

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ
ТА ІМУНОЛОГІЇ ім. І.І. МОЧНІКОВА

На правах рукопису

КОБЗАР ГАННА ІВАНІВНА

УДК 579.6:615.1 : 615.322:616-053.2

КОНСЕРВУЮЧИЙ КОМПЛЕКС ДОПОМІЖНИХ РЕЧОВИН
ДЛЯ НЕСТЕРИЛЬНИХ ДИТЯЧИХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ

03.00.07 - мікробіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Харків - 1994



00778885 (0)

Робота виконана у Державному науковому центрі
лікарських засобів /ДНЦЛЗ

Науковий керівник – академік Міжнародної академії
комп'ютерних наук і систем,
заслужений робітник вищої школи
України, професор А.Л.Циганенко

Науковий консультант – кандидат біологічних наук
Т.П.Скубіо

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
В.Л.Надтока
доктор біологічних наук, професор
А.В.Руденко

Провідна організація – Українська Фармацевтична
академія

Захист дисертації відбудеться "25" лютого 1994 р.
о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої Вченої
Ради К 088.07.01 при Харківському науково-дослідному
інституті мікробіології та імунології ім. І.І.Мечнікова
за адресою: ЗІОС57, м. Харків, вул. Пушкінська, 14.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці
інституту.

Автореферат розісланий "22" січня 1994 р.

Вчений секретар спеціалізованої
Вченої Ради, кандидат
біологічних наук

Пугин

С.І.Чупринова

Актуальні сть проблеми. Лікарські препарати, до яких не ставляться вимоги фармакопеї по стерильності, майже завжди заоруднені мікроорганізмами /Р.Манахилов, Р.Григорова, 1984; H. Seufarth, 1985; H. Vogelpand, H. Kozzege, 1988; И.И.Тарасова, 1989; А.С.Тихонова, Л.И.Дмитрова, 1989; Т.А.Шуб и др., 1991 /. При цьому мікроорганізми в процесі життєдіяльності здатні руйнувати молекули лікарських і допоміжних речовин і можуть обумовити зміну хімічного складу готової лікарської форми / J. Williams, E.O. Bennett, 1973; E.G. Beveridge, 1975; Н.С.Егоров и др., 1979; Т.П.Скубко и др., 1990/. В ряді країн зареєстровані випадки тяжких інфекційних захворювань, які виникли в результаті використання лікарських препаратів, контамінованих умовнопатогенними і патогенними мікроорганізмами /Т.С. Кондратьєва, Л.А.Иванова, 1976; Г.Опълченова, Г.Генчева, 1986; H. Sciezynska, 1986; Е.В.Бухарцева и др., 1993 /.

Основними джерелами контамінації мікроорганізмами нестерильних лікарських форм є допоміжні речовини і лікарські субстанції рослинного і тваринного походження, в яких рівень мікроорганізмів інколи досягає $1 \cdot 10^7$ колонієутворюючих одиниць / КУО / в 1 г / И.И.Дмитрова, 1986; К.А.Каграманова и др., 1991 /.

З метою підвищення якості лікарських препаратів в Державну фармакопею XI вид., вип. 2, що діє на Україні, введені вимоги щодо допустимого рівня мікроорганізмів в нестерильних лікарських формах. В 1 г/мл/ препаратів для внутрішнього використання допускається не більше $1 \cdot 10^3$ КУО бактерій і $1 \cdot 10^2$ КУО грибів /плісєневих і дріжджевих сумарно/. Не допускається наявність бактерій сімейства Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa і Staphylococcus aureus.

Проблема вибору допоміжних речовин, здатних забезпечити мікробіологічну безпеку готової дитячої лікарської форми і задовольнити її по технологічним, хімічним, біологічним і іншим вимогам,

актуальна і вельми складна.

Серед консервантів, що дозволені для медичного застосування, більшість виявились або не ефективними в концентраціях, які використовуються в виробництві дитячих лікарських засобів для перорального вживання, або негативно впливали на їх смакові якості.

Найбільш раціональними для перорального вживання в дитячій практиці визнані рідкі лікарські форми з коригованими смаковими якостями, приємним запахом і привабливим зовнішнім виглядом. Ліки, які не відповідають цим вимогам, здатні негативно вплинути на лабільну психіку дитини і викликати не тільки труднощі під час вживання, але й проявити слабу терапевтичну дію / А.М.Котенко, 1962 /.

Для коригування смакових якостей в дитячі лікарські препарати вводять цукор рафінований. Але рідкі форми ліків, в складі яких присутні органічні компоненти, одночасно є хорошим середовищем для розвитку бактерій і грибів. Тому в складі таких препаратів потрібна наявність протимікробних допоміжних речовин, здатних в процесі використання і зберігання забезпечити стійкість лікарської форми до біологічного руйнування.

Перспективною лікарською формою для дитячої практики є сухі гранули, із яких в клініці чи домашніх умовах для дітей виготовляють водяні суспензії.

Співробітниками лабораторії технології дитячих лікарських засобів Державного наукового центру лікарських засобів проведений пошук нешкідливих допоміжних речовин для виготовлення гранул фламініну, флакуміну, калафлону і силібору з коригованими смаковими якостями. Препарати пропонувані для лікування гастроентерологічних захворювань у дітей. Із сухих гранул цих препаратів, розфасованих в стандартні банки з мірною поміткою,

дітям для вживання виготовляють водяні суспензії в об'ємі 100 мл.

Мета роботи і завдання дослідження. Метою роботи є теоретичне і практичне обґрунтування можливості використання комплексу допоміжних речовин, до складу якого входять пектин яблучний, кислота сорбінова, кислота лимонна і цукор рафінований як консерванта в виробництві нестерильних дитячих лікарських препаратів рослинного походження: гранул фламину, флакуміну, калефлону і силібору.

