вібростеми подачі фармацевтичної маси з біна;

3 - завантажувальна воронка для влаштування наповнення;

4 - пристрій наповнення Fill-O-Matic; 5 - електрошафа;

6 - пристрій подачі ковзних речовин; 7 - візок для транспортування

пристрою

подачі ковзних речовин;

8 - сопло подачі ковзних речовин;

9 - шланг подачі ковзних речовин;

10 - шланги відсмоктування повітря і зайвої маси від сопла подачі

КОВЗНИХ

речовин;

11 - ротор таблетпреса;

12 - аварійна кнопка передньої панелі;

- 13 - обеспиліватель GrateX;
- 14 - розподільний клапан для відбору проб пристрої Checkmaster 4;
- 15 - вихідний канал для якісних таблеток;
- 16 - канал відбору таблеток для влаштування Checkmaster 4;
- 17 - пристрій для in-line контролю параметрів таблеток Checkmaster 4;
- 18 - відсмоктування повітря таблетпреса (нижня частина);
- 19 - вихідний канал для якісних таблеток;
- 20 - вихідний канал для відбракованих таблеток;
- 21 - направляючий пристрій;
- 22 - відсмоктування повітря таблетпреса (верхня частина);
- 23 - сигнальні лампи таблетпреса на фронтальній панелі.



Рис. 7.13. Загальний вигляд пристрою для in-line контролю параметрів таблеток Checkmaster 4

Технічні характеристики обладнання

Характеристика	Ідентифікація		
	Таблетпрес FETTE, тип 2090	Знепилювач Gratex	Checkmaster 4
Виробник	FETTE COMPACTING GMBH (WILHELM FETTE GMBH), Германия		
Тип	2090	–	Checkmaster 4
Модель (версія)	FETTE 2090	–	–
Габарити: Д×Ш, мм	1200×1200	733×290	725×615
Висота, мм	2239	795	595
Висота в піднятому стані, мм	–	995	607
Вага, кг	3600 3500 (таблетпрес) + 100 (ПУ)	32	–
Допустимі умови зовнішнього середовища (рекомендовані значення для роботи)	Відносна вологість, %	5 – 95	
	Температура роботи обладнання, °С	5 – 35	
	Температура роботи пульта управління, °С	0 – 25	
	Температура роботи електрошафи, °С	0 – 25	

Обґрунтування вибору способу насення оболонки

Нанесення оболонок переслідує такі цілі: надати таблеткам гарний зовнішній вигляд, збільшити їх механічну міцність, приховати неприємний смак, запах, захистити від впливу навколишнього середовища (світла, вологи, кисню повітря), локалізувати або пролонгувати дію лікарської речовини, захистити слизові оболонки стравоходу і шлунку від руйнуючої дії лікарської речовини. Покриття, що наносяться на таблетки, можна розділити на 3 групи: дражировані, плівкові і пресовані.

Плівкові покриття.

Створюються на таблетках шляхом нанесення розчину плівкоутворюючої речовини з подальшим видаленням розчинника. При цьому на поверхні таблеток утворюється тонка (0,05 - 0,2 мм) оболонка. Плівкові покриття в залежності від розчинності ділять на наступні групи: водорозчинні, розчинні в шлунковому соку,

розчинні в кишечнику і нерозчинні покриття.

Водорозчинні покриття захищають від механічних пошкоджень, але не оберігають від впливу вологи повітря. Водорозчинні оболонки утворюють ПВП, МЦ, оксипропіленметилцелюлоза, Na КМЦ та ін наносяться у вигляді водно-етанольних або водних розчинів.

Покриття, розчинні в шлунковому соку - це плівки, які захищають таблетки від дії вологи, але не перешкоджають швидкому руйнуванню їх у шлунку (протягом 10-30хв). Відносяться полімери, які мають у молекулі замісники основного характеру, головним чином аміногрупи, наприклад діетиламінометилцелюлоза, бензиламіноцелюлоза, параамінобензоати цукрів і ацетилцелюлозу та ін.. Для покриття використовують розчини зазначених речовин в органічних розчинниках: етанолі, ізопропанолі, ацетоні.

Покриття, розчинні в кишечнику. Вони локалізують лікарську речовину в кишечнику, пролонгуючи її дію. Для отримання покриттів використовують ацетилфталіл Ц, метафталіл Ц, полівінілацетатфталат, фталати декстрину, лактози, маніту, сорбіту, шелаку (природні ВМС) Для отримання плівки використовують зазначені речовини у вигляді розчинів в етанолі, ізопропанолі, етилацетаті, толуолі та ін розчинниках, ХФІ розробив технологію покриття таблеток водно-аміачним розчином шелаку і ацетилфталіл Ц. Для покращення механічних властивостей плівок до них додають пластифікатор.

Нерозчинні покриття - плівки з мікропористою структурою. Являють собою розчини етил Ц і ацетил Ц в етанолі, ізопропанолі, ацетоні, толуолі, хлороформі, етилацетаті та ін з додаванням пластифікаторів. Механізм вивільнення лікарської речовини: травні соки швидко проникають через пори нерозчинної оболонки і розчиняють лікарську речовину або викликають її набухання. У першому випадку лікарська речовина дифундує через плівку у зворотному напрямку, у другому - відбувається розрив оболонки, після чого лікарська речовина вивільняється звичайним способом.

Для виготовлення таблеток глутатіону використовуються плівкові покриття розчинні у шлунку, що дозволяє захистити препарат від дії руйнівної дії вологи.

Методи нанесення плівкових покриттів.

Нанесення плівкових покриттів здійснюється в дражирувальних котлах, установках відцентрові дії і в псевдозрідженому шарі. Метод нанесення покриттів в псевдорозрідженому шарі застосовується для нанесення водних покриттів, оскільки дражировочні котли мають низькі показники тепло- і масопередачі і процес покриття протікає повільно, що знижує продуктивність апарату. Використання водних покриттів має ряд переваг: відпадає необхідність уловлювання та регенерації розчинника; готувати водні розчини простіше, вони краще розподіляються по поверхні таблеток. Для плівкових водних покриттів використовують водні розчини оксипропілметил Ц, амонійних солей шелаку і ацетилфталіл Ц. Перед нанесенням водних покриттів поверхні таблеток надають гідрофобність за рахунок нанесення шару рослинної олії. Апарат для нанесення водного плівкового покриття розроблений ЛНПО «Прогрес». При неможливості використання водного плівкового покриття застосовується покриття на основі органічних розчинників. Для нанесення цих покриттів використовують дражировочні котли. Цей метод простий, відрізняється високою продуктивністю при використанні покриттів на основі органічних розчинників. Для нанесення покриття двоопуклі таблетки завантажуються в дражирувальний котел. Перед початком процесу покриття з поверхні таблеток віддається пил (за допомогою повітряного потоку або вакууму). Покриваючий розчин вводиться в котел шляхом багаторазового розбризкування (за допомогою встановленої у отвори котла форсунки).

Обґрунтування вибору обладнання для насення плівкових покриттів

Установка для нанесення покриттів GS, тип НР /М 300

Короткий опис обладнання

Установка для нанесення покриттів GS, тип HP / М 300 призначена для нанесення на таблетки-ядра плівкових і цукрових покриттів. Передбачає використання розчинів і суспензій на водній основі. Загальний вигляд установки представлений на рис. 7.14 і на рис. 7.15.



Рис. 7.14. Загальний вигляд установки для нанесення покриттів GS, тип HP / М 300 (основний модуль - вигляд спереду)

- 1 - пістолет подачі цукрового розчину;
- 2 - лопаті для відводу повітря;
- 3 - оглядове вікно;
- 4 - штанга-тримач



а)

б)

Рис. 7.15. Загальний вигляд установки для нанесення покриттів GS, тип HP / M 300.

а) шафа панелі управління, б) допоміжний модуль (насосна група)

До складу обладнання входять наступні основні елементи:

- котел для нанесення покриттів;
- система лопатей;
- система підготовки повітря;
- системи витяжки з пилозбірником;
- система подачі покривного розчину;
- електропневматична шафа і панель управління;
- знімні елементи (канал вивантаження і система мийних форсунок).

Котел для нанесення покриттів із суцільною стінкою "Pellegrini", тип SPG 300 об'ємом 300л. Виконаний у вигляді обертової біконічної чаші, виготовленої з нержавіючої сталі AISI 316L. Усередині наявні шість вбудованих профільованих лопатей, приварених до внутрішньої поверхні котла, спеціально сконструйованих для перемішування таблеток. Передні оглядові дверцята виготовлені з нержавіючої сталі AISI 316L і загартованого скла для закриття технологічного

отвору в передній частині котла. Диск, що закриває отвір в задній частині котла, виконаний з нержавіючої сталі AISI 316L. Конструкція диска передбачає підключення припливних і витяжних повітроводів, монтаж лампи підсвічування. Внутрішню поверхню котла має шорсткість поверхні $Ra \leq 0,4$ мкм. Блок контролю обертання складається їх 3-х фазного електродвигуна у вибухозахищеному виконанні (Ex-d) з варіатором і редуктором. Варіатор для зміни швидкості обертання котла регулюється спеціальним електродвигуном.

Установка комплектується силіконовими ущільненнями з системою бистрофіксуючих затискачів для зручності очищення. Для освітлення котла зсередини передбачена лампа у вибухозахищеному виконанні Ex-d зі ступенем захисту IP 65.

Підготовка повітря установки для нанесення покриттів GS, тип HP / M 300, представлена блоком підготовки повітря (АНУ), який встановлений окремо в технічній зоні. Робота блоку підготовки повітря забезпечується припливним вентилятором. Забір повітря здійснюється з вулиці. На блоці АНУ відбувається попереднє нагрівання повітря, що поступає, потім попередня фільтрація на фільтрі G4. Потім повітря проходить через охолоджувач, де висаджується волога з повітря. Після цього на теплообміннику основного нагріву відбувається нагрівання повітря до необхідної робочої температури. В якості теплоносія на теплообміннику основного нагрівання використовується технічний пар. Далі повітря проходить очищення на фільтрі F9. Після блоку АНУ встановлений НЕРА фільтр (H13) для фінішної очистки повітря, який за допомогою потроводів поступає в котел для використання в технологічному процесі. Лопаті для витяжки повітря виконані з нержавіючої сталі AISI 316L. Група забезпечена пневматичним циліндром, що дозволяє автоматично піднімати і опускати лопаті.

Устаткування для контролю потоку повітря в котлі забезпечує:

- регулювання і контроль вхідного потоку повітря;
- балансування значення тиску повітря всередині котла відносно тиску повітря в навколишньому приміщенні.

Система індикації вхідного об'єму повітря, з вимірювачем типу «вентури» встановлюється в трубопроводі між системою підготовки повітря і котлом. Витяжний повітряний вентилятор сконструйований в виконанні з трифазним вибухозахищеним двигуном (Ex-d).

Пилозбірник включає поліпропіленовий антистатичний фільтр (з ваговою ефективністю вище ніж 92-93%) з автоматично працюючої механічної струшуючої системи, що приводиться в дію за допомогою вибухозахищеного двигуна. Обладнання оберігає від вибуху мембранна система. Бункер постачений двома пилезбірними кошиками, покритими захисною фарбою. Пилозбірник включає з'єднання для підключення диференційного манометра (і сам дифманометр) для контролю засмічення фільтру.

Пристосування збірника пилу:

з'єднання для автоматичного контролю засмічення фільтру; клапан з пружинною стулкою для регулювання вихідного потоку повітря; пропорційний циліндр плавного регулювання для контролю вищевказаного клапана. Циліндр регулюється за допомогою спеціального регулятора, розташованого на передній панелі котла. Система подачі (дозування) покривають розчинів конструктивно виконана на базі мультисистеми і функціонально здатна підтримувати розпорошення плівкового і цукрового розчинів для покриття, для чого передбачено два окремих контура. Також на установці передбачена система для виробництва пілетів. Для цього використовується одна з систем подачі розчину для покриття і спеціальні лопаті для подачі повітря в котел. При цьому в технологічні отвір в котлі для подачі припливного технологічного повітря підключають канал витяжки, а до технологічного отвору для відбору відпрацьованого (витяжного) повітря з котла підключається припливний повітропровід. Операції зі зміни місць підключення повітроводів можна легко проводити тому на вході в котел зроблені в повітроводи зроблені гнучкими. На даній установці також передбачена система дозування порошку для нарощування «гранул». Для цього до установки додатково підключається шнек для подачі порошку з системою контролю. Оскільки роботи з пілетів і з системою дозування

порошку на обладнанні не виробляються то, предметом розгляду цього протоколу є тільки системи розпилення плівкового і цукрового покриття. Для систем, які є в постачанні устаткування, але не використовуються в технологічному процесі, будуть проводитися тільки тести з кваліфікації монтажу. Контур подачі плівкового покриття оснащений розпиляючою форсункою низького тиску для розпилення розчинів плівкового покриття. Для плівкового покриття використовується перистальтичний насос з трифазним вибухозахищеним двигуном. Для компенсації пульсацій в контурі подачі розчину використовується буферна (компенсаційна) ємність. Компоненти обладнання та пневматики, укладені під допоміжний модуль (насосна група): контроль тиску стисненого повітря на розпорошення; контроль тиску в лінії розчину для нанесення плівкового покриття.

Панель управління призначена для контролю параметрів процесу і управління роботою обладнання. Пристрій вивантаження продукту для котлів типу SPG виконано з нержавіючої сталі AISI 316L і відповідним чином профільованих, а також оснащено пристроєм швидкої фіксації для його розміщення на передній горловині котла. Для проведення очищення обладнання додатково вмонтовується система мийних форсунок усередині котла. Дана система форсунок, виконана з нержавіючої сталі AISI 316L.

Панель управління та інші органи управління устаткуванням

Панель управління (ПУ) призначена для контролю робочих фаз котла і розпилюючого обладнання. Ступінь захисту IP 55. Забезпечує зберігання 25 програм для різних продуктів, служить для контролю часу розпилення / паузи, часу попереднього нагрівання перед робочим процесом, рахунки кількості циклів (розпорошення-пауза-період сушіння), виконуваних в процесі розпилення, а також контролю температури вхідного повітря, ядер і повітря на виході. Панель управління включає в себе такі основні компоненти - дисплей, клавіатуру, блок двохпозиційного управління та індикації. Клавіатура дозволяє програмувати функції обладнання, запускати і зупиняти процеси, встановлювати дані рецептів.

