УДК 615. 322: 579.61

Т.М. Зубченко, О.І. Тихонов

Дослідження з мікробіологічної чистоти лікарських препаратів на основі розторопші плямистої

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: *мікробіологічні випробування, мікроорганізми, бактерії, гриби, силібор.*

Ключевые слова: *микробиологические испытания, микроорганизмы, бактерии, грибы, силибор.*

Keywords: *microbiological tests, microorganisms, bacteria, mushrooms, of silymarin.*

Розроблено методики випробування на мікробіологічну чистоту препаратів на основі розторопші; перевірено їх відповідність вимогам ДФУ.

Разработаны методики испытания на микробиологическую чистоту препаратов на основе расторопши; проверено их соответствие требованиям ГФУ.

The methods of test are developed on the microbiological cleanness of preparations on the basis of gardui marianae fructus and their accordance is tested to the requirements of SPU.

Розторопша плямиста в якості лікарського засобу використовується з давніх часів і застосовується в традиційній медицині для лікування печінки й нормалізації процесу травлення [2,3].

«Силібор» – препарат, що містить суму флаволігнанів з плодів розторопші плямистої, належить до групи засобів, що мають високу гепатозахисну активність; випускається у формі таблеток або капсул. Отримані у попередніх дослідженнях результати [2–5] показали перспективність створення на основі плодів і знежиреної сировини розторопші плямистої вітчизняних гепатопротекторних препаратів.

Мета роботи

Дослідження з перевірки придатності методик випробування на мікробіологічну чистоту субстанції силібор і таблеток силібор-35, отриманих на основі комплексної переробки плодів розторопші плямистої [2–9].

Матеріали і методи дослідження

Об'єктом дослідження були субстанція силібор виробництва ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я» і таблетки силібор-35 [2,3,4,5].

Розроблені методики випробування на мікробіологічну чистоту субстанції силібор і таблеток силібор-35 відповідають вимогам ДФУ І.І, розділи 2.6.12, 2.6.13. Перевірку придатності методик проводили відповідно до вимог ДФУ І.І, 2.6.12, 2.6.13 [1]. Для перевірки придатності методики використовували наступні штами тест-мікроорганізмів: Bacillus subtilis ATCC 6633 (субстанція); Bacillus cereus ATCC 10702 (таблетки); Escherichia coli ATCC 25922; Staphylococcus aureus ATCC 6538; Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027; Salmonella typhimurium 144; Candida albicans ATCC 885-653; Aspergillus niger ATCC 16404;

Препарати, отримані на основі переробки розторопші плямистої (субстанція силібор та таблетки силібор-35), в умовах випробування на мікробіологічну чистоту, зазначених в ДФУ (висівання на живильні середовища з розведення препарату 1:10 у фосфатному буферному розчині з натрію хлоридом і пептоном pH 7,0), не виявляють антимікробну дію відносно Escherichia coli ATCC 25922 (на живильних середовищах №1 і №11), Salmonella typhimurium 144 (на живильному середовищі №11), Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 (на живильному середовищі №8), Candida albicans ATCC 885-653 (на живильному середовищі №2), Aspergillus niger ATCC 16404 (на живильному середовищі №2), але мають антимікробну дію відносно Bacillus subtilis ATCC 6633 (на живильних середовищах №1), Staphylococcus aureus ATCC 6538 (на живильних середовищах №1 і №8).

Для перевірки придатності методики випробування субстанції силібор готували зразки препарату, як зазначено в методиці, використовуючи фосфатний буферний розчин, що містив тест-мікроорганізми. Для перевірки придатності методики визначення загальної кількості бактерій (висівання на живильне середовище №1) використовували буферний розчин, що містив близько 100 КУО/мл монокультур тест-штамів бактерій. Для перевірки придатності методики визначення загальної кількості грибів (висівання на живильне середовище №2) використовували буферний розчин, що містив близько 100 КУО/мл монокультур тест-штамів грибів. Для перевірки придатності методики випробування на наявність бактерій родини Enterobacteriacea (висівання на рідке живильне середовище №11) до живильного середовища додавали суміш тест-мікроорганізмів, згідно з вимогами ДФУ І.І, 2.6.13 [1]. Для перевірки придатності методики випробування на наявність Staphylococcus aureus і Pseudomonas aeruginosa (висівання на живильне середовище №8) використовували буферний розчин, що містив суміш тест-мікроорганізмів, згідно з вимогами ДФУ І.І, 2.6.13 [1]. Підготовлені зразки висівали на живильні середовища, як зазначено в методиці. Проводили інкубацію посівів, після чого підраховували кількість колоній тест-мікроорганізмів на чашках Петрі та проводили ідентифікацію тест-мікроорганізмів, що виросли на рідких живильних середовищах.