Досягнення мети даної роботи реалізовано рішенням таких завдань:

- вивчити рівень мікробної контамінації допоміжних речовин і лікарських субстанцій;

- вивчити протимікробну активність водяних суспензій пектину яблучного в концентраціях, які використовуються в виробництві гранульованих лікарських препаратів для дітей;

- визначити протимікробну активність пектину яблучного, кислоти сорбінової і кислоти лимонної відносно мікрофлори, що забруднює лікарські препарати флавоноїдної природи;

- вивчити протимікробну активність водяних суспензій комплексу допоміжних речовин з метою обґрунтування можливості використання його як консерванта дитячих ліків рослинного походження;

- визначити вплив протимікробного комплексу допоміжних речовин на нормальну мікрофлору кишечника в експерименті;

- вивчити протимікробну активність водяних суспензій, виготовлених із гранул фламину, флакуміну, калефлону і силібору, в виробництві яких використані інгредієнти комплексу допоміжних речовин;

- дослідити в динаміці рівень мікробної контамінації су-

хих гранул фламіну, флакуміну, калефлону і силібору під час їх виготовлення і на протязі терміну зберігання;

- вивчити рівень мікробної контамінації водняних суспензій, виготовлених із гранул фламіну, флакуміну, калефлону і силібору, на протязі періоду використання /10 діб/ і визначити їх стійкість при різних температурних режимах зберігання.

Наукова новизна роботи. Вперше для виробництва лікарських препаратів флавоноїдної природи з коригованими смаковими якостями на основі нешкідливих природних речовин: пектину яблучного, кислоти сорбінової, кислоти лимонної і цукру рафінованого розроблено комплекс допоміжних речовин, який здатний забезпечити мікробіологічну безпеку сухих гранул фламіну, флакуміну, калефлону і силібору і виготовлених із них водняних суспензій.

Виявлена наявність протимікробної активності в водняних суспензіях пектину яблучного в концентраціях, які використовуються в виробництві дитячих лікарських форм, по відношенню до *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Pseudomonas aeruginosa* "Тесаков", *Escherichia coli* M-17 і *Bacillus cereus* ATCC 8035.

Показана залежність рівня контамінації водняних суспензій флавоноїдного препарату від наявності в його складі пектину яблучного, кислоти лимонної і кислоти сорбінової.

Вивчена протимікробна активність водняних суспензій комплексу допоміжних речовин, показана її залежність від концентрації складових компонентів комплексу і мікробного навантаження, обґрунтована можливість використання комплексу допоміжних речовин як консерванта в нестерильних дитячих лікарських формах.

Вивчена і доведена відсутність інгібіторного впливу протимікробних суспензій комплексу допоміжних речовин на інди-

генну мікрофлору кишечника в експерименті. При цьому виявлено зменшення кількості дріжджів і плісневих грибів в фекаліях товстого кишечника тварин і доведена залежність її від концентрації сорбінової кислоти в водяних суспензіях.

Встановлена наявність протимікробної активності водяних суспензій із гранул фламину, флакуміну, калефлону і силібору відносно умовнопатогенних і патогенних мікроорганізмів.

Практична цінність роботи. Консервуючий комплекс допоміжних речовин впроваджений у виробництво сухих гранул фламину, флакуміну, калефлону і силібору, пропонується для лікування гастроентерологічних захворювань у дітей. Ці лікарські форми контаміновані незначною кількістю сапрофітних бактерій і плісневих грибів, розвиток яких не відбувається протягом встановленого для ліків терміну зберігання. Водяні суспензії, виготовлені із гранул фламину, флакуміну, калефлону і силібору, стійкі до розвитку бактерій і грибів.

На підставі проведених дослідів і з метою випуску дитячих нестерильних лікарських препаратів високої якості встановлено допустиму кількість життєздатних мікроорганізмів /не більше 500 КУО/г бактерій і 50 КУО/г грибів / в сухих гранулах фламину, флакуміну, калефлону і силібору.

Гранули флакуміну, калефлону та силібору пройшли клінічну апробацію згідно з вимогами Фармакологічного комітету МОЗ України по доклінічному вивченню лікарських препаратів.

В позитивних відгуках клініцистів особливий акцент поставлений на зручності використання препаратів у вигляді водяних суспензій з коригованими смаковими якостями.

Гранули фламину проходять стадію клінічного вивчення.

Консервуючий комплекс допоміжних речовин може бути використаний при створенні нових гранульованих лікарських засобів рослинного походження.

Зв'язок завдань досліджень з планом наукових робіт. Дисертаційну роботу виконано згідно з планом науково-дослідних робіт Державного наукового центру лікарських засобів за постановою Кабінету Міністрів України від 8 жовтня 1992 року № 573 "Про розвиток медичної, ветеринарної та мікробіологічної промисловості, поліпшення забезпечення населення і потреб тваринництва лікарськими засобами, медичною і ветеринарною технікою", договору № 811 "Проведення науково-дослідних робіт з метою створення нових виробництв ін'єкційних розчинів, медичних аерозолів, м'яких і дитячих ліків на 1993 рік" і теми № 9 "Засоби для лікування шлунково-кишкових захворювань: противиразових, жовчогінних і гепатозахисних".