На дисплеї відображаються сторінки, що дозволяють оператору встановити дані щодо функціонування машини і для відображення аварійних повідомлень і повідомлень статусу (індикація виконуваної функції). Для ряду функцій на панелі керування в ході роботи відображаються тільки настановні значення, і є можливість двохпозиційного управління (ON / OFF). Їх точне регулювання проводиться з периферійних органів управління обладнання згідно з відповідним рецептом.



а).



б).

Рис.2.6.2.9. Загальний вигляд панелі керування установки для нанесення покриттів GS, тип HP / М 300, s / n HPB-2334.

а). Дисплей, клавіатура

б). Блок двохпозиційного управління та індикації

Опис процесу

У даному пункті вказано загальний випадок для нанесення плівкових. Принципово процес нанесення покриття реалізується у вертикальному котлі, куди проводиться завантаження таблеток-ядер, на які наноситься покриття. Для забезпечення середовища належної якості в котел подається повітря, яке готується на установці підготовки повітря. Витяжка повітря здійснюється за допомогою витяжної системи з пілозбірником і термінальним фільтром. Після кожного включення обладнання, а також по завершенню виконання кожного автоматичного рецепта (в автоматичному режимі або режимі переривчастого обертання котла) або простого виключення припливного і витяжного

вентиляторів в ручному режимі роботи, відбувається струшування термінального фільтра в автоматичному режимі.

У котлі передбачено спеціальні перфоровані лопаті для забезпечення виведення повітря. Взаємна настройка системи підготовки повітря та витяжки повітря дозволяє встановити фіксовану витрату повітря і розрядження в котлі з метою недопущення проникнення дозуємогоагента в приміщення, а також для підтримки параметрів технологічного процесу. Система підготовки вхідного повітря дозволяє забезпечити необхідний температурний режим в котлі за рахунок нагріву повітря на теплообміннику. В якості теплоносія в теплообміннику використовується технічний пар.

В системі дозування плівкового покриття функціонує перистальтичний насос і лінія подачі розчину, в якій контролюється тиск. У разі перевищення тиску в лінії подачі розчину значення 1,5 бар відбувається автоматичне вимикання роботи насоса. Розпилення здійснюється за допомогою подачі стисненого повітря на распилітельную форсунку.

В системі дозування цукрового покриття функціонує поршневий насос і лінія подачі розчину, в якій контролюється тиск. У разі перевищення тиску в лінії подачі розчину відбувається автоматичне вимикання роботи насоса. Розпилення здійснюється за допомогою подачі стисненого повітря на распилітельную форсунку.

Для проведення покриття (плівкового) характерними етапами процесу є:

Фаза 1 (преднагрів);

Фаза 2 .. n (розпилення);

Фаза n + 1 (охолодження).

Детальний опис кожної фази дивися нижче.

Фаза 1 (преднагрів).

В ході цієї фази котел з ядрами таблеток прогривається до заданої температури. Керуючою функцією є встановлений час попереднього нагрівання. На цій фазі активовані функції обертання казана, працюють припливний і

витажний вентилятор, лопаті розташовуються в нижньому положенні. Фаза 2 .. n (розпилення).

Для плівкового покриття. При досягненні заданої температури здійснюється етап розпилення розчину плівкового покриття. Керуючим є датчик температури ядер, встановлений в котлі. Відлік часу розпилення починається тільки за умови, що дійсна температура ядер відповідає встановленому значенню. Етап розпилення передбачає собою, як правило, декілька фаз. Це пов'язано з необхідністю варіювати значеннями температури, витрати повітря, продуктивності насоса, тиску розпилення і швидкості обертання казана, що, в свою чергу, визначається технологією індивідуально в кожному конкретному випадку. Загальним для всіх фаз даного етапу є функціонування обертання казана, припливного і витажного вентилятора, розташування лопатей в нижньому положенні (площі перфорації повинні знаходитися в шарі таблеток щоб уникнути виносу подаваного розчину в витажною воздуховод), робота дозуючої системи (дозуючий насос і подача стиснутого повітря на розпорошення).

Фаза n + 1 (охолодження).

По закінченні етапу нанесення покриваючого розчину здійснюється охолодження таблеток до заданої температури. Керуючою функцією є встановлений час охолодження. На цій фазі, як і на фазі попереднього нагрівання, активовані функції обертання казана, працюють припливний і витажний вентилятор, лопаті розташовуються в нижньому положенні.

Технічні характеристики установки

Ідентифікація устаткування

Загальні характеристики установки для нанесення покриттів GS, тип HP / M 300 представлені в таблиці нижче:

Характеристика	Ідентифікація
Виготовлювач	IMA IndustriaMacchineAutomaticheS.p.A., Італія
Устаткування	GS
Модель	HP/M
Тип	HP/M 300
Об'єм котла, л	300

Характеристика		Ідентифікація
Маса оброблюваного завантаження (плівкове покриття)	Максимальна загрузка, кг	186,0 *
	Мінімальна загрузка, кг	105,85 *
Маса оброблюваного завантаження (цукрове покриття)	Максимальная загрузка, кг	110 *
	Мінімальна загрузка, кг	106,87 *

Енергоспоживання обладнання

Енергоспоживання всієї установки представлено в таблиці нижче.

Енергоресурс і його характеристика		Значення	
Електроенергія	Споживана потужність, кВт	56	
	Напруга основного живлення	380В 3-х фаз	
	Сила струму, А	96	
	Частота основного живлення, Гц	50	
Стисле повітря	<i>Загальна подача стиснутого повітря на установку</i>	Тиск, бар	6
		Максимальна витрата, м ³ /час	70
		Максимальна витрата, Нл/мин (при t = 0°C и P = 1bar)	6400
Холодоносій	Вода охолоджує (подача) <i>(на блок підготовки повітря)</i>	Температура, °С	6
		Витрата, л/час	5504
	Вода охолоджує (зворотна) <i>(на блок підготовки повітря)</i>	Температура, °С	12
		Витрата, л/час	5504
Вода для проведення очистки	Вода питної якості (гаряча)	Температура, °С	70
		Тиск, Мпа	0,4
	Вода очищена (гаряча)	Температура, °С	80
		Тиск, Мпа	0,3

8. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Позиція	Позначка	Найменування	Кількість	Примітка
ПМ –1	Машина пральна	Пральна машина SAMSUNG WF8590NHW. Максимальне завантаження бкг, потужність 1.02 кВт, виробник: фірма «SAMSUNG».	1	
СШ –2	Сушильна машина	Сушильна шафа Binder серії FD. Обсяг камери 115 л, виробник: ТОВ «САРТОКАРАТ»	1	
ПС –3	Пакувальний стіл	Стіл для пакування одягу. Габаритні розміри 900x700x850 мм.	1	н/сталь 12X18Н 10Т
КП–4 КП–7 КП –10 КП –13 КП –14 КП–18	Контрольно-вимірювальний прилад	Контрольно-вимірювальний прилад для вимірювання дезінфікуючих розчинів.	6	
Р –5 Р –8 Р –17	Змішувач	Змішувачі для приготування дезінфікуючих розчинів, обладнані мішалками	2	12X18Н1 0Т ГОСТ(5 949-75
З –11 З –12 З –15	Збірник	Збірник для приготування дезінфікуючих розчинів	3	
ПЗ –19	Повітрозабірник	Повітрозабірник. Обладнаний металевією сіткою для видалення механічних забруднень.	1	
Ф – 20	Фільтр	Фільтр першого ступеня очистки ячeyковий повітряний. Продуктивність – 10000 м ³ /год. Площа робочого січення – 0,22 м ² Тип “G4”	1	
В –21	Вентилятор відцентровий	Апарат середнього тиску Nitrotomizer. Продуктивність – 10000 м ³ /год. Потужність електродвигуна – 5 кВт.	1	
ГФ –22 ГФ - 37	Теплообмінник	Теплоагрівач з спуском конденсату.	2	
ГФ –24	Парозволожувач	Парозволожувач повітря. Використовується лише в зимовий період		
Ф – 25	Фільтр	Фільтр другого ступеня очистки ячeyковий повітряний. Продуктивність – 10000 м ³ /год. Площа робочого січення – 0,22 м ² Тип “F5”	1	

НУХТ БТЕК 02.02.23 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Яник Ю.М.			
Перевір.	Пенчук Ю.М.			
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.	Стабніков В.П.			
Розділ 8. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ			Літ.	Арк.
				120
			122	
Кафедра БТМ				

Ф – 26	Фільтр	HEPA фільтр розмірами 610x610x78 мм у комплекті з коробкою з регулювальним клапаном і ґратами. Коефіцієнт ефективності 99,95 % часток розміром до 0,06 мкм. Виробник: фірма "GEA", Чехія. Тип H11	1	
Н – 6 Н – 9 Н – 27 Н – 34 Н – 36	Насос	Насос високого тиску серії МНІ. Продуктивність до 25 м ³ /год. Напір до 48 м. Тиск 10 бар. Виробник: «PROM-NASOS»	5	
Ф – 28 Ф – 29 Ф – 30	Фільтр для грубої фільтрації води	Установка для грубої фільтрації (пісочний фільтр) води працює в автоматичному режимі. Попередній тиск до 0.08 Мпа. Поріг затримання 5 мкм. Циліндричної форми: діаметр 120 мм, висота 250 мм.	3	
Ф – 31	Фільтр вугільний	Фільтр вугільний. Виробник: фірма "Рокем", Німеччина. Об'єм 140 л.	1	
Н – 3 Н – 6 Н – 9 Н – 12 Н – 14	Насос	Відцентровий, тип KRSН 32/160, продуктивність 30 м ³ /год, потужність двигуна 2,5 кВт, висота напору 40 м.	5	12x18H10 Т
ГФ – 34	Установка для пом'якшення води	Установка для пом'якшення води. Продуктивність 830-850 л/год. Споживана потужність до 5кВт. Керування роботою установки здійснюється мікропроцесором.	1	
ГФ – 33 ГФ – 34	Станція пом'якшення	<u>RondomatDuo 6</u> . Число колон – 2 шт., діаметр колон – 400 мм, діаметр ємності для солі – 650 мм, продуктивність – 250 м ³ х °d, робоча температура max./min. - 30/5 °С, - 2,5-8 кг/см ² (бар).	1	
ГФ – 35	Установка зворотноосмотична	<u>BWT</u> . Двоступенева. продуктивність – 2000 л/ч, робоча температура – 15 °С, температура води max./min. - 35/3 °С, отримання води 1-я ступінь - 75 %, отримання води 2-я ступінь - 90 %, отримання води на установці - 72 %, тиск. - 20 кг/см ² (бар). Розміри: ширина – 2000 мм, висота – 1000 мм, глибина – 1500 мм. - 400 В, 50 Гц, 7 кВт.	1	
З – 36	Збірник води очищеної	LUXUN, Китай. Об'єм – 10 м ³ , шорховатість внутрішньої поверхні < 0,8	1	

		мкм, робоча температура max./min. - 95/5 °С, тиск – атмосферний, ізоляція - мінеральна вата, матеріал -AISI 316.		
КП-37,39,41,43,45,47	ВУС-3/150М(т)	Терези штучного зважування з температурним діапазоном від -10 до +40°С. До складу входять: вагова платформа, пульт управління з вібраційним адаптером, стояк кріплення пульта до вагової платформи. Межі зважування: від 0,2 до 150,0 кг. Живлення здійснюється від мережі змінного струму, напругою 220 Вт (+10%-15%) частотою 50Гц, потужність не більше 25Вт. Габаритні розміри, мм 600x400x150. Виробник ЗАТ «Мера», м. Москва, Росія.	6	
З-38,40,42,44,46,48,50,51,52,53,54,55,56,60,61,64,65		Набір ємностей з кришками місткістю 0,2; 0,5; 1; 3; 4; 5; 10; 30; 50; 80 л. Завантаження і вивантаження вручну. Виробник: ВАТ «Запоріжсталь», м. Запоріжжя.	17	н/сталь 12X18H10 Т
ГФ-49	S-350	Вібросито. Забезпечено комплектом сит прокладок та обручів. Продуктивність до 50 кг/год. Встановлена потужність: 0,55 кВт. Напруга живлення мережі змінного струму: 380 В, частота 50 Гц. Ступінь захисту двигуна IP44. Завантаження вручну, вивантаження самопливом. Габаритні розміри, мм: 540x490x1040. Виробник DGM PharmaApparate, Китай.	1	Матеріал робочої зони- н/сталь ALSI 304
Р-57		Змішувач. Робочий об'єм – 150 л. Максимальне завантаження – 120 кг. Частота обертання корпусу – 28,8 об/хв.. Потужність приводу: 0,75 кВт. Електродвигун асинхронний, напруга – 415 В. Частота – 50 Гц., число обертів 1360 об/хв.. Ступінь захисту оболонки IP54. Обладнаний місцевим підсосом від місць пиловидалення. Системою пневмотранспорту, вивантаження самопливом. Висота завантаження 150 мм. Висота розвантаження – 450 мм. Габаритні розміри: 1400x800x1500 мм. Виробник «BombayEngineering», м.	1	Матеріал робочої зони н/сталь ALSI 304.

