

УДК 615.076.7:615.458

ВИПРОБУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ АНТИМІКРОБНИХ КОНСЕРВАНТІВ ПРЕПАРАТУ «ЕФІАЛЬ»

Борщевський Г. І., Райлко З. О., Рейда В. П.

ПАТ «Фармак», м. Київ

Стаття присвячена випробуванню ефективності антимікробних консервантів спрею «Ефіаль». Доведено, що обраний склад препарату «Ефіаль», спрей для зовнішнього застосування 15 мл у флаконі, забезпечує стабільність мікробіологічної чистоти препарату при зберіганні при температурі від 2 до 8 °С. Збільшення ефективності антимікробної дії препарату за рахунок заміни або підвищення концентрації консерванту при збереженні необхідних властивостей препарату неможливо. Належна мікробіологічна чистота препарату в процесі його використання після відкриття первинного пакування забезпечується відповідними умовами у процесі виробництва (фільтрація через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм на момент випуску), визначеними умовами (температура від 2 до 8 °С) і терміном зберігання - 7 діб.

Ключові слова: спрей, антимікробні консерванти, мікроорганізми, живильні середовища, лікарський препарат.

Лікарська форма «спрей» є однією з найбільш перспективних і сучасних способів введення лікарських препаратів до організму людини. Перевагою повітряно-крапельного способу доставки ліків (інгаляції) порівняно з ін'єкційними та ентеральними способами є можливість безпосереднього і швидкого впливу на зону запалення слизових оболонок або, при дрібнодисперсному випаровуванні – на бронхи та легені [1].

Якщо готовий лікарський засіб сам по собі не має достатньої антимікробної активності, до його складу можуть бути введені антимікробні консерванти, що особливо важливо для лікарських препаратів (ЛП), у вигляді водних розчинів. Оскільки мікробне забруднення може викликати інфікування пацієнта або псування готового лікарського засобу, антимікробні консерванти призначені для запобігання мікробної забрудненості готового ЛП в процесі зберігання та застосування, особливо у випадку використання багатодозових контейнерів [2, 3].

Обґрунтування складу та технології спрею «Ефіаль» проводилось нами з використанням фізико-хімічних та технологічних методів [4, 5]. Важливим

завданням у створенні нових лікарських препаратів є дослідження з вибору консервантів [6].

Метою даної роботи є проведення випробування ефективності антимікробних консервантів спрею «Ефіаль» та доведення антимікробної дії обраного консерванту, що дозволяє ефективно захистити лікарський засіб від мікробного забруднення протягом терміну його використання.

У результаті випробування за допомогою тест-мікроорганізмів повинно бути доведено зменшення числа життєздатних мікроорганізмів, у відповідності до вимог Державної фармакопеї України (ДФУ) [7].

Дослідження необхідно проводити в асептичних умовах, згідно вимог ДФУ.

Матеріали і методи

Об'єкт випробування – «Ефіаль», спрей для зовнішнього застосування 15 мл у флаконі з вмістом консервантів на нижній межі (пропілпарагідроксибензоат натрієва сіль – 0,18 мг/мл, метилпарагідроксибензоат натрієва сіль – 1,62 мг/мл): с. 10814 (витримування інокульованих зразків при температурі від 20 °С до 25 °С) та с. 10914 (витримування інокульованих зразків при температурі від 2 °С до 8 °С).

Кожний контейнер із випробовуваним ЛП інокульовали суспензією, що містила один з тест-мікроорганізмів, забезпечуючи мікробне навантаження від 105 КУО до 106 КУО в 1 мл препарату. Ретельно перемішували для рівномірного розподілу мікроорганізмів у зразку.

Інокульовані зразки витримували у захищеному від світла місці при температурі від 20 °С до 25 °С (с. 10814) та при температурі від 2 °С до 8 °С (с. 10914). Із кожного випробовуваного зразка відбирали проби (1мл) безпосередньо після інокуляції і через зазначені інтервали часу. Визначення кількості життєздатних мікроорганізмів проводили методом поверхневого висівання.

Вимоги та критерії:

Ефективність консервантів у готовому лікарському засобі вважають задовільною, якщо за умов проведення випробування, при зберіганні інокульованих зразків при заданій температурі, протягом зазначених проміжків часу спостерігається значне зменшення або не спостерігається збільшення числа мікроорганізмів, у залежності від вимог до готового лікарського засобу.

