

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ АНТИМІКРОБНОГО КОНСЕРВАНТА У СКЛАДІ КОМБІНОВАНОГО ГЕЛЮ

Бурбан О. І., Калужная О. С.

Національний фармацевтичний університет,  
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 стабільності лікарських засобів, для досягнення якої використовують речовини, які активно пригнічують ріст мікроорганізмів, що потрапляють у фармацевтичні системи в процесі виробництва і використання [1, 2].

**Мета роботи.** Експериментальне дослідження ефективності антимікробних консервантів комбінованого гелю для використання при променевих ураженнях шкіри.

**Матеріали та методи досліджень.** Випробування ефективності антимікробних консервантів проводили за методикою ДФУ 2.3, п. 5.1.3 [3].

Матеріали: живильні середовища: соєво-казеїновий агар, Сабуро-декстрозний агар; розчини – буферний розчин із натрію хлоридом та пептоном рН = 7,0, який містить 50 г / л полісорбату-80, 5 г / л лецитину, 1 г / л гістидину гідрохлориду.

Проводили перевірку стерильності живильних середовищ, розчинника та перевірку ростових властивостей поживних середовищ. Тест-культури мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Приготування інокуляту здійснювали згідно ДФУ 2.3, п. 5.1.3 [3].

Перевірка придатності методики визначення загального числа життєздатних мікроорганізмів. Підготовка зразка: 10 мл препарату вміщували у флакон, доводили об'єм до 100 мл буферним розчином із натрію хлоридом та пептоном рН = 7,0, який містить 50 г / л полісорбату-80, 5 г / л лецитину, 1 г / л гістидину гідрохлориду та струшували. В пробірці з розведенням препарату, підготовленими для кожного тест-мікроорганізму окремо, вносили

суспензію тест-штаму одного з видів мікроорганізмів, яка містить близько 1000 колонієутворювальних одиниць (КУО). Готували контроль тест-мікроорганізмів. Інокульовані зразки ретельно перемішували. По 1 мл із розведень препарату та контролів окремо для кожного тест-штаму, що містить не більше 100 КУО, висівали поверхневим методом на густі живильні середовища: соєво-казеїновий агар для виявлення бактерій та Сабуро-декстрозний агар для виявлення грибів.

Розчинник: буферний розчин із натрію хлоридом та пептоном рН = 7,0, який містить 50 г / л полісорбату-80, 5 г / л лецитину, 1 г / л гістидину гідрохлориду.

**Результати дослідження та їх обговорення.** За результатами попередніх досліджень було розроблено склад активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) та допоміжних речовин комбінованого гелю для використання при променевих ураженнях шкіри, однак він виявився нестабільним у процесі зберігання [4, 5].

З метою ефективного захисту лікарського засобу від мікробного забруднення у процесі зберігання та використання, були виготовлені зразки гелю із обраними консервантами, також у дослідженнях випробовували зразок гелю № 1 – без консервантів, діючі компоненти якого за даними літератури потенційно можуть володіти антимікробними властивостями (табл. 1).

Для проведення випробування ефективності обраних антимікробних консервантів кожен контейнер із зразком гелю інокульовали свіжовиготовленою суспензією із одним з тест-мікроорганізмів, при цьому забезпечуючи мікробне навантаження від  $10^5$  КУО до  $10^6$  КУО у 1 мл зразку, ретельно перемішували для їх рівномірного розподілу у об'ємі зразку та зберігали за температури від 20 до 25 °С у захищеному від світла місті. Безпосередньо після інокуляції та через 2, 7, 14 та 28 діб, із кожного зразка відбирали 1 мл проби і визначали кількість життєздатних мікроорганізмів методом прямого висівання на чашки. Критерієм оцінки ефективності консерванту у лікарській формі слугує зниження кількості життєздатних клітин тест-мікроорганізмів у препараті за певний період часу після його контамінації [3].

