

Рекомендована д. мед. наук, проф. С. І. Климнюком

УДК 615.454.1:615.281:615.041.22

ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЧИСТОТИ МАЗІ З ЛІПОФІЛЬНИМ КОМПЛЕКСОМ КОРИ ТОПОЛІ ТРЕМТЯЧОЇ ТА ДЕКАМЕТОКСИНОМ© **В. В. Альхуссейн¹, Л. М. Хохлова², Н. І. Філімонова²**¹Харківська медична академія післядипломної освіти²Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: проведено дослідження з визначення мікробіологічної чистоти мазі з ліпофільним екстрактом кори тополі тремтячої та декаметоксину на поліетиленоксидній основі. Встановлено, що ріст клітин грибів не спостерігається, а кількість життєздатних клітин мікроорганізмів відповідає вимогам ДФУ.

Ключові слова: мікробіологічна чистота, мазі, інфекційні захворювання шкіри та м'яких тканин.

Вступ. Однією зі значущих проблем сучасної вітчизняної та світової медицини залишаються захворювання шкіри та м'яких тканин. Медична статистика свідчить про широке розповсюдження гнійно-запальних, інфекційних та алергічних захворювань шкіри, слизової та сполучної тканини, лікування яких належить до найбільш давніх, але не старіючих проблем практичної фармації.

Щороку в Україні реєструються більше 25 млн хворих з ранами, запальними ураженнями шкіри, опіками, забоями, які супроводжуються інфекційними ускладненнями. У сучасній медицині рановий процес є одним із поширених видів патології, який нерідко викликає тяжкі захворювання, що призводять до тривалої, а іноді і стійкої втрати працездатності. Тому головним завданням фармацевтичної галузі є пошук та створення нових ефективних, безпечних та доступних лікарських засобів для лікування вищезазначених хвороб [1, 2, 3].

На підставі раніше проведених досліджень було встановлено оптимальний склад та розроблено технологію мазі з ліпофільним екстрактом кори тополі тремтячої та декаметоксину на поліетиленоксидній основі [4]. За результатами мікробіологічної та фармакологічної активності доведено, що комбінована мазь проявляє виражену протизапальну, репаративну, знеболювальну, антиексудативну дію, а також діє на грампозитивні, грамнегативні мікроорганізми та гриби.

Протягом всього технологічного процесу виготовлення мазі існує можливість забруднення її мікроорганізмами, тому доцільним є проведення визначення мікробіологічної чистоти готової лікарської форми [5, 6].

Методи дослідження. Дослідження мазі на мікробіологічну чистоту проводили згідно з вимогами ДФУ, 1-ше вид., п. 2.6.12 та 2.6.13, категорія 3А (5.1.4, N).

Випробовування проводили за умов, що дозволяють запобігти випадковому забрудненню випробовуваних зразків готової лікарської форми.

Оцінювання мікробіологічної чистоти мазей проводили на базі кафедри мікробіології, вірусології та імунології НФаУ під керівництвом проф. Н. І. Філімонової.

Для дослідження використано живильні середовища, зазначені в ДФУ та наступні тест-мікроорганізми: *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *C. albicans* ATCC 885-653, *A. niger* ATCC 704 [7, 8, 9].

Готували окремо робочу суспензію кожного тест-мікроорганізму (бактерій), яка містила близько 100 КУО/мл наступним чином: добову культуру кожного тест-мікроорганізму (бактерій) змивали буферним розчином із натрію хлоридом і пептоном з рН 7,0, стандартизували до 10 Од (1 млн мікр. тіл в 1 мл) та доводили суспензію до 100 КУО/мл типовою нейтралізуючою рідиною [6,10].

Для нейтралізації антимікробної активності готували розведення препарату 1:100 типовою нейтралізуючою рідиною наступного складу:

Полісорбат – 80	30 г
Лецитин (яєчний)	3 г
Гістидину гідрохлорид	1 г
Пептон (м'ясний чи казеїновий)	1 г
Натрію хлорид	4,3 г
Калію дигідрофосфат	3,6 г
Динатрію гідрофосфат дигідрат	7,2 г
Вода очищена	1000 мл

По 10 мл проби зразку в розведенні 1:10 поміщали в три стерильні мірні флакони, доводили об'єм до 100 мл робочими суспензіями тест-мікроорганізмів у типовій нейтралізуючій рідині: в 1-й флакон – *B. subtilis* ATCC 6633, в 2-й флакон – *S. aureus* ATCC 6538, в 3-й флакон – *E. coli* ATCC 25922 [6,10].