Результати перевірки придатності методики випробування на мікробіологічну чистоту наведено в *таблицях 1* і *2*.

© Т.М. Зубченко, О.І. Тихонов, 2010

Таблиця 1

Результати перевірки придатності методики випробування на загальну кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів субстанції силібор

Зразок препарату	Середня кількість КУО в перерахунку на 1 мл зразка				
	B. Subtilis ATCC 6633 (серед. №1)	S. aureus ATCC 6538 (серед. №1)	E. coli ATCC 25922 (серед. №1)	C. albicans ATCC 885-653 (серед. №2)	Aspergillus niger ATCC 16404 (серед. №2)
Серія 1	69	103	161	38	73
Серія 2	26	96	153	35	75
Контроль	78	107	157	36	77

Таблиця 2

Результати перевірки придатності методики випробування на окремі види мікроорганізмів субстанції силібор

Тест-мікроорганізми	Використані живильні середовища		Наявність росту на живильних середовищах за наявності випробовуваного зразка		Наявність росту на живильних середовищах у контролі		Середня кількість КУО в 1 мл робочої суспензії
	рідкі	густі	рідких	густих	рідких	густих	
E. coli ATCC 25922	№ 11 № 3	Ендо ВСА	+	+ +	+	+ +	157
S. typhimu-rium 144	№ 11 № 3	Ендо ВСА	+	+ +	+	+ +	93
S. aureus ATCC 6538	№ 8	№ 10	+	+	+	+	107
P. aeruginosa ATCC 9027	№ 8	№ 9	+	+	+	+	80

Для перевірки придатності методики випробування препарату таблетки силібор-35 готували зразки, як зазначено в методиці, використовуючи фосфатний буферний розчин, що містив тест-мікроорганізми. Для перевірки придатності методики визначення загальної кількості бактерій (висівання на живильне середовище №1) використовували буферний розчин, що містив полісорбат-80 і близько 100 КУО/мл монокультур тест-штамів бактерій. Для перевірки придатності методики визначення загальної кількості грибів (висівання на живильне середовище №2) використовували буферний розчин, що містив полісорбат-80 і близько 100 КУО/мл монокультур тест-штамів грибів.

Для перевірки придатності методики випробування на наявність бактерій родини Enterobacteriacea (висівання на рідке живильне середовище №11) до живильного середовища додавали суміш тест-мікроорганізмів, згідно з вимогами ДФУ І.І, 2.6.13 [1]. Для перевірки придатності методики випробування на наявність Staphylococcus aureus і Pseudomonas aeruginosa (висівання на живильне середовище №8) використовували буферний розчин, що містив суміш тест-мікроорганізмів, згідно з вимогами ДФУ І.І, 2.6.13 [1].

Підготовлені зразки висівали на живильні середовища, як зазначено в методиці. Проводили інкубацію посівів, після чого підраховували кількість колоній тест-мікроорганізмів на чашках Петрі, проводили ідентифікацію тест-мікроорганізмів, що виросли на рідких живильних середовищах.

Результати перевірки придатності методики випробування таблеток силібор на мікробіологічну чистоту наведено в *таблицях 3* і *4*.

Таблиця 3

Результати перевірки придатності методики випробування на загальну кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів таблеток силібор

Зразок препарату	Середня кількість КУО в перерахунку на 1 мл зразка				
	B. subtilis ATCC 6633 (серед. №1)	S. aureus ATCC 6538 (серед. №1)	E. coli ATCC 25922 (серед. №1)	C. albicans ATCC 885-653 (серед. №2)	Aspergillus niger ATCC 16404 (серед. №2)
Серія 1	69	103	161	38	73
Серія 2	26	96	153	35	75
Контроль	78	107	157	36	77

Таблиця 4

Результати перевірки придатності методики випробування на окремі види мікроорганізмів таблеток силібор-35

Тест-мікроорганізми	Використані живильні середовища		Наявність росту на живильних середовищах за наявності випробовуваного зразка		Наявність росту на живильних середовищах у контролі		Середня кількість КУО в 1мл робочої суспензії
	рідкі	густі	рідких	густих	рідких	густих	
E. coli ATCC 25922	№11 №3	Ендо BCA	+	+ +	+	+ +	157
S. typhimu-rium 144	№11 №3	Ендо BCA	+	+ +	+	+ +	93
S. aureus ATCC 6538	№8	№ 10	+	+	+	+	107
P. aeruginosa ATCC 9027	№8	№ 9	+	+	+	+	80

Результати та їх обговорення

Як видно з *таблиці 1*, результати, отримані при підрахунку кожного з тест-мікроорганізмів, відрізняються не більше ніж у 5 разів, що свідчить про придатність методики випробування на визначення загальної кількості життєздатних аеробних мікроорганізмів. Результати, наведені в *таблиці 2* показали, що в умовах випробування, зазначених у методиці, за наявності випробовуваних зразків спостерігається ріст тест-мікроорганізмів на рідких живильних середовищах і при висіванні на відповідні густі середовища. Для кожного з тест-мікроорганізмів за наявності випробовуваних зразків отримано позитивні результати ідентифікаційних тестів, що свідчить про придатність методики випробування на окремі види мікроорганізмів. Нормування мікробіологічної чистоти препарату встановлено відповідно до національної частини розділу 5.1.4 ДФУ, як для субстанцій категорії 3 А [1].