		Бомбей, Індія.		
P-58	Canguro Tumbler ELT 1200	Опудрювач складається з базової структури і обертає раму, на яку встановлюється бін за допомогою вилочного підйомника (ручного або електричного). Змішування компонентів, що знаходяться всередині біна, проводиться шляхом обертання біна. Діапазон швидкості обертання, об/хв.4 – 20. Виробник Zanchetta, Італія. Підрозділ RomacoS.p.A., Італія	1	
ГФ-59		Машина таблеткова FETTE 2090. Кількість станцій пресування, шт.: 29. Тиск попереднього пресування 20 кN. Тиск пресування 80 кN. Максимальний діаметр таблетки 22 мм. Максимальна висота таблетки – 11 мм. Максимальна продуктивність - 139200 таб./ год. Електрична потужність 7 кВт. Швидкість обертів ротору: 26-80 об/хв.. Напруга живлення мережі змінного струму - 380 В, частотою – 50 Гц. Ступінь захисту оболонки IP54. Габаритні розміри, 2200x1342x960мм. Виробник – Німеччина.	1	Матеріал робочої зони - н/сталь ALSI 304.
ГФ-62		Обезпилювач таблеток. Обертаючий перфоруючий барабан з сталі 12X18Н10Т розмірами: діаметром120 мм, довжиною 600 мм, швидкістю обертання 40 об/хв. Габаритні Розміри 600x800x400 мм. Виробництво Німеччина.	1	
M-63		Металовловлювач. Виробник Італія.	1	
P-66,67	CVC	Установка підготовки розчинів - апарат з пропелерною мішалкою, об'ємом 15 л. Матеріалн/сталь ALSI 304. Габаритні розміри 300x300x250 мм Виробник CVC, Тайвань.	2	
ГФ-68		Установка для нанесення покриттів GS, тип HP / M 300. Об'єм котла, 300л. Максимальна загрузка 186,0 кг. Мінімальна загрузка 122,85кг.Споживана потужність56 кВт Напруга основного живлення380В 3-х фаз. ВиготовлювачMA IndustriaMacchine AutomaticheS.p.A., Італія	1	
ГФ-70	PACLINER PV	Машина для пакування контейнерів в картонні пачки з одночасним вкладенням інструкцій.	1	Матеріал робочої зони -

		Укомплектована: вузлом подачі контейнерів (автоматично), вузлом складання проспектів (листів-вкладишів, інструкцій), вузлами формування картонних пачок та вкладання контейнерів з проспектами в пачку, вузлом маркування. Максимальна продуктивність - до 90 пачок за хвилину. Потужність – 3,4 кВт. Напруга живлення від трьохфазної мережі – 380 В., частота 50Гц, Ступінь захисту оболонки електродвигунів IP54. Габаритні розміри: 1500x950x1450 мм. Виробник: ОТТО HANSEL, Німеччина.		н/сталь ALSI 304.
ГФ-69	TLT-1560	Автомат для пакування таблеток в односторонню контурну безчарункову упаковку. Укомплектований: вакуумною помпою, системою автоматичного регулювання швидкості та контролю заповнення чарунків таблетками. Матеріали для пакування: фольга алюмінієва. Продуктивність до 240 уп./хв.. Забезпечує інформацію про неспадку окремих вузлів. Напруга живлення від трьохфазної мережі – 380 В., частота 50Гц, Ступінь захисту оболонки електродвигунів IP54. Габаритні розміри: 1200x2020x5200 мм Виробник: BOSCH, Німеччина.	1	Матеріал робочої зони - н/сталь ALSI 304.
ГФ-71		Стіл для пакування. Габаритні розміри: 600x1200x800 мм.	1	

9. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.

ДР 1.1 Підготовка персоналу до виробництва

Полягає в забезпеченні персоналу спеціальним одягом, а в разі необхідності і взуттям та іншим необхідним оснащенням. Одяг виготовляється зі спеціальної тканини, яка повинна мати мінімальне ворсовиділення, пиломісткість, пилепроникність та повітряпроникність – не менше $300\text{м}^3/(\text{м}^2\cdot\text{с})$. Важливою також є частота зміни одягу, яка залежить від пори року і кліматичних умов. Також до працівників фармацевтичних підприємств висуваються жорсткі вимоги відносно їх особистої гігієни та чистоти. Для обробки рук персоналу використовується дезінфікуючий розчин Октанідерм.

ДР 1.1.1 Навчання персоналу

Усі працівники при прийнятті на роботу проходять на підприємстві інструктаж з питань охорони праці. Весь персонал, включаючи співробітників, які займаються прибиранням і технічним обслуговуванням, повинен регулярно проходити навчання з дисциплін, пов'язаних з належним виробництвом стерильної продукції. Крім ознайомлення з теорією та правилами належної виробничої практики новий персонал має пройти навчання, яке відповідає його конкретним обов'язкам.

Навчання персоналу полягає в проведенні зборів та семінарів на яких керівництво підприємства вказує на помилки та недоліки в роботі працюючих, заохочує їх ініціативу щодо вдосконалення виробництва та вживає необхідні заходи покарання за недбалість. Також проводиться поточний контроль знань робітників шляхом анкетування.

ДР 1.1.2 Санітарна підготовка персоналу

Персонал є одним із джерел забруднення готового продукту механічними

					НУХТ БТЕК 02.02.23 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Яник Ю.М.			Розділ 9. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ					
Перевір.		Пенчук Ю.М.						Літ.	Арк.	Акрушів
Реценз.									125	167
Н. Контр.								127		
Затверд.		Стабніков В.П.						Кафедра БТМ		

частками і мікроорганізмами. Найбільша кількість мікроорганізмів виділяється з верхніх дихальних шляхів, волосся, шкірних покривів.

Контроль мікробного забруднення рук персоналу проводить мікробіолог за допомогою змивів тампонами 1 раз на тиждень протягом року вибірково у кількох робітників 1 раз на 2 тижні після обробки рук дезінфікуючими засобами. На руках, після обробки дезінфікуючим розчином, не повинно залишатися мікроорганізмів. В процесі роботи допускається наявність у змивах не більше 10 колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на двох паралельних частках Петрі.

ДР 1.2 Підготовка технічного одягу

Підготовка комплекту технологічного одягу складається з: огляду одягу безпосередньо перед пранням, пранням, сушкою та прогладжуванням.

ДР 1.2.1 Огляд технічного одягу

Перед пранням проводять огляд стану технологічного одягу, оцінку стану її зношеності, виявлення пошкоджень, перевірку роботи застібок та сортування одягу по кольору та призначенню. При наявності дефектів одяг ремонтується або замінюється на новий.

Технологічний одяг, що призначений для роботи у приміщеннях різних класів чистоти, оглядається та зберігається до прання окремо. Перед відправкою на прання чи ремонт технологічний одяг зберігають у боксах або контейнерах, що закриваються кришками. Перед відправкою на прання технологічний одяг застібають на застіжки.

ДР 1.2.2 Прання технічного одягу

Прання одягу здійснюється в пральній машині (ПМ-1) при температурі 60-80°C і протягом 20 хв. Для прання використовують пральний порошок «Tide» у відповідності до рекомендаціями для обладнання, що використовується пральними підприємствами.

Рекомендована концентрація розчину – 2г/л. На кожен кілограм завантаженої білизни має приходитись не менш ніж 10 л розчину миючого засобу «Tide».

ДР 1.2.3 Сушіння технічного одягу

Сушіння одягу проводиться в сушильній шафі (СШ-2) при температурі 110°C і протягом 60 хв. Сушку та упаковку технологічного одягу виконують у приміщеннях Д класу чистоти. Сушку та упаковку технологічного одягу, що призначений для роботи у приміщеннях різних класів чистоти, проводять окремими порціями. По завершенню сушки кожний комплект технологічного одягу загортають у два прошарки пергаменту або спочатку поміщають у мішечки з безворсової тканини, а потім загортають.

ДР 1.2.4 Пакування та зберігання технічного одягу

Пакування відбувається на пакувальному столі (ПС-3). Термін придатності стерильного одягу в пачках не більше 7-х діб.

Пакети з чистим стерильним одягом передають в гардеробну цеху.

Визначення мікробного забруднення технологічного одягу проводиться за допомогою змивів тампонами 1 раз на тиждень протягом виробничого процесу і 1 раз на 2 тижня після його стерильної обробки. На технологічному одязі після його стерилізації не повинні міститися мікроорганізми. В процесі роботи допускається наявність у змивах не більше 10 колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі.

ДР 1.3 Приготування дезінфікуючих розчинів

Приготовані миючі та дезінфікуючі засоби використовують з метою для санітарної обробки (миття та дезінфекції) приміщень, технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю, санітарно-технічного обладнання тощо, а також антисептичної обробки рук.

ДР 1.3.1 Приготування розчину «Октанідерму». Для приготування 10 л 1 % розчину октанідерму використовують 100 гоктанідерму зі складу та 9900 мл води очищеної після чого інтенсивно перемішують в збірнику (З-11).

ДР 1.3.2 Приготування розчину «Аквідезу». Для приготування 10 л 1 % розчину аквідезу використовують 100 мл аквідезу зі складу та 9900 мл води очищеної та перемішують. Робочі розчини готують у ємності (З-13) з щільною кришкою.

ДР 1.3.3 Приготування 3% і 6% розчину перекису водню

Для приготування 10 л 3 % розчину перекису водню використовують 300 мл перекису водню та 9700 мл води очищеної, а для 6 % – 600 мл перекису водню та 9400 мл води очищеної та ретельно перемішують протягом 20-25 хв в збірнику (Р-5).

ДР 1.3.4 Приготування 76 % розчину спирту етилового.

Для приготування 1 л спирту потрібно відмірити 800 мл спирту етилового (об'ємна доля 96 %) і 224 мл води очищеної, ретельно перемішати в ємності (Р-8).

ДР 1.3.7 Приготування розчину «Мірасепт». Для приготування 10 л 0,2 % розчину 20 гмірасепту розчиняють в 9980 мл води очищеної в ємності (З-15).

ДР 1.4 Підготовка виробничих приміщень

Виробничі приміщення для виробництва таблеток мають систему водопроводів, каналізацій, вентиляції і систему знищення відходів виробництва. Виробничі приміщення мають гладку внутрішню поверхню (стіни, потолки, поли, двері), а також мінімум виступаючих частин. Поверхні приміщень непроникні для рідин і легко доступні для миття миючими і дезінфікуючими розчинами і можуть піддаватись ультрафіолетовому опроміненню.

ДР 1.4.1 Щоденне прибирання

Стіни і підлога чистих приміщень покрита матеріалами, які мають достатню механічну міцність, не піддаються корозії, очищуються і миються миючими засобами з дезрозчинами, підлога водонепроникна з гладкою поверхнею зручною для миття. В якості миючих і дезінфікуючих засобів використовують розчин перекису водню. Обробку приміщень проводять шляхом прибирання поверхні дезрозчином чи розпилюючи його за допомогою пристрою з аерозольною насадкою.

Вологе прибирання роблять після кожної зміни вологою ганчіркою. З приміщень забирають готову продукцію, напівпродукти, відходи виробництва, невикористані матеріали. Прибирання починають з приміщень, де потрібні асептичні умови, а потім передбоксники.

ДР 1.4.2 Генеральне прибирання

Генеральне прибирання приміщень проводиться 1 раз на тиждень (у день профілактики устаткування) або за вимогою бактеріолога у випадку бактеріального зараження повітря.

У випадку виявлення в повітрі приміщень цвілі, концентрацію перекису водню збільшують до 6%. Проточна вентиляція під час обробки повинна працювати безперервно.

Стелю, стіни, вікна, перегородки та устаткування обробляють шляхом розпилювання дезрозчину з розрахунку 150 – 200 мл/м² площі.

По закінченні зрошення приміщення закривають на 30 – 40 хв., зайвий дезрозчин видаляють шляхом протирання оброблених поверхонь чистою серветкою з завитими краями.

Мікробіологічний контроль повітря у чистих приміщеннях робиться 2 рази на тиждень перед початком технологічного процесу за допомогою апарату Кротова баклабораторією ВТК.

ДР 1.5 Підготовка виробничого обладнання та комунікацій

Апаратуру, устаткування, ємкості, автомати зазначені в специфікації, інвентар утримують в чистоті, систематично піддають чищенню, миттю теплою водою (40-45 °С) з миючим засобом «Мірасепт» (з поверхнево-активних речовин), потім промивають очищеною водою та висушують або витирають до відсутності вологи. З'ємні частини обладнання та комунікацій миють в спеціальній ємності (З-18).

Виробниче обладнання не повинне негативно впливати на якість продукції. Частини або поверхні устаткування, що контактують з продукцією, виготовляються з матеріалів, які не вступають з нею в реакцію, не мають абсорбційних властивостей і не виділяють речовин у такій кількості, щоб це могло вплинути на якість продукції. Ця стадія включає в себе кілька операцій.

ДР 1.5.1 Миття

При здійсненні операцій по підготовці приміщень зовнішні поверхні всього обладнання, центрифуги, розливочно-закупорювальні лінії підлягають очищенню

і обробці разом з поверхнями приміщень миючим засобом «Мірасепт» при температурі 60 – 70⁰С, та спиртом етиловим.

ДР 1.5.2. Дезінфекція та ополіскування.

Для попередження стійких форм мікроорганізмів дезінфікуючі засоби потрібно чергувати. Внутрішні частини обладнання рекомендується обробляти водою очищеною, а у випадку необхідності – розчином миючого засобу 0,5% при температурі 60⁰С. Приготовлений дезінфікуючий розчин насосом подають в дистиляційну апаратуру, реактори, збірники, теплообмінники, фільтри і комунікації. Заповнену розчином систему витримують протягом 30 хвилин. Після витримки дезрозчини змивають у каналізацію. Всю систему відмивають від дезрозчину розчином чистої води знесоленої.

Контроль мікробної контамінації обладнання проводять не рідше 1 разу на тиждень протягом виробничого процесу і за 1,5 години до початку роботи. У змивах допускається ріст не більше 2 колоній неспорутворюючих мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі.

ДР 2. Підготовка стерильного технологічного повітря.

Під вентиляційним повітрям розуміють повітря, очищене від часток та мікроорганізмів у системі підготовки триступінчатої фільтрації, яке надходить до приміщень виробництва лікарських засобів. Виробничі приміщення повинні мати ефективну систему припливної та витяжної вентиляції. Для очищення повітря в приміщеннях з високими вимогами застосовується 3-ступенева система очистки.

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря

При визначенні місця забору зовнішнього повітря необхідно враховувати існуючі та можливі джерела аерозольних і газоподібних забруднень (димарі, автотранспорт, газоподібні промислові викиди, квітучі рослини та інш.).

Особливо багато мікроорганізмів над поверхнею землі, з висотою концентрація їх зменшується і стає постійною на рівні близько 30 м над землею, забір атмосферного повітря відбувається на висоті близько 20 – 30 м.

Забір повітря здійснюється повітрозбірником ПЗ-19 .

ДР 2.2 Грубе очищення повітря. На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром понад 10 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення використовують – фільтри грубої очистки (Ф-20). Всередині фільтра розташовані дві решітки, між якими поміщають фільтруючий матеріал. Ступінь очищення становить $E = 80\%$.

ДР 2.3 Нагрівання повітря

Якщо виробництво лікарських препаратів відбувається взимку, то повітря потрібно нагрівати в теплообмінниках (ГФ-22) до температури близько 21 °С,

ДР 2.4 Транспортування і стабілізація термодинамічних показників повітря.