Апробація роботи. Окремі матеріали дисертації докладе-ні на Всесоюзній науковій конференції "Состояние и перспекти-вы разработки, производства и использования вспомогательных веществ для изготовления лекарственных средств" /Харків, 1982/; на IV з'їзді фармацевтів Української РСР /Запоріжжя, 1984 /; на конференції молодих вчених Всесоюзного науково-дослідно-го інституту хімії і технології лікарських засобів /Харків, 1986 /; на Другій республіканській конференції по медичній ботаніці /Київ, 1988 /; на Галузевій нараді "Основные на-правления снижения микробной обсемененности нестерильных ле-карственных средств" /Дубни, 1989 /; на III з'їзді фарма-цевтів Туркменської РСР /Ашгабад, 1989 /; на науково-прак-тичній конференції "Перспективы создания и производства ле-карственных средств в Украине" /Одеса, 1993 /.

Публікації. По окремим положенням дисертаційної робо-ти опубліковано 7 наукових робіт, оформлені і представлені ОІ.І2.1993р. /лист № 06/1553 / в Держпатент України мате-ріали заявки на винахід "Консервувачі комплекс допоміжних

речовин для нестерильних дитячих лікарських форм".

Структура і обсяг дисертації. Матеріали дисертації викладені на 130 сторінках машинописного тексту і складаються із вступу, огляду літератури, 3 глав власних досліджень, закінчення, висновків, бібліографічного показника літератури, який включає 129 вітчизняних і 63 іноземних джерел. Робота ілюстрована 17 таблицями та 7 малюнками.

Основні положення, які виносяться на захист:

- допоміжні речовини: пектин яблучний, кислота сорбінова і кислота лимонна в присутності цукру рафінованого є ефективним консервуючим комплексом флавоноїдних нестерильних лікарських препаратів, пропонованих для лікування гастроентерологічних захворювань у дітей;

- комплекс допоміжних речовин проявляє протимікробну активність по відношенню до мікроорганізмів, наявність яких згідно вимог Державної фармакопеї XI вид., вип. 2, фармакопей США, Німеччини, Великобританії і інших в готових лікарських формах не допускається або обмежується: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* і *Aspergillus niger*.

- консервуючий комплекс допоміжних речовин в досліджах *in vivo* не проявляє інгібіторного впливу на індигенну мікрофлору кишечника тварин;

- використання в фармацевтичній промисловості консервуючого комплексу допоміжних речовин дозволяє одержати для дітей пероральні лікарські препарати, безпечні в інфекційному відношенні і відповідальні вимогам щодо допустимого рівня контамінації мікроорганізмами.

ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. Об'єктом дослідів в роботі є допоміжні речовини: пектин яблучний, кислота сорбінова, кислота лимонна, цукор рафінований; лікарські субстанції: фламін, флакумін, калефлон, силібор; водяні суспензії пектину яблучного; водяні суспензії комплексу допоміжних речовин; сухі гранули фламину, флакуміну, калефлону, силібору і водяні суспензії, виготовлені із гранул цих препаратів.

Дослідження рівня контамінації мікроорганізмами допоміжних речовин, лікарських субстанцій, сухих гранул препаратів і водяних суспензій проводили згідно з вимогами Державної фармакопеї XI вид., вип. 2, розділу "Испытание на микробиологическую чистоту". При цьому визначали загальне число КУО/ г/мл/ аеробних бактерій, дріжджевих і плісневих грибів, а також наявність бактерій сімейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus*.

При вивченні протимікробної активності водяних суспензій пектину яблучного, комплексу допоміжних речовин і лікарських препаратів використовували пропоновані фармакопеями Німеччини /1988/, США /1990/ і Великобританії /1991/ метод "штучного мікробного зараження" для вивчення протимікробної активності консервантів в пероральних препаратах.

В роботі використовували грампозитивні і грамнегативні бактерії, плісеневі і дріжджеподібні гриби, одержані в музеї патогенних бактерій Державного науково-дослідного інституту стандартизації і контролю мелічних біологічних препаратів ім. Д.А.Тарасевича /м. Москва/ і науково-дослідному відділі глибоких мікозів С-Петербурзького ГИДУВ. Для

посіву застосовували / 18 - 24 / - годинні культури бактерій, 48-годинні культури дріжджеподібних і 5-досові культури плісневих грибів.

Під час проведення дослідів були використані живильні і діагностичні середовища виробництва ДП "Аллерген" м. Ставрополя і підприємства "Біолек" м. Харкова, пропонувані Державною Фармакопеею XI вид., вип. 2 для виділення і ідентифікації мікроорганізмів в лікарських засобах.

Стерилізацію досліджуваних водяних суспензій проводили вплихом прогрівання на протязі 3 діб по 15 хвилин кожної доби при температурі 70 °С /В.А.Метхлева и др., 1974 /.

Стерильні водяні суспензії "заражали" суспензіями монокультур і витримували на протязі 30 діб при температурі від 20 до 25 °С.

Мікробне навантаження в водяних суспензіях пектину яблучного становило від $1 \cdot 10^3$ до $2 \cdot 10^3$ КУО/мл бактерій і від $5 \cdot 10^2$ до $6 \cdot 10^2$ КУО/мл грибів; в водяних суспензіях комплексу допоміжних речовин - від 10 до $1 \cdot 10^4$ КУО/мл бактерій і від 10 до $5 \cdot 10^3$ КУО/мл грибів; в водяних суспензіях лікарських препаратів - від $5 \cdot 10^3$ до $1 \cdot 10^4$ КУО/мл бактерій і від $5 \cdot 10^2$ до $1 \cdot 10^3$ КУО/мл грибів.

