

Farmasötik Preparatların Antimikrobiyal Prezervasyon Etkinlik Testi II

Şahide GENÇER (*)
Murat ŞUMNU (**)

Özet: Bu derlemede, antimikrobiyal prezervatiflerin etkinliğini ölçmek için uygulanan test yöntemleri bazı literatür örnekleri ile açıklanmıştır.

THE TEST FOR THE EFFECTIVENESS OF ANTIMICROBIAL PRESERVATION OF PHARMACEUTICALS

Summary: Test methods for assaying the antimicrobial effect of preservation are described in this review with some examples from the literature.

GİRİŞ:

Farmasötik preparatların mikrobiyal saflıkları ve stabiliteilerinin devamını sağlamak yönünden antimikrobiyal prezervatiflerin önemi büyüktür (1). Bu preparasyonlar arasında sıvı ve su bazlı yarı-katı formlar özellikle önemlidir.

FIP raporlarında da (1972-1975) belirtildiği gibi, sağlık otoriteleri ve imalatçılar, antimikrobiyal prezervasyonun etkinliğini ispatlamak gereğini duymuşlardır (1, 2, 3).

Bu etki, spesifikasyondan dolayı, basit bir kimyasal ya da biyolojik analiz metodu ile test edilemez. Nitekim çoğu farmakopelerin böyle bir testi içermemeleri de bu yüzdendir (1).

Ancak USP XIX, bir mikrobiyolojik metod açıklamış (4) ve British Farmakopede, bir spesifik olgudan dolayı antimikrobiyal etkinlik gereğini şart koymuştur (5).

Testin Genel Prensipleri:

Antimikrobiyal prezervasyonun etkinliği çok çeşitli faktörlere bağlıdır.

Başvuru Tarihi: 5.9.1988

Kabul Tarihi: 20.6.1989

(*) Refik Saydam Hıf. Merkezi Başkanlığı İlaç ve Kozmetikler Araştırma Müdürlüğü Sıhhiye, Ankara.

(**) Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji ABD, Ankara.

Komponentler, bileşim, antimikrobiyal prezervatif, şişe ve kapak tipi, mikrobiyal saflığın ilk derecesi, tatbik şekli ve raf yaşamı gibi.

Bazı jemler preparasyonun içerdiği suya bağlı olarak preparatın içindeki bazı maddeleri karbon kaynağı olarak kullanırlar (6, 7, 8).

Yine bazı sistem ya da komponentler antimikrobiyal prezervatifler olmaksızın mikrobiyal gelişimi önleyebilirler (9, 10, 11). Hatta prezervatifin etkisini artırabilirler (12, 13).

Şişe ya da kapağın adsorpsiyonu da ayrıca hesaba katılmalı ve bazı mikroorganizmaların rezistansları ve antimikrobiyal ajanın kompozisyonunu bozabilme yetenekleri de gözönünde bulundurulmalıdır (14, 15).

Test sırasında, öncelikle antimikrobiyal ajan ilave edilerek veya edilmeden önce, preparatın mikrobisidal özelliği olup olmadığı test edilmelidir.

Bunun sonucuna göre mikrobiyal kontaminasyona karşı yeterince korunup korunmadığına karar verilecektir. Preparatın mikrobiyal kontaminasyona karşı ne derece korunması gerektiği, kullanılış şekline ve preparatın özelliğine bağlıdır.

Sıvı veya yarı katı preparatlarda test, preparatın geliştirilmesi basamağında, stabilite testleri uygulanırken ve preparatın final ambalajına karar verilirken uygulanır.

Mukayese yapabilmek için preparat bir mikrobiyal ajan ilave edilmeden test edilmeli, bir de prezervatif ilave edildikten sonra test edilmelidir (16).

Sonuç olarak prezervatiflerin yalnız

veya kombine olarak hakiki antimikrobiyal aktivitesinin tesbiti, kimyasal ve fizikokimyasal karakterlerine uygun çalışma için spesifik bir yöntem ve test prosedürleri gerektirir (17, 18, 19).

Bu test çok dozlu parenteral, otik, nasal ve oftalmik preparatların sulu baz veya diğer maddeler ile oluşturdukları dozaj şekillerinin içine antimikrobiyal ajan olarak eklenen prezervatiflerin etkilerini ölçmek için uygundur (20).