У таблиці 1 подані критерії оцінки антимікробної активності у вигляді логарифму зменшення числа життєздатних мікроорганізмів по відношенню до визначеного вихідного числа мікроорганізмів

Таблиця 1 - Вушні лікарські засоби, назальні лікарські засоби, лікарські засоби для зовнішнього застосування та лікарські засоби для інгаляцій

	Критерій	log зменшення			
		2 дні	7 днів	14 днів	28 днів
Бактерії	А	2	3	-	НЗ
	В	-	-	3	НЗ

Гриби	A	-	-	2	НЗ
	B	-	-	1	НЗ

Примітка. НЗ - не спостерігається збільшення числа мікроорганізмів у порівнянні з кількістю життєздатних мікроорганізмів у попередній контрольній точці.

Матеріали:

1. Поживні середовища: соєво-казеїновий агар, Сабуро-декстрозний агар.

2. Розчини: буферний розчин із натрію хлоридом та пептоном рН=7,0, який містить 50 г/л полісорбату-80, 5 г/л лецитину, 1 г/л гістидину гідрохлориду.

Проводили перевірку стерильності поживних середовищ, розчинника та перевірку ростових властивостей поживних середовищ.

Тест-мікроорганізми: *S. aureus* ATCC 6538; *P. aeruginosa* ATCC 9027; *C. albicans* ATCC 10231; *As. brasiliensis* ATCC 16404.

Приготування інокуляту проводили згідно ДФУ, п. 5.1.3.

Перевірка придатності методики визначення загального числа життєздатних мікроорганізмів:

Підготовка зразка: 10 мл препарату вміщували у флакон, доводили об'єм до 100 мл буферним розчином із натрію хлоридом та пептоном рН=7,0, який містить 50 г/л полісорбату-80, 5 г/л лецитину, 1 г/л гістидину гідрохлориду та струшували. В пробірці з розведенням препарату, підготовленими для кожного тест-мікроорганізму окремо, вносили суспензію тест-штаму одного з видів мікроорганізмів, яка містить близько 1000 колонієутворюючих одиниць (КУО).

Готували контроль тест-мікроорганізмів. Інокульовані зразки ретельно перемішували. По 1 мл із

розведень препарату та контролів окремо для кожного тест-штаму, що містить не більше 100 КУО висівали поверхневим методом на густі поживні середовища: соєво-казеїновий агар для виявлення бактерій та Сабуро-декстрозний агар для виявлення грибів.

Розчинник: буферний розчин із натрію хлоридом та пептоном рН=7,0, який містить 50 г/л полісорбату-80, 5 г/л лецитину, 1 г/л гістидину гідрохлориду.

Результати та обговорення

Результати перевірки придатності методики приведені в таблиці 2.

Результати одержані при підрахунку кожного з тест-мікроорганізмів у присутності та за відсутності випробовуваного зразка відрізняються не більше як у 1,12 раз, що відповідає критерію прийнятності.

Таким чином, метод поверхневого висівання на чашки по 1 мл з розведення препарату 1:10 (відповідно та подальших десятикратних розведень 1:100, 1:1000 тощо) з використанням розчинника буферного розчину із натрію хлоридом та пептоном рН=7,0, який містить 50 г/л полісорбату-80, 5 г/л лецитину, 1г/л гістидину гідрохлориду, придатний для визначення кількості мікроорганізмів у 1 мл препарату та може використовуватися при проведенні випробування ефективності антимікробних консервантів.

Таблиця 2 - Результати перевірки придатності методики для препарату «Ефіаль» з вмістом консервантів на нижній межі с. 10814

Розведення препарату	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>As.brasiliensis</i> ATCC 16404
Зразок препарату 1:10, КУО/мл	69	81	73	51
Контроль, КУО/мл	74	91	79	52
Відношення числа КУО в присутності і у відсутності випробовуваного зразка	1,07	1,12	1,08	1,01

Далі нами було проведено випробування ефективності антимікробних консервантів в препараті «Ефіаль» з вмістом консервантів на нижній межі (пропілпарагідроксibenзоат натрієва сіль – 0,18 мг/г, метилпарагідроксibenзоат натрієва сіль – 1,62 мг/г): с. 10814 (витримування інокульованих зразків при

температурі від 20 °С до 25 °С) та с. 10914 (витримування інокульованих зразків при температурі від 2 °С до 8 °С).

Отримані експериментальні дані с. 10814 спрею «Ефіаль» наведено у таблицях 3, 4.

