

ОЦЕНКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ МЯГКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ РЕДКОСШИТЫХ АКРИЛОВЫХ ПОЛИМЕРОВ

Ю. Н. Молчанова¹, А. Ю. Кулибин², А. А. Трубников¹, С. В. Онегин¹

¹Ярославский государственный медицинский университет

²ГБУЗ ЯО «Городская больница № 2 им. Н.И. Пирогова»

Поступила в редакцию 06.02.2018 г.

Аннотация. В данной статье рассматриваются производные редкосшитых акриловых полимеров как важные компоненты при разработке мягких лекарственных форм пролонгированного действия. При разработке лекарственного средства в виде геля, для последующего его применения в стоматологической практике, используются современные подходы, основанные на свойствах действующих и вспомогательных веществ.

При производстве лекарственных препаратов одним из основных показателей качества является микробиологическая чистота. С целью стандартизации показателей качества мягких лекарственных форм проведено исследование микробиологической чистоты шести образцов гелей сразу после изготовления и через 1, 3 и 6 месяцев хранения. Исследуемые образцы были проанализированы по показателям «Общее число аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов», «Количество бактерий *Staphylococcus aureus*» и «Количество бактерий *Pseudomonas aeruginosa*». В статье описаны методики аналитического контроля (среды для культивирования микроорганизмов, температура и продолжительность инкубации) и идентификации микроорганизмов. Отмечены особенности проведения испытаний. Также в статье приведены требования к качеству мягких лекарственных форм по показателю «Микробиологическая чистота» в соответствии с Государственной Фармакопеей РФ XIII.

В состав геля для нанесения на слизистую оболочку полости рта входили следующие компоненты: редкосшитый акриловый полимер Carbopol Ultrez 10 NF, нейтрализатор триэтаноламин, пластификатор полиэтиленгликоль 400, неорганический растворитель и действующие вещества в различной комбинации. В качестве действующих веществ использовались местноанестезирующее средство – лидокаина гидрохлорид, антисептическое средство – мирамистин и растительный экстракт комплексного противовоспалительного действия «Ротокан». Составы исследуемых образцов также приведены в статье.

Экспериментально установлено общее число аэробных микроорганизмов, плесневых и дрожжевых грибов, бактерий *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* чашечным агаровым методом в исследуемых образцах. Выявлена зависимость микробиологической чистоты мягкой лекарственной формы от ее состава, а так же времени хранения.

Ключевые слова: микробиологическая чистота, контроль качества, стоматологический гель, лидокаина гидрохлорид, мирамистин, Ротокан, редкосшитый акриловый полимер, Carbopol Ultrez 10 NF.

Одним из важнейших аспектов при разработке новых лекарственных препаратов является их стандартизация и всесторонняя оценка показателей качества, что гарантирует их безопасность и стабильность в течение всего срока годности. Также известно, что наряду с положительными сторонами мягких лекарственных форм с большим содержанием водной фазы (пролонгированное действие, удобство использования, возможность совмещения гидрофильных и гидрофобных

веществ в одном лекарственном препарате и т.д.), существует большая вероятность развития постоперационной микрофлоры в благоприятной дисперсионной среде и проявление токсических продуктов метаболизма микроорганизмов [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Микробиологическая чистота – один из показателей качества лекарственных средств. Особенно важно понимание бионагрузки лекарственной формы, которую предполагается наносить на слизистую оболочку полости рта [7, 8, 9].

Целью данной работы является оценка микробиологической чистоты нестерильной мягкой лекарственной формы в течение 6 месяцев.

МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения исследования было изготовлено шесть образцов мягких лекарственных форм различных составов, данные представлены в таблице 1. Все гели готовили в условиях лаборатории, используя нестерильную лабораторную посуду и исходные ингредиенты. Полученные гели переносили в алюминиевые тубы и герметично упаковывали [10, 11, 12, 13, 14].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Санитарно-бактериологическое исследование проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» Государственной Фармакопеи XIII.