Повітря стискають у турбокомпресорі до 0,35 – 0,5 МПа, при температурі 21 °С, $W = 30 - 60 \%$. Тиск повітря за компресором визначають із розрахунку тиску на подолання опору в системі підготовки повітря.

ДР 2.5 Тонке очищення повітря для касу чистоти D.

Тонке очищення повітря відбувається у фільтрах HEPA класу фільтрації H11 – фільтри, які видаляють частинки більше за 0,3 мкм. Ступінь очищення становить 99,5%.

ДР 3 Підготовка води очищеної

ДР 3.1 Надходження води з міського водоканалу.

Надходження води на фармацевтичне підприємство відбувається з міського водоканалу.

ДР 3.2 Груба фільтрація

Груба фільтрація дає можливість знищувати частинки розміром більше 80 - 100 мкм. В якості для обладнання грубої фільтрації використовують фільтри з пісочною набивкою (Ф-28,29,30). Вибір сорту піску залежить від результатів аналізу води з врахуванням сезонних змін. Фільтр періодично промивається.

ДР 3.3 Фільтрація через вугільні фільтри та помякшення

Фільтрація через вугільний фільтр (Ф-31) дозволяє знизити концентрацію органічних речовин і хлору. Використовуються стандартні патронні фільтри з

активованим вугіллям. Придатність фільтрів контролюється різницею тисків води до і після фільтра.

Пом'якшення дозволяє знизити жорсткість води за рахунок знищення іонів кальцію і магнію за допомогою установки для пом'якшення води (ГФ-34). В якості обладнання на цій стадії можуть бути автоматичні пом'якшувачі, що працюють за принципом іонів кальцію і магнію іонами натрію.

Правильність роботи пом'якшувача можна контролювати пі одичним вимірюванням жорсткості води на вході і на виході.

ДР 3.4 Зворотній осмос

На стадії зворотного осмосу вода очищується від органічних з'єднань і солей за допомогою установки для зворотного осмосу (ГФ-35). Знищення домішок відбувається за рахунок пропускання води через напівпроникну мембрану при тиску, що перевищує осмотичний. Для збільшення ефективності процесу використовується тангенціальна подача води до поверхні мембрани при рециркуляції. Обладнання являє собою системи мембран. Мембрани мають розміри пор 0,0005 -0,001 мкм. Контроль систем зворотного осмосу здійснюється вимірюванням електричної провідності на виході з системи.

ДР 3.5 Зберігання води очищеної

Простерилізовану воду зберігають при температурі 80-90°C, протягом 2-х діб. Щодо води очищеної, то її зберігають в закритих ємкостях (Зб-36), виготовлених з матеріалів, нормативних документів і захищають її від ішорідних частинок і мікробіологічних забруднень. Матеріалами ємкості для зберігання води очищеної можуть бути поліпропілен, тефлон, нержавіюча сталь AISI 316 чи інші інертні матеріали.

ТП 4. Приготування маси для таблетування

ТП 4.1. Зваження компонентів та просіювання сировини

Розтарування сировини здійснюють в окремому приміщенні. Транспортування сировину в закритих ємностях, попередньо підготовлених.

На вагах (КП-37,39,41,43,45,47) в окремі ємності (З-38,40,42,44,46,48) відважують глутатіон, мікрокристалічну целюлозу, натрію крохмалю гліколят, кремнію діоксиду колоїдного, магнію стеарат.

Ємності зі зваженою сировиною транспортують на візку на операцію просіювання.

Просіювання сировини здійснюють на вібраційному ситі (ГФ -49).

Просіяний порошок і відсів надходять в різні лотки(З -51,52,53,54,55,56,), які потім переносять в заздалегідь підготовлену тару.

Глутатіон, мікрокристалічну целюлозу, натрію крохмалю гліколят, кремнію діоксиду колоїдного, магнію стеарат просівають через сито з розміром отворів $(0,50 \pm 0,03)$ мм. Просіювання здійснюється в різні ємності в приміщенні класу Д при температурі повітря не вище 25 градусів і відносній вологості не більше 25%. Після просіювання в сировині повинні бути відсутні сторонні домішки та грудки.

Ємності з просіяними компонентами передають на стадію одержання маси для таблетування.

Допускається здійснювати просіювання сировини для декількох завантажень.

ТП 4.2. Змішування компонентів

Змішування компонентів проводять в окремому приміщенні при температурі повітря не вище 25 градусів і відносній вологості не більше 25%.

Змішування компонентів проводять у змішувачі типу **AZO** (P-57). Змішувач складається з ємності та перемішувачих пристроїв - двох поруч розташованих зет-подібних роторів, що обертаються назустріч один одному з різними швидкостями, що забезпечує рівномірний розподіл маси.

У змішувач за допомогою системи пневмотранспорту з ємностей з просіяною і зваженою сировиною завантажують компоненти. Змішувач закривають кришкою, включають у роботу і перемішують суху суміш інгредієнтів протягом (20 ± 2) хв при швидкості обертання мішалки 8об/хв.

ТП 4.3. Опудрювання компонентів.

Опудрювання здійснюють у змішувачі типу «п'яна бочка» (Р-58) при температурі 25⁰С і відносній вологості не більше 25%. За допомогою системи пневмотранспорту завантажують опудрювальну суміш з ємності (З-) і суміш змішаних компонентів. Змішувач закривають кришкою, включають у роботу і перемішують суміш протягом 3 хв.

Змішувач зупиняють, ставлять у зручне для вивантаження положення і виробляють вивантаження готової таблеткової маси в ємність, яку щільно закривають кришками і передають на стадію таблетування. Таблеткова маса повинна бути білого або майже білого кольору з вмістом води за Фішером не більше 10%.

ТП 5. Таблетування і знесилення

ТП 5.1 Таблетування таблетмаси

Процес отримання таблеток Глутатіон здійснюють на таблетпреса FETTE, тип 2090 (ГФ-59) з примусовою подачею таблетмаси з бункера та системою перемішування таблетмаси у зоні дозування. При температурі повітря не вище 25 градусів і відносній вологості не більше 25%. Для таблетування використовують пуансони овальної форми діаметром (12×18): верхній з двояковипуклою поверхнею, нижній з двояковипуклою поверхнею з рисою. Середня маса одержуваних таблеток повинна становити (1,025± 0,051) гр. Швидкість таблетування на таблетпресі 25-30 тис. табл./год.

Таблетмасу засипають у бункер таблеткового преса за допомогою системи пневмотранспорту з опудрювача (ГФ-58). З бункера маса самопливом надходить на встановлені решітки (матриці) для дозування. Кількість маси регулюється за допомогою шибера в бункері. Пройшовши зону харчування та дозування матриці, маса потрапляє в зону попереднього пресування. Верхні пуансони машини торкаються матричного отвору, занурюються в нього і здавлюють таблетмасу. Потім при проходженні верхнього та нижнього пуансона під роликami тиску відбувається наростання тиску пресування до необхідної величини при якій відбувається остаточне пресування і формування таблеток. Після чого верхні пуансони піднімаються, а нижні виштовхують таблетки з матриці.

У процесі роботи таблеткового преса кожну годину в зміну контролюють геометричні параметри таблеток, кожні 45 хвилин - середню масу таблеток і кожні 2 години - зовнішній вигляд таблеток.

Отримані таблетки надходять в ємності (З-60 і З-61), їх передають на операцію знепилювання.

ТП 5.2. Знепилення таблеток

Відокремлення пилу від таблеток здійснюється у знепилювачі (ГФ-62) за допомогою пропускання стисненого повітря. Після знепилення таблетки надходять на метало вловлювач (М-63).

ТП 5.3. Контроль таблеток на металічні включення

Проходячи через металовловлювач (М-63) відбракування таблеток, містять включення чорних і кольорових металів та нержавіючої сталі. Некондиційні таблетки надходять у ємність (З-). Таблетки, що не містять включень металів вивантажуються у ємність (З-) і подаються на стадію нанесення оболонки.

ТП 6. Приготування та нанесення оболонки

ТП 6.1. Приготування розчину для нанесення оболонки

ТП 6.1.1. Приготування суміші 1

У змішувач (Р-66) надходить зважена суха суміш для нанесення оболонки і перемішується з водою очищеною протягом 1 год, для одержання однорідної суспензії. Отриману суміш передають на стадію отримання суміші 2.

ТП 6.1.2. Приготування суміші 2

У змішувачі (Р-67) перемішують суміш 1 з етиловим спиртом протягом 20-30 хв. Отриманий розчин для нанесення покриття надходить в дражирувальний котел.

ТП 6.2. Нанесення покриття

Нанесення оболонки відбувається при температурі повітря не вище 25 градусів і відносній вологості не більше 25%в установка для нанесення покриттів **GS, тип НР /М 300** (ГФ-68). Принципово процес нанесення покриття реалізується у вертикальному котлі, куди проводиться завантаження таблеток-ядер, на які

наноситься покриття. Для забезпечення середовища належної якості в котел подається повітря, яке готується на установці підготовки повітря. Витяжка повітря здійснюється за допомогою витяжної системи з пилозбірником і термінальним фільтром. Після кожного включення обладнання, а також по завершенню виконання кожного автоматичного рецепта (в автоматичному режимі або режимі переривчастого обертання котла) або простого виключення припливного і витяжного вентиляторів в ручному режимі роботи, відбувається струшування термінального фільтра в автоматичному режимі. У котлі передбачено спеціальні перфоровані лопаті для забезпечення виведення повітря. Взаємна настройка системи підготовки повітря та витяжки повітря дозволяє встановити фіксовану витрату повітря і розрядження в котлі з метою недопущення проникнення дозуємого агента в приміщення, а також для підтримки параметрів технологічного процесу. Система підготовки вхідного повітря дозволяє забезпечити необхідний температурний режим в котлі за рахунок нагріву повітря на теплообміннику. В якості теплоносія в теплообміннику використовується технічний пар.

В системі дозування плівкового покриття функціонує перистальтичний насос і лінія подачі розчину, в якій контролюється тиск. У разі перевищення тиску в лінії подачі розчину значення 1,5 бар відбувається автоматичне вимикання роботи насоса. Розпилення здійснюється за допомогою подачі стисненого повітря на розпилюючу форсунку.

В системі дозування цукрового покриття функціонує поршневий насос і лінія подачі розчину, в якій контролюється тиск. У разі перевищення тиску в лінії подачі розчину відбувається автоматичне вимикання роботи насоса. Розпилення здійснюється за допомогою подачі стисненого повітря на распылительную форсунку. По закінченні етапу нанесення покриваючого розчину здійснюється охолодження таблеток до заданої температури. Таблетки покриті оболонкою відвантажуються для фасування в первинну упаковку.

ПМВ 7. Фасовка, упакування і маркування готової продукції

Фасовку і упакування таблеток Глутатіон проводять в окремому приміщенні.

ПМВ 7.1. Фасовка таблеток у контурній чарунковій упаковці

Фасовку таблеток Глутатіон проводять по 10 штук у контурних чарункових упаковках з плівки полівінілхлоридної марки ЕП-73 по ГОСТ 25250-88 або імпоротної (безбарвної, зеленої або помаранчевої) виробництва фірми "ТВР LENART", Словенія і фольги алюмінієвої друкованої, лакованої по ГОСТ 745-79 або ТУ 48-21-270-94, або виробництва фірми "ALUPAK d.o.o", Словенія на автоматі для фасовки таблеток типу 557 - РК (ГФ-69) з автоматичним лічильником або на пакувальній машині Ульман UPS 300.

Процес фасування здійснюється наступним чином. З бобіни плівка ПВХ надходить на форматний барабан. Нагрівачем інфрачервоного випромінювання при автоматично підтримуваній температурі (50-70)°С плівка розм'якшується і за допомогою вакууму формується осередка. У зоні відділення плівки від форматного барабана подається холодне повітря, яке допомагає відокремити відформовану плівку від барабана і стабілізує форму осередків. Відформована плівка надходить на стіл, де заповнюється таблетками, які подаються двома віброживильниками по таблетковотводам в перегрузочні барабани, безпосередньо якими таблетки перекладаються в осередку.

На столі здійснюють візуальний контроль заповнення осередків таблет-ками, відбраковка. Встановлена на столі щітка знепилює плівку і перекидає або виправляє погано укладені таблетки. Потім плівка надходить на нижній приводний барабан валкового термозклеювання. Фольга з бобіни, розташованої над валками термозклеювання, охоплює верхній гарячий валок, який притискає її до плівки і у міру проходження стрічки та фольги здійснює їх зклеювання. Під час роботи температура валків термозклеювання складає (170-210)° С і підтримується автоматично.

Зклеєне полотно подається в прес маркування та вирубки. У пресі маркування наноситься номер серії і термін придатності препарату.

У процесі фасування контролюють:

- кожні 30 хв роботи автомата - температуру формуючого і склеюючого барабанів;

- кожні 15 хв роботи автомата - кількість таблеток в упаковці;
- кожні 15 хв роботи автомата - правильність і чіткість нанесення маркувальних даних на упаковках.

ПМВ 7.2. Пакування блістерів у пачки

Упаковку продукції здійснюють в машині для пакування контейнерів в картонні пачки (ГФ-70), де в пачку з картону для споживчої тари по ГОСТ 32. 417933-89 або картону хром-ерзац макулатурного по ТУ 13-0281020-97-94 поміщають по 2 блістера разом з інструкцією із застосування.

ПМВ 7.3. Упаковка готової продукції в групову тару

На контурній упаковці, пачці і етикетці групової тари на українській або українською і інших мовах вказують: країну, фірму-виробника, її товарний знак і адресу, назву препарату латинською та українською або латинською, українською і іншими мовами, вміст діючої речовини в одній таблетці в грамах, кількість таблеток в упаковці, умови зберігання, «Застосовувати за призначенням лікаря», «Зберігати в недоступному для дітей місці», реєстраційний номер, номер серії, термін придатності, штриховий код.

Номер серії та термін придатності препарату допускається наносити на бічній стороні пачки методом тиснення.

На етикетці групової тари додатково зазначають кількість упаковок.

Готову продукцію по накладній разом з аналітичним паспортом направляють на склад.

Групова та транспортна тара відповідно до ГОСТ 17768-90.

10. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД

Глутатіон (США «SourceNaturals»).

Таблетки білого кольору. Вкриті оболонкою.

Склад:

1 таблетка містить:

діюча речовина: 1 таблетка містить 500 мг глутатіону (відновлена форма).