Посіви водяних суспензій проводили негайно після "зараження", через 15, 30 хвилин, 1, 2, 4, 8 і 24 години, 2, 4, 6, 8, 10 і т.д. до 30 діб по 1 мл на відповідні густі живильні середовища в чашках Петрі. Для нейтралізації протимікробної дії сорбінової кислоти на мікроорганізми в живильні середовища добавляли твін-80 в концентрації 1,0 % /С.В.Денисова и др., 1990/. Чашки з посівами бактерій витримували протягом 24-48 годин при температурі від 30 до 35 °С, грибів - 3 - 5 діб при температурі від 20 до 25 °С. По закінченні строку

інкубації підраховували число колонієутворюючих одиниць на живильних середовищах в чашках Петрі, а при їх відсутності наявність бактерицидної і фунгіцидної дії підтвержували шляхом посіву 10 мл водяних суспензій на живильні середовища, пропеновані для контролю стерильності / тіогліколеве і рідке Сабуро / відповідно. Оскільки досліджувані водяні суспензії були виготовлені з використанням стерильної водопровідної води, то для контролю стерильну водопровідну воду "заражали" суспензіями монокультур.

Вивчення впливу водяних суспензій комплексу допоміжних речовин на мікрофлору кишечника проводили на 30 підростаючих білих безпородних щурятах обох статей масою від 45 до 58 г, віком 32 доби. Тварини були розподілені на 3 групи по 10 в кожній: 1 - контроль; 2 і 3 групи тварин одержували водяні суспензії комплексу допоміжних речовин № 2 і № 3 відповідно. Склад цих суспензій приведений в табл. 2.

Водяні суспензії тварини одержували перорально протягом 30 діб: перші 15 діб добова доза становила 15,0 мл/кг / найвища добова терапевтична доза лікарських суспензій для дітей віком до 1 року /; наступні 15 діб - 30 мл/кг / найвища добова терапевтична доза лікарських суспензій для дітей /.

При вивченні кишкової мікрофлори у тварин в роботі керувались методичними рекомендаціями: "Микробиологическая диагностика дисбактериозов". - Киев, 1986 і "Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями. Диагностика и лечение дисбактериоза кишечника". - Москва, 1986. В фекаліях щурят визначали кількість КУО/г біфідобактерій, бактероїдів, лактобактерій, кишкових паличок /лактозопозитивних/, ентерококів, стафілококів, синьогнійної пали-

чки, загальне число аеробних бактерій, дріжджів і плісневих грибів до початку, через 15 і 30 діб проведення досліду. В роботі були використані такі живильні середовища: Блаурокка, агар для оактероїдів в модифікації /Т.Р.Пономарева, А.З.Смолянская, 1984/, МРС - 4, Ендо, Каліни, жовтково-сольовий агар, малахітовий агар, кров'яний агар, густе середовище Сабуро.

Результати досліджень піддані статистичній обробці методом варіаційної статистики з використанням критеріїв Ст'юдента /А.Т.Ашмарин, А.А.Воробьев, 1962; Гуолер Е.В., 1978 / із застосуванням ІМ - 386.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

На підставі мікробіологічних досліджень для виробництва гранул фламину, флакуміну, калефлону і силібору були відібрані природні допоміжні речовини: пектин яблучний /ГСТ ІІІ-3-82, сорт І /, кислота сорбінова / ТУ 6-І4-358-76І /, кислота лимонна / ДСТ 3652-69, х.ч. /, цукор рафінований / ДСТ 22-78/.

Вивчення рівня мікробної контамінації показало, що в пектині яблучному загальне число аеробних бактерій становило не більше 15 КУО/г, грибів - 20 КУО/г; цукру рафінованому - бактерій не більше 25 КУО/г, грибів 10 КУО/г. Бактерії сімейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus* в цих речовинах не виявлені. В кислотах сорбіновій і лимонній бактерії і гриби не виявлені.

Лікарські субстанції контаміновані значною кількістю плісневих грибів. Число їх у фламіні находилось в межах від 105 до 110 КУО/г, флакуміні - від 1220 до 1590 КУО/г, калефлоні - від 90 до 105 КУО/г, силіборі - від 110 до 130 КУО/г.

Загальне число сапрофітних аеробних бактерій в кожній субстанції не перевищувало 25 КУО/г.

До складу комплексу пектин яолучний введений як стабілізатор і загусник водяних суспензій. Він представляє собою рослинний кислий полісахарид. В науковій літературі є одиничні відомості про наявність протимікробної дії у пектину яолучного відносно деяких фітопатогенних бактерій /Е.А.Метхьева и др., 1972; Ф.Д.Костик, Е.А.Метхьева, 1972 /; Протимікробна дія його відносно мікроорганізмів, наявність яких в лікарських препаратах не допускається чи обмежується, в наукових працях не описана.

Вивчення протимікробної активності водяних суспензій пектину яолучного в концентраціях 0,5; 1,0 і 1,5 % при значеннях рН 3,25; 3,15 і 3,10 відповідно дозволили виявити наявність бактерицидної дії у нього відносно аспорогенних грамнегативних і грампозитивних бактерій. Незалежно від концентрації пектину яолучного в водяних суспензіях з моменту контамінування *Pseudomonas aeruginosa* "Тесакон" не виявили через 4 години, *Staphylococcus aureus* 6538 Р - 24 години, *Escherichia coli* М-17 - 48 годин. Число життєздатних клітин *Bacillus cereus* АТСС 8035 протягом 10 діб знаходились на одному рівні. Водяні суспензії пектину яолучного не проявили протидунгальної активності і на протязі 10 діб в них проходило активне розмноження *Candida albicans* NISS 885-153 і *Aspergillus niger* ВКІР Р 156/7813.