Таблиця 1. Експериментальні зразки комбінованого гелю

Інгредієнти	Номери зразків та кількість інгредієнтів, %							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Сік очитку	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Олія обліпихи	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Олія шипшини	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Олія звіробою	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Кверцитин	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Lannete SX	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
ГЕЦ	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25

Гліцерин	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
БОА	–	0,03	–	–	–	–	–	–
БОА	–	–	0,04	–	–	–	–	–
БОА	–	–	–	0,05	–	–	–	–
Калію сорбат	–	–	–	–	0,1	–	–	–
Калію сорбат	–	–	–	–	–	0,2	–	–
Калію сорбат	–	–	–	–	–	–	0,3	–
Калію сорбат БОА	–	–	–	–	–	–	–	0,1 0,03
Вода очищена до 100,0								

Згідно вимог ДФУ проводили перевірку стерильності живильних середовищ, розчинника, ростових властивостей живильних середовищ (соєво-казеїнового живильного середовища – для вирощування бактерій та Сабуро-декстрозного середовища без додавання антибіотика – для вирощування грибів) та перевірку придатності методики визначення загального числа життєздатних клітин [3].

Контролем при визначенні ростових якостей середовища служить стандартне середовище з гарантованими ростовими властивостями, на якому правильно проявляється кількісне та якісне зростання мікроорганізмів (морфологія колоній). 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 [3].

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 петеном рН = 7,0 із 5 % полісорбату-80, 0,5 % лецитину та 0,1 % гістидину гідро хлориду. Метод поверхневого висівання з розведенням зразків 1 : 10 з використанням типового нейтралізуючого розчинника, придатний для визначення кількості мікроорганізмів у зразках та може використовуватись у даному випадку при випробуванні ефективності антимікробних препаратів.

Результати, одержані при підрахунку кожного з тест-мікроорганізмів у присутності та за відсутності випробуваного зразка, відрізняються не більше як у 1,18 разів, що відповідає критерію прийнятності (не більше ніж в два рази).

Отже, метод поверхневого висівання на чашки з розведення препарату 1 : 10 (відповідно та подальших десятикратних розведень) з використанням стандартного розчинника придатний для визначення кількості мікроорганізмів у препараті та може використовуватися при проведенні випробування ефективності антимікробних консервантів.

Надалі проводили випробування ефективності антимікробних консервантів.

Результати ефективності антимікробних консервантів у зразках комбінованого гелю протягом 28 діб, наведено у табл. 2.

**Таблиця 2. Результати ефективності антимікробних консервантів у зразках комбінованого гелю**

Зразок	Концентрація консерванту, %	lg кількості життєздатних мікроорганізмів безпосередньо після інюляції, lg КУО/мл	lg зменшення кількості життєздатних мікроорганізмів, lg КУО/мл (вимоги ДФУ 2.3 / отримані результати)			
			2 доби	7 діб	14 діб	28 діб
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538						
Без консерванта		5,30	2 / 2,85	3 / 3,10	-	НЗ/НВ
Бутилоксанізол	0,03	5,28	2 / 3,03	3 / 3,50	-	НЗ/НВ
Бутилоксанізол	0,04	5,36	2 / 3,16	3 / 3,50	-	НЗ/НВ
Бутилоксанізол	0,05	5,34	2 / 3,14	3 / 3,53	-	НЗ/НВ
Калію сорбат	0,1	5,36	2 / 2,91	3 / 3,10	-	НЗ/НВ
Калію сорбат	0,2	5,38	2 / 2,96	3 / 3,34	-	НЗ/НВ
Калію сорбат	0,3	5,30	2 / 2,92	3 / 3,35	-	НЗ/НВ
Бутилоксанізол Калію сорбат	0,03 0,1	5,30	2 / 3,05	3 / 3,52	-	НЗ/НВ