допоміжні речовини: мікрокристалічна целюлоза, натрію крохмалю гліколят, кремнію діоксиду колоїдного, магнію стеарат

Призначення:

- ✓ судоми;
- ✓ хвороба Альцгеймера;
- ✓ хвороба Паркінсона;
- ✓ серповидно-клітинна анемія;
- ✓ серцевий напад;
- ✓ інсульт;
- ✓ цукровий діабет 2 типу.

Протипоказання:

✓ Підвищена чутливість до глутатіону або інших компонентів препарату.

					НУХТ БТЕК 02.02.23 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Яник Ю.М.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.				139	167
Реценз.					141		
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.					

Спосіб застосування та дози:

Таблетку слід приймати 1 раз на добу на голодний шлунок, переважно о першій половині дня .

Середня тривалість курсу лікування – 1 місяць, курс можливо пройти повторно, зробивши перерву на 3–4 тижні;

Форма випуску: Таблетка білого кольору, вкрита оболонкою.

Фармакологічні властивості

Фармакодинаміка.

Глутатіон – трипептид, що є природним компонентом клітин усіх тканин організму. Його значне поширення пов'язане зі широким спектром біологічних функцій і має фундаментальне значення для численних біохімічних та метаболічних процесів.

Сульфгідрильні групи цистеїну, що входять до складу глутатіону, є потужними нуклеофільними агентами. У зв'язку з цим вони стають основною ціллю електрофільної атаки хімічних речовин або їх активних метаболітів, що призводить до інактивації потенційно токсичних екзогенних речовин. Таким чином, препарат чинить захисну дію на життєво важливі нуклеофільні ділянки, при атаці на які розпочинається процес пошкодження клітин.

Крім того, глутатіон, відновлений у результаті взаємодії з великою кількістю окиснених органічних метаболітів, утворює менш токсичні кон'юговані сполуки, які у подальшому легше метаболізуються і виводяться у складі меркаптурових кислот.

З огляду на дані властивості глутатіон призначають у разі реакцій гепатотоксичності, механізмами розвитку яких можуть бути етиловий або медикаментозний гепатотоксикоз або патогенетично обумовлений гепатотоксикоз, пов'язаний із порушеннями механізмів детоксикації.

Особливості застосування

При вагітності, годуванні грудьми, прийомі медичних препаратів чи наявності будь-яких захворювань слід проконсультуватися з лікарем перед

вживанням. У разі виникнення побічних реакцій припиніть використання та проконсультуйтеся з лікарем. Зберігати у недоступному для дітей місці. Не використовувати, якщо зовнішня захисна мембрана відсутня чи пошкоджена.

Термін зберігання:

1 рік.

Умови зберігання

Зберігати в оригінальній упаковці при температурі не вище 25 °С.

Зберігати у недоступному для дітей місці.

Упаковка: по 30 таблеток у пластиковій тарі.

Категорія відпуску: Без рецепту [8].

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Показники якості	Допустимі межі	Методи контролю
Опис	Таблетка білого кольору. За п. 1 візуально	За п. 1 (візуально)
Ідентифікація	<p>А. Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину, одержаного в розділі «Кількісне визначення» в області від 220 нм до 320 нм повинен мати максимум за довжини хвилі (275±2) нм</p> <p>В. На хроматографі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматографі розчину порівняння.</p> <p>С. Характерна реакція (с).</p>	<p>За п. 2.А, ДФУ, 2.2.25 (СФ-метод)</p> <p>За п. 2.В, ДФУ, 2.2.27 (метод ТШХ)</p> <p>За п. 2.С, ДФУ, 2.3.1 N (метод ТШХ)</p>
Однорідність дозованих одиниць	Має відповідати вимогам *ДФУ	За п. 3. ДФУ, 2.9.40 2.2.25
Розпадання	Не більше 30 хв	За п. 4, ДФУ, 2.9.1
Супровідні домішки Будь-яка домішка Сума домішок	<p>Не більше 0,2%</p> <p>Не більше 0,5%</p>	За п. 5, ДФУ, 2.2.29 (метод РХ)
Розчинення	Не менше 80% (Q) за 45 хв	За п. 6, ДФУ, 2.9.3, 2.2.25(СФ-метод)
Мікробіологічна чистота	<p>Критерії прийнятості:</p> <p>Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) - 10^3 КУО в 1 г.</p> <p>Загальне число дріжджових і плісневих грибів (ТУМС) - 10^2 КУО в 1 г.</p> <p>Відсутність <i>Echerichiacoli</i> в 1 г.</p>	За п. 7, ДФУ, 5.1.4, 2.6.12, 2.6.13.
Кількісне визначення	Для аналізу беруть 20 мл зразкуселективно осаджують за допомогою етанолу (3: 1), потім відбирають 10 г осаду і центрифугують протягом 10 хв і після центрифугування осад розчиняють в 1,5 М NaCl (1: 1). Даний процес (селективну преципітацію) виконують двічі в однакових умовах, але після центрифугування осад із глутатіоном розчиняють у дистильованій воді.	За п. 8, ДФУ, 2.2.25 (СФ-метод)

Методи контролю

1. Опис

Таблетка білого кольору відповідним запахом та смаком. Визначають візуально, за допомогою органолептичних показників, а також можна визначити за допомогою органів нюху та органів смаку.

2. Ідентифікація

А. Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину, одержаного в розділі «Кількісне визначення», в області від 220 нм до 320 нм повинен мати максимум за довжини хвилі (275) нм і мінімум за довжини хвилі (248) нм.

В. Тонкошарова хроматографія (*ДФУ, 2.2.27).

Розчики готують безпосередньо перед використанням.

Випробовуваний розчин. До 0,20 г вмісту таблеток додають 15,0 мл 96 % спирту Р, 5,0 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду, струшують протягом 3 хв, доводять об'єм розчину 0,1 М розчином натрію гідроксиду до 25,0 мл, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка».

Розчин порівняння. 0,025 г глутатіону розчиняють у 15,0 мл 96 % спирту Р, додають 5,0 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду, струшують і доводять 0,1 М розчином натрію гідроксиду до об'єму 25,0 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю 60 Fас. з товщиною шару 0,25 мм.

Рухома фаза: толуол Р - метанол Р (90:10).

Примітка. Камеру перед хроматографуванням не насичують.

- Об'єм проби, що наноситься: 5 мкл; наносять випробовуваний розчин і розчин порівняння.

- Відстань, яку має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту.

- Висушування: на повітрі протягом 5 хв.

- Виявлення: в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм, або витримують в парах йоду протягом 5 хв і переглядають при денному світлі

- Результати: на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися

основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння.

С. Характерна реакція (с) на натрій (*ДФУ, 2.3.1 N).

3. Однорідність дозованих одиниць.

Метод прямого визначення (* ДФУ, 2.9.40).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях (*ДФУ, 2.2.25).

Розчини готують безпосередньо перед використанням.

Випробовуваний розчин.

Вміст однієї таблетки, попередньо розтертий в порошок, кількісно, за допомогою 50 мл 0,01 М розчину натрію гідроксиду переносять в мірну колбу об'ємом 100 мл, струшують протягом 10 хв, доводять тим самим розчинником до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші 10 мл фільтрату.

2,0 мл одержаного розчину доводять 0,01 М розчином натрію гідроксиду до об'єму 50,0 мл.

Розчин порівняння. 50,0 мг глутатіону розчиняють у 0,01 М розчині натрію гідроксиду і доводять тим самим розчинником до об'єму 100,0 мл.

2,0 мл одержаного розчину доводять 0,01 М розчином натрію гідроксиду до об'єму 100,0 мл.

Компенсаційний розчин. 0,01 М розчин натрію гідроксиду.

Оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 275 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм відносно компенсаційного розчину.

Визначають кількісний вміст діючої речовини у кожній із 10 відібраних капсул.

Розраховують приймально число.

Приймальне число для перших десяти таблеток має бути меншим або дорівнювати 15,0. Якщо приймально число більше 15,0, випробуванню піддають наступні 20 таблеток. Приймальне число, розраховано із 30 таблеток, має бути меншим або дорівнювати 15,0 | жоден вміст у таблетці не має бути меншим за 0.75

М і більшим за 1.25 М.

4. Розпадання (*ДФУ, 2.9.1). Не більше 30 хв.

5. Супровідні домішки.

Визначення проводять методом рідинної хроматографії (*ДФУ, 2.2.29).

Розчин А. Метанол Р - вода Р (130:70).

Розчин В. Суміш розчину 1 г/л кислоти фосфорної Р та розчину 2 г/л натрію дигідрофосфату Р (50:50). рН суміші доводять до 2,5.

Випробовуваний розчин. До 0,40 г порошку розтертого вмісту таблеток додають 20 мл розчину А, струшують протягом 10 хв, доводять тим самим розчинником до об'єму 25,0 мл, перемішують і фільтрують.

Розчин порівняння(а). 0,5 мл випробовуваного розчину доводять розчином А до об'єму 10,0 мл. 0,4 мл одержаного розчину доводять розчином А до об'єму 10,0 мл.

Розчин порівняння (b). 10,0 мг домішки А глутатіону розчиняють у 5 мл розчину А і доводять тим самим розчинником до об'єму 10,0 мл. До 1,0 мл одержаного розчину додають 0,5 мл випробовуваного розчину та доводять розчином А до об'єму 10,0 мл. 1,0 мл одержаного розчину доводять розчином А до об'єму 10,0 мл.

Нормування:

- будь-яка домішка: площа піка будь-якої домішки не має перевищувати площу основного піка глутатіону на хроматограмі розчину порівняння (а) (0,2 %);
- сума домішок: сума площ піків домішок не має перевищувати 2,5 площі основного піка глутатіону на хроматограмі розчину порівняння (а) (0,5 %);
- не враховують: домішки, площа піків яких становить менше 0,25 площі піка глутатіону на хроматограмі розчину порівняння (а) (0,05 %) та піки з часом утримування менше 2,5 хв.

6. Розчинення.

Випробування проводять методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій і видимій областях (*ДФУ, 2.2.25) відповідно до вимог *ДФУ, 2.9.3.

Розчини готують безпосередньо перед використанням.

- Середовище розчинення: вода Р; об'єм - 1000 мл;
- Обладнання: прилад 1, швидкість обертання 100 об/хв.;
- Час розчинення: 45 хв.

Випробовуваний розчин. В кошик для розчинення поміщають одну таблетку. Через 45 хв відбирають 100 мл з центру посудини для розчинення і фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші 10 мл фільтрату. 5,0 мл одержаного фільтрату доводять водою Р до об'єму 10,0 мл.

Розчин порівняння. 50,0 мг натрію глутатіону (ФСЗ ДФУ або USP RS) розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до

100,0 мл. 2,5 мл отриманого розчину доводять водою Р до об'єму 100,0 мл.

Компенсаційний розчин. Вода Р.

Оптичну густина випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 275 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм відносно компенсаційного розчину.

Кількість глутатіону, що перейшов у розчин за 45 хв, має бути не менше 80 % (Q) від зазначеного в розділі «Склад».

7. Мікробіологічна чистота.

Відбір проб лікарського засобу треба проводити в суворо визначеному порядку. Порядок відбору проб залежить від розмірів серії, ступеня небезпеки для здоров'я, пов'язаної з мікробним забрудненням лікарського засобу вище допустимого рівня, характеристиками лікарського засобу й очікуваним рівнем мікробного забруднення. Якщо немає інших зазначень в окремій статті, для випробування використовують зразки по 10 г субстанції або готового лікарського засобу, відібрані з дотриманням застережних заходів. Зразки відбирають у випадковому порядку з контейнерів з готовим лікарським засобом. Якщо необхідно, при відборі однієї проби змішують вміст кількох контейнерів, для того щоб одержати зразок необхідної маси .

10 г випробовуваного лікарського засобу розчиняють буферним розчином із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0 або іншою підходящою рідиною. Як

правило, використовують розведення 1:10. Якщо необхідно, допускається використання інших розведень відповідно до властивостей лікарського засобу. Готують подальші десятикратні серійні розведення, використовуючи той самий розчинник.

Визначення загальної кількості бактерій та загальної кількості грибів.

У чашки Петрі діаметром 9 см вносять від 15 до 20 мл розплавленого густого живильного середовища для вирощування бактерій (МПА) або розплавленого густого живильного середовища для вирощування грибів (агар Сабуро) із температурою від 45°C до 50°C і дають середовищу застигнути. 1 мл зразка підготованого вносять у пробірку стерильною піпеткою, що містить близько 4 мл розплавленого і охолодженого до температури не більше 45°C густого живильного середовища МПА або густого живильного середовища Сабуро. Швидко перемішують вміст пробірки і переносять у чашку Петрі з густим живильним середовищем МПА чи Сабуро, відповідно. Швидким погойдуванням чашки Петрі рівномірно розподіляють верхній шар поживного середовища. Для кожного розведення використовують не менше двох чашок Петрі з кожним поживним середовищем. Після застигання середовища чашки перевертають й інкубують при температурі від 30°C до 35°C (від 20°C до 25°C для грибів) протягом п'яти діб. Обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній і визначають число колоніє утворюючих одиниць у грамі або мілілітрі.

Визначення родини *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Salmonella*)

Відповідно 1 мл зразку лікарського засобу вносять у 10 мл поживного середовища №3 (середовище збагачення для бактерій роду *Enterobacteriaceae* і інкубують при температурі від 35°C до 37°C від 18 до 48 год. Якщо у середовищі з'явилися ознаки бродіння, помутніння середовища, то петлею роблять пересів на середовище №4 (Ендо) для ідентифікації *E. coli* та №5 для *Salmonella*) і інкубують при температурі від 35°C до 37°C від 18 до 48 год. Проводять кількісний підрахунок колоній, визначають середньоарифметичну кількість мікроорганізмів, мікроскопіюють окремі колонії.

Визначення бактерій *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*

Відповідно 1 мл зразку лікарського засобу вносять у 10 мл поживного середовища Чистовича (середовище збагачення для бактерій *Staphylococcus aureus* *Pseudomonas aeruginosa*) і інкубують при температурі від 35°C до 37°C від 24 до 48 год. Після закінчення періоду інкубації, при появі мутності роблять пересівання петлею на чашку з густим поживним середовищем №10 для ідентифікації *S. aureus*, *P. aeruginosa* і інкубують при температурі від 35°C до 37°C від 24 до 48 год. Проводять кількісний підрахунок колоній, визначають середньоарифметичну кількість мікроорганізмів, мікроскопіюють окремі колонії

8. Кількісне визначення глутатіону в готовому продукті.