Для количественного определения микроорганизмов в исследуемых образцах использовали чашечный агаровый метод. Для культивирования микроорганизмов использовали агаризованные питательные среды: среду №1 – для культивирования аэробных бактерий, агар Сабуро – для культивирования дрожжевых и плесневых грибов. Питательные среды с посевами инкубировали при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$. Для каждого разведения образца использовали по 3 чашки Петри с каждой из сред. Посевы исследовались визуально. Просмотр колоний производился через (48 – 72) часа (предварительный результат) и через 5 суток (окончательный результат) [7, 8, 15, 16].

Для выделения, идентификации и количественного определения энтеробактерий, использовали лактозный бульон (инкубировали 2 часа при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$) с последующим культивированием на среде обогащения №3 (инкубировали (18 – 48) часов при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$). При появлении роста производили пересев на среду №4 (инкубировали (18 – 24) часов при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$) с последующей идентификацией по морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам [15, 16].

Для выделения и идентификации бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa* использовали среду №8 (инкубировали (24 – 48) часов при темпера-

туре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$) с последующим пересевом на селективную питательную среду (ЦПХ-агар) и дальнейшей идентификацией по морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам [15, 16].

Для выделения и идентификации *Staphylococcus aureus* использовалась среда №8 (инкубировали (24 – 48) часов при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$) с последующим пересевом на селективную питательную среду (инкубировали (24 – 48) часов при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$) и дальнейшей идентификацией по морфологическим, тинкториальным, биохимическим и антигенным свойствам [15, 16].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с требованиями ГФ XIII в лекарственном препарате местного применения общее число аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов суммарно не должно превышать 10^2 КОЕ в 1 г (мл) препарата. *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* должны отсутствовать в 1 г (мл) препарата (категория 2) [15, 16, 17].

Из результатов, представленных в таблице 2, следует, что образцы гелей № 1, 2, 3, 4, проанализированных сразу после изготовления, не соответствуют по показателю «Общее число аэробных бактерий». В процессе хранения образцов наблюдалось снижение числа аэробных бактерий, что свидетельствует об отсутствии благоприятных факторов для развития микроорганизмов в исследуемых образцах. Образцы гелей № 3 и № 4 обладают меньшей бионагрузкой по сравнению с образцами гелей № 1 и № 2, что, предположительно, связано с присутствием в них мирамистина, обладающего выраженным противомикробным действием [10, 18, 19, 20].

Оптимальными по показателю «Микробиологическая чистота» являются гели, имеющие в своем составе ротокан – комплексный лекарственный препарат, содержащий жидкие экстракты ромашки, календулы и тысячелистника, а также ротокан совместно с мирамистином (образцы № 5 и № 6 соответственно).

Таблица 1

Состав анализируемых образцов

Образец	Действующие вещества	Вспомогательные вещества
1	Нет	Carbopol Ultrez 10 NF, триэтаноламин, полиэтиленгликоль 400, вода очищенная
2	Лидокаина гидрохлорид	Carbopol Ultrez 10 NF, триэтаноламин, полиэтиленгликоль 400, вода очищенная
3	Мирамистин	Carbopol Ultrez 10 NF, триэтаноламин, полиэтиленгликоль 400
4	Лидокаина гидрохлорид, Мирамистин	Carbopol Ultrez 10 NF, триэтаноламин, полиэтиленгликоль 400
5	Лидокаина гидрохлорид, Ротокан	Carbopol Ultrez 10 NF, триэтаноламин, полиэтиленгликоль 400, вода очищенная
6	Лидокаина гидрохлорид, мирамистин, ротокан	Carbopol Ultrez 10 NF, триэтаноламин, полиэтиленгликоль 400

Таблица 2

Микробиологические показатели исследуемых образцов

Образец	Анализируемый показатель	Срок хранения				Критерий приемлемости, КОЕ в 1 г (мл)
		После Изготовления	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	
1	Общее число аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов	5×10^2	8×10^1	Не обнаружено	Не обнаружено	Не более 10^2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Отсутствие
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Отсутствие
2	Общее число аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов	4×10^2	8×10^1	Не обнаружено	Не обнаружено	Не более 10^2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Отсутствие
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Отсутствие
3	Общее число аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов	2×10^5	4×10^1	Не обнаружено	Не обнаружено	Не более 10^2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Отсутствие
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Отсутствие
4	Общее число аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов	2×10^2	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не более 10^2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Отсутствие
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Отсутствие
5	Общее число аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов	5×10^1	2×10^1	Не обнаружено	Не обнаружено	Не более 10^2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Отсутствие
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Отсутствие
6	Общее число аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов	5×10^1	1×10^1	Не обнаружено	Не обнаружено	Не более 10^2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Отсутствие
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Отсутствие

