

Обґрунтування вибору антимікробних консервантів при розробці складу та технології м'якої лікарської форми для корекції порушень репродуктивної системи чоловіків

О.Л.Івахненко, О.П.Стрілець, Л.С.Стрельников, С.П.Кустова

Національний фармацевтичний університет, кафедра біотехнології
Харків, Україна

Відомо, що в процесі зберігання лікарські препарати можуть контамінуватися сторонньою мікрофлорою, що може призвести до зміни фізико-хімічних та фармакологічних властивостей. Тому в даній роботі було проведено дослідження по вибору ефективного антимікробного консерванта та шляху уведення його до мазевої основи препарату, що розробляється для корекції порушень репродуктивної системи чоловіків. Результати проведеного експерименту показали доцільність використання в якості консервуючого елемента суміші метилового та пропілового ефірів гідроксibenзойної кислоти у співвідношенні ніпагін:ніпазол 3:1 у кількості 0,2% при уведенні їх у воду, яка є дисперсійним середовищем для емульсійної основи першого роду.

Ключові слова: м'яка лікарська форма, антимікробний консервант, ніпагін, ніпазол, бензойна кислота.

ВСТУП

На сьогоднішній день у терапевтичній практиці існує суттєвий дефіцит лікарських препаратів з дією, спрямованою на коригування сперматогенної функції чоловіків, тому набуває актуальності питання розробки нових ліків, здатних стимулювати сперматогенез при лікуванні чоловічого безпліддя [4]. На кафедрі біотехнології НФаУ сумісно з Інститутом проблем ендокринної патології ім. В.Я.Данилевського АМН України розроблено склад експериментальних зразків м'якої лікарської форми

(МЛФ), які містять катіазин — речовину, здатну стимулювати сперматогенез. Попередніми дослідженнями було встановлено, що в процесі зберігання дані зразки контамінуються сторонньою мікрофлорою (бактеріями та особливо грибами), що, в свою чергу, може призвести до змін не тільки у фізико-хімічних властивостях препарату, але й до втрати фармакологічної активності препарату, накопичення токсичних для організму людини речовин або навіть його ураження патогенними мікроорганізмами (тяжкими інфекційними хворобами), які розмножуються в мазях, що містять достатньо велику кількість вологи, як у сприятливому поживному середовищі, використовуючи складові компоненти в якості поживних речовин. Тому для попередження виникнення означених вище складнощів, згідно з рекомендаціями ЄФ та ДФУ, було вирішено увести до складу обраних зразків антимікробні консерванти [2, 3].

Метою дослідження було обґрунтування вибору виду та концентрації найбільш ефективного антимікробного консерванту (або комбінації консервантів) та визначення шляху додавання його в препарат при виробництві.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для проведення досліджень з визначення ефективності антимікробної дії консервантів в МЛФ було напрацьовано експериментальні зразки, які містять діючу речовину, емульсійну мазеву основу першого роду (емульгатор №1, вазелінове масло, гліцерин, диметилсульфоксид (ДМСО) та воду) та консервант або комбінацію консервантів у різноманітних концентраціях, наведених у табл. 1.

ТАБЛИЦЯ 1
Склад експериментальних зразків
для вибору виду консерванта

Номер зразка	Вид консервантів	Вміст, %
1	-	-
2	ніпагін:ніпазол (3:1)	0,2
3	ніпагін:ніпазол (3:1)	0,1
4	ніпагін:ніпазол (1:1)	0,2
5	ніпагін:ніпазол (4:1)	0,2
6	кемабен	1,0
7	триклозан	0,3
8	бронопол	0,2
9	бензойна кислота	0,1
10	бензойна кислота	0,5
11	бензойна кислота	1,0

Крім того, базуючись на теоретичному аналізі наукової літератури, було вирішено дослідити ефективність деяких консервантів у залежності від шляху введення в емульсійну основу, та, згідно з вище означеною метою, було напрацьовано зразки мазі емульсійного типу з комбінаціями метилового та пропілового ефірів гідроксибензойної кислоти в різних співвідношеннях та введених до мазевої основи на різних стадіях технологічного процесу: у воду, у розплавлений емульгатор та у вазелінове масло.