За вимогами ДФУ загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів повинно бути не більш 102 бактерій і грибів (сумарно) в 1,0 г. Відсутність ентеробактерій і деяких інших грам-негативних бактерій в 1,0 г. Відсутність *Staphylococcus aureus* в 1,0 г. Відсутність *Pseudomonas aeruginosa* в 1,0 г.

Вміст кожного флакона суспендували і проводили посів по 1 мл зразка методом двохшарового висівання паралельно на дві чашки Петрі з густим живильним середовищем № 1 [6, 10, 11, 12]. Одночасно проводили посів цим же методом по 1 мл кожної робочої суспензії тест-мікроорганізмів на густе живильне середовище № 1 (контроль). Посіви інкубували згідно з вимогами ДФУ.

Після закінчення інкубації обчислювали середнє арифметичне значення кількості колоній на двох чашках Петрі в кожному досліді і контролі. Отримані результати представлено в таблиці 1.

Результати й обговорення. Результати дослідження, представлені в таблиці 1, показали, що зразок в умовах випробовування на мікробіологічну чистоту на живильному середовищі №1 в розведенні 1:10 в присутності типової нейтралізуючої рідини не виявляє протимікробної дії на *E. coli* ATCC 25922, в розведенні 1:100 в присутності типової нейтралізуючої рідини не виявляє протимікробної дії на *S. aureus* ATCC 6538 та *B. subtilis* ATCC 6633.

Методика для визначення загального числа життєздатних грибів.

Готували окремо робочу суспензію кожного тест-мікроорганізму (грибів), яка містила близько 100 КУО/мл наступним чином: добову культу-

ру кожного тест-мікроорганізму (грибів) змивали буферним розчином з натрію хлоридом і пептоном рН 7,0, стандартизували до 10 ОД (1 млн мікр. тіл в 1 мл) та доводили суспензію до 100 КУО/мл типовою нейтралізуючою рідиною.

По 10 мл проби зразка в розведенні 1:10 поміщали у два стерильні мірні флакони, доводили об'єм до 100 мл робочими суспензіями тест-мікроорганізмів в типовій нейтралізуючій рідині: в 1-й флакон – *S. albicans* ATCC 885-653, в 2-й флакон – *A. niger* ATCC 704.

Вміст кожного флакона суспендували і проводили посів по 1 мл зразка методом двохшарового висівання паралельно на дві чашки Петрі з густим живильним середовищем № 2. Одночасно проводили посів цим же методом по 1 мл кожної робочої суспензії тест-мікроорганізмів на густе живильне середовище № 2 (контроль). Посіви інкубували згідно з вимогами ДФУ. Після закінчення інкубації обчислювали середнє арифметичне значення кількості колоній на двох чашках Петрі в кожному досліді і контролі. Отримані результати представлено в таблиці 2.

Результати дослідження, представлені в таблиці 2, показали, що зразки мазей в умовах випробовування на мікробіологічну чистоту на живильну середовищі № 2 в розведенні 1:100 не проявляють пригнічувальної дії на життєздатність грибів.

Методика для визначення на окремі види мікроорганізмів.

Готували окремо робочу суспензію кожного тест-мікроорганізму (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 25853), яка містила близько 1000 КУО/мл. Змішували однакові об'єми кожної суспензії з метою отримання

Таблиця 1. Результати перевірки придатності методики випробовування на мікробну чистоту (визначення числа життєздатних аеробних бактерій на середовищі №1), КУО/мл

Препарат	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	
	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль
1	2	3	4	5	6	7
Зразок мазі 1:10	0	100	92	100	0	96
Зразок мазі 1:100	94		92		89	

Таблиця 2. Результати перевірки придатності методики випробовування на мікробіологічну чистоту (визначення загального числа життєздатних грибів на середовищі № 2), КУО/мл

Препарат	<i>S. albicans</i> ATCC 885-653		<i>A. niger</i> ATCC 704	
	дослід	контроль	дослід	контроль
1	2	3	4	5
Зразок мазі 1:10	0	88	0	110
Зразок мазі 1:100	90		112	

суміші з мікробним навантаженням близько 100 КУО/мл кожного тест-мікроорганізму.

