

ОБҐРУНТУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ АНТИМІКРОБНИХ КОНСЕРВАНТІВ І МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ МЕДИЧНОГО ОЛІВЦЯ В ПРОЦЕСІ ЗБЕРІГАННЯ

Нестерук Т.М., Стрілець О.П., Половко Н.П.

Національний фармацевтичний університет, м.
Харків, Україна

Вступ. Стандартизація лікарських засобів є основним гарантом їх високої якості при виробництві і забезпечує ефективність і безпечність їх використання протягом всього терміну зберігання. Необхідність контролю якості лікарських препаратів, зокрема мікробіологічного контролю, пояснюється важливістю забезпечення їх безпечності і ефективності, тобто зниження ризику виникнення сторонніх реакцій при використанні споживачем.

Починаючи з розробки нових фармацевтичних препаратів, та на всіх етапах виробництва необхідно проводити оцінку вірогідності ризику випуску неякісних засобів, чітко контролювати процес за для забезпечення якості готової продукції. Мікробіологічні методи при цьому займають особливе місце, а саме – визначення мікробіологічної чистоти активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ), допоміжних речовин і лікарських препаратів, біологічної стабільності лікарської форми протягом всього терміну зберігання [1]. Тому мікробіологічні дослідження є важливими показниками якості і безпечності використання лікарських препаратів. Результати мікробіологічних досліджень препаратів повинні бути максимально точними і надійними, ризик отримання псевдонегативних результатів повинен бути зведений до мінімуму.

Мета роботи – обґрунтування вибору і оптимальної концентрації антимікробного консерванту, вивчення мікробіологічної чистоти нової лікарської форми репаративної, протизапальної, антимікробної і противірусної дії у формі медичного олівця (бальзаму) у відповідності з методиками Державної фармакопеї України (ДФУ) в процесі зберігання.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження є зразки нового лікарського препарату у формі медичного олівця. При отриманні медичного олівця в якості АФІ використовували екстракт манго, олійний екстракт ЛРС (екстракт отримували з листя шавлії і евкаліпту, а також квіток нагідок і ромашки). Як допоміжні компоненти - масло какао, бджолиний віск, ланолін, карнаубський віск, канделільський віск [2]. В якості консервантів, які рекомендуються при розробці лікарських засобів на воскожировій основі за даними наукової літератури були обрані пропілпарабен (ніпазол) і феноксіетанол в середньоєфективних, рекомендованих виробником концентраціях [3, 4].

Протимікробна дія обраних консервантів спрямована безпосередньо на клітини мікроорганізмів, як грибів так і бактерій і полягає в інгібуванні активності ферментної системи та руйнуванні клітинних оболонок. Ніпазол, як представник парабенів має широкий спектр дії, порушує проникність цитоплазматичної мембрани клітини мікроорганізму, в результаті змінюється транспортна функція мембрани, що призводить до загибелі клітини [5]. Феноксіетанол ефективний щодо різних грамнегативних і грампозитивних бактерій, а також щодо дріжджових грибків і має лише слабку інгібувальну дію на резидентну шкірну флору. Механізм протимікробної дії феноксіетанолу полягає у гідрофобній взаємодії з цитоплазматичними мембранами мікроорганізмів, в підвищенні проникності клітинної мембрани для іонів калію і прямій інгібувальній дії на мікробний синтез ДНК та РНК [6].

Першим етапом проведених досліджень було визначення ефективності обраних антимікробних консервантів і обґрунтування концентрації консерванту для розробки складу і технології медичного олівця. Усі дослідження виконували у асептичних умовах, з використанням ламінарного боксу (кабінет біологічної безпеки АС2-4Е1 «Eisco», Індонезія).

При дослідженнях використовували методику оцінки ефективності антимікробних консервантів, наведену в ДФУ [7]. При проведенні дослідів в зразки готової лікарської форми які знаходяться у первинній упаковці, з різними консервантами і різними їх концентраціями, вносили певну кількість тест-мікроорганізмів і зберігали дані зразки при певній температурі (від 20 до 25 °С) у захищеному від світла місці. Безпосередньо після інокуляції і через визначені проміжки часу (лікарські засоби для зовнішнього застосування – 2, 7, 14 і 28 діб зберігання) із інокульованих зразків відбирали проби (звичайно 1 г) і визначали число життєздатних мікроорганізмів.