Таблиця 3 - Результати визначення загального числа життєздатних мікроорганізмів в інокуляті та у випробовуваному зразку с.10814 через зазначені інтервали часу згідно вимог критерію А та В

Назва тест-штаму мікроорганізму	Початкова кількість КУО/мл	Безпосередня кількість після інокуляції КУО/мл	Час контакту (експозиція)			
			2 доби КУО/мл	7 діб КУО/мл	14 діб КУО/мл	28 діб КУО/мл
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	$2,8 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	ріст	ріст	ріст	ріст

<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	7,7×10 ⁵	5,9×10 ⁵	ріст	ріст	ріст	ріст
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,02×10 ⁶	6,9×10 ⁵	-	-	1,46×10 ⁶	1,5×10 ⁶
<i>As.brasiliensis</i> ATCC 16404	1,5×10 ⁵	3,5×10 ⁵	-	-	5,0×10 ⁴	5,3×10 ⁴

Таблиця 4 - Результати випробування ефективності консервантів у вигляді логарифму зменшення числа життєздатних мікроорганізмів згідно вимог ДФУ у препараті с. 10814

Назва тест-штаму мікроорганізму	Вихідне число мікроорганізмів	log числа КУО мікроорганізмів	Годин (діб)							
			2 доби		7 діб		14 діб		28 діб	
			log	зміна log	log	зміна log	log	зміна log	log	зміна log
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	2,8×10 ⁵	5,44	ріст	↑	ріст	↑	ріст	↑	ріст	↑
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	7,7×10 ⁵	5,88	ріст	↑	ріст	↑	ріст	↑	ріст	↑
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,02×10 ⁶	6,00	-	-	-	-	6,16	↑ 0,16	6,17	↑
<i>As.brasiliensis</i> ATCC 16404	1,5×10 ⁵	5,17	-	-	-	-	4,69	↓ 0,48	4,72	↓ 0,45

Примітка: ↑ - збільшення на; ↓ - зменшення на
Експериментальні дані с. 10914 спрею «Ефіаль» наведено у таблицях 5, 6.

За результатами експериментальних досліджень на 2, 7, 14 та 28 добу препарату «Ефіаль» (вміст консервантів на нижній межі): с.10814 (умови зберігання - 20-25 °С) було встановлено, що ефективність антимікробного консерванту не відповідає критерію прийнятності ефективності антимікробних консервантів А та В для всіх тест-штамів мікроорганізмів.

За результатами експериментальних досліджень на 2, 7 та 14 добу препарату «Ефіаль» (вміст консервантів на нижній межі): с.10914 (умови зберігання - 2-8 °С) було встановлено, що ефективність антимікробного консерванту також не відповідає критерію прийнятності ефективності антимікробних консервантів А та В згідно таблиці 1 для всіх тест-штамів мікроорганізмів.

Таблиця 5 - Результати визначення загального числа життєздатних мікроорганізмів в інокуляті та в випробовуваному зразку с. 10914 через визначені інтервали часу згідно вимог критерію А та В

Назва тест-штаму мікроорганізму	Початкова кількість КУО/мл	Безпосередня кількість після інокуляції КУО/мл	Час контакту (експозиція)			
			2 доби КУО/мл	7 діб КУО/мл	14 діб КУО/мл	28 діб КУО/мл
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	4,00×10 ⁵	7,10×10 ⁵	6,90×10 ⁵	7,00×10 ⁴	2,00×10 ⁴	6,00×10 ³
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	6,90×10 ⁵	4,50×10 ⁵	1,04×10 ⁶	5,70×10 ⁵	3,00×10 ⁴	6,00×10 ³
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,26×10 ⁶	8,10×10 ⁵	-	-	1,0×10 ⁶	1,5×10 ⁶
<i>As.brasiliensis</i> ATCC 16404	1,30×10 ⁵	1,00×10 ⁵	-	-	1,5×10 ⁴	2,0×10 ⁴

Результати випробування показали, що при зберіганні інокульованих зразків препарату при температурі 2-8 °С, не відбувається суттєвої зміни числа життєздатних клітин тест-мікроорганізмів в порівнянні із вихідним числом:

- зазначається тенденція до невеликого зменшення числа життєздатних тест-мікроорганізмів *P. aeruginosa* та *S. aureus* на 7 добу та 14 добу, що не відповідає критерію прийнятності ефективності антимікробного консерванту А та В;

- зазначається тенденція до невеликого зменшення числа життєздатних тест-мікроорганізмів *C. albicans*, та невеликого збільшення *As. brasiliensis* на 14 добу, що не відповідає критерію прийнятності ефективності антимікробних консервантів А та В.