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						
Без консерванта		5,44	2 / 1,15	3 / 2,53	-	НЗ/НЗ
Бутилоксанізол	0,03	5,48	2 / 2,74	3 / 3,70	-	НЗ/НВ
Бутилоксанізол	0,04	5,44	2 / 2,79	3 / 3,78	-	НЗ/НВ
Бутилоксанізол	0,05	5,51	2 / 2,97	3 / 3,78	-	НЗ/НВ
Калію сорбат	0,1	5,44	2 / 1,99	3 / 2,84	-	НЗ/НЗ
Калію сорбат	0,2	5,52	2 / 2,12	3 / 2,92	-	НЗ/НЗ
Калію сорбат	0,3	5,48	2 / 2,72	3 / 3,48	-	НЗ/НВ
Бутилоксанізол	0,03	5,48	2 / 2,76	3 / 3,70	-	НЗ/НВ
Калію сорбат	0,1					
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231						
Без консерванта		5,58	-	-	2 / 1,76	НЗ/НЗ
Бутилоксанізол	0,03	5,59	-	-	2 / 2,99	НЗ/НВ
Бутилоксанізол	0,04	5,59	-	-	2 / 2,98	НЗ/НВ
Бутилоксанізол	0,05	5,57	-	-	2 / 3,09	НЗ/НВ
Калію сорбат	0,1	5,54	-	-	2 / 3,06	НЗ/НВ
Калію сорбат	0,2	5,47	-	-	2 / 3,47	НЗ/НВ
Калію сорбат	0,3	5,58	-	-	НВ	НЗ/НВ
Бутилоксанізол	0,03	5,54	-	-	2 / 3,24	НЗ/НВ
Калію сорбат	0,1					
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404						
Без консерванта		5,57			2 / 1,65	НЗ/1,9
Бутилоксанізол	0,03	5,54	-	-	2 / 3,80	НЗ/НВ
Бутилоксанізол	0,04	5,52	-	-	НВ	НЗ/НВ
Бутилоксанізол	0,05	5,59	-	-	2 / 3,89	НЗ/НВ
Калію сорбат	0,1	5,59	-	-	2 / 3,87	НЗ/НВ
Калію сорбат	0,2	5,57	-	-	НВ	НЗ/НВ
Калію сорбат	0,3	5,53	-	-	НВ	НЗ/НВ
Бутилоксанізол	0,03	5,53	-	-	НВ	НЗ/НВ
Калію сорбат	0,1					

**Примітки:** НЗ – не спостерігається збільшення числа мікроорганізмів у порівнянні з кількістю життєздатних мікроорганізмів у попередній контрольній точці; НВ – не виявлено життєздатних клітин мікроорганізмів у досліді.

Результати, наведені у табл. 2, свідчать про те, що через 2 доби зберігання інокульованих зразків гелю із консервантом БОА Іg зменшення кількості життєздатних бактерій був більше 2 і складав при концентрації 0,03 % для *Staphylococcus aureus* 3,03, для *Pseudomonas aeruginosa* – 2,74; при концентрації 0,04 % для *Staphylococcus aureus* дорівнював 3,16, для *Pseudomonas aeruginosa* – 2,79; при концентрації 0,05 % для *Staphylococcus aureus* складав 3,14, для *Pseudomonas aeruginosa* – 2,97.

Через 7 днів зберігання інокульованих зразків гелю із консервантом БОА Іg зменшення кількості життєздатних бактерій був більше 3 і складав при концентрації 0,03 % для *Staphylococcus aureus* 3,50, для *Pseudomonas aeruginosa* – 3,70; при концентрації 0,04 % для *Staphylococcus aureus* дорівнював 3,51, для *Pseudomonas aeruginosa* – 3,74; при концентрації 0,05 % для *Staphylococcus aureus* складав 3,53, для *Pseudomonas aeruginosa* – 3,78.

Для клітин грибів *Candida albicans* на 14 добу Іg зменшення кількості життєздатних клітин у зразках з БОА 0,03 % склав 2,99 (за вимогами не менше 2), з БОА 0,04 % – 2,98, з БОА 0,05 % – 3,09. Для культури *Aspergillus brasiliensis* на 14 добу з БОА 0,03 % Іg зменшення складав 3,8, з БОА 0,04 % - не реєструвались, з БОА 0,05 % – 3,89. На 28 добу

життєздатні клітини бактерій та грибів у зразках гелю із БОА обраних концентрацій не виявлялися.

Виходячи з результатів табл. 2, зразки гелю із калію сорбатом у кількості 0,1, 0,2 та 0,3 % також проявляли антимікробну активність по відношенню до *Staphylococcus aureus*. Так, на 2 добу Іg зменшення кількості бактерій *Staphylococcus aureus* становив 2,91, 2,96 та 2,92 при концентрації калію сорбату 0,1, 0,2 та 0,3 %, відповідно; на 7 добу спостерігалась подібна тенденція – Іg зменшення кількості бактерій становив 3,10, 3,34 та 3,35 при концентрації калію сорбату 0,1, 0,2 та 0,3 %, відповідно; на 28 добу – клітини не виявлялись.