В якості тест-мікроорганізмів для інокуляції зразків згідно вимог ДФУ використовували *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 [7].

Перед проведенням досліджень проводили досліди на відповідність ростових властивостей поживних середовищ, для цього поживні середовища інокулювали малою кількістю тест-штамів мікроорганізмів ($10 \cdot 10^2$ колонієутворюючих одиниць на мл середовища – КУО/мл) і визначали кількість колоній (КУО/мл), що вирости. Вихідну культуру кожного із зазначених тест-мікроорганізмів пересівали на поверхню густого живильного середовища: у разі вирощування бактерій – соєво-казеїнового (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*), при використанні грибів (*Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) Сабуро-декстрозного середовища без додавання антибіотиків. Отримані результати показали, що всі культури

мікроорганізмів відповідали таксономічному позначенню штаму, морфологія колоній при культивуванні на поживних середовищах, морфологія клітин при мікроскопії була типовою і таким чином, ростові властивості поживних середовищ повністю відповідають вимогам ДФУ.

Культури бактерій *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* інкубували у термостаті ТСО-80 при температурі 30-35 °С протягом 18-24 год, культуру *Candida albicans* інкубували при температурі 20-25 °С протягом 2-3 діб, культуру *Aspergillus brasiliensis* при температурі 20-25 °С – 7 діб.

Для приготування суспензій бактеріальних культур і культури гриба *Candida albicans* мікробну масу змивали з поверхні поживного середовища стерильним суспендуючим розчином, що вміщує 9 г/л натрію хлориду Р, переносили у стерильну пробірку і доводили вміст мікроорганізмів до 10^8 клітин у мл. При приготуванні суспензії культури *Aspergillus brasiliensis* використовували стерильний суспендуючий розчин, який містить 9 г/л натрію хлориду Р і 0,5 г/л полісорбату-80 Р і доводили вміст спор до 10^8 у мл. З кожної суспензії зразу після її приготування відбирали пробу і визначали КУО/мл кожної суспензії шляхом прямого висіву на чашки Петрі на щільні поживні середовища, які використовували для початкового вирощування тест-культур.

До кожного зразка олівця, що досліджується з різними антимікробними консервантами, вносили суспензію з вмістом тест-мікроорганізмів з навантаженням 10^8 КУО в 1 мл. У самому зразку мікробне навантаження мало становити від 10^5 КУО/мл до 10^6 КУО/мл.

Критерієм оцінки ефективності антимікробних консервантів було визначення логарифму (lg) зменшення кількості життєздатних клітин мікроорганізмів за відповідний період зберігання після контамінації зразків. У відповідності до вимог ДФУ в препаратах засобів для зовнішнього застосування логарифм зменшення числа життєздатних клітин бактерій повинен складати через 2 доби не менше 2-х, через 7 діб – не менше 3-х, через 28 діб - число життєздатних клітин бактерій не повинно збільшуватись у порівнянні з кількістю життєздатних мікроорганізмів у попередній контрольній точці. Логарифм зменшення числа життєздатних клітин грибів через 14 діб повинен складати не менше 2-х, через 28 діб - число життєздатних клітин грибів не повинно збільшуватись у порівнянні з кількістю життєздатних мікроорганізмів у попередній контрольній точці. Ці показники відповідають критерію «А». Відповідно до критерію «В» у препаратах для місцевого застосування логарифм зменшення кількості життєздатних бактерій за 14 діб має складати не менше 3-х, у подальшому (28 діб) кількість життєздатних бактерій не повинна збільшуватись. Логарифм зменшення кількості життєздатних грибів за 14 діб має складати не менше 1 і в подальшому (28

діб) не збільшуватись. Наявність життєздатних клітин мікроорганізмів і грибів на 28 добу дослідження свідчить про те, що препарат не відповідає критеріям «А» або «В» і вимогам ДФУ [7].

