

БІОФАРМАЦЕВТИЧНІ ВИПРОБУВАННЯ МАЗІ З ОФЛОКСАЦИНОМ І НІМЕСУЛІДОМ ЗА ПОКАЗНИКОМ „МІКРОБІОЛОГІЧНА ЧИСТОТА”

Українська військово-медична академія

Вступ. Біофармацевтичні дослідження в аспекті встановлення показника “мікробіологічна чистота” є необхідними з метою регулювання факторів, які завчасно впливають на якість ЛЗ. Мета. Провести біологічні дослідження розробленої мазі з офлоксацином і німесулідом за показником “мікробіологічна чистота” відповідно вимог ДФУ.

Матеріали та методи. Перевірку придатності методики визначення загального числа ТАМС і ТУМС проводили відповідно вимогам ДФУ. Кількісне визначення КУО тест-мікроорганізмів у суспензіях проводили методом висівання в чашки Петрі з СКА для ТАМС та із СДА для ТУМС. Для верифікації умов дослідження проводили негативне контрольне дослідження, використовуючи для висівання в поживні середовища стерильний розчинник. Після інкубації посівів підраховували число колоній на кожній чашці Петрі, визначали середнє арифметичне значення числа колоній.

Результати. Методом *in vitro* проведені біологічні випробування досліджуваної мазі антибактеріальної та протизапальної дії з офлоксацином і німесулідом та встановлено її відповідність нормам ДФУ за показником “мікробіологічна чистота”. На підставі експериментальних досліджень встановлено, що оптимальним є метод мембранного фільтрування для визначення загального числа життєздатних аеробних бактерій, а для грибів - метод прямого висівання.

Висновок. У ході проведеного експерименту встановлено, що загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів менше 100, а дріжджових і плісневих грибів менше 10 в 1 г кожного зразка; *St. aureus* і *Ps. aeruginosa* і деяких інших грамнегативних бактерій не визначено, що відповідає вимогам ДФУ.

Ключові слова: мікробіологічна чистота, інактиватор, поживне середовище, мікроорганізм, тест-штам, мембранний фільтр, лікарський засіб, мазь, німесулід, офлоксацин.

ВСТУП

Процес виробництва лікарського засобу (ЛЗ) має виключати можливі причини мікробної контамінації. Тому, необхідним є регулювання тих факторів, що заздалегідь впливають на якість ЛЗ. Мікробіологічна чистота, що регламентується ДФУ, є важливим показником гарантії якості готової продукції

Виходячи з актуальності вищенаведеного, нами проведені біологічні випробування опрацьованої мазі з офлоксацином і німесулідом за показником „мікробіологічна чистота” [3, 4].

З метою випробування мікробіологічної чистоти опрацьованого м'якого лікарського засобу (МЛЗ) визначали кількість живих анаеробів (бактерії і гриби), а також присутність патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів: *St. aureus*, *Ps. aeruginosa*, види роду *Candida*, *Aspergillus*.

Дослідження показника «мікробіологічна чистота» проводили на кафедрі імунології і мікробіології ХМАПО під керівництвом проф. Бірюкової С. В. згідно вимог ДФУ [1, 2].

ТЕХНОЛОГІЯ ЛІКІВ І ОРГАНІЗАЦІЯ ФАРМСПРАВИ

Мета. Провести біологічні дослідження розробленої мазі з офлоксацином і німесулідом за показником "мікробіологічна чистота" відповідно вимог ДФУ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом дослідження є мазь антибактеріальної та протизапальної дії з офлоксацином та німесулідом.

Визначення показника «мікробіологічна чистота» проводили як безпосередньо після виготовлення лікарської форми (ЛФ) так і в процесі її зберігання: в природних умовах (на момент дослідження ЛФ витримана 3 роки зберігання) при двох температурних режимах: + 2 - + 8 °С; + 18 - + 25 °С.

При проведенні випробувань використовували поживні середовища та тест-мікроорганізми відповідно до вимог ДФУ.

Поживні середовища відповідали за ростовими, інгібіторними, індикативними властивостями та витримували випробування на стерильність відповідно до вимог ДФУ (табл. 1).