У чотири стерильних мірних флакони вносили 1-й і 3-й по 1 г проби препарату в розведенні 1:100 типовою нейтралізуючою рідиною (дослід), в 2-й і 4-й по 1 мл типової нейтралізуючої рідини (контроль). В 1-й і 2-й флакони додавали стерильне живильне середовище № 3, в 3-й і 4-й флакони – стерильне середовище № 8 до об'єму 100 мл. В кожний флакон вводили по 0,4 суміші робочої суспензії тест-мікроорганізмів. Вміст кожного флакона перемішували та інкубували при темпратурі від 35 до 37 °С від 18 до 24 год. Після закінчення терміну інкубації проводили виявлення кожного тест-мікроорганізму у відповідному живильному середовищі (у живильному середовищі № 3 – *E. coli*, у живильному середовищі № 8 – *S. aureus* і *P. aeruginosa*) з використанням методів, описаних у ДФУ. Отримані результати представлено в таблиці 3.

Різниця в інтенсивності росту кожного тест-мікроорганізму в досліді і контролі не спостерігали.

Результати дослідження, представлені в таблиці 3, показали, що представлені зразки в розведенні 1:100 в умовах випробовування на мікробіологічну чистоту на живильному середовищі № 3 не виявляють пригнічувальної дії на життєздатність *E. coli*, на живильному середовищі № 8 – на життєздатність *S. aureus* і *P. aeruginosa*.

Таким чином, на основі проведених досліджень розроблено методику випробовування на мікробіологічну чистоту, яка представлена в проекті МКЯ.

Відсутність пригнічуючої дії на тест-штами аеробних бактерій в розведенні препарату 1:100 і тест-штами грибів в розведенні препа-

рату 1:100 в типовій нейтралізуючій рідині свідчать про придатність розробленої пробопідготовки.

Результати випробовування представлених зразків на мікробіологічну чистоту, яка була визначена за розробленою методикою, представлені в таблиці 4.

Мазі повинні витримувати вимоги, які висувають до готових лікарських засобів категорії 2.

У мазах допускається загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10² бактерій і грибів сумарно в 1 г.

Не допускається наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae* в 1 г.

Не допускається наявність *Staphylococcus aureus* в 1 г.

Не допускається наявність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г.

Як видно з таблиці 4, дослідні мазі відповідають вимогам ДФУ, в них не виявлено бактерій роду *S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Ps. aeruginosa*. Кількість бактерій та грибів не перевищує норм.

Висновки. 1. Проведено дослідження мікробіологічної чистоти мазі з ліпофільним екстрактом кори тополі тремтячої та декаметоксином на поліетиленоксидній основі. Отримані результати вказують на відсутність клітин грибів. Встановлено, що кількість життєздатних клітин мікроорганізмів не перевищує 10³ КУО/мл в 1 г препарату, що відповідає вимогам ДФУ для препаратів для внутрішнього застосування.

2. Отримані дані дозволяють стверджувати про безпечність та доцільність подальшої розробки лікарського засобу для застосування у терапії інфекційних та протизапальних уражень шкіри та м'яких тканин.

Таблиця 3. Результати перевірки придатності методики випробовування на мікробіологічну чистоту (випробовування на окремі види мікроорганізмів)

Препарат	Номер середовища	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		дослід	контр.	дослід	контр.	дослід	контр.
1	2	3	4	7	8	9	10
Зразок мазі	8			+	+	+	+

Примітка. + – наявність росту тест-мікроорганізмів.