При дослідженнях використовували методику оцінки ефективності антимікробних консервантів, наведену в ДФУ. Згідно з даною методикою, у зразки мазі з різними консервантами, які знаходились у первинному упакуванні, вносили певну кількість тест-мікроорганізмів та зберігали їх при певній температурі в темному місці. Після чого препарат висівали на тверде поживне середовище для визначення життєздатних клітин. Дослідження проводили в динаміці: у свіжевикотворених та через 2 доби, 7, 14 та 28 діб.

У роботі використовували поживні середовища виробництва, HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Індія), а саме: середовище В (поживний м'ясо-пептонний агар) та середовище С (агар Сабуро з додаванням антибіотиків). Кожна серія перевірялась на ростові властивості.

В якості тест-мікроорганізмів використовували *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404. Для приготування культур тест-мікроорганізмів робили висіви бактерій на поверхню щільного поживного середовища В, у випадку висіву грибів використовували поживне середовище С без додавання антибіотиків (у відповідності до вимог ДФУ). Культури бактерій

Staphylococcus aureus и *Pseudomonas aeruginosa* інкубували при температурі 30-35°C протягом 18 год., культуру *Candida albicans* інкубували при температурі 20-25°C протягом 48 год., культуру *Aspergillus niger* при температурі 20-25°C – 7 діб. Для приготування суспензії бактеріальних культур та культури *Candida albicans* мікробну масу змивали з поверхні поживного середовища стерильним суспендуючим розчином, що містив 9 г/л натрію хлориду Р та 1 г/л пептону, переносили в стерильну пробірку та доводили вміст мікроорганізмів до 10⁸ в 1 мл. При приготуванні суспензії культури *Aspergillus niger* використовували стерильний суспендуючий розчин, що містить 9 г/л натрію хлориду Р и 0,5 г/л полісорбату-80 Р, та доводили кількість спор до 10⁸ в 1 мл. Із кожної суспензії одразу ж після приготування її відбирали пробу та визначали кількість колонієутворюючих одиниць (КОУ) в 1 мл кожної суспензії шляхом прямого висіву на чашки Петрі на щільні поживні середовища, які використовували для первинного вирощування тест-культур. У кожен досліджуваний зразок мазі вносили суспензію з вмістом тест-мікроорганізмів з навантаженням 10⁸ КОУ в мл. У самому зразку мікробне навантаження мало становити від 10⁵ до 10⁶ КОУ. Ретельно перемішували для рівномірного розподілу мікроорганізмів у зразку. Потім зразки витримували при температурі 20-25°C у захищеному від світла місці. Із кожного зразка відбирали проби – 1 мл відразу ж після обмінення та через певні інтервали часу (2 доби, 7, 14 та 28 діб), кількість життєздатних мікроорганізмів визначали шляхом прямого висіву на чашки Петрі з щільним поживним середовищем. Результати оцінювали за lg зменшення числа життєздатних мікроорганізмів [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Першим етапом досліджень було обґрунтування вибору виду та концентрації антимікробних консервантів для МЛФ з катіазином. Результати цих досліджень наведені в табл. 2 та 3. Отримані дані свідчать про те, що, по-перше, у контрольному зразку без додавання будь-якого консерванта суттєво збільшується вміст мікрофлори, що в черговий раз доводить необхідність використання додаткових речовин для пригнічення росту мікроорганізмів у процесі зберігання лікарського препарату, що розробляється. По-друге, високу ефективність проти зараження грамнегативною мікрофлорою (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) проявили зразки №7,

ТАБЛИЦЯ 2

Логарифм зменшення життєздатних клітин бактерій в експериментальних зразках при виборі виду консерванта