По показателям «*Pseudomonas aeruginosa*» и «*Staphylococcus aureus*» все анализируемые образцы соответствуют на протяжении всего исследования.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии необходимости введения в разрабатываемый нами стоматологический гель (образцы № 5 и № 6) противомикробных консервантов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carpi Angelo. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications, Progress in Molecular and Environmental Bioengineering. Analysis and Modeling to Technology Applications, 201, pp. 117 – 150.
2. Chunjie Wu, Hongyi Qi, Wenwen Chen. Preparation and evaluation of Carbopol. HPMC-based in situ gelling ophthalmic system for puerarin. The pharmaceutical society of Japan, 2007, Vol. 127 (1), pp. 183 – 191.
3. Escobar – Chaves J.J., Lopez – Cervantes M., Naik A., Kalia Y.N., Quantar – Guerrero D., Ganem – Quintanar A. Applications of thermoreversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulation. J Pharm Pharmaceut Sci, 2006, № 3, pp. 339 – 358.
4. Harnish Patel, Priyanka Patel, Tushar Brahm-bhaatt, Mayur Suthar. In-situ gelling system: A review. J. of chemical and pharmaceutical research, 2011, Vol. 3 (6), pp. 217 – 221.
5. Prabhjotkaur. Topical formulations and Hydro-gel: An overview. International J. of advances in Pharmacy, Biology and Chemistry, 2013, Vol. 2 (1), pp. 201 – 206.
6. Roychowdhury Santanu, Singh Deep Hussan, Gupta Rajesh, Masih Daliit. A Review on pharmaceutical gel. International J of pharmaceutical research and bio-science, 2012, Vol. 1 (5), pp. 21 – 36.
7. Аюпова Г.В., Федотова А.А., Булякова А.Р., Давлетинина Р.Я. // «Изучение микробиологической чистоты сорбционных гелей», матер. научн.-практ. конф., Пермь, 2011, с. 35 - 37.
8. Ивахненко Е.Л., Стрилец О.П., Стрельников Л.С., Кустов П.С. // Человек и его здоровье. 2013. № 2. С. 102 - 105.
9. Панкрушева Т.А. Разработка лекарственных препаратов для лечения воспалительных заболеваний пародонта. Воронеж, 2003, № 2, с. 214 – 219.
10. Кривошеин Ю.С. Мирамистин. Москва, ООО «Медицинское информационное агентство», 2004, 156 с.

11. Федосов П.А., Сливкин А.И., Николаевский В.А., Бузлама А.В. Исследование острой токсичности, раздражающего и кожнорезорбтивного действия геля хитозана с таурином и аллантоином, Воронеж, 2015, № 4, с. 141 - 144.

12. Kolodziejska Justyna, Marian Mikolaj Zgoda. Auxiliary substances and applicative properties of modal dental gels with ketoprofen and therapeutic saline. Pharmaceutical technology, 2007, Vol. 63, pp. 453 – 459.

13. Molchanova J.N., Trubnikov A.A. Rheological study of Carbopol Ultrez 10 NF hydro-gel. Topical issues of new drugs development, April 21, 2016, Kharkiv, 2016, Vol. 1, p. 289.

14. Ricci E.J., Lunardi L.O., Nanclares D.M.A., Marchetti J.M. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gel. International J of pharmaceutics, 2005, pp. 235 – 244.

15. Государственная Фармакопея РФ XIII: ОФС 1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота».