Для аналізу беруть 20мл зразку селективно осаджують за допомогою етанолу (3:1), потім відбирають 10г осаду і центрифугують протягом 10 хв і після центрифугування осад розчиняють в 1,5 М NaCl (1:1). Даний процес (селективну преципітацію) виконують двічі в однакових умовах, але після центрифугування осад із глутатіоном розчиняють у дистильованій воді та визначають концентрацію методом описаним Blumenkrantz and Asboe-Hansen (1973) з модифікацією, запропонованою Murado, Vázquez, Montemayor, Cabo and González (2005).

Використовувалися реактиви:

(C) $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (1ммоль розводять у 1 мл у сірчаній кислоті 96%,)

(D) мета-гідроксидифеніл(1мг/1мл) у NaOH (0,0125 моль).

Реакцію проводили шляхом зливання 0,5 мл проби і 3,4 мл реагенту А при інтенсивному змішуванні, інкубують зразок протягом 5 хв у киплячій водянній бані з подальшим охолодженням при температурі 22°C. Після цього, 100 мкл реагенту В додаються з подальшим інтенсивним змішуванням.

Через 15 хв вимірювали оптичну щільність при довжині хвилі 520 нм проти зразка, що містив 0,5мл дистильованої води. Калібрування проводилася з серійними розведеннями глутатіону (10–100мкг/1мл) [9].

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Simões J., Moreira A.S.P., daCosta E., Evtyugin D., Domingues P., Nunes F.M., Coimbra M.A., Domingues M.R.M. Oxidation of amylose and amylopectin by hydroxyl radicals assessed by electrospray ionisation mass spectrometry. *Carbohydr. Polym.* 2016;148:290–299. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.03.034.
2. VandenEnde W., Peshev D., DeGara L. Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. *Trends Food Sci. Technol.* 2011;22:689–697. doi: 10.1016/j.tifs.2011.07.005.
3. Butterfield D.A., Castegna A., Pocernich C.B., Drake J., Scapagnini G., Calabrese V. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.* 2002;13:444–461. doi: 10.1016/S0955-2863(02)00205-X.
4. Kohen R., Yamamoto Y., Cundy K.C., Ames B.N. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, andanserine present in muscle and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988;85:3175–3179. doi: 10.1073/pnas.85.9.3175.
5. Gu L., Zhao M., Li W., You L., Wang J., Wang H., Ren J. Chemical and cellular antioxidant activity of two novel peptides designed based on glutathione structure. *Food Chem. Toxicol.* 2012;50:4085–4091. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.028.
6. Wang L., Ding L., Yu Z., Zhang T., Ma S., Liu J. Intracellular ROS scavenging and antioxidant enzyme regulating capacities of corn gluten meal-derived antioxidant peptides in HepG2 cells. *Food Res. Int.* 2016;90:33–41. doi: 10.1016/j.foodres.2016.10.023.
7. Qian Z.-J., Jung W.-K., Kim S.-K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresour. Technol.* 2008;99:1690–1698. doi: 10.1016/j.biortech.2007.04.005.
8. Carrasco-Castilla J., Hernández-Álvarez A.J., Jiménez-Martínez C., Jacinto-Hernández C., Alaiz M., Girón-Calle J., Vioque J., Dávila-Ortiz G.

Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food Chem.* 2012;135:1789–1795. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.016.

9. Megías C., Pedroche J., Yust M.M., Girón-Calle J., Alaiz M., Millán F., Vioque J. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT-Food Sci. Technol.* 2008;41:1973–1977. doi: 10.1016/j.lwt.2007.11.010.

10. Guo Y., Zhang T., Jiang B., Miao M., Mu W. The effects of an antioxidative pentapeptide derived from chickpea protein hydrolysates on oxidative stress in Caco-2 and HT-29 cell lines. *J. Funct. Foods.* 2014;7:719–726. doi: 10.1016/j.jff.2013.12.013.

11. Shi Y., Kovacs-Nolan J., Jiang B., Tsao R., Mine Y. Peptides derived from eggshell membrane improve antioxidant enzyme activity and glutathione synthesis against oxidative damage in Caco-2 cells. *J. Funct. Foods.* 2014;11:571–580. doi: 10.1016/j.jff.2014.08.017.

12. Kerasioti E., Stagos D., Tzimi A., Kouretas D. Increase in antioxidant activity by sheep/goat whey protein through nuclear factor-like 2 (Nrf2) is cell type dependent. *Food Chem. Toxicol.* 2016;97:47–56. doi: 10.1016/j.fct.2016.08.022.

13. Sarmadi B.H., Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides.* 2010;31:1949–1956. doi: 10.1016/j.peptides.2010.06.020.

14. Nikoo M., Benjakul S. Potential application of seafood-derived peptides as bifunctional ingredients, antioxidant–cryoprotectant: A review. *J. Funct. Foods.* 2015;19:753–764. doi: 10.1016/j.jff.2015.10.014.

15. Zou T.-B., He T.-P., Li H.-B., Tang H.-W., Xia E.-Q. The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. *Molecules.* 2016;21:72. doi: 10.3390/molecules21010072.

16. Zheng L., Zhao Y., Dong H., Su G., Zhao M. Structure–activity relationship of antioxidant dipeptides: Dominant role of Tyr, Trp, Cys and Met residues. *J. Funct. Foods.* 2016;21:485–496. doi: 10.1016/j.jff.2015.12.003.

17. Chen H.-M., Muramoto K., Yamauchi F., Nokihara K. Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Soybean Protein. *J. Agric. Food Chem.* 1996;44:2619–2623. doi: 10.1021/jf950833m.
18. Saito K., Jin D., Ogawa T., Muramoto K., Hatakeyama E., Yasuhara T., Nokihara K. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51:3668–3674. doi: 10.1021/jf021191n.
19. Li Y.-W., Li B., He J., Qian P. Quantitative structure–activity relationship study of an antioxidative peptide by using different sets of amino acid descriptors. *J. Mol. Struct.* 2011;998:53–61. doi: 10.1016/j.molstruc.2011.05.011.
20. Li Y.-W., Li B. Characterization of structure–antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid properties. *J. Theor. Biol.* 2013;318:29–43. doi: 10.1016/j.jtbi.2012.10.029.
21. Iwaniak A., Minkiewicz P., Darewicz M., Protasiewicz M., Mogut D. Chemometrics and cheminformatics in the analysis of biologically active peptides from food sources. *J. Funct. Foods.* 2015;16:334–351. doi: 10.1016/j.jff.2015.04.038.
22. Meng D., Zhang P., Zhang L., Wang H., Ho C.-T., Li S., Shahidi F., Zhao H. Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. *J. Funct. Foods.* 2017;37:467–479. doi: 10.1016/j.jff.2017.08.008.
23. Meng D., Zhang P., Li S., Ho C.-T., Zhao H. Antioxidant activity evaluation of dietary phytochemicals using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. *J. Funct. Foods.* 2017;38:36–44. doi: 10.1016/j.jff.2017.08.041.
24. Mailloux R.J. Protein S-glutathionylation reactions as a global inhibitor of cell metabolism for the desensitization of hydrogen peroxide signals. *Redox Biol.* 2020;32:101472. doi: 10.1016/j.redox.2020.101472.
25. Jena A.B., Samal R.R., Bhol N.K., Duttaroy A.K. Cellular Red-Ox system in health and disease: The latest update. *Biomed. Pharmacother.* 2023;162:114606. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114606.

26. Mallén-Ponce M.J., Huertas M.J., Florencio F.J. Exploring the Diversity of the Thioredoxin Systems in Cyanobacteria. *Antioxidants*. 2022;11:654. doi: 10.3390/antiox11040654.
27. Kalinina E., Novichkova M. Glutathione in Protein Redox Modulation through S-Glutathionylation and S-Nitrosylation. *Molecules*. 2021;26:435. doi: 10.3390/molecules26020435.
28. Ogata F.T., Branco V., Vaie F.F., Coppo L. Glutaredoxin: Discovery, redox defense and much more. *Redox Biol.* 2021;43:101975. doi: 10.1016/j.redox.2021.101975
29. Nianiou-Obeidat I., Madesis P., Kissoudis C., Voulgari G., Chronopoulou E., Tsaftaris A., Labrou N.E. Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: Functions and biotechnological applications. *Plant Cell Rep.* 2017;36:791–805. doi: 10.1007/s00299-017-2139-7.
30. Gallé Á., Czékus Z., Bela K., Horváth E., Ördög A., Csiszár J., Poór P. Plant glutathione transferases and light. *Front. Plant Sci.* 2019;9:1944. doi: 10.3389/fpls.2018.01944.
31. Musaogullari A., Chai Y.C. Redox regulation by protein s-glutathionylation: From molecular mechanisms to implications in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:9113. doi: 10.3390/ijms21218113.
32. Schieber M., Chandel N.S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* 2014;24:R453–R462. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
33. Sanchez-Baracaldo P., Bianchini G., Wilson J.D., Knoll A.H. Cyanobacteria and biogeochemical cycles through Earth history. *Trends Microbiol.* 2022;30:143–157. doi: 10.1016/j.tim.2021.05.008.
34. Hamilton T.L., Bryant D.A., Macalady J.L. The role of biology in planetary evolution: Cyanobacterial primary production in low-oxygen Proterozoic oceans. *Environ. Microbiol.* 2016;18:325–340. doi: 10.1111/1462-2920.13118.

35. West J.B. The strange history of atmospheric oxygen. *Physiol. Rep.* 2022;10:e15214. doi: 10.14814/phy2.15214.
36. Fisher W.W., Hemp J., Valentine J.S. How did life survive Earth's great oxygenation? *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2016;31:166–178. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.03.013.
37. Demoulin C.F., Lara Y.J., Cornet L., François C., Baurain D., Wilmotte Y., Javaux E.J. Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. *Free Radic. Biol. Med.* 2019;140:206–223. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.007.
38. Schad M., Konhauser K.O., Sanchez-Baracaldo P., Kappler A., Bryce C. How did the evolution of oxygenic photosynthesis influence the temporal and spatial development of the microbial iron cycle on ancient Earth? *Free Radic. Biol. Med.* 2019;140:154–188. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.014.
39. Fourmier G.P., Morre K.R., Rangel L.T., Fayette J.G., Momper L., Bosak T. The Archean origin of oxygenic photosynthesis and extant cyanobacterial lineages. *Proc. R. Soc. B.* 2021;288:20210675. doi: 10.1098/rspb.2021.0675.
40. Shimakawa G., Matsuda Y., Nakajima K., Tamoi M., Shigeoka S., Miyake C. Diverse strategies of O₂ usage for preventing photo-oxidative damage under CO₂ limitation during algal photosynthesis. *Sci. Rep.* 2017;7:41022. doi: 10.1038/srep41022.
41. Weiss E.L., Fang M., Taton A., Szubin R., Palsson B.O., Mitchell B.G., Golden S.S. An unexpected role for leucylaminopeptidase in UV tolerance revealed by a genome-wide fitness assessment in a model cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2022;119:e2211789119. doi: 10.1073/pnas.2211789119.
42. Diaz J.M., Plummer S. Production of extracellular reactive oxygen species by phytoplankton: Past and future directions. *J. Plankton Res.* 2018;40:655–666. doi: 10.1093/plankt/fby039.
43. Garcia-Calleja J., Cossart T., Pedrero Z., Santos J.P., Ouerdane L., Tessier E., Slaveykova V.I., Arnoux D. Determination of the intracellular complexation of inorganic and methylmercury in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Environ. Sci. Technol.* 2021;55:13971–13979. doi: 10.1021/acs.est.1c01732.

44. Ali S., Mir R.A., Tyagi A., Manzar N., Kashyap A.S., Mushtaq M., Raina A., Park S., Sharma S., Mir Z.A., et al. Chromium Toxicity in Plants: Signaling, Mitigation, and Future Perspectives. *Plants*. 2023;12:1502. doi: 10.3390/plants12071502.
45. Collado-Lopez S., Betanzos-Robledo L., Tellez-Rojo M.M., Lamadrid-Figueroa H., Reyes M., Rios C., Cantoral A. Heavy Metals in Unprocessed or Minimally Processed Foods Consumed by Humans Worldwide: A Scoping Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2022;19:8651. doi: 10.3390/ijerph19148651.
46. Wang R., Sang P., Guo Y., Jin P., Cheng Y., Yu H., Xie Y., Yao W., Qian H. Cadmium in food: Source, distribution and removal. *Food Chem*. 2023;405:134666. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134666.
47. Lea-Smith D.J., Bombelli P., Vasudevan R., Howe C.J. Photosynthetic, respiratory and extracellular electron transport pathways in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg*. 2016;1857:247–255. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.10.007.
48. Veaudor T., Blanc-Garin V., Chenebault C., Diaz-Santos E., Sassi J.F., Cassier-Chauvat C., Chauvat F. Recent advances in the photoautotrophic metabolism of cyanobacteria: Biotechnological implications. *Life*. 2020;10:71. doi: 10.3390/life10050071.
49. Cui J., Xie Y., Sun T., Chen L., Zhang W. Deciphering and engineering photosynthetic cyanobacteria for heavy metal bioremediation. *Sci. Total Environ*. 2021;761:144111. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144111.
50. Chakdar H., Thapa S., Srivastava A., Shukla P. Genomic and proteomic insights into the heavy metal bioremediation by cyanobacteria. *J. Hazard. Mater*. 2022;424:127609. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.127609.
51. Narainsamy K., Farci S., Braun E., Junot C., Cassier-Chauvat C., Chauvat F. Oxidative-stress detoxification and signaling in cyanobacteria: The crucial glutathione synthesis pathway supports the production of ergothioneine and ophthalate. *Mol. Microbiol*. 2016;100:15–24. doi: 10.1111/mmi.13296.
52. Kammerscheit X., Chauvat F., Cassier-Chauvat C. From cyanobacteria to human, MAPEG-type glutathione-S-

transferases operate in cell to tolerate heat, cold, and lipid peroxidation. *Front. Microbiol.* 2019;10:2248. doi: 10.3389/fmicb.2019.02248.