Після інокуляції мікроорганізмами досліджуваних зразків олівців (навантаження 10^5 КУО/г – 10^6 КУО/г), з кожного зразка відбирали проби: відразу після обсіменіння та через певні інтервали часу (2, 7, 14 і 28 діб), методом прямого посіву висівали на агаризовані поживні середовища на чашки Петрі для визначення кількості життєздатних мікроорганізмів і розрахунку логарифму зменшення кількості життєздатних мікроорганізмів.

Зразки олівцю медичного без консервантів були також інокульовані культурами мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 і зберігались упродовж 28 діб.

Другим етапом мікробіологічних досліджень було визначення біологічної стабільності нового лікарського засобу у формі олівця при різних температурних умовах протягом певного терміну зберігання. Мікробіологічну чистоту досліджуваних зразків визначали відразу після отримання і в процесі зберігання при температурі $25 \pm 2^\circ\text{C}$ та $5 \pm 3^\circ\text{C}$ через 3, 6, 9, 12 і 15 місяців [8].

При аналізі мікробіологічної чистоти використовували метод поверхневого висівання, що пропонує ДФУ, проводили визначення загальної кількості життєздатних аеробних мікроорганізмів (ТАМС), загальної кількості дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) і встановлення відсутності бактерій родини *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* [7].

Для перевірки придатності методики визначення загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів і грибів використовували мікроорганізми з американської колекції культур (ATCC) і підготовку тест-мікроорганізмів проводили відповідно до вимог ДФУ.

У відповідності з рекомендаціями ДФУ під час випробувань використовували наступні густі та рідкі живильні середовища: соєво-казеїновий агар (для визначення загальної кількості життєздатних аеробних мікроорганізмів (ТАМС)), Сабуро-декстрозний агар (для визначення загальної кількості дріжджових та плісневих грибів (ТУМС)), соєво-казеїновий бульйон (для попереднього інкубування при визначенні наявності певних видів мікроорганізмів), манітно-сольовий агар (для ідентифікації *Staphylococcus aureus*), цетримідний агар (для ідентифікації *Pseudomonas aeruginosa*). Живильні середовища відповідали вимогам за ростовими, інгібіторними та індикативними властивостями, витримували випробування на стерильність відповідно до вимог ДФУ.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили згідно вимог ДФУ [7].

Результати та обговорення

Для аналізу антимікробної ефективності консервантів досліджували зразки олівців медичних, де зразок №1 додатково містив ніпазол 0,02%; зразок №2 – ніпазол 0,04%; зразок №3 – ніпазол 0,06%, зразок №4 – феноксіетанол 0,2%, зразок №5 – феноксіетанол 0,4%, зразок №6 – феноксіетанол 0,6%, зразок №7 – не містив консервантів.

Результати дослідження антимікробної ефективності консервантів наведено в табл. 1. Одержані експериментальні дані свідчать про те, що за мікробіологічними показниками дослідні зразки олівцю без консерванту №7 не відповідають вимогам ДФУ, тому що логарифм зменшення числа життєздатних мікроорганізмів бактерій (*Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa*) менше 2,0 і 3,0 через 2 доби і 7 діб відповідно і кількість бактерій *Pseudomonas aeruginosa* подовжує збільшуватися через 28 діб (2,91). Для клітин грибів *Candida albicans* і *Aspergillus brasiliensis* на 14-у добу Lg зменшення числа життєздатних клітин у зразках за вимогами ДФУ має бути не менше 2,0, а у зразках №7 спостерігаємо 1,82 (*Candida albicans*) і 1,78 (*Aspergillus brasiliensis*), що також не відповідає вимогам.

Таким чином, одержані результати доводять необхідність додавання до складу розробленого медичного олівця антимікробних консервантів.