Ярославский государственный медицинский университет

Молчанова Ю. Н., аспирант кафедры фармакогнозии и фармацевтической технологии

Тел.: +7 902 225-78-66

E-mail: molchanova.julya@gmail.com

Трубников А. А., доцент кафедры фармакогнозии и фармацевтической технологии

Тел.: +7 (903) 825-08-38

E-mail: atrub@rambler.ru

Онегин С. В., доцент кафедры фармакогнозии и фармацевтической технологии

Тел.: +7 (920) 105-41-15

E-mail: sergoneg@rambler.ru

ГБУЗ ЯО «Городская больница № 2 им. Н.И. Пирогова»

Кулибин А. Ю., заведующий бактериологической лабораторией, врач-бактериолог

Тел.: +7 (920) 109-25-88

E-mail: kulibin_2008@mail.ru

16. The European Pharmacopoeia. Strasbourg, 2013, Vol. 1, p. 1211.

17. Перцев И.М., Котенко А.М., Чуешов О.В. Фармацевтические и биологические аспекты мазей, Харьков, Изд-во НФаУ: Золотые страницы, 2003, 288 с.

18. Кривошеин, Ю. С. Дис. док. мед. наук. Киев, 1985, 35 с.

19. Hitesh R. Patel, Rakesh P. Patel, Patel M.M. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. International J of Pharmtech research, 2009, Vol.1, № 2, pp. 299 – 303.

20. Yvonne Tze Fung Tan, Kok Khiang Peh, Othmaan Al-Hanbali. Investigation of interpolymer complexation between Carbopol and various grades of polyvinylpyrrolidone and effects on adhesion strength and swelling properties. J of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2001, Vol. 4 (1), pp. 7 – 14.

Yaroslavl State Medical University

Molchanova J. N., post-graduate student of Pharmacognosy and Pharmaceutical technology Department

Ph.: +7 902 225-78-66

E-mail: molchanova.julya@gmail.com

Trubnikov A. A., assistant professor, Dept. of Pharmacognosy and Pharmaceutical technology

Ph.: +7 (903) 825-08-38

E-mail: atrub@rambler.ru

Onegin S. V., assistant professor, Dept. of Pharmacognosy and Pharmaceutical technology

Ph.: +7 (920) 105-41-15

E-mail: sergoneg@rambler.ru

City Hospital number 2 named after N.I. Pirogov

Kulibin A. J., head of the city hospital's bacteriological laboratory, bacteriologist

Ph.: +7 (920) 109-25-88

E-mail: kulibin_2008@mail.ru

EVALUATION OF MICROBIOLOGICAL PURITY OF SOFT MEDICINAL FORM WITH CROSS-LINKED ACRYLIC POLIMER

J. N. Molchanova¹, A. J. Kulibin², A. A. Trubnicov¹, S.V. Onegin¹

Yaroslavl State Medical University

The City Hospital № 2 named. N.I. Pirogov

Abstract. In this article, derivatives of the rare-crosslinked acrylic polymers are considered as important components in the development of soft dosage forms. In the development of a drug in the form of a gel,

for its subsequent application in dental practice, modern approaches based on the properties of active and auxiliary substances are used.

In the production of medicinal products, one of the main indicators of quality is microbiological purity. In order to standardize the quality indicators of the developed drug for the using in dental practice the microbiological purity of six soft dosage forms immediately after manufacture and after 1, 3 and 6 months of storage. The test samples were analyzed for «Total number of aerobic bacteria, yeast and mold fungi», «Staphylococcus aureus bacteria number» and «Pseudomonas aeruginosa bacteria number». In the article methods of control (environment for cultivation of microorganisms, temperature and duration of incubation) and identification of microorganisms are described in detail. Features of the analytical control are noted. Also in the article, the requirements for the quality of soft medicinal forms according to the indicator «Microbiological purity» in accordance with the State Pharmacopeia of the Russian Federation XIII are given.

The composition of gel to be applied to oral mucosa included: lightly cross-linked acrylic polymer Carbopol Ultrez 10 NF, triethanolamine, polyethyleneglycol 400, inorganic solvent and active ingredients in various combinations. The active agents used were the local anesthetic - lidocaine hydrochloride, antiseptic agent - miramistine and plant extract of the complex anti-inflammatory action Rotokan. The compositions of the test samples are also given in the article.

The content of aerobic microorganisms, mould and yeasts, bacteria Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa was determined by direct inoculation. The dependence of the microbiological purity of the soft dosage form on its composition, as well as on the storage time, has been revealed.

Keywords: microbiological purity, quality control, dental gel, lidocaine hydrochloride, miramistin, Rotokan, cross-linked acrylic polymer, Carbopol Ultrez 10 NF.

