

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2015

Л. В. Колосова, О. В. Гунар

ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ КОНСЕРВАНТОВ НЕКОТОРЫХ НЕСТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРИЕМА ВНУТРЬ

Федеральное государственное бюджетное учреждение “Научный центр экспертизы средств медицинского применения” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия; e-mail: gunar@exrmed.ru

Определена эффективность антимикробных консервантов некоторых нестерильных лекарственных препаратов для приема внутрь в виде сиропов и растворов: Кларисенс[®], сироп 1 мг/мл, Элькар[®], раствор для приема внутрь 300 мг/мл, Лазолван[®], сироп 15 мг/5 мл и др. Установлено, что качество 7 исследованных образцов, содержащих в составе такие консерванты, как бензойная кислота, метилпарабен, пропилпарабен, натрия бензоат, спирт этиловый, соответствует требованиям ОФС 42-0069-07 “Определение эффективности антимикробных консервантов лекарственных средств”. Представленные результаты испытаний получены с помощью модифицированного глубинного чашечного метода посева, рекомендованного ГФ РФ XII издания при определении микробиологической чистоты лекарственных средств. Возможность применения модифицированного глубинного чашечного метода целесообразно внести как дополнение к методике и в дальнейшем включить в следующее издание Государственной фармакопеи РФ.

Ключевые слова: антимикробный консервант; лекарственный препарат; эффективность.

При производстве некоторых готовых лекарственных форм препаратов, например, сиропов, мазей и других, могут применяться вспомогательные вещества, обладающие направленным антимикробным действием, — консерванты. Добавление этой группы веществ в лекарственные препараты (ЛП) позволяет избежать роста и развития микроорганизмов, тем самым предотвращая возможность возникновения побочных местных осложнений, связанных с активизацией бактериальной и грибковой инфекции, а также не допускает разложения действующих веществ. При этом антимикробные консерванты не должны использоваться как альтернатива надлежущей производственной практике [1, 2].

Консерванты применяются только в том случае, если физическими методами и специальными технологическими приемами невозможно предотвратить

микробную контаминацию препаратов. Это ограничение связано с тем, что данные вещества могут обладать аллергическими, канцерогенными и мутагенными свойствами, тем самым создавая реальную опасность для организма человека [3, 4]. Производителями должна быть доказана безопасность применяемых доз антимикробных консервантов, обосновано их применение, а также гарантирована их эффективность.

Подбор приемлемой концентрации консерванта или их комбинации для обеспечения защищенности препарата в течение срока хранения и при использовании многодозовых готовых лекарственных форм [2, 5, 6] осуществляют на стадии разработки ЛП в соответствии с требованиями ОФС 42-0069-07 “Определение эффективности антимикробных консервантов лекарственных средств” ГФ РФ XII издания, ч. 1, с. 216 – 219 [5].

Таблица 1

Нестерильные ЛП для приема внутрь, используемые в эксперименте

№ п/п	Наименование препарата	Международное непатентованное название	Консервант/консерванты (концентрация), мг/мл
1	Бромгексин, сироп 4 мг/5 мл	Бромгексин	Натрия бензоат (0,5)
2	Бронхорус [®] , сироп 3 мг/мл	Амброксол	Метилпарабен (0,8) Пропилпарабен (0,2)
3	Бронхостоп, сироп 4 мг/5 мл	Бромгексин	Натрия бензоат (0,5)
4	Кларисенс [®] , сироп 1 мг/мл	Лоратадин	Метилпарабен (0,33) Пропилпарабен (0,167)
5	Кларотадин [®] , сироп 5 мг/5 мл	Лоратадин	Бензойная кислота (1,0)
6	Лазолван [®] , сироп 15 мг/5 мл	Амброксол	Бензойная кислота (2,0)
7	Элькар [®] , раствор для приема внутрь 300 мг/мл	Левокарнитин	Метилпарабен (0,5), Пропилпарабен (0,2)

Питательные среды и условия инкубации при определении эффективности антимикробных консервантов

Микроорганизм-контаннант образца	Питательная среда	Температура инкубации, °С	Время инкубации, сут
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Соево-казеиновый агар	32,5 ± 2,5	6
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Агар Сабуро с глюкозой	22,5 ± 2,5	6