Таблиця 1

Поживні середовища, використані для перевірки придатності методики

Назва живильного середовища	Призначення
Сосво-казеїновий бульйон (СКБ)	Вирощування тест-штамів бактерій цільового використання
Соєво-казеїновий агар (СКА)	Визначення загального числа аеробних мікроорганізмів
Сабуро-декстрозний агар (СДА) (без додавання антибіотиків)	Вирощування тест-штамів грибів цільового використання Визначення загального числа дріжджових та плісневих грибів
Манітно-сольовий агар	Диференційно-діагностичне середовище для виділення <i>S. aureus</i>
Цетримідний агар	Диференційно-діагностичне середовище для виділення <i>P. aeruginosa</i>

Перелік та призначення тест-мікроорганізмів наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Тест-мікроорганізми, використані для перевірки придатності методики

Тест-мікроорганізм	Номер штаму	Придатність методики випробування
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	на загальне число аеробних мікроорганізмів
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	на загальне число аеробних мікроорганізмів та випробування на окремі види мікроорганізмів
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	на загальне число аеробних мікроорганізмів та випробування на окремі види мікроорганізмів
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	на загальне число аеробних мікроорганізмів і дріжджових та плісневих грибів
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404	на загальне число аеробних мікроорганізмів і дріжджових та плісневих грибів

Для тестування використовували робочі суспензії мікроорганізмів відповідно до вимог ДФУ (), які вирощували кожний окремо на відповідному поживному середовищі. Так, тест-штами бактерій вирощували на соєво-казеїновому бульйоні (СКБ) при температурі 30-35°C протягом 18-24 год; тест-штами грибів вирощували на поверхні Сабуро-декстрозного агару (без додавання антибіотика) при температурі 20 - 25 °С. Тест-штам мікроорганізму *Candida albicans* вирощували протягом 48 годин, тест-штам мікроорганізму *Aspergillus brasiliensis* - протягом 5 - 7 діб.

Обов'язковим етапом поведених досліджень була перевірка придатності методики визначення загального числа бактерій та грибів [1, 2].

Перевірку придатності методики визначення загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів (ТАМС) і дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) проводили відповідно до вимог ДФУ.

Кількісне визначення КУО тест-мікроорганізмів в суспензіях проводили методом висівання у чашки Петрі з соєво-казеїновим агаром (СКА) для ТАМС та з Сабуро-декстрозним агаром (СДА) для ТУМС.

Для верифікації умов випробування проводили негативний контрольний дослід, використовуючи для висівання у поживні середовища стерильний розчинник. Інкубували посіви згідно з вимогами ДФУ, підраховували число колоній на кожній чашці Петрі, визначали середнє арифметичне значення числа колоній.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для перевірки придатності методики визначення загального числа аеробних мікроорганізмів (ТАМС) готували випробовуваний зразок препарату у розведенні 1:10 та 1:100 по п'ять зразків (табл. 3).

Таблиця 3

Результати перевірки придатності методики випробування на загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів і дріжджових та плісневих грибів

Назва зразка	Середнє число КУО 1 мл зразка						
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>		
	СКА	СКА	СКА	СКА	СДА	СКА	СДА
Розведення 1:10							
Суспензія мікроорганізмів + досліджуваний ЛЗ 1:10	0/0	0/0	28/24	58/60	64/63	69/71	71/70
Контрольна суспензія мікроорганізмів	87/93	75/78	56/58	63/62	61/62	72/74	70/73
Негативний контрольний дослід	Ріст відсутній						
Розведення 1:100							
Суспензія мікроорганізмів + досліджуваний ЛЗ м/о	43/46	30/36	52/54	60/61	-	68/73	-
Контрольна суспензія мікроорганізмів	87/93	75/78	56/58	63/62	-	72/74	-
Негативний контрольний дослід	Ріст відсутній						

ТЕХНОЛОГІЯ ЛІКІВ І ОРГАНІЗАЦІЯ ФАРМСПРАВИ

Дані таблиці свідчать, що випробовуваний препарат в розведенні 1:10 пригнічує ріст *B. subtilis*, *S. aureus* та *P. aeruginosa*. В розведенні 1:100 пригнічує ріст *B. subtilis*, *S. aureus*.