Для інгібування розвитку грибів до складу комплексу введена сорбін за кислота. Протимікробну активність в концентрації 0,1 % вона проявляє відносно бактерій і грибів у вільному недисоційованому стані в кислому середовищі при значеннях рН від 3,0 до 4,0 / Н.И.Русанова, Э.А.Цветкова,

1961 / . В концентрації 0,05 % при значеннях рН 3,8 сорбінова кислота не проявляє фунгістатичної дії / О.П. Белозерова, Т.И.Ефимова, 1969 / . Зважаючи рН водяних суспензій за рахунок пектину яблучного і кислоти лимонної, ми передбачали, що кислота сорбінова здатна посилити антимікробну активність і це дасть можливість використати її в дитячих ліках в мінімальній концентрації: Але ефективність сорбінової кислоти в водяних суспензіях залежить також і від природи використаного стабілізатора / Л.Н.Хохлова, /1985 / . Вплив пектину яблучного на ефективність сорбінової кислоти в науковій літературі не описаний.

На прикладі водяних суспензій, виготовлених із різних за складом гранул флакуміну, була визначена протимікробна активність пектину яблучного, кислоти лимонної і кислоти сорбінової при наявності цукру рафінованого відносно мікроорганізмів, забруднювачів лікарську форму /таблиця I / .

Таблиця I

Життєздатність мікроорганізмів в водяних суспензіях, виготовлених із гранул флакуміну

Склад гранул, г	Температура зберігання суспензій, °С	Число бактерій КУО/мл		Число грибів КУО/мл	
		В момент виготовлення	Через 10 діб	В момент виготовлення	Через 10 діб
Флакумін - 0,5 Цукор рафінований-18,0 Пектин яблучний - 1,5	20 - 25 6 - 8	3 -	1 2	5 -	10183 2582
Флакумін - 0,5 Цукор рафінований-17,93 Пектин яблучний - 1,5 Кислота лимонна - 0,07	20 - 25 6 - 8	2 -	1 4	10 -	1600 220
Флакумін - 0,5 Цукор рафінований-17,95 Пектин яблучний - 1,5 Кислота сорбінова - 0,05	20 - 25 6 - 8	3 -	2 3	4 -	1 1

Результати дослідів показали, що незалежно від температурних режимів в водяних суспензіях при наявності в гранулах

флакуміну, цукру рафінованого і пектину яблучного розвитку бактерій не відбувалось, але число плісневих грибів досягло високого рівня / 10183 і 2582 КУО/мл /. Введення до складу гранул кислоти лимонної дало можливість знизити рівень числа плісневих грибів в суспензії тільки на один порядок / 1600 і 220 КУО/мл /. При наявності в гранулах пектину яблучного і кислоти сорбінової розвитку бактерій і грибів в водяних суспензіях не відбувалось. Отже, одержані дані свідчать про виявлений синергізм дії, при якому кислота сорбінова в концентрації 0,05 % в присутності пектину яблучного проявила фунгістатичну активність відносно плісневих грибів.

До складу комплексу для коригування смакових якостей водяних суспензій введені також кислота лимонна і цукор рафінований.

Основною метою дисертаційної роботи було визначити можливість використання комплексу допоміжних речовин в цілому /пектину яблучного, кислоти сорбінової, кислоти лимонної і цукру рафінованого / як консерванта в лікарських препаратах для дітей.

Для дослідів брали водяні суспензії комплексу № 1, № 2 і № 3, які мали різні концентрації кожного компоненту /таблиця 2 /.

Таблиця 2
Концентрація допоміжних речовин в водяних суспензіях комплексу, %

Назва речовин	Водяні суспензії:		
	№ 1	№ 2	№ 3
Пектин яблучний	0,5	1,0	1,5
Кислота сорбінова	0,025	0,05	0,1
Кислота лимонна	0,05	0,1	0,15
Цукор рафінований	15,0	20,0	30,0
pH	2,7	2,65	2,6

Протимікробну активність водних суспензій комплексу допоміжних речовин вивчали по відношенню до кишкової палички, синьої гриної палички, стафілококу золотистого, дріжджоподібного і плісеневого грибів. Ці мікроорганізми проаналізовані фармакопейами Німеччини, США і Великобританії для визначення ефективності консервантів в пероральних лікарських препаратах. В зв'язку з тим, що в науковій літературі, є відомості про роль споруутворюючих бактерій *Bacillus cereus* і *Bacillus subtilis* в виникненні харчових отруєнь, в дослідях була додатково випробувана *Bacillus cereus* ATCC 8035.

Результати дослідження протимікробної активності водних суспензій досліджуваного комплексу показали /таблиця 3 /, що відносно грампозитивних споруутворюючих бактерій вони проявили бактеріостатичну дію. На протязі 30 діб *Bacillus cereus* була життєздатною, але збільшення числа КЮ/мл не відбувалось. Відносно аспорогенних грамнегативних і грампозитивних бактерій водні суспензії проявили бактерицидну дію в інтервалі часу від 15 хвилин до 48 годин. Інгібіторний вплив водних суспензій на гриби менш виражений і становив відносно дріжджоподібних від 24 годин до 10 діб, плісневих від 48 годин до 26 діб. Із збільшенням концентрації допоміжних речовин протимікробна активність водних суспензій була більш вираженою.

В контрольних зразках бактерії і гриби були життєздатними і розмножувались за винятком стафілококу золотистого, число КЮ/мл якого поступово зменшувалось.

При вирішенні питання про можливість використання комплексу допоміжних речовин як консерванта порівнювали його протимікробну активність і вимоги до протимікробної активності консервантів фармакопей Німеччини, США і Великобританії.