Сравнение результатов исследований, полученных глубинным и модифицированным глубинным методами

Тест-штамм	Глубинный метод		Модифицированный глубинный метод		F**	F _{табл} ***
	КОЕ на чашке	CV*, %	КОЕ на чашке	CV*, %		
<i>E. coli</i>	127 ± 40	24	90 ± 25	22	1,83	5,05
<i>S. aureus</i>	34 ± 4	11	35 ± 5	12	0,77	6,39
<i>P. aeruginosa</i>	8 ± 2	26	9 ± 2	24	0,83	9,28
<i>C. albicans</i>	37 ± 6	16	37 ± 11	26	0,49	5,05
<i>A. brasiliensis</i>	13 ± 3	24	11 ± 4	28	1,14	5,05

Обозначения: CV* — коэффициент вариации; F** — расчетное значение F-критерия Фишера; F_{табл}*** — табличное значение F-критерия Фишера.

Цель настоящей работы — изучение эффективности антимикробных консервантов нестерильных ЛП для приема внутрь с использованием модифицированного глубинного чашечного метода посева.

Экспериментальная часть

Для реализации поставленной цели выбраны 7 наименований нестерильных ЛП для приема внутрь, содержащих различные консерванты (табл. 1).

В соответствии с ОФС 42-0067-07 “Микробиологическая чистота” [5] первоначально в исследуемых образцах ЛП определяли антимикробную активность в условиях испытания микробиологической чистоты, а также исходную степень их контаминации. Далее была выполнена искусственная контаминация выбранных образцов взвешивая следующих тест-штаммов микроорганизмов в концентрации 10⁵ – 10⁶ КОЕ/мл:

Escherichia coli ATCC 8739;

Staphylococcus aureus ATCC 6538;

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027;

Candida albicans ATCC 10231;

Aspergillus brasiliensis ATCC 16404.

Контаминированные образцы хранили при температуре (22,5 ± 2,5) °С в защищенном от света месте в течение 28 сут. В день инокуляции образца указанными тест-штаммами и через 14, 28 сут после подбора подходящего разведения проводили посев модифицированным глубинным чашечным методом; для препарата Бронхорус® дополнительно осуществляли посев глубинным методом. Подсчитывали количество жизнеспособных клеток микроорганизмов в 1 мл исследуемых образцов через 6 сут.

Используемые питательные среды и условия инкубации посевов приведены в табл. 2.

Разведение исследуемых образцов стерильным изотоническим раствором натрия хлорида 0,9 % подбира-

ли таким образом, чтобы количество колоний на чашке Петри было от 30 до 300 — для бактерий; от 10 до 100 — для грибов. Кроме того, разведение образцов использовалось в качестве метода нейтрализации антимикробного действия консервантов при его выявлении.

Антимикробные консерванты ЛП считали эффективными, если полученные результаты удовлетворяли следующим критериям оценки:

1. Количество клеток бактерий уменьшалось на 1 lg через 14 сут, отсутствовало увеличение их количества через 28 сут;

2. Количество клеток дрожжеподобных и плесневых грибов не увеличивалось на протяжении всего срока исследования.

Для сравнения глубинного и модифицированного глубинного методов при изучении эффективности консервантов рассчитывали значения коэффициента вариации и F-критерия Фишера с помощью компьютерной программы “Статистика”.