У зв'язку із зазначеним з метою усунення антимікробної дії препарату були використані інактиватори у складі ФБР (фізіологічно-буферного розчину): саме 5 % - полісорбат-80, 0,5 % - соєвий лецитин, 0,1 % - гістидин гідрохлорид (табл. 4).

Таблиця 4

Оцінка впливу ФБР на антимікробну дію досліджуваного ЛЗ

Назва зразка	Середнє число КУО в 1 мл зразка						
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>		<i>A. brasiliensis</i>	
	СКА	СКА	СКА	СКА	СДА	СКА	СДА
Розведення 1:10							
Суспензія мікроорганізмів + досліджуваний ЛЗ	0/0	0/0	20/22	81/76	83/81	64/60	65/64
Контрольна суспензія мікроорганізмів	92/94	66/68	51/53	83/84	85/81	63/63	66/68
Негативний контрольний дослід	Ріст відсутній						
Розведення 1:100							
Суспензія мікроорганізмів + досліджуваний ЛЗ	23/21	13/21	52/48	82/84	-	62/66	-
Контрольна суспензія мікроорганізмів	92/94	66/68	51/53	83/84	-	85/81	-
Негативний контрольний дослід	Ріст відсутній						

Дані таблиці свідчать, що випробовуваний препарат в розведенні 1:10 та 1:100 пригнічує ріст тест-мікроорганізмів *B. subtilis*, *S. aureus* та *P. aeruginosa*.

Приведені результати спричинили необхідність вивчення можливості використання для визначення загального числа бактерій методу мембранного фільтрування (табл. 5).

Дані таблиці свідчать, що антимікробна дія випробовуваного препарату по відношенню до зазначених тест-штамів бактерій і грибів методом мембранної фільтрації показує, що ріст тест-мікроорганізмів в присутності та відсутності ЛЗ не відрізняється. Випробовувана методика може бути використана для визначення ТАМС та ТУМС.

Наступним етапом досліджень було проведення перевірки придатності методики випробування на окремі види мікроорганізмів (*St. aureus* та *Ps. aeruginosa*).

Перевірка придатності методики випробування на загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів методом мембранного фільтрування

Назва зразка	Число КУО на одному фільтрі						
	B. subtilis	S. aureus	P. aeruginosa	C. albicans	A. brasiliensis		
	СКА	СКА	СКА	СКА	СДА	СКА	СДА
Розведення 1:10							
Суспензія мікроорганізмів + досліджуваний ЛЗ	69/65	63/59	46/48	55/59	55/56	75/73	80/78
Контрольна суспензія мікроорганізмів	66/68	54/57	43/44	60/64	60/57	81/80	83/81
Негативний контрольний дослід	Ріст відсутній						

Підготовку тест-мікроорганізмів проводили методом послідовних кратних розведень суспензії монокультур тест-мікроорганізмів *St. aureus* та *Ps. aeruginosa* фосфатному буферному розчині з натрію хлоридом і пептоном рН 7.0 до концентрації не більше 10^3 КУО/мл.

Кількісне визначення КУО тест-мікроорганізмів в робочій суспензії проводили методом висівання 0,1 мл суспензії у кожен з двох чашок Петрі з живильним середовищем СКА (табл. 6).

Таблиця 6

Результати перевірки придатності методики при випробуванні на наявність *St. aureus* і *Ps. aeruginosa*

Тест-мікроорганізм	Наявність росту на середовищах						КУО
	дослід		контроль		негативний контрольний дослід		
	на рідких	на густих	на рідких	на густих	на рідких	на густих	
<i>St. aureus</i>	Розведення 1:10						76/72
	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	
	Розведення 1:50						
	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	
<i>Ps. aeruginosa</i>	Розведення 1:10						57/60
	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	
	Розведення 1:50						
	-/-	+/-	+/+	+/+	-/-	-/-	

Примітка: «+» - наявність росту, «-» - відсутність росту.