Prensip:

Preparatın uygun kaplardaki eşit miktarları bilerek tek bir test organizması ile kontamine edilir. Numuneler farklı sürelerde bekletilir ve uygun bir dilüsyondan sonra yaşayan mikroorganizmalar kantitatif bir yöntemle saptanır (16). (Ör. Plate Count metodu gibi)

Bu testler sadece üretici tarafından piyasaya sunulduğu şekildeki preparata, yani açılmamış bir orijinal preparata uygulanabilir (20).

Test Organizmaları:

1. Staphylococcus aureus (ATCC 6538)
2. Escherichia coli (ATCC 8739)
3. Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027)
4. Candida albicans (ATCC 10231)
5. Aspergillus niger (ATCC 16404)

Bu bakterilerin stok kültürleri Soybean-Casein Digest Agar Medium ile sağlanır. Mantar kültürleri, Sabouraud Dekstroz Agar'da sürdürülür.

İnokülasyon Materyali:

Uygun katı agarlı besi yerine,

seçilmiş olan mikroorganizmanın stok kültüründen ekim yapılır. Bakteriyel kültürler, yatık olarak hazırlanmış Soybean Casein Digest Agar Medium'a alınarak 18-24 saat 30-35°C'da inkübe edilir.

Mantarların stok kültürlerinden yatık olarak hazırlanmış Sabouraud Dekstroz Agar'a inoküle edilerek;

Candida albicans 20-25°C'da 48 saat

Aspergillus niger 20-25°C'da

1 hafta inkübe edilir.

Bakteriel ve Candida albicans kültürlerini besi yerinden almak için steril peptonlu izotonik sodyum klorür kullanılır.

Aspergillus sporlarının süspansiyonunu kolaylaştırmak için % 0.1 Polysorbat 80 ilave edilir.

Yağlı preparatlar için az sulu inokülasyon materyali kullanılır. (Ör: Nutrient Agar'ın yüzeyinden mikroorganizmalar öze ile direkt olarak alınabilir.) Test organizmasının yağlı preparatta dağılımı mekanik olarak sağlanabilir.

Test için kullanılan başlangıç mikroorganizma konsantrasyonu 10^8 /ml olacak şekilde sulandırılır. Bu işlem sulu veya hidrofilik preparatlarda peptonlu serum fizyolojik, yağlı preparatlarda ise kalibre edilmiş bir öze ile yapılır.

Ayrıca stok kültür organizmaları uygun bir sıvı besiyerinde de üretilebilir. Hücreler santrifüj edilir ve dipten alınarak yıkanır, istenen konsantrasyona steril serum fizyolojik

ile dilüe edilir. Her süspansiyonun ml'sindeki koloni sayısı tesbit edilir. Bu sayı testte kullanılacak inokülüm miktarını tayin etmeye yarar. Eğer standardize edilmiş süspansiyon kullanılmıyorsa, periyodik olarak süspansiyonların Plate Count metodu ile canlılıklarındaki azalma kontrol edilir. İnoküle edilmiş test preparatlarının Plate Count metodunda, agarlı besiyeri olarak testte kullanılan mikroorganizmanın son kültüvasyonunda kullanılan besiyeri kullanılır (20).

Yöntem:

5 adet orijinal preparat kullanılır. Preparatlara aseptik şartlarda ve steril enjektör ile kauçuk tıpadan girilir. Eğer preparata aseptik şartlarda girmek mümkün değilse, uygun büyüklükte beş adet steril, kapaklı bakteriyolojik tüplere 20 ml numune konur.

Hep tüp veya preparata standardize edilmiş mikrop süspansiyonundan inoküle edilir. 20 ml numune için, 0.10 ml. inokülüm kullanılır, karıştırılır. Test organizmasından uygun konsantrasyonda ilave edilerek, inokülasyondan hemen sonra, preparatın ml'sindeki mikroorganizma sayısı 10^5 - 10^6 arasında olması sağlanmalıdır. İnokülasyondan sonra her süspansiyondaki yaşayan mikroorganizma sayısı tesbit edilir ve Plate Count metodu ile test edilen preparatın son konsantrasyonundaki mikroorganizma sayısı/ml tesbit edilerek hesaplanır.

İnoküle edilen numuneler 20-25°C'da inkübasyona bırakılır ve 7,14,21,28. günlerde kontrol edilir.

Görünüşleri tesbit edilir. Ayrıca Plate Count metodu ile yukarıda belirtilen günlerde her preparattaki canlı mikroorganizma sayısı tesbit edilir.