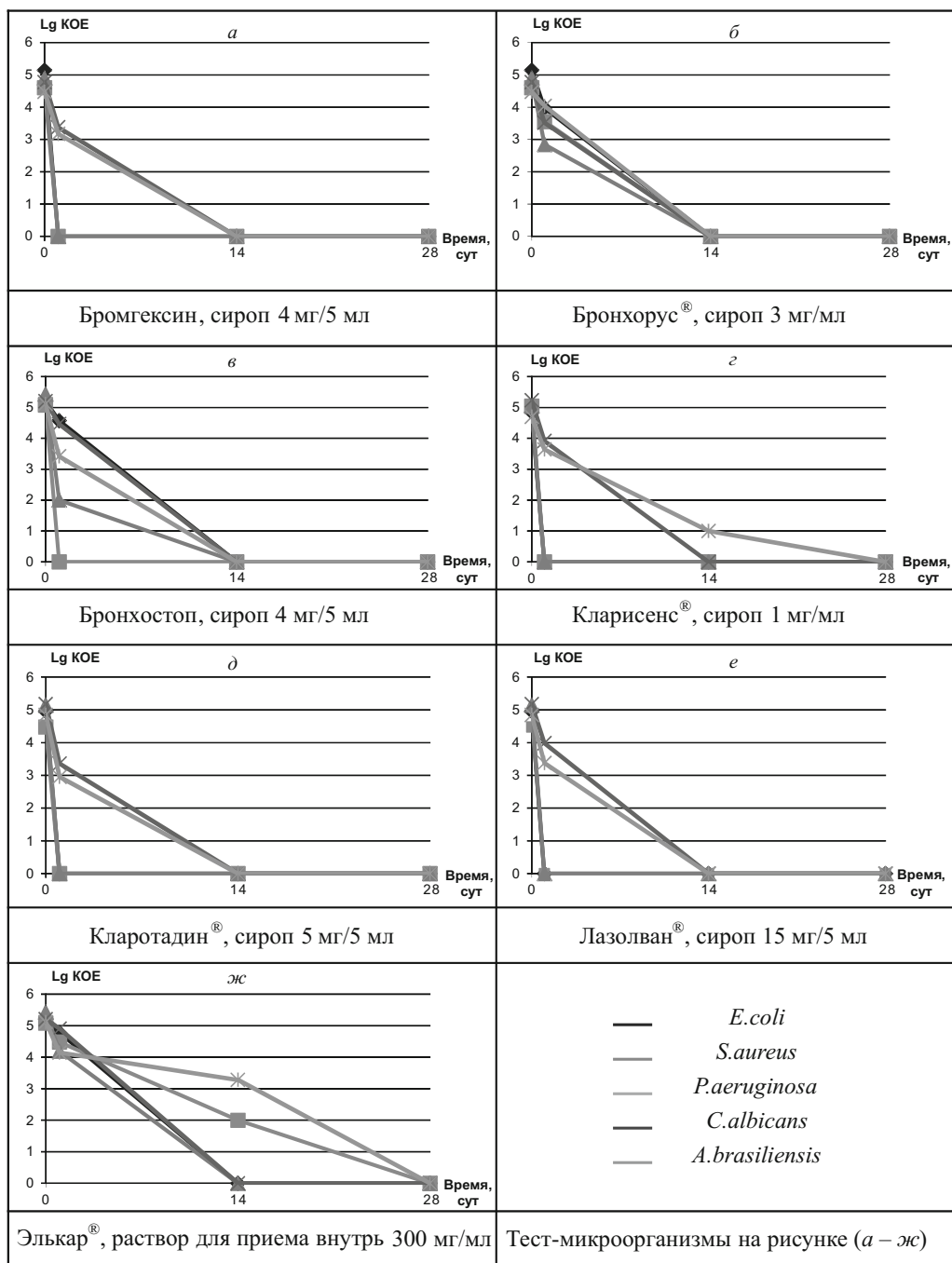
Результаты и их обсуждение

В результате исследования установлено:

1. Качество исследуемых образцов ЛП удовлетворяло требованиям ГФ РФ XII издания по показателю “Микробиологическая чистота”: общее число бактерий — не более 10³ КОЕ/мл, общее число грибов — не более 10² КОЕ/мл в отсутствие *E. coli*.

2. Образцы лекарственных препаратов Бронхостоп, Бромгексин, Кларотадин®, Кларисенс®, Элькар® не обладали антимикробным действием.

3. Препараты Бронхорус® и Лазолван® в разведении 1:10 обладали антимикробным действием, которое устранялось разведением 1:50 в отношении бактерий и *C. albicans*; разведением 1:20 в отношении *A. brasiliensis*.



Эффективность защиты изученных ЛП в отношении тест-микробов.