З метою усунення антимікробної дії препарату був використаний метод мембранної фільтрації.

Використовували мембранні фільтри діаметром пор 0,45 мкм фірми MILLIPORE, виробництва Франція. Інкубацію посівів проводили при температурі 30-35 °С 18-24 год. відповідно до вимог ДФУ. Після закінчення терміну інкубації проводили пересівання на поверхню манітно-сольового агару. Посіви інкубували в термостаті температурі 30-35 °С протягом 18-72 год. (табл. 7).

Таблиця 7

Результати перевірки придатності методики випробування методом мембранної фільтрації

Тест-мікроорганізм	Наявність росту на середовищах						КУО
	дослід		контроль		негативний контрольний дослід		
	на рідких	на густих	на рідких	на густих	на рідких	на густих	
Staphylococcus aureus	препарат в розведенні 1:10						72/69
	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	
Pseudomonas aeruginosa	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	65/71

Примітка: «+» - наявність росту, «-» - відсутність росту.

Результати, наведені в табл., що метод мембранної фільтрації усуває антимікробну дію по відношенню до тест-штамів.

Послідуючим етапом наших досліджень було проведення випробування опрацьованого МЛЗ згідно розроблених методик, за показником «мікробіологічна чистота», який був витриманий в різних умовах зберігання.

Визначення загального числа аеробних мікроорганізмів (ТАМС) і дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) проводили наступним чином: пропускали через мембранні фільтри по 10 мл підготовленої проби зразка ЛЗ, відмивали п'ятьма порціями по 100 мл 0,9 % стерильного розчину NaCl, фільтри поміщали на поверхню СКА та СДА. Інкубували в термостаті при температурі 30-35°C упродовж 3-5 діб (для ТАМС) та 20-25°C упродовж 5-7 діб (для ТУМС).

Випробування на відсутність St. aureus і Ps. aeruginosa проводили таким чином: пропускали через мембранний фільтр 10 мл підготовленої проби ЛЗ, відмивали п'ятьма порціями по 100 мл 0,9 % стерильного розчину NaCl. Фільтр поміщали у 100 мл СКБ.

Після закінчення терміну інкубації проводили пересівання на поверхню манітно-сольового агару (St. aureus) та на поверхню цетримідного агару (Ps. aeruginosa). Посіви інкубували в термостаті температурі 30-35 °С протягом 18-72 год. (табл. 8).

ВИСНОВКИ

Нормування мікробіологічної чистоти розробленого ЛЗ встановлено відповідно до вимог ДФУ [1] як для ГЛЗ категорії 2.

Розроблена методика випробувань опрацьованої мазі для вивчення показника „мікробіологічна чистота“. Встановлено, що оптимальним є метод мембранного

Результати дослідження ЛЗ за показником „мікробіологічна чистота”

Умови та термін зберігання	Мазь				
	№ зразку	Загальна кількість			
		TAMC	TYMC	St. aureus	Ps. aeruginosa
1. Безпосередньо після виготовлення	1	менше 100	менше 10	Відсутні	Відсутні
2. Зберігання 27 міс в природних умовах					
2.1. при + 18 - + 25 °С	1а	менше 100	менше 10	Відсутні	Відсутні
2.2. при + 2 - + 8 °С	1б	менше 100	менше 10	Відсутні	Відсутні

фільтрування для визначення загального числа життєздатних аеробних бактерій, а для грибів - метод прямого висівання.

Результати експерименту можуть бути використані як основа для розробки мазі з антибактеріальною та протизапальною дією.

Література

1. Державна фармакопея України. Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. 1-е вид. Х. : PIPEF. 2011, 4.

2. Державна фармакопея України. Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. 1-е вид. Х. : PIPEF. 2001.

3. Scientia Pharmaceutica: Abstracts of 4th Central European Symp. on Pharmaceutical Technology. 2001, 1 (69).

4. Swarbrick Ed. J., Boyalan J. C. Encyclopedia of Pharmaceutical Tecnology. New-York, DaseI: Marcel Dekker, Inc. 2002, 3: 2654-2668.