Таблиця 3

Виттездатність мікроорганізмів у водяних суспензіях комплексу допоміжних речовин

Мікроорганізми	Концентрація КУО/мл /від - до /	Водяні суспензії:			Контроль, КУО/мл
		№ 1	№ 2	№ 3	
Bacillus cereus ATCC 8035	10 - 1.10 ² 1.10 ² - 1.10 ³ 1.10 ³ - 1.10 ⁴	Виттездатність на протязі 30 діб без збільшення числа КУО/мл			3,9.10 ⁴ 6,3.10 ⁴ 2,5.10 ⁵
Escherichia coli M - 17	10 - 1.10 ² 1.10 ² - 1.10 ³ 1.10 ³ - 1.10 ⁴	24 г 48 г 48 г	8 г 8 г 8 г	2 г 2 г 2 г	3,4.10 ⁶ 2,3.10 ⁷ 2,8.10 ⁷
Pseudomonas aeruginosa "Тесаков"	10 - 1.10 ² 1.10 ² - 1.10 ³ 1.10 ³ - 1.10 ⁴	24 г 24 г 24 г	2 г 2 г 2 г	15 хв 15 хв 15 хв	3,5.10 ⁴ 5,1.10 ⁵ 2,2.10 ⁶
Staphylococcus aureus ATCC 6538 P	10 - 1.10 ² 1.10 ² - 1.10 ³ 1.10 ³ - 1.10 ⁴	24 г 24 г 24 г	8 г 24 г 24 г	4 г 4 г 4 г	19 20 32
Candida albicans NCTC 885 - 653	10 - 1.10 ² 1.10 ² - 5.10 ² 5.10 ² - 5.10 ³	6 діб 8 діб 10 діб	48 г 4 доби 6 діб	24 г 4 доби 6 діб	8,5.10 ⁴ 5,3.10 ⁵ 7,1.10 ⁵
Aspergillus niger ВКНГ _Г 156/7813	10 - 1.10 ² 1.10 ² - 5.10 ² 5.10 ² - 5.10 ³	8 діб 16 діб 26 діб	48 г 12 діб 14 діб	48 г 6 діб 6 діб	3,2.10 ² 2,3.10 ³ 5,5.10 ³

Основним критерієм ефективності консерванта є зменшення числа КУО/мл бактерій і грибів за певний період часу. Проте терміни посівів на живильні середовища і вимоги до протимікробної активності консервантів фармакопеями встановлені різні. При мікроскопому навантаженні від $1 \cdot 10^5$ до $1 \cdot 10^6$ КУО/мл згідно з вимогами фармакопеї США через 28 діб в препараті пускається бактерій не більше 0,1 % КУО/мл, грибів - без збільшення числа КУО/мл; фармакопеї Німеччини - через 7 діб бактерій не більше $1 \cdot 10^3$ КУО/мл, грибів - через 14 і 28 діб не більше 10 КУО/мл; фармакопеї Великобританії - через 7 діб бактерій не більше $1 \cdot 10^2$ КУО/мл, грибів - без збільшення числа КУО/мл.

В лікарських препаратах для внутрішнього вживання допускається не більше $1 \cdot 10^3$ КУО/мл бактерій і $1 \cdot 10^2$ КУО/мл грибів. Мікробне навантаження від $1 \cdot 10^5$ до $1 \cdot 10^6$ КУО/мл для таких ліків є завишеним і не дає змоги виявити реальної ефективності консерванта / K.G. Wallhässler, 1985 /. Тому для вивчення протимікробної активності комплексу допоміжних речовин, пропозованих для виробництва дитячих ліків, в дослідках було використано максимальне мікробне навантаження $1 \cdot 10^4$ КУО/мл бактерій і $5 \cdot 10^3$ КУО/мл грибів.

Порівнюючи дані протимікробної активності комплексу допоміжних речовин і вимоги фармакопей Німеччини, США і Великобританії до протимікробної активності консервантів, можна зробити висновок, що в водяних суспензіях досліджуваній комплекс здатний виконувати функцію ефективного консерванта.

Протимікробна активність комплексу допоміжних речовин обумовлена наявністю в його складі пектину яблучного, кислоти сорбінової і кислоти лимонної, які проявляють бактерицидну дію відносно кишкової палички. В наукових працях є одиничні відно-

мости про те, що пектин яолучний залежно від концентрації в дослідах *in vitro* і *in vivo* проявляє інгібіторний вплив на кишкову мікрофлору / И.Б.Куваева, 1986; О.П.Мазитова и др., 1988; С.И.Морев, В.В.Зубков, 1988 /. Впливу кислоти сорбінової і кислоти лимонної на кишкову мікрофлору в літературі не описано.

Доломіжні речовини досліджуваного комплексу входять до складу лікарських препаратів, які пропонувані для лікування гастроентерологічних захворювань у дітей. Курс лікування такими препаратами становить 3, 4 і більше тижнів. При хронічних гастроентерологічних захворюваннях і особливо в період виражених запальних процесів створюється умова для формування дизбактеріозів /В.Г.Дорофейчук и др., 1988; Д.У.Усманов и др., 1989 /.

Вивчення впливу комплексу доломіжних речовин на кишкову мікрофлору показало, що водні суспензії № 2 і № 3, які в дослідах *in vitro* проявили виражену протимікробну активність відносно аспорогенних грамнегативних і грампозитивних бактерій, в дослідах *in vivo* не проявили інгібіторного впливу на індигенну і випадкову кишкову мікрофлору підростаючих шурят. Статистично вірогідних різниць по рівню біфідобактерій, лактобактерій, бактероїдів, кишкових паличок /лактозопозитивних/, ентерококів і стафілококів в фекаліях дослідних і контрольних груп не одержано. Статистично вірогідні різниці одержані по рівню дріжджів і плісневих грибів. Рівень дріжджів в фекаліях знижувався і через 15 діб логарифм числа їх становив в групі контрольних тварин і групі тварин № 3 відповідно $4,12 \pm 0,58$ і $3,34 \pm 0,51$ / $P < 0,05$ /, через 30 діб - в групі контрольних тварин $4,03 \pm 1,60$, групі тварин № 2 - $3,17 \pm 1,37$