Назва тест-мікроорганізму	Номер зразка	Початкове мікробне навантаження	Lg зменшення			
			2 доби	7 діб	14 діб	28 діб
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	1	5,8	(-2,11±0,01)	(-4,10±0,07)	(-6,30±0,08)	(-8,10±0,05)
	2	5,8	(3,80±0,02)	(4,10±0,06)	НВ	НВ
	3	5,8	(2,03±0,05)	(3,66±0,02)	(3,97±0,06)	НВ
	4	5,8	(1,66±0,05)	(3,12±0,03)	(3,86±0,04)	НВ
	5	5,9	(1,72±0,03)	(2,96±0,04)	(3,53±0,06)	(4,18±0,04)
	6	5,9	(2,72±0,01)	(3,88±0,02)	(4,16±0,05)	НВ
	7	5,8	(2,3±0,03)	(3,18±0,02)	(3,69±0,02)	НВ
	8	5,8	(2,90±0,04)	(3,52±0,05)	НВ	НВ
	9	5,8	(1,69±0,05)	(2,10±0,02)	(2,96±0,06)	(3,15±0,05)
	10	5,8	(1,60±0,03)	(2,50±0,03)	(3,60±0,02)	(3,54±0,02)
	11	5,8	(2,30±0,03)	(3,10±0,04)	(3,40±0,03)	(3,10±0,03)
Staphylococcus aureus ATCC 6538	1	5,9	(-1,80±0,04)	(-3,20±0,03)	(-4,3±0,03)	(-6,90±0,03)
	2	5,9	(3,02±0,04)	(3,12±0,02)	НВ	НВ
	3	5,9	(2,10±0,04)	(3,18±0,04)	(4,80±0,01)	НВ
	4	5,9	(2,46±0,03)	(3,42±0,03)	(3,38±0,01)	НВ
	5	5,8	(1,99±0,03)	(3,10±0,03)	(3,31±0,03)	НВ
	6	5,8	(2,22±0,05)	(2,69±0,02)	(3,18±0,02)	НВ
	7	5,7	(2,44±0,01)	(3,04±0,03)	(3,26±0,05)	НВ
	8	5,8	(2,30±0,02)	(2,97±0,03)	(3,48±0,02)	НВ
	9	5,8	(1,60±0,03)	(2,12±0,03)	(2,41±0,03)	(2,39±0,02)
	10	5,8	(1,72±0,02)	(2,41±0,02)	(2,73±0,02)	(2,86±0,04)
	11	5,7	(2,10±0,03)	(2,93±0,04)	(3,10±0,03)	(3,10±0,03)

Примітки: «НВ» – не виявлено.

№8, №9, які містили у своєму складі наступні консерванти: кемабен – 1%, триклозан – 0,3%, бронопол – 0,2% відповідно; причому зразки із кемабеном та триклозаном були ефективні й проти грампозитивної мікрофлори (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538). Однак усі вони виявилися нездатними до пригнічення росту міцеліальних грибів (*Aspergillus niger* ATCC 16404), причому бронопол був неефективним й по відношенню до *Candida albicans* ATCC 10231.

Експериментальні зразки мазі, які містили бензойну кислоту в кількості 0,1%, 0,5%, 1,0% відповідно, проявили свою активність по відношенню до грамнегативних (у деяких випадках до грампозитивних – зразок №11) бактерій та до дріжджеподібних грибів, але в зразках, інокульованих *Aspergillus niger* ATCC 16404, через певний проміжок часу спостерігалось збільшення життєздатних мікроорганізмів, що є недопустимим згідно з вимогами ДФУ до лікарських засобів для місцевого застосування. Низька ефективність бензойної кислоти в якості антимікробного консерванта лікарського препарату, що розробляється, може бути пов'язана з кис-

лотністю середовища, оскільки відомо, що ця речовина є найефективнішою проти сторонньої мікрофлори в кислому середовищі, а попередньо проведені дослідження показали, що рН мазі, що розробляється, є нейтральним.