За результатами даних, наведених в таблиці, можна зробити висновок, що досліджувані зразки олівцю з консервантами ніпазол 0,04%, 0,06% і феноксіетанолом 0,4%, 0,6% повністю відповідають вимогам ДФУ (критерій класу «А») як по відношенню до клітин мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 і *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, так і грибів *Candida albicans* ATCC 885-653 і *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Отримані дані, наведені у таблиці, свідчать про те, що після 2-х діб зберігання інокульованих зразків олівця з різними консервантами ніпазол 0,04% і 0,06% і феноксіетанолом 0,4% і 0,6% логарифм зменшення числа життєздатних мікроорганізмів для культури *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 був не менше 2,0, що відповідає вимогам ДФУ (табл.1). Для

культури *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 логарифм зменшення числа життєздатних мікроорганізмів склав для зразків з консервантом ніпазол 0,04% і 0,06% – 2,34 і 3,10; для зразків з феноксіетанолом 0,4% і 0,6% – 2,86 і 3,05 відповідно. Усі отримані значення логарифму були не менше 2,0, що відповідає вимогам ДФУ. Для зразків олівцю з консервантом ніпазол 0,02% і феноксіетанолом 0,2% логарифм зменшення числа життєздатних мікроорганізмів після 2-х діб зберігання склав для культури *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 – 1,65 і 1,98, що не відповідає вимогам ДФУ (логарифм зменшення числа життєздатних клітин бактерій менше 2-х).

На 7-у добу логарифм зменшення числа життєздатних клітин *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 для всіх досліджуваних зразків олівцю з консервантами ніпазол і феноксіетанол всіх концентрацій був більше 3,0, що повністю відповідає вимогам.

На 28-у добу інкубації в зразках з консервантами ніпазолом 0,02%, 0,04%, 0,06% та феноксіетанолом 0,2%, 0,4%, 0,6% життєздатні мікроорганізми бактерій *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 і *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 не були виявлені, що відповідає вимогам.

Для клітин грибів *Candida albicans* ATCC 885-653 і культури *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 на 14-у добу Lg зменшення числа життєздатних клітин у зразках олівця з консервантами був більше 2,0, або клітини грибів не виявлялися. На 28-у добу зберігання інокульованих зразків з усіма консервантами ніпазол 0,02%, 0,04%, 0,06% і феноксіетанолом 0,2%, 0,04%, 0,06% життєздатні клітини грибів *Candida albicans* ATCC 885-653 і *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 не виділялися в жодному з зразків. Слід зазначити, що динаміка зменшення кількості життєздатних клітин як бактерій так і грибів на 2-у, 7-у і 14-у добу більш значна у зразків з консервантом феноксіетиленом 0,4% і 0,6% ніж у зразків з ніпазолом 0,04%, 0,06% (табл. 1).

Таблиця 1. Результати дослідження антимікробної ефективності консервантів у досліджуваних зразках олівцю медичного (n = 5, P = 95%)

Тест-культури мікроорганізмів	Консервант (концентрація, %)	Мікробне навантаження після інокуляції, lg КУО/мл	Lg зменшення вихідного мікробного навантаження (вимоги ДФУ/зразок)			
			2 доби	7 діб	14 діб	28 діб
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	№1 ніпазол 0,02%	5,74	2/2,33	3/3,20	-	НЗ/НВ
	№2 ніпазол 0,04%	5,90	2/3,08	3/4,04	-	НЗ/НВ
	№3 ніпазол 0,06%	5,66	2/3,60	3/4,52	-	НЗ/НВ
	№4 феноксіетанол 0,2%	5,70	2/2,10	3/4,06	-	НЗ/НВ
	№5 феноксіетанол 0,4%	5,92	2/3,26	3/НВ	-	НЗ/НВ
	№6 феноксіетанол 0,6%	5,72	2/3,65	3/НВ	-	НЗ/НВ