/ $P < 0,05$ /, групі тварин № 3 - $2,82 \pm 1,54$ / $P < 0,01$ /. Рівень плісневих грибів в фекаліях знизився через 30 діб і логарифм числа їх становив в групі контрольних тварин $4,12 \pm 0,35$, групі тварин № 2 $2,69 \pm 0,56$ / $P < 0,05$ /, групі тварин № 3 $1,86 \pm 0,96$ / $P < 0,01$ /. Показники рівня дріжджів і плісневих грибів відрізнялись не тільки від контрольних груп тварин, але і між дослідними групами № 2 і № 3. В кінці досліду найменший рівень їх був в групі тварин № 3, які одержували водяні суспензії з найвищою концентрацією сорбінової кислоти 0,1 %. Ці дані корелюють з даними, проведеними в дослідах *in vitro*, в яких була виявлена залежність ефективності водяних суспензій комплексу допоміжних речовин відносно грибів від концентрації сорбінової кислоти.

Дріжджеподібні і плісневі гриби належать до випадкової умовнопатогенної мікрофлори кишечника. При гастроентерологічних захворюваннях у дітей в кишковій мікрофлорі часто виявляють дріжджеподібні гриби роду *Candida* /В.Г.Дорофейчук и др., 1988/. Тому використання лікарських препаратів, здатних інгібувати розвиток грибів, дозволяє зробити передбачення, що таке явище буде сприяти відновленню нормального мікробного ценозу кишечника у дітей.

Вивчення протимікробної активності водяних суспензій, виготовлених із гранул фламину, флакуніну, калефлону і силібору, показало, що відносно грампозитивних споруутворюючих бактерій вони проявили бактеріостатичну дію, відносно аспорогенних грамнегативних і грампозитивних бактерій - бактерицидну дію в інтервалі часу від 30 хвилин до 24 годин. Більш стійкими в лікарських суспензіях були дріжджеподібні і плісневі гриби. В водяних суспензіях калефлону, фламину і силібору час, необхідний для їх інактивації, становив від 24 годин до 5 діб, в сус-

пензії флакуміну - більше 10 діб / таблиця 4 /.

Таблиця 4

Життєздатність мікроорганізмів в лікарських препаратах
для дітей (годин)

Мікроорганізми	Водяні суспензії виготовлені із гранул:			
	фламіну	флакуміну	калефлону	симіору
Bacillus cereus ATCC 8035	Життєздатність на протязі 10 діб без збільшення числа КУО/мл			
Escherichia coli M-17	24	24	4	4
Proteus vulgaris OX ₁₉ N221	0,5	I	I	2
Citrobacter freundii 33/57	0,5	4	0,5	4
Enterobacter cloacae A-186	24	24	4	24
Shigella Sonnei N 3	0,5	24	I	2
Salmonella typhimurium N55	0,5	24	I	4
Klebsiella pneumoniae NCTC 5054	I	I	0,5	0,5
Pseudomonas aeruginosa "Тесаков"	2	2	I	I
Staphylococcus aureus ATCC 6358 P	0,5	0,5	0,5	0,5
Streptococcus piogenes DICK-1	0,5	0,5	I	I
Corinebacter diphtheroides N1911	I	2	2	24
Candida albicans NCTC 885-653	72	Більше 10 діб	24	120
Aspergillus niger ВКПФ 156/7813	96	Більше 10 діб	120	96
pH	2,6	3,17	3,2	3,2

Різниця в швидкості інактивації мікроорганізмів в водяних суспензіях лікарських препаратів можна пояснити варіюванням в них концентрації допоміжних речовин /пектину яблучного, кислоти лимонної і цукру рафінованого/, наявності лікарських субстанцій і різними значеннями рН. Концентрація сорбінової кислоти в лікарських суспензіях становила 0,05 %.

Дослідження рівня мікробного забруднення гранул фламину / 16 серій /, фламіну / 50 серій /, калефлону / 29 серій / і силібору / 23 серій / показали, що препарати контаміновані чезначною кількістю сапрофітних бактерій і плісневих грибів: граничні їх межі в гранулах фламину відповідно від 0 до 80 КУО/г і від 0 до 25 КУО/г, гранулах флакуміну - від 0 до 150 КУО/г і від 0 до 20 КУО/г, гранулах калефлону - від 0 до 330 КУО/г і від 0 до 15 КУО/г, гранулах силібору - від 10 до 130 КУО/г і від 0 до 25 КУО/г.

Проведені досліди 28 серій гранул фламину, флакуміну, калефлону і силібору на протязі встановленого терміну придатності для препаратів / 2 роки / показали, що рівень контамінації їх бактеріями і плісневими грибами знизувався і не перевищував 80 КУО/г бактерій і 10 КУО/г плісневих грибів. Необхідно відмітити, що після 1 року зберігання плісневих грибів в гранулах препаратів не виявлено.

В водяних суспензіях, виготовлених із гранул лікарських препаратів, на протязі 10 діб розмноження бактерій і грибів не відбувалось незалежно від температурних режимів / 20 - 25 °С і 6 - 8 °С / і максимальне їх число відповідно становило в суспензіях фламину 5 КУО/мл і 1 КУО/мл, флакуміну 26 КУО/мл і 2 КУО/мл, калефлону 25 КУО/мл і 0, силібору 4 КУО/мл і 1 КУО/мл.

Дріжджі, бактерії сімейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus* в гранулах і водяних суспензіях лікарських препаратів ні в одному випадку не виявлені. Одержані дані по рівню мікробної контамінації гранул і водяних суспензій підтверджують консервуючу ефективність досліджуваного комплексу допоміжних речовин відносно мікроорганізмів, забруднюючих готові дитячі лікарські препарати рослинного походження.