Таблиця 4. Результати визначення мікробіологічної чистоти досліджуваного зразка мазі

Серія	Дата аналізу	Число КУО/г		Наявність в 1 г		
		бактерій	грибів	<i>S. aureus</i>	Род. <i>enterobacteriaceae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	2	3	4	5	6	7
Зразок мазі № 1	24.06.09	<100	<100	Відсутні	Відсутні	Відсутні

Література

1. Балин В. Н. Местное лечение гнойных хирургических заболеваний кожи и подкожной клетчатки в ус-

ловиях регулируемой активности раневых энзимов / В. Н. Балин, Д. Ю. Мадай. – СПб., 1996. – 37 с.

2. Вплив поліфенольного комплексу «Локорин» на різні стадії запального процесу / Л. В. Галузинська, О. І. Набока, Л. М. Вороніна та ін. // Клінічна фармація. – 2005. – Т. 9, № 2. – С. 39–43.
3. Граник В. Г. Лекарства. Фармакологический, биохимический и химический аспекты. – М. : Вузовская книга, 2001. – 408 С.
4. Антимикробные консерванты в составе готовых лекарственных средств / Н. А. Ляпунов, Е. Г. Жемерова, Е. П. Безуглая, Е. В. Дунай // Фармация. – 2004. – № 1. – С. 13–15.
5. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology / ed. by J. Swarbrick. – 3-rd ed. – New York; London: Informa Healthcare, 2007. – 4128 p.
6. Исследование микробиологической чистоты крема для наружного применения «Фитапиол» / А. П. Дудов, М. Р. Хисматуллин, Л. В. Гусакова, В. В. Гладышев // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. – 2006. – Т. 2, вип. XV. – С. 398–403.
7. Державна Фармакопея України / Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Харків : PIPEГ, 2001.– 556с.
8. Исследование микробиологической чистоты крема для наружного применения «Фитапиол» / А. П. Дудов, М. Р. Хисматуллин, Л. В. Гусакова, В. В. Гладышев // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. – 2006. – Т. 2, вип. XV. – С. 398–403.
9. Phenolic compounds in the leaves of *Populus ussuriensis* and their antioxidant activities / C. L. Si, J. K. Kim, Y. S. Bae [et al.] // *Planta Med.* – 2009. – Vol. 75, №10. – P. 1165–1167.
10. Жемерова Е. Г. К вопросам контроля микробиологической чистоты лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ. Сообщ. 1. Проверка пригодности методик определения общего числа жизнеспособных аэробных микроорганизмов / Е. Г. Жемерова, А. И. Кобзарь, Н. П. Хованская // Фармаком. – 2002. – № 3. – С. 51–55.
11. Бактеріологічний контроль поживних середовищ. Інформаційний лист МОЗ України № 05.4.1/1670. – К., 2001.
12. К вопросам о стандартизации мягких лекарственных средств / Н. А. Ляпунов, Н. П. Хованская, Е. П. Безуглая, Н. В. Долейко // Фармаком. – 1999. – № 2. – С. 36–41.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ МАЗИ С ЛИПОФИЛЬНЫМ КОМПЛЕКСОМ КОРЫ ТОПОЛЯ ДРОЖАЩЕГО И ДЕКАМЕТОКСИНОМ

В. В. Альхуссейн¹, Л. Н. Хохлова², Н. И. Филимонова²

¹Харьковская медицинская академия последипломного образования

²Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: проведено исследование по определению микробиологической чистоты мази с липофильным экстрактом коры тополя дрожащего и декаметоксином на полиэтиленоксидной основе. Установлено, что рост клеток грибов не наблюдается, а количество жизнеспособных клеток микроорганизмов соответствует требованиям ГФУ.

Ключевые слова: микробиологическая чистота, мази, инфекционные заболевания кожи и мягких тканей.

RESEARCH OF MICROBIOLOGICAL PURITY OF AN OINTMENT WITH LIPOPHILIC COMPLEX OF POPLAR BARK AND DECAMETOXINE

V. V. Alhusseyn¹, L. M. Khokhlova², N. I. Filimonova²

¹Kharkiv Medical Academy of Post-Graduate Education

²National Pharmaceutical University, Kharkiv

Summary: a study to determine the microbiological purity of an ointment with lipophilic extract of the poplar bark and decametoxine on polyethylenoxide basis was conducted. It was found out that the growth of fungi not observed, and the number of viable cells of microorganisms meets the requirements of SPhU.

Key words: microbiological purity, ointments, infections of skin and soft tissues.