	№7 без консерванта	5,70	2/1,38	3/2,54	-	НЗ/НЗ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	№1 ніпазол 0,02%	5,82	2/1,65	3/3,03	-	НЗ/НВ
	№2 ніпазол 0,04%	5,80	2/2,34	3/4,05	-	НЗ/НВ
	№3 ніпазол 0,06%	5,90	2/3,10	3/4,39	-	НЗ/НВ
	№4 феноксіетанол 0,2%	5,86	2/1,98	3/3,59	-	НЗ/НВ
	№5 феноксіетанол 0,4%	5,72	2/2,86	3/НВ	-	НЗ/НВ
	№6 феноксіетанол 0,6%	5,64	2/3,05	3/НВ	-	НЗ/НВ
	№7 без консерванта	5,72	2/0,94	3/1,56	-	НЗ/2,91
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	№1 ніпазол 0,02%	5,68	-	-	2/3,50	НЗ/НВ
	№2 ніпазол 0,04%	5,90	-	-	2/3,97	НЗ/НВ
	№3 ніпазол 0,06%	5,74	-	-	2/НВ	НЗ/НВ
	№4 феноксіетанол 0,2%	5,58	-	-	2/4,26	НЗ/НВ
	№5 феноксіетанол 0,4%	5,60	-	-	2/НВ	НЗ/НВ
	№6 феноксіетанол 0,6%	5,62	-	-	2/НВ	НЗ/НВ
	№7 без консерванта	5,72	-	-	2/1,82	НЗ/2,88
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	№1 ніпазол 0,02%	5,90	-	-	2/3,22	НЗ/НВ
	№2 ніпазол 0,04%	5,72	-	-	2/НВ	НЗ/НВ
	№3 ніпазол 0,06%	5,48	-	-	2/НВ	НЗ/НВ
	№4 феноксіетанол 0,2%	5,64	-	-	2/3,98	НЗ/НВ
	№5 феноксіетанол 0,4%	5,70	-	-	2/НВ	НЗ/НВ
	№6 феноксіетанол 0,6%	5,82	-	-	2/НВ	НЗ/НВ
	№7 без консерванта	5,70	-	-	2/1,78	НЗ/2,94

Примітка: НВ – мікроорганізми не виявляються; НЗ – не спостерігається збільшення числа мікроорганізмів; «-» - не потребує визначення за методикою

ході проведення експерименту було встановлено, що досліджувані зразки олівцю медичного з консервантами ніпазол 0,04% і 0,06% і феноксіетанолом 0,4% і 0,6% відповідають критерію «А» за вимогами ДФУ для нестерильних лікарських препаратів для зовнішнього використання і є перспективними для подальших досліджень з розробки складу та технології лікарської форми для профілактики і лікування інфекційно-запальних захворювань шкіри губ.

За результатами проведених досліджень встановлено, що зразки з консервантами ніпазол 0,02% і феноксіетанол 0,2% не відповідають вимогам ДФУ за показником «Антимікробна ефективність консервантів» (логарифм зменшення числа життєздатних мікроорганізмів для культури *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 менше 2,0).

На підставі проведених досліджень встановлено доцільність введення до складу олівцю медичного консерванту феноксіетанолу як більш ефективного і обрано оптимальну концентрацію 0,4 %, подальше збільшення концентрації не є доцільним.

Виготовлені зразки олівцю з консервантом феноксіетанолом у обраній концентрації 0,4% були закладені на збереження протягом 15 місяців для визначення показників якості протягом терміну зберігання.

Другим етапом досліджень було вивчення мікробіологічної чистоти розробленого лікарського засобу протягом терміну зберігання. Відповідно до

вимог ДФУ досліджувані зразки медичного олівця повинні відповідати критеріям прийнятності мікробіологічної чистоти нестерильних лікарських форм як засоби для зовнішнього застосування: загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів (ТАМС) не повинна перевищувати 10^2 КУО/г і дріжджових і плісневих грибів (ТУМС) 10^1 КУО/г. Також повинні бути відсутні бактерії *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* [7].

Для усунення антимікробної дії зразків використовували розведення лікарської форми 1:10 та додавали типову нейтралізуючу рідину (3%-й розчин полісорбата-80, 0,3%-й розчин соєвого лецитину, 0,1%-й розчин гістидину гідрохлориду).

Для проведення одного аналізу відбирали 10,0 г досліджуваного зразка, додавали стерильний буферний розчин з натрію хлоридом і пептоном (рН 7,0) з нейтралізуючою рідиною, проводили нагрівання суміші до 40 °С на водяній бані і доводили об'єм до 100 мл (розведення 1:10).

Результати перевірки придатності методики визначення загального числа аеробних мікроорганізмів і дріжджових та плісневих грибів випробовуваних зразків в розведенні 1:10 наведені в табл. 2 та 3.