Для тест-мікроорганізма *Pseudomonas aeruginosa* при концентрації калію сорбату 0,1 % на 2 добу Іg зменшення кількості бактерій був менше 2 та на 7 добу був менше 3, що не відповідає вимогам ДФУ 2.3, і складав 1,99 та 2,84, відповідно; при концентрації калію сорбату 0,2 % на 2 добу дорівнював 2,12, а на 7 добу – 2,92, останній показник також не відповідає вимогам. На 28-у добу не спостерігалось збільшення числа мікроорганізмів у порівнянні з попередньою контрольною точкою. При концентрації калію сорбату 0,3 % показники відповідали вимогам у кожній контрольній точці і склали 2,72 та 3,48 на 2 та 7 добу та не реєструвались на 28 добу.

Для грибів *Candida albicans* на 14 добу спостереження I<sub>g</sub> зменшення кількості клітин дорівнював 3,06 та 3,47 та 3,14 у зразках із калію сорбатом в концентраціях 0,1 та 0,2 %, відповідно, і клітини не виявлялись при концентрації 0,3 %; а для *Aspergillus brasiliensis* – 3,87 (калію сорбату 0,1 %) і клітини не виявлялися при інших концентраціях. В обох випадках на 28 добу експерименту клітини даних тест-мікроорганізмів не реєструвалися.

При сумісному використанні БОА та калію сорбату у концентраціях 0,03 та 0,1 %, відповідно, спостерігалась наступні результати: I<sub>g</sub> зменшення кількості клітин *Staphylococcus aureus* дорівнював 3,05 та 3,52 на 2 та 7 добу; для *Pseudomonas aeruginosa* – 2,76 та 3,7 на 2 та 7 добу; для *Candida albicans* та *Aspergillus brasiliensis* на 14 добу – 3,24 та 3,88, відповідно; на 28 добу клітини даних тест-мікроорганізмів не реєструвалися.

Узагальнюючи результати табл. 2, зразок гелю без консерванта (№ 1) проходить мікробіологічний тест лише для бактерій *Staphylococcus aureus*, що підтверджує літературні дані щодо помірної антимікробної дії активних компонентів гелю, зокрема кверцетину, на грампозитивні бактерії. Але він не відповідає вимогам ДФУ, оскільки логарифм зменшення числа життєздатних мікроорганізмів бактерій *Pseudomonas aeruginosa* менше 2,0 і 3,0 через 2 доби і 7 діб відповідно. Для клітин грибів *Candida albicans* і *Aspergillus brasiliensis* на 14-у добу L<sub>g</sub> зменшення числа життєздатних клітин у зразках за вимогами ДФУ повинен бути не менше 2,0, а у зразку без консервантів спостерігаємо 1,76 та 1,65, відповідно, що також не відповідає вимогам. Отримані результати доводять необхідність додавання до складу розробленого гелю антимікробних консервантів.

Для гелю із БОА, калію сорбатом, можна відмітити відповідність отриманих даних вимогам ДФУ до препаратів для нашкодженого застосування для концентрацій БОА 0,03, 0,04, 0,05 %, калію сорбату 0,3 % та їх комбінації у мінімальних обраних концентраціях.

Отже, враховуючи вимоги безпечності та економічності при використанні консервантів, а також основні властивості бутилоксіанізолу як жиророзчинного антиоксиданта для створення оксистабільних композицій, найбільш прийнятним консервантом при створенні гелю із рослинними оліями представляється БОА у мінімально дієвій із досліджуваної концентрації – 0,03 %. Зразки гелю з консервантом у обраній концентрації були закладені на збереження для визначення показників якості протягом терміну зберігання.

**Висновки.** Мікробіологічні випробування експериментальних зразків комбінованого гелю для використання при променевих ураженнях шкіри дозволили визначити, що консерванти БОА у концентраціях 0,03, 0,04 та 0,05 %, а також калію сорбат у концентрації 0,3 % та їх комбінація (БОА

0,03 %, калію сорбат 0,1 %) мають високу антимікробну ефективність і відповідають вимогам ДФУ 2.3 критерію А до препаратів для нашкодженого застосування.