Крім того, отримані результати проведених досліджень показали високу ефективність комбінації антимікробних консервантів ніпагін – ніпазол у різних концентраціях та співвідношеннях. Згідно з даними табл. 2 та 3, можна зробити висновок, що усі зразки вищезначеної комбінації речовин відповідають вимогам ДФУ до лікарських засобів для місцевого застосування, але тільки зразок №2, який містить ніпагін:ніпазол (3:1) у концентрації 0,2% за вмістом життєздатних клітин мікроорганізмів задовольняє рекомендованій ефективності категорії А.

Наступним етапом наших досліджень було вивчення впливу методу уведення консервантів у МЛФ на їх ефективність та вибір найдодільнішого шляху додавання досліджуваних речовин у мазеву основу. Результати проведених досліджень свідчать про те, що при введенні суміші ніпагін:ніпазол, незалежно від спів-

ТАБЛИЦЯ 3

Логарифм зменшення життєздатних клітин грибів в експериментальних зразках при виборі виду консерванта

Назва тест-мікроорганізму	Номер зразка	Початкове мікробне навантаження	Lg зменшення			
			2 доби	7 діб	14 діб	28 діб
Candida albicans ATCC 10231	1	5,9	(-0,50±0,01)	(-1,10±0,02)	(-3,80±0,03)	(-4,6±0,01)
	2	5,8	(2,41±0,01)	(3,44±0,06)	(3,97±0,07)	НВ
	3	5,7	(2,11±0,05)	(3,09±0,02)	(3,67±0,01)	(3,99±0,02)
	4	5,9	(2,02±0,01)	(2,98±0,02)	(3,14±0,04)	(3,46±0,01)
	5	5,7	(2,26±0,04)	(3,08±0,03)	(3,46±0,03)	(3,71±0,04)
	6	5,6	(1,24±0,06)	(1,38±0,01)	(1,41±0,03)	(1,92±0,03)
	7	5,9	(1,02±0,02)	(1,24±0,02)	НЗ	НЗ
	8	5,8	(0,20±0,02)	(0,54±0,04)	(0,46±0,02)	(0,52±0,02)
	9	5,8	(0,98±0,01)	(1,01±0,04)	(1,33±0,02)	(1,60±0,04)
	10	5,7	(1,43±0,01)	(1,72±0,03)	(2,05±0,05)	(2,41±0,03)
	11	5,8	(1,89±0,02)	(2,16±0,02)	(2,49±0,04)	(3,12±0,05)
Aspergillus niger ATCC 16404	1	5,7	-	(-0,80±0,05)	(-1,60±0,02)	(-2,10±0,04)
	2	5,7	-	(1,90±0,03)	(3,40±0,03)	НЗ
	3	5,8	(0,04±0,01)	(1,22±0,02)	(3,06±0,04)	НЗ
	4	5,7	-	(1,65±0,04)	(3,04±0,03)	НЗ
	5	5,7	(0,02±0,01)	(1,62±0,02)	(3,01±0,03)	(3,20±0,02)
	6	5,6	-	-	-	(1,40±0,04)
	7	5,7	-	-	-	(0,24±0,02)
	8	5,6	-	-	-	(0,61±0,01)
	9	5,7	-	(1,00±0,02)	(1,20±0,03)	(1,00±0,02)
	10	5,7	-	(1,50±0,01)	(1,80±0,02)	(1,60±0,02)
	11	5,9	-	(1,60±0,01)	(1,80±0,02)	(1,60±0,03)

Примітки: «-» — не зменшується, «НВ» — не виявлено, «НЗ» — не збільшується.

відношення та концентрації, у вазелінове масло чи в попередньо розплавлений емульгатор №1 консерванти виявляють нижчу антимікробну активність як проти бактерій, так і проти грибів, ніж при додавання такої ж суміші у воду, яка є дисперсійним середовищем у мазевій основі емульсійного типу першого роду. Це буде використано при подальшій розробці технології виробництва м'якої лікарської форми для коригування сперматогенної функції чоловіків.