53. Hasanuzzaman M., Nahar K., Anee T.I., Fujita M. Glutathione in plants: Biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2017;23:249–268. doi: 10.1007/s12298-017-0422-2.

54. Dai W., Chen M., Myers C., Ludtke S.J., Pettitt B.M., King J.A., Schmid M.F., Chiu W. Visualizing Individual RuBisCO and Its Assembly into Carboxysomes in Marine Cyanobacteria by Cryo-Electron Tomography. *J. Mol. Biol.* 2018;430:4156–4167. doi: 10.1016/j.jmb.2018.08.013.

55. Nelson C., Garcia-Pichel F. Beneficial Cyanosphere Heterotrophs Accelerate Establishment of Cyanobacterial BioCrust. *Appl. Environ. Microbiol.* 2021;87:e0123621. doi: 10.1128/AEM.01236-21.

56. Singh J.S., Kumar A., Rai A.N., Singh D.P. Cyanobacteria: A precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Front. Microbiol.* 2016;7:529. doi: 10.3389/fmicb.2016.00529.

57. Panjari N., Mishra S., Yadav A.N., Verma P. Functional Foods from Cyanobacteria. In: Gupta V.K., Treichel H., Shapaval V., deOliveira L.A., Tuohy M.G., editors. *Microbial Functional Foods and Nutraceuticals*. Wiley; Hoboken, NY, USA: 2017.

58. Sheha G.R., Yadav R.K., Chatrath A., Gerard M., Tripathi K., Govindsamy V., Abraham G. Perspectives on the potential application of cyanobacteria in the alleviation of drought and salinity stress in crop plants. *J. Appl. Phycol.* 2021;33:3761–3778. doi: 10.1007/s10811-021-02570-5.

59. Liu D., Liberton M., Hendry J.I., Aminian-Dehkordi J., Maranas C.D., Pakrasi H.B. Engineering biology approaches for food and nutrient production by cyanobacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2021;67:1–6. doi: 10.1016/j.copbio.2020.09.011.

60. Cassier-Chauvat C., Dive V., Chauvat F. Cyanobacteria: Photosynthetic factories combining biodiversity, radiation resistance, and genetic tools to facilitate drug discovery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017;101:1359–1364. doi: 10.1007/s00253-017-8105-z
61. Demay J., Bernard C., Reinhardt A., Marie B. Natural products from cyanobacteria: Focus on beneficial activities. *Mar. Drugs.* 2019;17:320. doi: 10.3390/md17060320.
62. Kirsch F., Klähn S., Hagemann M. Salt-Regulated Accumulation of the Compatible Solutes Sucrose and Glucosylglycerol in Cyanobacteria and Its Biotechnological Potential. *Front. Microbiol.* 2019;10:2139. doi: 10.3389/fmicb.2019.02139.
63. Pade N., Hagemann M. Salt Acclimation of Cyanobacteria and Their Application in Biotechnology. *Life.* 2015;5:25–49. doi: 10.3390/life5010025.
64. Kollmen J., Strieth D. The Beneficial Effects of Cyanobacterial Co-Culture on Plant Growth. *Life.* 2022;12:223. doi: 10.3390/life12020223.
65. Verseux C., Baqué M., Lehto K., De Vera J.P.P., Rothschild L.J., Billi D. Sustainable life support on Mars—The potential roles of cyanobacteria. *Int. J. Astrobiol.* 2016;15:65–92. doi: 10.1017/S147355041500021X.
66. Keller R., Goli K., Porter W., Arabaa A., Jones J.A. Cyanobacteria and Algal-Based Biological Life Support System (BLSS) and Planetary Surface Atmospheric Revitalizing Bioreactor Brief Concept Review. *Life.* 2023;13:816. doi: 10.3390/life13030816.
67. Rautela A., Kumar S. Engineering plant family TPS into cyanobacterial host for terpenoids production. *Plant Cell Rep.* 2022;41:1791–1803. doi: 10.1007/s00299-022-02892-9.
68. Cassier-Chauvat C., Blanc-Garin V., Chauvat F. Genetic, Genomics, and Responses to Stresses in Cyanobacteria: Biotechnological Implications. *Genes.* 2021;12:500. doi: 10.3390/genes12040500.

69. Herrero A., Stavans J., Flores E. Themulticellularnatureoffilamentousheterocyst-formingcyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2016;40:831–854. doi: 10.1093/femsre/fuw029.
70. Cassier-Chauvat C., Veaudor T., Chauvat F. Comparativegenomicsof DNA recombinationandrepairincyanobacteria: Biotechnologicalimplications. *Front. Microbiol.* 2016;7:1809. doi: 10.3389/fmicb.2016.01809.
71. Berndt C., Lillig C.H. Glutathione, Glutaredoxins, andIron. *Antioxid. RedoxSignal.* 2017;27:1235–1251. doi: 10.1089/ars.2017.7132.
72. 89. Scire A., Cianfruglia L., Minnelli C., Bartolinin D., Torquato P., Principato G., Galli F., Armeni T. Glutathionecompartmentalizationanditsroleinglutathionylationandotherregulatoryproces sesofcellularpathways. *BioFactors.* 2018;45:152–168. doi: 10.1002/biof.1476.
73. Trnka D., Engelke A.D., Gellert M., Moseler A., Hossain M.F., Lindenberg T.T., Pedroletti L., Odermatt B., deSouza J.V., Bronowska A.K., etal. Molecularbasisforthedistinctfunctionsofredox-activeandFeS-transferringglutaredoxins. *Nat. Commun.* 2020;11:3445. doi: 10.1038/s41467-020-17323-0.
74. Ponce-Toledo R.I., Deschamps P., López-García P., Zivanovic Y., Benzerara K., Moreira D. AnEarly-BranchingFreshwaterCyanobacteriumattheOriginofPlastids. *Curr. Biol.* 2017;27:386–391. doi: 10.1016/j.cub.2016.11.056.
75. Pinevich A.V. Chloroplasthistoryclarifiedbythecriterionoflight-harvestingcomplex. *Biosystem.* 2020;196:104176. doi: 10.1016/j.biosystems.2020.104173.
76. Seregin I.V., Kozhevnikova A.D. Phytochelatins: Sulfur-ContainingMetal(loid)-ChelatingLigandsinPlants. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24:2430. doi: 10.3390/ijms24032430.
77. Ito T., Ohkama-Ohtsu N. Degradationofglutathioneandglutathioneconjugatesinplants. *J. Exp. Bot.* 2023:erad018. doi: 10.1093/jxb/erad018.

78. Gao C., Gao K., Yang H., Ju T., Zhu J., Tang Z., Zhao L., Chen Q. Genome-wide analysis of metallothionein gene family in maize to reveal its role in development and stress resistance to heavy metal. *Biol. Res.* 2022;55:1. doi: 10.1186/s40659-021-00368-w.
79. Mikhaylina A., Scott L., Scanlan D.J., Blindauer C.A. A metallothionein from an open ocean cyanobacterium removes zinc from the sensor protein controlling its transcription. *J. Inorg. Biochem.* 2022;230:111755. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2022.111755.
80. Ziller A., Fraissinet-Tachet L. Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: A multifunctional protein. *Metallomics.* 2018;10:1549–1559. doi: 10.1039/C8MT00165K.
81. Saing T., Lagman M., Castrillon J., Gutierrez E., Guilford F.T., Venketaraman V. Analysis of glutathione levels in the brain tissue samples from HIV-1-positive individuals and subject with Alzheimer's disease and its implication in the pathophysiology of the disease process. *Biochim. Biophys. Acta Clin.* 2016;29:38–44. doi: 10.1016/j.bbaci.2016.05.006.
82. Dwivedi D., Megha K., Mishra R., Mandal P.K. Glutathione in Brain: Overview of Its Conformations, Functions, Biochemical Characteristics, Quantitation and Potential Therapeutic Role in Brain Disorders. *Neurochem. Res.* 2020;45:1461–1480. doi: 10.1007/s11064-020-03030-1.
83. Couto N., Wood J., Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic. Biol. Med.* 2016;95:27–42. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028.
84. Dai H., Wang L., Li L., Huang Z., Ye L. Metallothionein 1: A New Spotlight on Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* 2021;5:739918. doi: 10.3389/fimmu.2021.739918.
85. Yang J., Li W., Wang D., Wu H., Li Z., Ye Q. Characterization of bifunctional L-glutathione synthetases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus succinogenes*.

enesforefficientglutathionebiosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016;100:6279–6289. doi: 10.1007/s00253-016-7437-4.

86. Jeon G.-B., Lee H.-J., Park J.P., Park K., Choi C.-H., Kim S.-K. Efficientproductionofglutathionein*Saccharomycescerevisiae* a syntheticisozymesystem. *Biotechnol. J.* 2022;8:2200398. doi: 10.1002/biot.202200398.

87. Wang C., Zhang J., Wu H., Li Z., Ye Q. Heterologous*gshF*geneexpressioninvariousvectorsystems in*Escherichiacoli*forenhancedglutathione production. *J. Biotechnol.* 2015;214:63–68. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.09.004.

88. Santos L.O., Silva P.G.P., Lemos W.J.F.L., deOliveira V.S., Anschau A. Glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*: Current state and perspectives. *Appl. Environ. Microbiol.* 2022;106:1879–1894. doi: 10.1007/s00253-022-11826-0.

89. Ali V., Behera S., Nawaz A., Equbal A., Pandey K. Unique thiol metabolism in trypanosomatids: Redox homeostasis and drug resistance. *Adv. Parasitol.* 2022;117:75–155. doi: 10.1016/bs.apar.2022.04.002.

90. Chandrangsu P., VanLoi W., Antelman H., Helman J.D. The Role of Bacillithiolin in Gram-Positive Firmicutes. *Antioxid. Redox Signal.* 2018;28:445–462. doi: 10.1089/ars.2017.7057.

91. SaoEmani C., Gallant J.L., Wild I.J., Baker B. The role of low molecular weight thiols in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 2019;116:44–55. doi: 10.1016/j.tube.2019.04.003.

92. Qiu Y., Chen Z., Su E., Wang L., Sun L., Lei P., Xu H., Li S. Recent Strategies for the Biosynthesis of Ergothioneine. *J. Agric. Food Chem.* 2021;69:13682–13690. doi: 10.1021/acs.jafc.1c05280.

93. Cumming B.M., Chinta K.C., Reddy V.P., Steyn A.J.C. Role of Ergothioneine in Microbial Physiology and Pathogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 2018;28:431–444. doi: 10.1089/ars.2017.7300.

94. Borodina I., Kenny L.C., McCarthy C.M., Paramasivan K., Pretorius E., Roberts T.J., vanderHoek S.A., Kell D.B. The biology of ergothioneine,

an antioxidant nutraceutical. *Nutr. Res. Rev.* 2020;33:190–217. doi: 10.1017/S0954422419000301.

95. Nakamichi N., Tsuzuku S., Shibagaki F. Ergothioneine and central nervous system diseases. *Neurochem. Res.* 2022;47:2513–2521. doi: 10.1007/s11064-022-03665-2.

96. Yadan J.-C. Matching chemical properties to molecular biological activities opens a new perspective on l-ergothioneine. *FEBS Lett.* 2022;596:1299–1312. doi: 10.1002/1873-3468.14264.

97. Liu H.-M., Tang W., Wang X.-Y., Jiang J.-J., Zhang W., Wang W. Safe and Effective Antioxidant: The Biological Mechanism and Potential Pathways of Ergothioneine in the Skin. *Molecules.* 2023;28:1648. doi: 10.3390/molecules28041648.

98. Stampfli A.R., Blankenfeldt W., Seebeck F.P. Structural basis of ergothioneine biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2020;65:1–8. doi: 10.1016/j.sbi.2020.04.002.

99. Gokçe G., Zuhuri M., Erfuna E. Ergothioneine prevents endothelial dysfunction induced by mercury chloride. *Exp. Ther. Med.* 2018;15:4697–4702. doi: 10.3892/etm.2018.6079.

100. Dello S.A.W.G., Neis E.P.J.G., deJong M.C., vanEijk H.M.H., Kicken C.H., OldeDamink S.W.M., Dejong C.H.C. Systematic review of ophthalmate as a novel biomarker of hepatic glutathione depletion. *Clin. Nutr.* 2013;32:325–330. doi: 10.1016/j.clnu.2012.10.008.

101. Servillo L., Castaldo D., Giovane A., Casale R., D'Onofrio N., Cautela D., Balestrieri M.L. Ophthalmic acid is a marker of oxidative stress in plants and animals. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2018;1862:991–998. doi: 10.1016/j.bbagen.2018.01.015.

102. Sajiki K., Pluskai T., Shimanuki M., Yanagida M. Metabolomic analysis of fission yeast at the onset of nitrogen starvation. *Metabolites.* 2013;3:1118–1129. doi: 10.3390/metabo3041118.

103. Ito T., Yamauchi A., Hemmi H., Yoshimura T. Ophthalmic acid accumulation in an *Escherichia coli* mutant lacking the conserved pyridoxal 5'-phosphate-binding protein YggS. *J. Biosci. Bioeng.* 2016;122:689–693. doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.06.010.
104. Gupta A., Ballal A. Unraveling the mechanism responsible for the contrasting tolerance of *Synechocystis* and *Synechococcus* to Cr(VI): Enzymatic and non-enzymatic antioxidants. *Aquat. Toxicol.* 2015;164:118–125. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.04.015.
105. Ashida H., Sawa Y., Shibata H. Cloning, biochemical and phylogenetic characterizations of gamma-glutamylcysteine synthetase from *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant Cell Physiol.* 2005;46:557–562. doi: 10.1093/pcp/pci056.
106. Jaiswal D., Nenwani M., Mishra V., Wangikar P.P. Probing the metabolism of γ -glutamyl peptides in cyanobacteria via metabolite profiling and ¹³C labeling. *Plant J.* 2022;109:708–726. doi: 10.1111/tpj.15564.
107. Sofyanovich O.A., Nishiuchi H., Yamagishi K., Matrosova E.V., Serebrianyi V.A. Multiple pathways for the formation of the γ -glutamyl peptides γ -glutamyl-valine and γ -glutamyl-valyl-glycine in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE.* 2019;14:e0216622. doi: 10.1371/journal.pone.0216622.
108. Kobayashi S., Ikeda Y., Shigeno Y., Konno H., Fujii J. γ -Glutamylcysteine synthetase and γ -glutamyltransferase as differential enzymatic sources of γ -glutamyl peptides in mice. *Amino Acids.* 2020;52:555–566. doi: 10.1007/s00726-020-02835-2.
109. Yang J., Bai W., Zeng X., Cui C. Gamma-glutamyl peptides: The food source, enzymatic synthesis, kokumi-active and the potential functional properties—A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2019;91:339–346. doi: 10.1016/j.tifs.2019.07.022.
110. 165. Kang Y.P., Mockabee-Maclas A., Jiang C., Falzone A., Prieto-Farigua N., Stone E., Harris I.S., DeNicolas G.M. Non-canonical glutamate-cysteine ligase activity protects against ferroptosis. *Cell Metab.* 2021;33:174–189. doi: 10.1016/j.cmet.2020.12.007.