Testin başlangıçtaki mikroorganizma konsantrasyonu teorik konsantrasyon olarak alınarak, test sırasında mikroorganizmadaki değişimler yüzde olarak hesaplanır.

Sonuçlar:

Preparattaki prezervatif, aşağıdaki şekilde etkilidir:

a) 14. gün yaşayan bakteri kon-

santrasyonundaki azalma % 0.1'den fazla değilse,

b) Yaşayan mantar veya küf konsantrasyonu 14. gün içinde son konsantrasyonda kaldıysa veya onun altına düşmüşse,

c) Her bir test organizmasının konsantrasyonu 28. günde de yukarıda belirtilen limitlerde kaldıysa veya bunun altına düşmüşse; prezervatif etkilidir ve bu preparat kendi kategorisinde yeterince korunmuş sayılabilir (16, 20).

KÜLTÜR BESİYERLERİ ve SOLÜSYONLAR:

1. Casein Soybean Digest Broth
2. Casein Soybean digest agar
3. Sabouraud Dekstroz Agar
4. Peptonlu Fizyolojik Tuzlu Su
5. Tamponlu Sodyum Klorür Pepton Solüsyonu

KAYNAKLAR

1. Anon. 3 rd joint report of the Committee of Official Laboratories, Pharm. Acta. Helv. 55/2, 40-49 (1980).

2. 1. FIP report, WHO/Pharm. 74, 477.

3. 2. FIP report, Pharm. Acta Helv. 51, 33 (1976).

4. US Pharmacopeia XIX. p. 587 (1975).

5. BP. 1973, "Injections", p. 242.

6. Yanagi, M. Onishi, G., "Assimilation of selected cosmetic ingredients by microorganisms", J. Soc. Cosmet. Chem. 22, 851 (1971).

7. Haines J.R., Alexander M., "Microbial degradation of polyethylene glycols", Appl. Microbiol. 29, 621 (1975).

8. Barr M., Tice L.F., "The preservation of aqueous preparations containing nonionic surfactants I. Growth of microorganisms in solutions and dispersions of nonionic surfactants", J. Amer. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.) 46, 442 (1957).

9. Ibid "Ibid II. Preservative Studies in solutions and products containing nonionic surfactants", Ibid. 445 (1957).

10. Barr M., Tice L.F., "A Study of the inhibitory concentrations of glycerin-sorbitol and propylene

glycol-sorbitol combinations on the growth of microorganisms", *ibid.* 46 217 (1957).

11. Barr M., Tice L.F., "A Study of the inhibitory concentrations of various sugars and polyols on the growth of microorganismas", *ibid.* 46, 219 (1957).

12. Prickett P.S., Murray H.L., Mercer N.H., "Potentiation of preservatives (Parabens) in pharmaceutical formulations by low concentrations of propylene glycol", *J. Pharm. Sci.* 50, 316 (1961).

13. Wickliffe B., Entekin D.N., "Relation of pH to preservative effectiveness II. Neutral and basic media", *J. Pharm. Sci.* 53, 769 (1964).

14. Bean H.S., Farrel R.C., "The persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous solutions of phenols", *J. Pharm. Pharmacol.* 19, 183 (1967).

15. Hugo W.B., Forster J.H.S., "Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in

solutions of p-hydroxy-benzoic acid", *J. Pharm. Pharmacol.* 16, 209 (1964).

16. Bühlmann, X., Gay, M., Gubler H.U., Hess H., Knüsel F., Sackman W., Schiller I., Urban S., "Microbiological quality of pharmaceutical preparations", *Am. J. Pharm.*, 144, 165-185 (1972).

17. Hugo P.G., "Additive and synergistic actions of equipotent admixture of some antimicrobial agents", *Pharm. Acta. Helv.* 51, 284 (1976).

18. Richards R.M.E., McBride R.J., "Cross resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resistant to phenylethanol", *J. Pharm. Sci.* 61, 1075 (1972).

19. Richards R.M.E., McBride R.J. "Effect of 3-phenyl-propane 1-ol, 2-phenylethanol and benzyl alcohol on *Pseudomonas aeruginosa*", *J. Pharm. Sci.* 62, 585 (1973).

20. U.S. Pharmacopeia XXI (61), 1151 (1985).

Yüzde on yanlış anlaşılma olasılığı olan bir emir mutlaka yanlış anlaşılır.

General von MOLTKE