

УДК: 615.454.1:262:076.7

ДОСЛІДЖЕННЯ З ВИЗНАЧЕННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЧИСТОТИ КОМБІНОВАНОГО ГЕЛЮ КОМПЛЕКСНОЇ ДІЇ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ПРОМЕНЕВИХ УРАЖЕНЬ ШКІРИ

Бурбан О. І., Калюжна О. С., Вишневська Л. І., Зубченко Т.М.

Національний фармацевтичний факультет, м. Харків, Україна

Вступ. Присутність мікроорганізмів у нестерильних препаратах може викликати зменшення або навіть інактивацію їх терапевтичної дії, тому на етапі фармацевтичної розробки повинні бути розглянуті питання забезпечення мікробіологічної чистоти. Тому виникло питання проведення мікробіологічних досліджень розробленого комбінованого гелю комплексної дії для лікування променевиx уражень шкіри, активними фармацевтичними інгредієнтами якого є свіжоотриманий сік очитка великого трави, кверцитин, обліпихи олія, шипшини олія, звіробою продирявленого олія.

Мета дослідження. Метою нашої роботи стало проведення дослідження з визначення мікробіологічної чистоти розробленого оригінального препарату – комбінованого гелю комплексної дії для лікування променевиx уражень шкіри [1, 2].

Методи дослідження. Аналіз мікробіологічної чистоти зразку гелю з обраним попередніми дослідженнями консервантом БОА 0,03 % проводили згідно ДФУ 2.4 статті 5.1.4 в асептичних умовах із використанням ламінарного боксу (кабінет біологічної безпеки АС2-4Е1 «Esco», Індонезія). Згідно вимог цієї статті критерії прийнятності мікробіологічної чистоти нестерильних дозованих лікарських форм для нашкірного застосування такі: загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) не повинне перевищувати 10^2 КУО / г або КУО / мл, загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – 10^1 КУО / г або КУО / мл; окремі види мікроорганізмів (*Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*) в 1,0 г або 1 мл мають бути відсутні [3].

Визначення числа мікроорганізмів при випробуванні мікробіологічної чистоти комбінованого гелю проводили згідно з методами, наведеними в ДФУ 2.0 статті 2.6.12, випробування на окремі види мікроорганізмів – у ДФУ 2.0 статті 2.6.13 [3].

Під час підготовки до проведення випробувань та власне випробувань використовували середовища, рекомендовані ДФУ:

- для підготовки тест-штамів бактерій та тест-штамів грибів – соєво-казеїновий бульйон та Сабуро-декстрозний бульйон, відповідно;
- для визначення ТАМС та ТУМС – соєво-казеїновий бульйон та Сабуро-декстрозний бульйон, відповідно
- для випробування на окремі види мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa* – манітно-сольовий агар та цетримідний агар, відповідно.

Згідно вимог ДФУ проводили перевірку стерильності живильних середовищ, розчинника, ростових властивостей живильних середовищ та перевірку придатності методики визначення загального числа життєздатних

клітин.

Контролем при визначенні ростових якостей середовища служить стандартне середовище з гарантованими ростовими властивостями, на якому правильно проявляється кількісне та якісне зростання мікроорганізмів (морфологія колоній).

Перед початком досліджень проводили перевірку ростових властивостей живильних середовищ. Живильні середовища відповідали за ростовими властивостями та витримували випробування на стерильність згідно вимог ДФУ 2.0, п. 2.6.12, а тест-мікроорганізми відповідали таксономічній характеристиці – морфологія колоній на середовищах та морфологія клітин при мікроскопуванні були типовими для відповідного штаму.

Перевірка придатності методики визначення загального числа життєздатних клітин полягає у порівнянні результатів підрахунку числа тест-мікроорганізмів, отриманих в присутності випробуваного препарату і на контрольних висіваннях. Антимікробну активність препарату усували шляхом розведення. Перевірку придатності методики визначення загального числа життєздатних мікроорганізмів здійснювали для випробуваних зразків препарату у розведенні 1 : 10 розчинником буферним розчином із натрію хлоридом та пептоном рН = 7,0 із 5 % полісорбату-80, 0,5 % лецитину та 0,1 % гістидину гідрохлориду.

Живильні середовища інокулювали невеликою кількістю відповідних тест-штамів мікроорганізмів ($10\text{-}10^2$ КУО / мл): *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Для тестування використовували робочі суспензії мікроорганізмів, які вирощували кожний окремо на відповідному живильному середовищі. Для приготування робочих суспензій тест-мікроорганізмів використовували буферний розчин з натрію хлоридом та пептоном рН 7,0, досягаючи відповідного навантаження ($10\text{-}10^2$ КУО / мл) методом послідовних кратних розведень. Використовували по дві чашки Петрі для кожного тест-штаму, інкубували чашки за умов табл. 1, підраховували число колоній тест-штамів, обчислювали середнє арифметичне значення числа колоній та визначали число КУО в 1 мл зразка.