ВИСНОВКИ

1. Проведені мікробіологічні дослідження показали, що найефективнішим консервантом для м'якої лікарської форми, що містить катіазин — речовину, яка стимулює сперматогенез, та мазеву основу емульсійного типу першого роду, є суміш метилового та пропілового ефірів гідроксибензойної кислоти у співвідношенні ніпагін:ніпазол 3:1 в кількості 0,2%.

2. Порівняльна характеристика антимікробної активності зразків, що містять однаковий склад консервантів, уведених різними технологічними шляхами (у воду, в емульгатор, у

вазелінове масло), доводить, що доцільним є введення вищезазначених речовин у препарат шляхом попереднього розчинення в дисперсійному середовищі, тобто у воді, що, в свою чергу, буде враховано при розробці технології виробництва даного лікарського препарату.

ЛІТЕРАТУРА

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доп. 4. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. — 540 с.
2. Допоміжні речовини та їх застосування в технології лікарських форм. — Львів: Львів. держ. мед. універ., 1996. — 88 с.
3. Фармацевтичні та медико-біологічні аспекти ліків / І.М.Перцев, О.Х.Пімінов, М.М.Слободянюк, О.П.Гудзенко; за ред. І.М.Перцева. — 2-е вид., перероб. та доп. — Вінниця: Нова книга, 2007. — 728 с.
4. Черних В.П. Значення фармації для поліпшення демографічної ситуації в Україні / В.П.Черних, С.М.Дрогозов, Г.В.Зайченко / Актуальні питання репродуктивної фармакології: матеріали I Міжнар. наук.-практ. конф., 21 листоп. 2008 р.: тези докл. — Х., 2008. — С. 3-6.

Е.Л.Ивахненко, О.П.Стрилец, Л.С.Стрельников, С.П.Кустова. Обоснование выбора антимикробных консервантов при разработке состава и технологии мягкой лекарственной формы для коррекции нарушений репродуктивной системы мужчин. Харьков, Украина.

Ключевые слова: мягкая лекарственная форма, антимикробный консервант, нипагин, нипазол, бензойная кислота.

Известно, что в процессе хранения лекарственных препараты могут подвергаться контаминации посторонней микрофлорой, что может привести к изменениям физико-химических и фармакологических свойств. Поэтому в данной работе было проведено исследование по выбору эффективного антимикробного консерванта и пути его введения в мазевую основу препарата, разрабатываемого для коррекции нарушений репродуктивной системы мужчин. Результаты проведенного эксперимента показали целесообразность использования в качестве консервирующего элемента смесь метилового и пропилового эфиров гидроксibenзойной кислоты в соотношении нипагин:нипазол 3:1 в количестве 0,2% при добавлении их в воду, являющуюся дисперсионной средой для эмульсионной основы первого рода.

H.L.Ivahnenko, O.P.Strilets, L.S.Strelnikov, S.P.Kustova. Justification for the selection of the antimicrobial preservatives in the development of the technology of the soft dosage form for correction of disorders of the male reproductive system. Kharkiv, Ukraine.

Key words: soft dosage form, an antimicrobial preservative, nipagin, nipazol, benzoic acid.

Medicines are known to be subjected of the contamination of the extraneous microflora, which may lead to changes in the physicochemical and the pharmacological properties. Therefore, this study was conducted at the selection of the effective antimicrobial preservative and its route of administration of in the ointment base of the drug, which is developed for the correction of the male reproductive system. The results of this experiment showed that composition of the methyl and the propyl ethers of the hydroxybenzoic acid in the ratio nipagin:nipazol 3:1 in an amount of 0,2% when they are added to water, which is a dispersive medium for first kind of emulsion bases, is the most effective preservative mixture for the soft dosage form, which is developed.

Надійшла до редакції 26.01.2012 р.