Результати дослідження, представлені в табл. 2, показали, що досліджувані зразки в умовах випробування на мікробіологічну чистоту на живильному соєво-казеїновому середовищі в розведенні 1:10 при додаванні нейтралізуючої рідини не виявляють протимікробну дію по відношенню до бактеріальних культур мікроорганізмів *S. aureus*

ATCC 6538, *P.aeruginosa* ATCC 9027, *B. subtilis* ATCC 6633.

Таблиця 2. Результати перевірки придатності методики визначення загального числа аеробних мікроорганізмів

Об'єкт дослідження	Середнє число КУО в 1,0 г зразка					
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538		<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	
	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль
	соєво-казеїновий агар					
медичний олівець (розведення 1:10+нейтралізуюча рідина)	98	101	102	96	96	102

Результати, представлені в табл. 3, показали, що досліджуваний засіб в умовах випробування на мікробіологічну чистоту на Сабуро-декстрозному агарі в розведенні 1:10 при додаванні нейтралізуючої

рідини не проявляє пригнічувальної дії на життєздатність грибів *C. albicans* ATCC 10231 і *A. brasiliensis* ATCC 16404.

Таблиця 3. Результати перевірки придатності методики визначення загального числа дріжджових та плісневих грибів

Об'єкт дослідження	Середнє число КУО в 1 г зразка			
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	
	дослід	контроль	дослід	контроль
	сабууро-декстрозний агар			
медичний олівець (розведення 1:10+нейтралізуюча рідина)	100	98	96	102

Таким чином, дані наведені у табл. 2 та 3 свідчать про придатність методики для випробування на загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів і грибів зразків медичного олівцю у розведенні 1:10 з додаванням нейтралізуючої рідини.

Результати визначення мікробіологічної чистоти зразків лікарського засобу медичного олівцю у різних умовах зберігання наведені у табл. 4-5.

Визначення мікробіологічної чистоти (табл. 4-5) зразків лікарського засобу медичного олівцю методом поверхневого висівання показало, що загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів (ТАМС) складає 10 КУО/г через 12 міс зберігання при температурі $25 \pm 2^\circ\text{C}$ і 10 КУО/г через 15 міс зберігання при температурі $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Загальне число дріжджових і плісневих грибів (ТУМС) не перевищує 10 КУО/г протягом всього періоду зберігання (15 міс) при двох температурних режимах зберігання.

Проведені дослідження показали, що протягом всього періоду зберігання при різних умовах наявності бактерій *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* не було виявлено.

Таким чином, за показниками загальної кількості життєздатних аеробних бактерій і грибів, а

також відсутності бактерій *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* усі досліджувальні зразки медичного олівця при різних умовах зберігання протягом 15 місяців відповідають вимогам ДФУ.

Висновки

1. Проведено мікробіологічні дослідження із вивчення ефективності антимікробних консервантів ніпазолу, феноксітанолу у складі олівцю медичного, що містить екстракт манго, олійний екстракт суміші ЛРС і масло какао, воски бджолиний, карнаубський, канделільський і ланолін.

2. На підставі отриманих результатів експериментально обґрунтовано доцільність використання як консерванту феноксітанолу у концентрації 0,4%.

3. Експериментально досліджено мікробіологічну чистоту зразків медичного олівця при різних температурних умовах ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ та $5 \pm 3^\circ\text{C}$) протягом 15 місяців зберігання методом поверхневого висівання у відповідності до вимог ДФУ.

4. Доказано, що за показниками загальної кількості життєздатних аеробних бактерій і грибів, а також відсутності бактерій *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* досліджувальні зразки

медичного олівця при різних умовах зберігання протягом 15 місяців відповідають вимогам ДФУ.

Justification of the effectiveness of antimicrobial preservatives and microbiological control of the medical pencil in the storage process

Nesteruk T.M., Strilets O.P., Polovko N.P.