Основні результати. За результатом перевірки, метод поверхневого висівання з розведенням зразків 1 : 10 із використанням типового нейтралізувального розчинника, придатний для визначення кількості мікроорганізмів у зразках. Результати визначення ростових властивостей живильних середовищ наведені у табл. 1, перевірки придатності методики – у табл. 2.

За результатами, одержаними при підрахунку кожного з тест-мікроорганізмів у присутності та за відсутності випробуваного зразка (табл. 2) відрізняються не більше як у 1,18 разів, що відповідає критерію прийнятності (за вимогами має відрізнятись не більше ніж в 2 рази).

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, 1 г / л гістидину гідрохлориду, придатний для визначення кількості мікроорганізмів у 1 мл препарату та може використовуватися при проведенні випробування.

Таблиця 1

Результати перевірки ростових властивостей живильних середовищ

Тест-мікроорганізми	Живильне середовище	Умови культивування		Висновки
		температура, °С	тривалість, год	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Соєво-казеїнове	30-35	18-24	Морфологія колоній та клітин типова
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Соєво-казеїнове	30-35	18-24	Морфологія колоній та клітин типова
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Соєво-казеїнове	30-35	18-24	Морфологія колоній та клітин типова
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Сабурозо-декстрозне	20-25	48-72	Морфологія колоній та клітин типова
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Сабурозо-декстрозне	20-25	120-168	Морфологія колоній та клітин типова
–	Контроль стерильності	35	24-72	Зростання мікроорганізмів відсутнє

При випробуванні мікробіологічної чистоти досліджуваного комбінованого гелю використовували метод поверхневого висівання у чашки Петрі з соєво-казеїновим агаром (для ТАМС) та Сабуро-декстрозним агаром (для ТУМС). Готували випробуваний зразок, використовуючи методику, придатність якої була доведена. Для кожного розведення зразка готували по 2 чашки Петрі з кожним живильним середовищем. Чашки з соєво-казеїновим агаром інкубували при температурі 30-35 °С протягом 3-5 діб, чашки з Сабуро-декстрозним агаром інкубували при температурі 20-25 °С протягом 5-7 діб. Для кожного живильного середовища обчислювали середнє арифметичне значення числа колоній та визначали число КУО в 1 мл зразка. Під час довгострокового зберігання у звичайних умовах контрольні випробування проводили кожні 3 місяці впродовж першого року зберігання та кожні півроку протягом другого року зберігання (0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 27 місяців).

Таблиця 2

Результати перевірки придатності методики

Зразок	Середнє число КУО в 1 мл зразка				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
Суспензія мікроорганізмів + гель 1 : 10	71	65	70	60	57
Контрольна суспензія мікроорганізмів	84	75	81	66	64
Відношення числа КУО у присутності та за відсутності випробовуваного зразка	1,18	1,15	1,16	1,10	1,12

Результати мікробіологічної чистоти зразка комбінованого гелю протягом 27 міс зберігання наведені в табл. 3.

Таблиця 3

Результати випробування зразка комбінованого гелю на мікробіологічну чистоту

Умови та термін зберігання	Зразок гелю			
	Загальна кількість, КУО / мл			
	ТАМС	ТУМС	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Безпосередньо після виготовлення	менше 100	менше 10	Відсутні	Відсутні
Зберігання 24 міс	менше 100	менше 10	Відсутні	Відсутні
Зберігання 27 міс	менше 100	менше 10	Відсутні	Відсутні

Як видно з даних табл. 3, випробування мікробіологічної чистоти досліджуваного зразку комбінованого гелю показало, що загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) не більше 100 КУО / г, загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) не більше 10 КУО / г, мікроорганізми родини *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* в 1,0 г відсутні, що відповідає вимогам ДФУ.

Отже, за результатами проведених досліджень, розроблений комбінований гель комплексної дії для лікування променевого ураження шкіри є мікробіологічно стабільним протягом 27 місяців (термін спостереження).

Висновки.

Мікробіологічними дослідженнями встановлено, що розроблений лікарський препарат – комбінований гель комплексної дії для лікування

променевих уражень шкіри за показниками мікробіологічної чистоти відповідає вимогам ДФУ протягом усього терміну зберігання.

Список літератури

1. Бурбан О. І., Вишневська Л. І., Зубченко Т. М. Дослідження з розробки технології соку очитка великого, як біогенного стимулятора для одержання лікарських засобів. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2021. № 1 (65). С. 14–20.

2. Бурбан О. І., Зубченко Т. М., Вишневська Л. І. Деякі аспекти щодо розробки складу препарату з протизапальними та ранозагоювальними властивостями / Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології: матеріали збірки наукових праць. Випуск 6 (7-8 листопада 2019 р., м. Харків). Х. : Вид-во НФаУ. 2019 С. 99-102.

3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Доп. 3. Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2018. 416 с.