REFERENCES

1. Carpi Angelo. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications, Progress in Molecular and Environmental Bioengineering. Analysis and Modeling to Technology Applications, 201, pp. 117 – 150.
2. Chunjie Wu, Hongyi Qi, Wenwen Chen. Preparation and evaluation of Carbopol. HPMC-based in situ gelling ophthalmic system for puerarin. The pharmaceutical society of Japan, 2007, Vol. 127 (1), pp. 183 – 191.
3. Escobar – Chaves J.J., Lopez – Cervantes M., Naik A., Kalia Y.N., Quantar – Guerrero D., Ganem – Quintanar A. Applications of thermoreversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulation. J Pharm Pharmaceut Sci, 2006, № 3, pp. 339 – 358.
4. Harnish Patel, Priyanka Patel, Tushar Brahmabhaatt, Mayur Suthar. In-situ gelling system: A review. J. of chemical and pharmaceutical research, 2011, Vol. 3 (6), pp. 217 – 221.
5. Prabhjotkaur. Topical formulations and Hydrogel: An overview. International J. of advances in Pharmacy, Biology and Chemistry, 2013, Vol. 2 (1), pp. 201 – 206.
6. Roychowdhury Santanu, Singh Deep Hussan, Gupta Rajesh, Masih Daliit. A Review on pharmaceutical gel. International J of pharmaceutical research and bio-science, 2012, Vol. 1 (5), pp. 21 – 36.
7. Ayupova G.V, Fedotova A.A., Bulyakova A.R., Davletinina R.Ya. Izuchenie mikrobiologicheskoi chistoty sorbtsionnykh gelei, mater. nauchn.-prakt. Konf, Perm', 2011, pp. 35 – 37.
8. Ivakhnenko E.L., Strilets O.P., Strel'nikov L.S., Kustov P.S. Chelovek i ego zdorov'e, 2013. Vol. 2, pp. 102 – 105.
9. Pankrusheva T.A. Razrabotka lekarstvennykh preparatov dlya lecheniya vospalitel'nykh zabolevanii parodonta. Voronezh, 2003, Vol. 2, pp. 214 – 219.
10. Krivoshein Yu. S. Miramistin. Moscow, ООО «Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo», 2004, p. 156.
11. Fedosov P.A., Slivkin A.I., Nikolaevskii V.A., Buzlama A.V. Issledovanie ostroi toksichnosti, razdrazhayushchego i kozhnorezorbtiivnogo deistviya gelya khitozana s taurinom i allantoinom, Voronezh, 2015, Vol. 4, pp. 141 – 144.
12. Kolodziejska Justyna, Marian Mikolaj Zgoda. Auxiliary substances and applicative properties of modal dental gels with ketoprofen and therapeutic saline. Pharmaceutical technology, 2007, Vol. 63, pp. 453 – 459.
13. Molchanova J.N., Trubnikov A.A. Rheological study of Carbopol Ultrez 10 NF hydro-gel. Topical issues of new drugs development, April 21, 2016, Kharkiv, 2016, Vol. 1, p. 289.
14. Ricci E.J., Lunardi L.O., Nanclares D.M.A., Marchetti J.M. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gel. International J of pharmaceuticals, 2005, pp. 235 – 244.
15. Gosudarstvennaya Farmakopeya RF XIII: OFS 1.2.4.0002.15 «Mikrobiologicheskaya chistota».

16. The European Pharmacopaea. Strasbourg, 2013, Vol. 1, p. 1211.
17. Pertsev I.M., Kotenko A.M., Chueshov O.V. Farmatsevticheskie i biologicheskie aspekty mazei, Kharkiv, Izd-vo NFaU: Zoloty strany, 2003, p. 288.
18. Krivoshein, Yu. Dis. dok. med. nauk. Kiev, 1985, p. 35.
19. Hitesh R. Patel, Rakesh P. Patel, Patel M.M. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. International J of Pharmtech research, 2009, Vol.1, № 2, pp. 299 – 303.
20. Yvonne Tze Fung Tan, Kok Khiang Peh, Othmaan Al-Hanbali. Investigation of interpolymer complexation between Carbopol and various grades of polyvinylpyrrolidone and effects on adhesion strength and swelling properties. J of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2001, Vol. 4 (1), pp. 7 – 14.