ВИСНОВКИ

1. Мікробіологічними дослідженнями обґрунтована раціональність використання комплексу нешкідливих природних допоміжних речовин, до складу якого входять пектин яблучний, кислота сорбінова, кислота лимонна і цукор рафінований, для виробництва флавоноїдних дитячих лікарських засобів, відпо-відаючих вимогам нормативно-технічної документації по допустимому рівню мікробного забруднення.

2. Визначена протимікробна активність водяних суспензій пектину яблучного в концентраціях від 0,5 до 1,5% по відношенню до *Pseudomonas aeruginosa* "Тесаков", *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Escherichia coli* M-17 і *Bacillus cereus* ATCC 8035.

3. Встановлено протимікробну активність водяних суспензій комплексу допоміжних речовин по відношенню до споруто-ворюючих грампозитивних, аспорогенних грамнегативних і грампозитивних, а також дріжджесподібних і плісневих грибів і показана її залежність від концентрації інгредієнтів, виду мікроорганізмів і їх мікробного навантаження.

4. Комплекс допоміжних речовин в вивчених концентраціях по ефективності відповідає вимогам, поставлених до консервантів в готових лікарських формах.

5. В водяних суспензіях досліджуваного комплексу виявлений синергізм дії сорбінової кислоти в присутності пектину яблучного і кислоти лимонної відносно грибів, що обумовлює використання її в виробництві лікарських препаратів для дітей в концентрації 0,05 %.

6. Пропонований комплекс допоміжних речовин не проявляє інгібіторного впливу в досліджах *in vivo* на бактерійну кишкову мікрофлору підростаючих білих щурят /біфідобактерії, лактобактерії, бактероїди, кишкові палички /лактозопозитивні/, ентерококи, стафілококи / і проявляє протицунгальну дію відносно дріжджів і плісневих грибів.

7. Сухі гранули фламину, флакуніну, калефлону та силібору для дітей, виготовлені з використанням допоміжних речовин досліджуваного комплексу, відрізняються незначним рівнем контамінації сапрофітними бактеріями і плісневими грибами, розвиток яких не відбувається на протязі встановленого терміну придатності для ліків. В препаратах відсутні дріжджі, бактерії сімейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus*.

8. Водяні суспензії, виготовлені із гранул фламину, флакуніну, калефлону і силібору, стійкі до розвитку бактерій і грибів. Вони проявляють протимікробну дію відносно широкого спектру умовнопатогенних і патогенних мікроорганізмів.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

I. В виробництві нестерильних лікарських препаратів доцільно використовувати допоміжні речовини, які здатні прояв-

ляти інгібіторний вплив на їх мікрофлору.

2. На стадії розробки готових лікарських засобів в необхідне наукове обґрунтування по використанню ефективних концентрацій консервуючих речовин з застосуванням мікробіологічних методів дослідження.

3. При розробці Національної Фармакопеї пропонувати ввести метод по визначенню ефективності консервантів в готових лікарських засобах. Метод по визначенню протимікробної активності комплексу допоміжних речовин може стати основою для його розробки.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Перспективы использования пектинов в качестве вспомогательных фармацевтических веществ // Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. "Состояние и перспективы разработки, производства и использования вспомогательных веществ для изготовления лекарственных средств". - Харьков, 1982. - С. 164 - 166 / у співавт. з О.М.Котенко, О.Г.Горіним, В.М.Спірідоновим, П.І.Безрук, І.М.Перцевим, В.В.Черкасенко/.

2. Розробка технології дитячої лікарської форми фламінду, фітину та кофеїну-бензоату натрію //Фармацевтичний журнал. - 1982. - № 6. - С. 74 / у співавт. з О.М.Котенко, В.М.Спірідоновим, О.Г.Горіним, В.В.Черкасенко, П.І.Безрук, І.М.Перцевим/.

3. К вопросу создания детских лекарственных форм // Тез. докл. IV съезда фармацевтов Украинской ССР. - Запорожье, 1984. - С. 70 / у співавт. з Р.Ф.Ставровою, Л.Ф.Вілоконь, В.Ф.Вілоконь, Л.П.Брюзгіною, О.І.Вісленко, Л.П.Бевю, Е.Т.Дзяляковою/.

4. Требования к качеству сырья и вспомогательных материалов в производстве лекарственных средств по показателям микробной чистоты //Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. "Науч-

но-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів". - Львів, 1987. С. 242-243 /у співавт. з Т.П.Скубо, Г.В.Оболенцевою, Н.З.Деркач /.

5. Изучение влияния начальной контаминации гранул для детей на микробиологическую чистоту суспензий // Тез. докл. III съезда фармацевтов Туркменской ССР. - Ашгабад, 1989. - С. 202 - 203 /у співавт. з Т.П.Скубо, Г.В.Оболенцевою, Н.З.Деркач /.

6. Значение микробиологических исследований при создании детских лекарственных средств // Микробиология, эпидемиология и клиника инфекционных болезней: Со. научн. тр. Харьк. мед. ин-та. - Харьков, 1992. - С. 5 - 10 / у співавт. з А.Я.Циганенко, Т.П.Скубо, Г.В.Оболенцевою, К.Г.Жемеровою/.

7. Подход к оценке эффективности консервантов в готовых лекарственных средствах // Тез. докл. науч.-практ. конф. "Перспективы создания и производства лекарственных средств в Украине". - Одесса, 1993. - С. 161 - 162 / у співавт. з Т.П.Скубо, С.О.Літквич, Н.З.Деркач /.

А.Косбица

AB 29.142