4. Антимикробные консерванты (метилпарабен, пропилпарабен, натрия бензоат, спирт этиловый, бензойная кислота) в составе изученных ЛП удовлетворяли критериям оценки эффективности. Через 14 сут наблюдали отсутствие роста бактерий во всех образцах, кроме препарата Элькар® (уменьшение числа клеток *S. aureus* на 2 lg). Рост грибов отсутствовал во всех препаратах, кроме образцов Кларисенса® и Элькара® (уменьшение числа клеток *A. brasiliensis* на 3 lg и 1 lg соответственно). Через 28 сут рост тест-микробов не выявлен.

Данные по эффективности антимикробных консервантов (метилпарабена и пропилпарабена), полученные с помощью глубинных чашечных агаровых мето-

дов, представлены в табл. 3 на примере препарата Бронхорус®, сироп 3 мг/мл.

Из данных таблицы видно, что коэффициенты вариации (CV), полученные в результате расчетов, находятся в пределах от 11 до 28 % и не превышают 30 %, принятого для микробиологических исследований предела [7]. Расчетные значения F-критерия Фишера меньше табличных значений, что свидетельствует о статистической неразличимости данных, полученных сравниваемыми методами.

Результаты исследования эффективности антимикробных консервантов рассматриваемых образцов представлены в виде графиков на рисунке.

Из результатов проведенных экспериментальных исследований видно, что используемые консерванты в изученных препаратах эффективно влияли как на бактерии, так и на грибы. Было отмечено бактерицидное действие консервантов сразу после контаминации образцов Бромгексин, Кларисенс[®], Кларотадин[®], Лазолван[®]. В течение 14 сут после экспозиции микроорганизмы не были выявлены во всех образцах, кроме препаратов Элькар[®] и Кларисенс[®].

Представленные результаты исследований, полученные с помощью модифицированного глубинного чашечного метода, показывают возможность его использования для определения эффективности антимикробных консервантов наряду с глубинным методом. Внесенные дополнения в методику определения эффективности антимикробных консервантов лекарственных препаратов целесообразно включить в следующее издание Государственной фармакопеи РФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. А. Ляпунов, Е. Г. Жемерова, Е. П. Безуглая, Е. В. Дунай, *Фармация*, № 1, 13 – 15 (2004).
2. *European Pharmacopoeia*, 8th edition, EDQM, Strasbourg (2014).
3. A. K. Charles and P. D. Darbre, *J. Appl. Toxicol.*, **29**(5), 422 – 434 (2009).
4. A. K. Charles and P. D. Darbre, *J. Appl. Toxicol.*, **33**(5), 390 – 398 (2013).
5. *Государственная фармакопея РФ*, XII издание, 1 часть, “НЦЭСМП”, Москва (2007).
6. *United States Pharmacopoeia*, 37th edition, USP 37 — NF 32, *United States Pharmacopoeial Convention*, Rockville, MD (2014).
7. PDA Technical Report No. 33, *J. Pharm. Sci. Tech.*, **54**(3), 26 (2000).

Поступила 19.03.14

EFFECTIVENESS OF ANTIMICROBIAL PRESERVATIVES OF SOME NONSTERILE ORAL DRUGS

L. V. Kolosova and O. V. Gunar*

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russia;

* e-mail: gunar@expmed.ru

We have determined the effectiveness of antimicrobial preservatives of a series of nonsterile drugs for oral administration in the form of syrups and solutions, including Klarisens R (syrup 1 mg/mL), Elkar R (oral solution 300 mg/mL), Lasolvan R (syrup 15 mg/5 mL), etc. It is established that the quality of seven investigated samples in the compositions containing preservatives such as benzoic acid, methylparaben, propylparaben, sodium benzoate, and ethyl alcohol meets General Pharmacopoeial Article (GFA) 42-0069-07 “The effectiveness of antimicrobial preservatives of drugs”. Test results obtained by a modified deep plate method recommended by the RF State Pharmacopoeia (XII Ed.) for determining the microbiological purity of drugs. The possibility of using the modified deep plate method should be included in addition to the main procedure in the next edition of the RF State Pharmacopoeia.

Keywords: antimicrobial preservatives; nonsterile drugs; effectiveness.