У препараті субстанція силібор допускається загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10^3 бактерій і не більше 10^2 грибів в 1 г.

Не допускається наявність в 1 г бактерій родини Enterobacteriacea, Staphylococcus aureus, родини Pseudomonas aeruginosa.

Результати перевірки придатності методики випробування таблеток силібор-35, як видно з *таблиці 3*, для всіх тест-мікроорганізмів результати, отримані при підрахунку кожного з тест-мікроорганізмів за наявності й відсутності випробовуваних зразків, відрізняються не більше ніж у 5 разів, що свідчить про придатність методики випробування на визначення загальної кількості життєздатних аеробних мікроорганізмів.

Результати, наведені в *таблиці 4*, показали, що в умовах випробування, зазначених у методиці, за наявності випробовуваних зразків спостерігається ріст тест-мікроорганізмів на рідких живильних середовищах і при висіванні на відповідні густі середовища. Для кожного з тест-мікроорганізмів за наявності випробовуваних зразків отримано позитивні результати ідентифікаційних тестів, що свідчить про придатність методики випробування на окремі види мікроорганізмів.

Нормування мікробіологічної чистоти досліджуваного препарату встановлено відповідно до національної частини розділу ДФУ I 5.1.4. N (готові лікарські засоби категорії 3 А) [1].

У препаратах допускається загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10^3 бактерій і не більше 10^2 грибів в 1 г.

Не допускається наявність в 1 г бактерій родини Enterobacteriacea, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa.

Висновки

1. Результати перевірки придатності розроблених методик випробування на мікробіологічну чистоту субстанції силібор і таблеток силібор-35 на її основі свідчить про їх відповідність вимогам ДФУ I.

2. За результатами досліджень встановлено нормування мікробіологічної чистоти препаратів субстанції силібор і таблеток силібор-35, згідно до вимог національної частини розділу ДФУ I 5.1.4. N.

Література

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науковий-експертний фармакопейний центр» – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 526 с.
2. *Зубченко Т.М.* Комплексна переробка плодів розторопші плямистої з розробкою нового способу очистки та виділення субстанції силібор / Т.М. Зубченко, О.І. Тихонов, Н.М. Скакун // Вісник фармації. – 2006. – №3 (47). – С. 10–14.
3. *Зубченко Т.М.* Фармацевтична розробка складу таблеток «Силібор 35» / Т.М. Зубченко, М.В. Штейнгарт, Т.Г. Ярних // Вісник фармації. – 2006. – №4 (48). – С. 10–14.
4. *Зубченко Т.М.* Вивчення показників якості рослинного гепатопротектора силібор / Т.М Зубченко, О.І. Тихонов, Т.Г Ярних // Матеріали VI всеукраїнської науково-практичної конференції «Клінічна фармація в Україні», 28–30 вересня 2007 р., м. Харків – Харків, 2007. – С. 35–36
5. *Зубченко Т.М.* Визначення критичних стадій та вивчення їх

впливу на технологічний процес виробництва субстанції «Силібор» / Т.М. Зубченко, О.І. Тихонов // Вісник фармації. – 2008. – №1 (53). – С. 24–29.
6. Настанова 42-01-2001 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика» – К.: Міністерство охорони здоров'я України. – 42 с.
7. Настанова з якості 42-3.3:2004 «Лікарські засоби. Випробування стабільності» – К.: Міністерство охорони здоров'я України. – 42 с.
8. Настанова з якості 42-3.2:2004 «Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування та критерії прийнятності» – К.: Міністерство охорони здоров'я України, 2004. – 42 с.
9. USP Pharmacists Pharmacopoeia. – II ed. – Rockville: The United State Pharmacopoeia, inc., 2008. – 1519 p.

Відомості про авторів:
Зубченко Т.М., к. фарм. н., асистент каф. аптечної технології ліків НФаУ.
Тихонов О.І., д. фарм. н., професор, зав. каф. аптечної технології ліків НФаУ, акад. Української АН.
Адреса для листування:
Зубченко Т.М. 61118, м. Харків, вул. Тимурівців, буд. 46, кв. 42.
Тел.: (057) 67 91 84.
E-mail: atl@ukrfa.kharkov.ua