Поряд з тим, при зберіганні зразків препарату при температурі від 2 до 8 °С, в них не спостерігається збільшення числа мікроорганізмів протягом 28 діб.

Таблиця 6 - Результати випробування ефективності консервантів у вигляді логарифму зменшення числа життєздатних мікроорганізмів згідно вимог ДФУ є препараті с. 10914

Назва тест-мікро- організму	Вихідне число мікро- організмів	log числа КУО	Годин (діб)							
			2 доби		7 діб		14 діб		28 діб	
			log	Зміна log	log	Зміна log	log	Зміна log	log	Зміна log
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	4×10^5	5,60	5,83	↑0,23	4,84	↓0,76	4,30	↓1,3	3,77	НЗ
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	$6,9 \times 10^5$	5,83	6,01	↑0,18	5,75	↓0,08	4,47	↓1,36	3,77	НЗ
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	$1,26 \times 10^6$	6,10	–	–	–	–	6,00	↓0,1	5,67	НЗ
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	$1,3 \times 10^5$	5,11	–	–	–	–	5,17	↑0,06	4,30	НЗ

Примітка: НВ - мікроорганізми не виявляються; НЗ - не спостерігається збільшення числа мікроорганізмів у порівнянні з кількістю життєздатних мікроорганізмів у попередній контрольній точці; «-» - випробування не проводилось; ↑ - збільшення на; ↓ - зменшення на

Збільшення ефективності антимікробної дії препарату за рахунок заміни або підвищення концентрації обраних консервантів при збереженні необхідних властивостей препарату неможливо. Тому, наші дослідження були спрямовані на розробку відповідних технологічних прийомів [8].

Враховуючи отримані дані, у технологічний процес спрею «Ефіаль» було включено стадію стерильної фільтрації. Для цього нами було вивчено оптимальні параметри фільтрації, обрано відповідні фільтри та доведено стабільність препарату за обраних умов [9].

Висновки:

- Проведено випробування ефективності антимікробних консервантів (пропілпарагідроксibenзоат натрієва сіль – 0,18 мг/мл, метилпарагідроксibenзоат натрієва сіль – 1,62 мг/мл) у спреї «Ефіаль». Доведено, що обрані консерванти забезпечують мікробіологічну чистоту препарату при зберіганні при температурі від 2 до 8 °С.
- Для забезпечення належної мікробіологічної чистоти препарату у процесі його використання після відкриття первинного пакування прийняті наступні заходи:
 - введена фільтрація через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм, яка дозволяє отримати необхідний ступінь мікробіологічної чистоти препарату;
 - зазначено режим зберігання при температурі від 2 до 8 °С – при якому не відбувається розмноження мікроорганізмів у препараті;
 - обмежено термін використання препарату після відкриття - до 7 діб.

References

- Borshchevskiy G. I. Standardization of liposomal drugs / G. I. Borshchevskiy, E. K. Tovmasyan, Y. M. Krasnopolskiy, A. I. Grizodub // Farmakom. – 2013. – № 2. – P. 5- 11.
- Borshchevskiy G. I. Physical and chemical substantiation of the method for producing a multi-component liposomal drug / G. I. Borshchevskiy, T. G. Yarnykh // News of pharmacy. – 2013. – № 3(75). – P. 5-7.
- Patent № 101235, Ukraine A 61 C 9/127, A 61 K 31/56, A 61 P 17/06. A process of obtaining pharmaceutical compositions for wound healing with regenerating action based on peptides of dermal layer of the pigs skin / F. I. Zhebrovska, G. V. Kostyuk, G. I. Borshchevskiy, M. I. Borshchevskay, V. V. Bihunyak, № a 201107335; stated 10.06.2011; publ. 03.11.2013, Bull. No. 5.
- Guide 42-3.6: 2004. The quality manual. Drugs. Auxiliaries. The Ministry of Public Health of Ukraine. – Kiev. – 2004. – 12 p.
- USP Pharmacists' Pharmacopeia. – II ed. – Rockville: The United State Pharmacopeial, 2008. – 1519 p.
- European Pharmacopoeia. – 7.5 th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2011. – 2416 p.
- State Pharmacopoeia of Ukraine / State Enterprise "Ukrainian Research Center Pharmacopoeial quality of drugs." - 1st ed., 4 reported. - Kh: State Enterprise "Ukrainian Research Center pharmacopoeia quality drugs", 2011. - 540 p.
- Borshchevskiy G. I. Determination of the optimal process parameters ultrafiltration protein solutions / GI Borshchevskiy, IA Omelchenko, TG Yarnih // Pharmacy Kazakhstan. - 2013. - № 6.- P.51-54.
- Borshchevskiy G.I. Development of quality indicators of liposomal preparations "EFIAL" / G. I. Borshchevskiy, T.G. Yarnykh, V.A. Konovalenko, V.N. Chabaniy // Research J. Pharm. and Tech. – 2014. № 8 (7). – P.864-87