Microbiological purity and stability of medicinal products is a prerequisite for their introduction into production and medical use. The need for microbiological control of medicines is explained by the importance of ensuring their safety and, accordingly, reducing the risk of adverse reactions when used by the consumer. The purpose of the work is to substantiate the choice and optimal concentration of an antimicrobial preservative, to study the microbiological purity of a medical pencil with reparative, anti-inflammatory, antimicrobial and antiviral effects in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU) during storage. **Material & methods.** The objects of the study are samples of a new drug in the form of a medical pencil. When obtaining a medical pencil, mango extract and oil extract of medicinal plant raw material were used as APIs (the extract was obtained from sage, marigold, chamomile and eucalyptus), cocoa butter, beeswax, lanolin, carnauba wax, candelilla wax were used as excipients. Propylparaben (Nipazol) and phenoxyethanol were selected as preservatives recommended for the development of medicinal products according to the scientific literature in medium-effective concentrations recommended by the manufacturer. Testing the effectiveness of antimicrobial preservatives and determining the microbiological purity of the dosage form under different temperature conditions for 15 months was carried out according to the State Pharmacopoeia of Ukraine method. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 were used as test microorganisms. Nutrient media and research conditions were used in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine. The criterion for evaluating of antimicrobial preservatives' effectiveness was determination of the logarithm (lg) of decrease in the number of viable cells of microorganisms during the corresponding period of storage after sample contamination. The microbiological purity of the studied samples was determined immediately after obtaining and during storage at a temperature of $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and $5 \pm 3^\circ\text{C}$ after 3, 6, 9, 12 and 15 months. The method of surface seeding offered by State Pharmacopoeia of Ukraine was used for the analysis of microbiological purity, the total number of viable aerobic microorganisms (TAMS), the total number of yeast and mold fungi (TYMC) and the absence of bacteria of the *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* family were determined. **Results & discussion.** The obtained experimental results showed that, according to microbiological indicators, the samples of the pencil without preservative № 7 do not meet the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine, because the logarithm of the decrease in the number of viable bacterial microorganisms (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) is less than 2.0 and 3.0 after 2 days and 7 days,

respectively, and the number of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria continues to increase after 28 days (2.91). The Lg of decrease in the number of viable cells in the samples for the cells of *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis* fungi should be at least 2.0 on the 14th day according to the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine, while in samples № 7 we observed 1.82 (*Candida albicans*) and 1.78 (*Aspergillus brasiliensis*), which also does not meet the requirements. Thus, the obtained results prove the necessity of adding antimicrobial preservatives to the composition of the developed medical pencil. The research results show that the studied pencil samples with preservatives nipazol 0,04%, 0,06% and phenoxyethanol 0,4%, 0,6% fully meet the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine (class "A" criterion) in relation to the cells of *Staphylococcus aureus* microorganisms ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 885-653 and *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. For pencil samples with the preservatives nipazol 0,02% and phenoxyethanol 0,2%, the logarithm of the decrease in the number of viable microorganisms after 2 days of storage was for cultures of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 was 1.65 and 1.98, which does not meet the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine (the logarithm of the decrease in the number of viable bacterial cells is less than 2). On the basis of the conducted studies, the expediency of introducing the medical preservative phenoxyethanol as more effective into the composition of the pencil was established, and the optimal concentration of 0,4% was chosen, further increasing the concentration is not advisable. Determining the microbiological purity of medical pencil drug samples using the surface seeding method showed that the total number of viable aerobic microorganisms (TAMC) is 10 CFU/g after 12 months of storage at a temperature of $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and 10 CFU/g after 15 months of storage at a temperature of $5 \pm 3^\circ\text{C}$. The total number of yeast and mold fungi (TYMC) does not exceed 10 CFU/g during the entire storage period (15 months) at two storage temperature regimes. The conducted studies showed that during the entire storage period under different conditions the presence of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria was not detected. **Conclusion.** Microbiological studies were conducted to study the effectiveness of the antimicrobial preservatives nipazol and phenoxyethanol in the composition of a medical pencil containing mango extract, oil extract of a mixture of medicinal plant raw material and cocoa butter, beeswax, carnauba wax, candelilla wax and lanolin. Based on the obtained results, the expediency of using phenoxyethanol at a concentration of 0.4% as a preservative was experimentally substantiated. The microbiological purity of medical pencil samples was experimentally investigated under different temperature conditions ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ and $5 \pm 3^\circ\text{C}$) during 15 months of storage by the method of surface seeding in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine.