### **Experimental justification of the choice of antimicrobial preservative in the combined gel** **Burban O. I., Kaliuzhnaia O. S.**

**Introduction.** The presence of microorganisms in non-sterile drugs could cause a reduction or even inactivation of their therapeutic effect, so at the stage of pharmaceutical development it should be considered to ensure the stability of drugs. **Materials and methods.** Tests of the effectiveness of antimicrobial preservatives were performed according to the method of SPhU 2.3, article 5.1.3. Materials: nutrient media: soy-casein agar, Saburo-dextrose agar; solutions - buffer solution with sodium chloride and peptone pH = 7.0, which contains 50 g/l of polysorbate-80, 5 g/l of lecithin, 1 g/l of histidine hydrochloride. The sterility of nutrient media, solvent and growth properties of nutrient media were tested. Test cultures of microorganisms: *St. aureus* ATCC 6538, *Ps. aeruginosa* ATCC 9027, *C. albicans* ATCC 10231, *As. brasiliensis* ATCC 16404. Preparation of the inoculum was carried out according to SPhU 2.3, item 5.1.3. **Results and discussion.** According to the research, a sample of gel without preservative (№ 1) undergoes microbiological testing only for bacteria *St. aureus*, which confirms the literature on the moderate antimicrobial action of the active components of the gel, in particular quercetin, on gram-positive bacteria. But it does not meet the requirements of SPhU, because the logarithm of the reduction of the number of viable microorganisms *Ps. aeruginosa* less than 2.0 and 3.0 after 2 days and 7 days, respectively. For cells of fungi *C. albicans* and *As. brasiliensis* on the 14th day L<sub>g</sub> reduction of the number of viable cells in the samples according to the requirements of SPhU should be at least 2.0, and in the sample without preservatives observed 1.76 and 1.65, respectively, which also does not meet the requirements. The obtained results prove the need to add antimicrobial preservatives to the composition of the developed gel. Given the requirements of safety and economy when using preservatives, as well as the main properties of butyloxylanisole as a fat-soluble antioxidant to create oxystable compositions, the most acceptable preservative in creating a gel with vegetable oils is butyloxylanisole in the least effective of the studied concentrations - 0.03%. Samples of the gel with the preservative in the selected concentration were stored for quality studies.

**Key words:** combined gel, antimicrobial preservatives, stonecrop juice, fatty oils, stability.

### **References**

1. Nastanova 42–3.3:2004. Nastanovy z yakosti. Likars'ki zasoby: Vyprovuvannya stabil'nosti / Ministerstvo okhorony zdorov'ya Ukrainy. Ofits. vyd. Kyiv : Vyd–vo TOV «Morion». 2004. 60 s.
2. Dopomizhni tekhnolohiyi v likiv: vplyv na

- tehnolohichni, spozhyvchi, ekonomichni kharakterystyky ta terapevtychnu efektyvnist' : navch. posib. dlya stud. vyshch. farmats. navch. zakl. / avt.-uklad.: I. M. Pertsev ta in. ; za red. I. M. Pertseva. Kharkiv : Zoloti storinky. 2010. 600 c.
3. State Pharmacopeia of Ukraine. / 2-e vyd. T. 3. Kharkiv.: 2018. 415 s.
4. Burban O. I., Vyshnevs'ka L. I., Zubchenko T. M. Doslidzhennya z rozrobky tekhnolohiy soku ochytka velykoho, yak biohennoho stymulyatora dlya oderzhannya likars'kykh zasobiv. *Upravlinnya, ekonomika ta zabezpechennya yakosti v farmatsiyi*. 2021. № 1 (65). S. 14–20.
5. Burban O. I., Vyshnevs'ka L. I., Zubchenko T. M. Doslidzhennya z rozrobky osnov helyu protyzapal'noyi ta ranozahoyuval'noyi diyi dlya likuvannya promenevykh ushkodzen' shkiry // *Suchasni aspekty stvorennya ekstemporal'nykh alopatychnykh, homeopatychnykh ta kosmetychnykh likars'kykh zasobiv*. X.: Vyd-vo NFaU. 2020. S. 42–45.