UDC 615.076.7:615.458

THE EFFECTIVENESS OF ANTIMICROBIAL PRESERVATIVES TESTING OF THE MEDICINE "EFIAL"

Borshchevskiy G. I., Railko Z. O., Reida V. P.

Dosage form - spray is one of the most advanced and modern methods of medicines administration in the human body. The advantage of airborne mode of medicines delivery (inhalation) than injection and enterable methods is the ability to direct and rapid impact on the area of inflammation of the mucous membranes or when fine evaporation - on the bronchi and lungs. When finished medicinal product itself has not a sufficient antimicrobial activity, in its composition can be administered antimicrobial preservatives, which is especially important for medicines as aqueous solutions. Because microbial contamination can cause infection of the patient or damage to the finished product, antimicrobial preservatives are designed to prevent microbial contamination of the finished medicinal product during storage and use, especially in the case of multi-container packaging. Rationale of composition and technology of spray "Efial" was conducted by us using physical, chemical and technological methods. An important task in creating new medicines is the study of preservatives choice.

The aim of this work is to test the effectiveness of antimicrobial preservatives of spray "Efial".

Material & methods The object of the test – "Efial" containing preservatives on the lower: series 10814 (holding inoculated samples at a temperature of 20-25 ° C) and series 10914 (holding inoculated samples at 2-8 ° C). Materials: 1. Nutrient medium: soy-casein agar, sabouro-dextrose agar. 2. Solutions: buffer solution of sodium chloride and peptone pH =7.0, containing 50 g/l of polysorbate-80, 5 g/l of lecithin, 1 g/l of histidine hydrochloride. Test-microorganisms: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; *Candida albicans* ATCC 10231; *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Preparation of inoculums was carried by State Pharmacopoeia of Ukraine, p. 5.1.3.

Results & discussion The checks of methods for determining total viable microorganisms suitability have been carried out. It was proved that the method of surface sowing on cups of 1 ml of medicine's dilution 1:10 is suitable for determining the number of microorganisms in 1 ml and can be used during the test effectiveness of antimicrobial preservatives. Further tests of efficacy of antimicrobial preservatives in the product "Efial": s. 10 814 (holding inoculated samples at a temperature of 20-25 °C) and s. 10914 (holding inoculated samples at 2-8 °C) were conducted. The test results showed that in storage of the inoculated medicine's samples at 2-8 °C, there is no significant change in the number of viable cells of the test microorganisms as compared to the original number:

- it is marked a tendency to a slight decrease in the number of viable test microorganism *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* on day 7 and 14 that do not meet the admissibility of the effectiveness of antimicrobial preservative according criteria A and B;
- it is marked a tendency to a slight decrease in the number of viable test microorganisms *Candida albicans* and

small increase in the number of viable test microorganisms *Aspergillus brasiliensis* on day 14 that do not meet the admissibility of the effectiveness of antimicrobial preservative according criteria A and B. At the same time, medicine's samples during storage at 2-8 °C, they are not an increase in the number of microorganisms within 28 days.

Conclusions

1. Testing the effectiveness of antimicrobial preservatives (sodium salt propylparahydroxybenzoate - 0.18 mg / ml sodium meathylparahydroxybenzoate - 1.62 mg / ml) in sprays "Efial." It is proved that the chosen preservatives ensure microbiological purity of the drug during storage at 2 to 8 ° C.

2. To ensure proper microbiological purity of the drug during its use after opening the primary packaging, the following measures:

- introduced filtration through a filter with a pore size of 0.22 microns, which provides a necessary degree of microbiological purity of the drug;
- set the storage mode at 2 to 8 ° C - which is not the reproduction of microorganisms in the sample;
- limited term use of the drug after opening - up to 7 days.