Keywords: antimicrobial preservatives, nipazol, phenoxyetanol, microbiological purity, medical pencil

References

1. Abrantes C. G., Duarte D., Reis C. P. An overview of pharmaceutical excipients: safe or not safe. J. Pharmaceutical Sci. 2016. Vol. 105. N 7. P. 2019–2026.
2. Nesteruk T. M., Polovko N. P. The substantiation of the composition amedical pencil for the prevention and treatment of diseases of the skin and the red border of the lips. News of pharmacy. 2022. Vol. 104. N. 2. P. 26–31.
3. Güven N., Kaynak Onurdağ F. Investigation of antimicrobial and antibiofilm effects of some preservatives used in drugs, cosmetics and food products. Mikrobiyol Bul. 2014. Vol. 48. N. 1. P. 94–105.
4. Dao H., Lakhani P., Police A. et al. Microbial stability of pharmaceutical and cosmetic products. AAPS PharmSciTech. 2018. Vol. 19, No. 1. P. 60–78.
5. Crovetto S. I., Moreno E., Dib A. L., et al. Bacterial toxicity testing and antibacterial activity of parabens. Toxicological & Environmental Chemistry. 2017. P. 113–124.
6. Dreno B., Zuberbier T., Gelmetti C., et al. Review of phenoxyethanol when used as a preservative in cosmetics. JEADV. 2019. 33(7). P. 15–24
7. State Pharmacopoeia of Ukraine. State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicines. Second edition. Supplement 1. Kharkov. State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Medicinal Center for Medicines. 2015. 1128 p.
8. Guideline 42–3.3:2004. Guidance on quality. Medicinal products: stability tests. Ministry of Health Uk. Official publication Kyiv: Published by TOV “Morion”. 2004. 60 p.

Таблиця 4. Результати дослідження зразків медичного олівцю за показником «мікробіологічна чистота» при $25 \pm 2^\circ\text{C}$

Об'єкт дослідження	Метод поверхневого висівання			
	Кількість КУО/г		Наявність бактерій	
	аеробних мікроорганізмів (ТАМС)	дріжджових і плісневих грибів (ТУМС)	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Свіжовиготовлені				
медичний олівець	до 10	до 10	відсутні	відсутні
<i>Термін зберігання – 3 місяці</i>				
медичний олівець	до 10	до 10	відсутні	відсутні
<i>Термін зберігання – 6 місяців</i>				
медичний олівець	до 10	до 10	відсутні	відсутні
<i>Термін зберігання – 9 місяців</i>				
медичний олівець	до 10	до 10	відсутні	відсутні
<i>Термін зберігання – 12 місяців</i>				
медичний олівець	10	до 10	відсутні	відсутні
<i>Термін зберігання – 15 місяців</i>				
медичний олівець	10	до 10	відсутні	відсутні

Примітки: КУО/г – колонієутворювальні одиниці в 1,0 г зразків

Таблиця 5. Результати дослідження зразків медичного олівцю за показником «мікробіологічна чистота» при $5 \pm 3^\circ\text{C}$

Об'єкт дослідження	Метод поверхневого висівання			
	Кількість КУО/г		Наявність бактерій	
	аеробних мікроорганізмів (ТАМС)	дріжджових і плісневих грибів (ТУМС)	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Свіжовиготовлені				
медичний олівець	до 10	до 10	відсутні	відсутні
<i>Термін зберігання – 3 місяці</i>				
медичний олівець	до 10	до 10	відсутні	відсутні
<i>Термін зберігання – 6 місяців</i>				
медичний олівець	до 10	до 10	відсутні	відсутні
<i>Термін зберігання – 9 місяців</i>				
медичний олівець	до 10	до 10	відсутні	відсутні
<i>Термін зберігання – 12 місяців</i>				
медичний олівець	до 10	до 10	відсутні	відсутні
<i>Термін зберігання – 15 місяців</i>				
медичний олівець	10	до 10	відсутні	відсутні

Примітки: КУО/г – колонієутворюючі одиниці в 1,0 г зразків