В.В. Шматенко, В.О. Тарасенко

Биофармацевтические исследования мази софлораксацином и нимесулидом по показателю „микробиологическая чистота”

Украинская военно-медицинская академия

Введение. Биофармацевтические исследования в аспекте установления показателя „микробиологическая чистота” есть необходимыми с целью регулирования факторов, которые заблаговременно влияют на качество ЛС.

Цель. Провести биологические исследования разработанной мази с офлораксацином и нимесулидом по показателю „микробиологическая чистота” в соответствии с требованиями ГФУ.

Материалы и методы. Проверку пригодности методики определения общего числа TAMC и TYMC проводили в соответствии требованиям ГФУ. Количественное определение КУО тест-микроорганизмов в суспензиях проводили методом висевания в чашки Петри с СКА для TAMC и с СДА для TYMC. Для верификации условий исследования проводили негативное контрольное исследование, используя для висевания в питательные среды стерильный растворитель. После инкубации посевов подсчитывали число колоний на каждой чашке Петри, определяли среднее арифметическое значение числа колоний.

Материалы и методы. Проверку пригодности методики определения общего числа ТАМС и ТУМС проводили в соответствии требованиям ГФУ. Количественное определение КУО тест-микроорганизмов в суспензиях проводили методом висеивания в чашки Петри с СКА для ТАМС и с СДА для ТУМС. Для верификации условий исследования проводили негативное контрольное исследование, используя для висеивания в питательные среды стерильный растворитель. После инкубации посевов подсчитывали число колоний на каждой чашке Петри, определяли среднее арифметическое значение числа колоний.

Результаты. Методом *in vitro* проведены биологические испытания исследуемой мази антибактериального и противовоспалительного действия с офлоксацином и нимесулидом и установлено ее соответствие нормам ГФУ за показателем „микробиологическая чистота“. На основании экспериментальных исследований установлено, что оптимальным есть метод мембранного фильтрования для определения общего числа жизнеспособных аэробных бактерий, а для грибов – метод прямого висеивания.

Заключение. В ходе проведенного эксперимента установлено, что общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов меньше 100, а дрожжевых и плесневых грибов меньше 10 в 1 г каждого образца; *St. aureus* и *Ps. aeruginosa* и некоторых других грамотрицательных бактерий не определено, что соответствует требованиям ГФУ.

Ключевые слова: микробиологическая чистота, инактиватор, питательная среда, микроорганизм, тест-штам, мембранный фильтр, лекарственное средство, мазь, нимесулид, офлоксацин.

V.V. Shmatenko, V.A. Tarasenko

Biopharmaceutical trial of ofloxacin and nimesulide bearing ointment by „microbiological purity“ index

Ukrainian military medical academy

Introduction. Biopharmaceutical studies aimed at establishing „microbiological purity“ are necessary in order to control the factors that affect the quality of medicines at early stages of manufacturing.

Purpose. To conduct biological study of the developed ofloxacin and nimesulide-bearing ointment in terms of „microbiological purity“ in accordance with the requirements of the National Pharmacopeia.

Materials and methods. Checking the suitability of TAMC and TYMC methods was conducted in compliance with the National Pharmacopoeia. Quantification of TEM test microorganisms in the suspensions was performed by plate count with SKA for TAMC and SDA for TYMC. To verify the conditions of the study negative control study was carried by inoculation of media with a sterile solvent. After incubation the number of colonies was counted in each plate then average value was determined

Results. *In vitro* biological trial showed microbiological purity compliance of the tested ointment with the standards of the National Pharmacopeia. Based on experimental studies it was established that membrane filtration is an optimal method to determine the total number of viable aerobic bacteria and direct plating - to detect fungi

Conclusions. The trial revealed the total number of viable aerobic microorganisms being less than 100, yeast and molds - less than 10 per 1 g of each sample; there was no found *St. aureus* and *Ps. aeruginosa* and other gram-negative bacteria, which is evident of meeting requirements of the National Farmacopea.

Key words: microbiological purity, inactivator, medium, microorganism, the test strain, membrane filter, drug, ointment, nimesulide, ofloxacin.