111. Wu Q., Li J., Zhu J., Sun X., He D., Li J., Cheng Z., Zhang X., Xu Y., Chen Q., et al. Gamma-glutamyl-leucine levels are causally associated with elevated cardio-metabolic risks. *Front. Nutr.* 2022;9:936220. doi: 10.3389/fnut.2022.936220.

112. Narainsamy K., Cassier-Chauvat C., Junot C., Chauvat F. High performance analysis of the cyanobacterial metabolism via liquid chromatography coupled to a LTQ-Orbitrap mass spectrometer: Evidence that glucose reprograms the whole carbon metabolism and triggers oxidative stress. *Metabolomics.* 2013;9:21–32. doi: 10.1007/s11306-011-0382-4.

113. Baran R., Ivanova N.N., Jose N., Garcia-Pichel F., Kyrpides N.G., Gigger M., Northern T.R. Functional Genomics of Novel Secondary Metabolites from Diverse Cyanobacteria Using Untargeted Metabolomics. *Mar. Drugs.* 2013;11:3617–3631. doi: 10.3390/md11103617.

114. Liao C., Seebeck F.P. Convergent Evolution of Ergothioneine Biosynthesis in Cyanobacteria. *ChemBioChem.* 2017;18:2115–2118. doi: 10.1002/cbic.201700354.

115. Wang, D., Wang, C., Wu, H., Li, Z., & Ye, Q. (2016). Glutathione production by recombinant *Escherichia coli* expressing bifunctional glutathione synthetase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(1), 45-53.

116. Zhang, G. C., Wang, D. H., Wang, D. H., & Wei, G. Y. (2017). The mechanism of improved intracellular organic selenium and glutathione contents in selenium-enriched *Candida utilis* by acid stress. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(5), 2131-2141.

117. Wang, D., Wang, C., Wu, H., Li, Z., & Ye, Q. (2016). Glutathione production by recombinant *Escherichia coli* expressing bifunctional glutathione synthetase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(1), 45-53.

118. Xu, C., Shi, Z., Shao, J., Yu, C., & Xu, Z. (2019). Metabolic engineering of *Lactococcus lactis* for high level accumulation of glutathione and S-adenosyl-L-methionine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 1-9.

119. Liang, G., Liao, X., Du, G., & Chen, J. (2009). A new strategy to enhance glutathione production by multiple H₂O₂-induced oxidative stresses in *Candida utilis*. *Bioresourcetechnology*, *100*(1), 350-355.
120. Nie, M., Wei, G., Shao, N., & Ge, X. (2010). A novel strategy on the high-cell-density cultivation of *Candida utilis* for the enhanced production of glutathione. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *27*, 1246-1251.
121. Yin, H., Ma, Y., Deng, Y., Xu, Z., Liu, J., Zhao, J., ... & Chang, Z. (2016). Genomes shuffling of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced glutathione yield and relative gene expression analysis using fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of microbiological methods*, *127*, 188-192.
122. Lorenz, E., Schmach, M., & Senz, M. (2016). Evaluation of cysteine ethylesterase efficient inducer for glutathione overproduction in *Saccharomyces* spp. *Enzyme and microbial technology*, *93*, 122-131.
123. Hara, K. Y., Aoki, N., Kobayashi, J., Kiriya, K., Nishida, K., Araki, M., & Kondo, A. (2015). Improvement of oxidized glutathione fermentation by thiol redox metabolism engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, *99*, 9771-9778.
124. Musatti, A., Manzoni, M., & Rollini, M. (2013). Post-fermentative production of glutathione by baker's yeast (*S. cerevisiae*) in compressed and dried forms. *New biotechnology*, *30*(2), 219-226.
125. Schmach, M., Lorenz, E., Stahl, U., & Senz, M. (2017). Medium optimization based on yeast's elemental composition for glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bioengineering*, *123*(5), 555-561.
126. Chen, J. L., Xie, L., Cai, J. J., Yang, C. S., & Duan, X. H. (2013). Enzymatic synthesis of glutathione using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters*, *35*, 1259-1264.
127. Herzenberg LA, DeRosa SC, Dubs JG, Roederer M, Anderson MT, Ela SW, *etal*. Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;94:1967-72

128. Kern JK, Geier DA, Adams JB, Garver CR, Audhya T, Geier MR. A clinical trial of glutathione supplementation in autism spectrum disorders. *MedSciMonit* 2011;17:CR677-82.
129. Grey V, Mohammed SR, Smountas AA, Bahlool R, Lands LC. Improved glutathione status in young adult patients with cystic fibrosis supplemented with whey protein. *J CystFibros* 2003;2:195-8.
130. Nordlund JJ, Boissy RE. The biology of melanocytes. In: Freinkel RK, Woodley DT, editors. *The Biology of the Skin*. New York: CRC Press; 2001. p. 113-30.
131. Watanabe F, Hashizume E, Chan GP, Kamimura A. Skin-lightening and skin-condition-improving effects of topical oxidized glutathione: A double-blind and placebo-controlled clinical trial in healthy women. *ClinCosmetInvestigDermatol* 2014;7:267-74.
132. Masaki H. Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. *J DermatolSci* 2010;58:85-90.
133. Halprin KM, Ohkawara A. Glutathione and human pigmentation. *ArchDermatol* 1966;94:355-7.
134. Yamamura T, Onishi J, Nishiyama T. Antimelanogenic activity of hydrocoumarins in cultured normal human melanocytes by stimulating intracellular glutathione synthesis. *ArchDermatolRes* 2002;294:349-54.
135. Karg E, Odh G, Wittbjer A, Rosengren E, Rorsman H. Hydrogen peroxide as an inducer of elevated tyrosinase level in melanoma cells. *J InvestDermatol* 1993;100 2 Suppl:209S-13S.
136. Maeda K, Hatao M. Involvement of photooxidation of melanogenic precursors in prolonged pigmentation induced by ultraviolet A. *J InvestDermatol* 2004;122:503-9.
137. Seçkin HY, Kalkan G, Bas Y, Akbas A, Önder Y, Özyurt H, *etal.* Oxidative stress status in patients with melasma. *CutanOculToxicol* 2014;33:212-7.
138. Villarama CD, Maibach HI. Glutathione as a depigmenting agent: An overview. *Int J CosmetSci* 2005;27:147-53.

139. <https://ijdvl.com/glutathione-as-a-skin-whitening-agent-facts-myths-evidence-and-controversies/> Available from: [Last accessed on 2015 Apr 17].
140. ThePerfectPeel. Available from: <https://www.medicadepot.com/the-perfect-peel-online.html>. [Last accessed on 2015 Mar 26].
141. GlutathioneandMesotherapy. Available from: [http://www.treato.com/Glutathione, Mesotherapy/?a=s](http://www.treato.com/Glutathione,Mesotherapy/?a=s). [Last accessed on 2015 Apr 17].
142. Hagen TM, Wierzbicka GT, Bowman BB, Aw TY, Jones DP. Fateofdietaryglutathione: Dispositioninthegastrointestinaltract. *Am J Physiol* 1990;259(4 Pt 1):G530-5.
143. Hagen TM, Wierzbicka GT, Sillau AH, Bowman BB, Jones DP. Bioavailabilityofdietaryglutathione: Effectonplasmaconcentration. *Am J Physiol* 1990;259(4 Pt 1):G524-9.
144. Whillier S, Raftos JE, Chapman B, Kuchel PW. Roleof N-acetylcysteineandcystineinglutathionesynthesisinhumanerythrocytes. *RedoxRep* 2009;14:115-24.
145. Witschi A, Reddy S, Stofer B, Lauterburg BH. Thesystemicavailabilityoforalglutathione. *Eur J ClinPharmacol* 1992;43:667-9.
146. Hagen TM, Jones DP. Roleofglutathioneinextrahepaticdetoxification. In: Sakamoto Y, Higashi T, Taniguchi N, Meister A, editors. *GlutathioneCentennial: MolecularandClinicalImplications*. NewYorkAcademicPress; 1989. p. 423-33.
147. Allen J, Bradley RD. Effectsoforalglutathionesupplementationonsystemicoxidativestressbiomarkersinhumanvolunteers. *J AlternComplementMed*. 2011;17(9):827-33.
148. Richie JP Jr., Nichenametla S, Neidig W, Calcagnotto A, Haley JS, Schell TD, *etal*. Randomizedcontrolledtrialoforalglutathionesupplementationonbodystoresofglutathione. *Eur J Nutr* 2015;54:251-63.
149. Park EY, Shimura N, Konishi T, Sauchi Y, Wada S, Aoi W, *etal*. Increaseintheprotein-

bound form of glutathione in human blood after the oral administration of glutathione. *J Agric Food Chem* 2014;62:6183-9. J

150. Demopoulos HB, Ross J. Methods of Manufacturing High Dosage Glutathione, the Tablets and Capsules Produced Thereby; 1993. Available from: <http://www.google.com/patents/WO1993019740A1?cl=en>. [Last accessed on 2015 Mar 26].

151. Jariwalla RJ, Lalezari J, Cenko D, Mansour SE, Kumar A, Gangapurkar B, *et al.* Restoration of blood total glutathione status and lymphocyte function following alpha-lipoic acid supplementation in patients with HIV infection. *J Altern Complement Med* 2008;14:139-46.

152. Glutathione Skin Lightening Pills in India. Available from: <http://www.bangalore.click.in/glutathione-skin-lightening-pills-in-india-c75-v4148389>. [Last accessed on 2015 Mar 26].

153. GRAS Notice for Glutathione; 2009. Available from: <http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-foods-gen/documents/document/ucm269318.pdf>. [Last accessed on 2015 Mar 26].

154. Arjinpethana N, Asawanonda P. Glutathione as a skin lightening agent: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Dermatolog Treat* 2012;23:97-102.

155. Handog EB, Datuin MS, Singzon IA. An open-label, single-arm trial of the safety and efficacy of a novel preparation of glutathione as a skin-lightening agent in Filipino women. *Int J Dermatol* 2016;55:153-7.

156. Suzuki H, Miki S, Oshima M, Sado T. Chronic toxicity and teratogenicity studies of glutathione sodium salt. *Clin Rep* 1972;6:2393.

157. Lenzi A, Lombardo F, Gandini L, Culasso F, Dondero F. Glutathione therapy for male infertility. *Arch Androl* 1992;29:65-8.

158. Paolisso G, Giugliano D, Pizza G, Gambardella A, Tesouro P, Varricchio M, *et al.* Glutathione infusion potentiates glucose-induced insulin secretion in aged patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 1992;15:1-7.

159. Lazo SH. Safety on the Off-label Use of Glutathione Solution for Injection (IV). Food and Drug Administration, Department of Health, Republic of the Philippines; 2011. http://www.fda.gov.ph/attachments/article/38960/Advisories_cosmetic_DOH-FDA%20Advisory%20No.%202011-004.pdf [last accessed on 2016 Feb 18].

160. Mercola D, Hofmekler O. Glutathione: This One Antioxidant Keeps All Other Antioxidants Performing at Peak Levels. Available from: <http://www.articles.mercola.com/sites/articles/archive/2010/04/10/can-you-use-food-to-increase-glutathione-instead-of-supplements.aspx>. [Last accessed on 2015 Mar 26].

161. Pressman AH, Buff S, editors. Glutathione: The Ultimate Antioxidant. 1st ed. New York: St. Martin's Paperbacks; 1998.

162. Alexis AF, Blackcloud P. Natural ingredients for darker skin types: Growing options for hyperpigmentation. *J Drugs Dermatol* 2013;12 9 Suppl: s123-7.

163. Perricone NV. Skin Hyperpigmentation Acyl Glutathione Treatments. Patent US 20110250157 A1; October 13, 2011. Available from: <http://www.google.com/patents/US20110250157>. [Last accessed on 2015 Apr 17].

164. Prussick R, Prussick L, Gutman J. Psoriasis improvement in patients using glutathione-enhancing, nondenatured whey protein isolate: A pilot study. *J Clin Aesthet Dermatol* 2013;6:23-6.

165. Shin JW, Nam KM, Choi HR, Huh SY, Kim SW, Youn SW, *et al.* Erythrocyte malondialdehyde and glutathione levels in vitiligo patients. *Ann Dermatol* 2010;22:279-83.

166. Yenin JZ, Serarslan G, Yönden Z, Ulutas KT. Investigation of oxidative stress in patients with alopecia areata and its relationship with disease severity, duration, recurrence and pattern. *Clin Exp Dermatol* 2015;40:617-21.

167. Millard TP, Fryer AA, McGregor JM. A protective effect of glutathione-S-transferase GSTP1*Val(105) against polymorphic light eruption. *J Invest Dermatol* 2008;128:1901-5.

168. Ikeno H, Tochio T, Tanaka H, Nakata S. Decrease in glutathione may be involved in pathogenesis of acne vulgaris. *J Cosmet Dermatol* 2011;10:240-4.
169. Panich U, Onkoksoong T, Limsaengurai S, Akarasereenont P, Wongkajornsilp A. UVA-induced melanogenesis and modulation of glutathione redox system in different melanoma cell lines: The protective effect of gallic acid. *J Photochem Photobiol B* 2012;108:16-22.
170. Vogel JU, Cinatl J, Dauletbaev N, Buxbaum S, Treusch G, Cinatl J Jr., *et al.* Effects of S-acetylglutathione in cell and animal models of herpes simplex virus type 1 infection. *Med Microbiol Immunol* 2005;194:55-9.
171. Fraternali A, Paoletti MF, Casabianca A, Oiry J, Clayette P, Vogel JU, *et al.* Antiviral and immunomodulatory properties of new pro-glutathione (GSH) molecules. *Curr Med Chem* 2006;13:1749-55