مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۳، شماره ۳، پاییز ۹۲، صفحات ۱۹۶ تا ۲۰۰

Original Article

ارزیابی و تعیین مقدار ضد عفونی کننده‌های مورد مصرف در کنترل میکروبی آب های داروسازی و انتخاب بهترین آن

رامین اصغریان[۱]، عسل حیدری[۲]، علی منتصری[۲]، عاصم عبدالله پور[۳]، سعید غیائی[۴]، مریم امینیان[۵]

[۱] استادیار، Ph.D داروسازی صنعتی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی
[۲] دکترای حرفه ای داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی
[۳] استادیار، Ph.D شیمی تجزیه، مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی ایران
[۴] دکترای حرفه ای داروسازی، معاونت کنترل و تحقیق شرکت داروسازی جابربن حیان
[۵] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، رئیس آزمایشگاه کنترل میکروبی شرکت داروسازی جابربن حیان

چکیده

سابقه و هدف: *آب مصرفی در صنایع داروسازی باید از نظر میکروبی و شیمیایی دارای ویژگی‌هایی باشد تا مورد تایید استانداردهای دارویی قرار گرفته و قابل استفاده در فرایندهای تولید باشد. از مهمترین شاخص های کیفی آب دارویی، میزان عوامل میکروبی و بیولوژیکی می‌باشد براین اساس انتخاب یک روش ضدعفونی موثر یکی از اساسی ترین اصول در طراحی یک سیستم آبسازی دارویی می‌باشد. در سیستم‌های آبسازی، آب را می‌توان در دمای بالاتر از ۷۰°C یا کمتر از ۱۰°C نگهداری نمود ولی نگهداری آب در دمای محیطی می تواند باعث افزایش احتمال آلودگی میکروبی آب شود، تحت این شرایط استفاده از مواد ضدعفونی کننده جهت کنترل یا کاهش بار میکروبی آب ضروری می باشد. بعضی از آنها مانند کلر، ازن و پراکسید هیدروژن به دلیل ایمن بودن و عدم ایجاد تغیرات نامطلوب در آب بیشترین کاربرد را دارند.*

روش بررسی: *در این تحقیق اثر سه ضدعفونی کننده کلر، ازن و پراکسید هیدروژن با غلظت 1ppm بر روی پنج میکروارگانیسم شاخص Pseudomonas aeruginosa، Staphylococcus aureus، candida albicans، Aspergillus niger و E.coli بررسی شد. سوسپانسیون های میکروبی تحت شرایط یکسان در معرض عوامل ضدعفونی کننده قرار گرفتند. در نهایت ازن با کاهش بیش از 5Log عوامل باکتریایی و 1Log مخمر به عنوان بهترین ضدعفونی کننده شناسایی و انتخاب گردید.*

یافته‌ها: *شمارش تعداد میکروارگانیزم ها قبل و بعد از تیمار شدن و مقایسه کاهش تعداد میکروارگانیزم ها، بیانگر کارایی ضدعفونی کننده ها بود.*

نتیجه‌گیری: *در نهایت ازن با کاهش بیش از 5Log عوامل باکتریایی و 1Log مخمر به عنوان بهترین ضدعفونی کننده شناسایی و انتخاب گردید.*

واژگان کلیدی: *آب دارویی، کنترل میکروبی، بیوفیلم، ازن، کلر، پراکسید هیدروژن.*

مقدمه

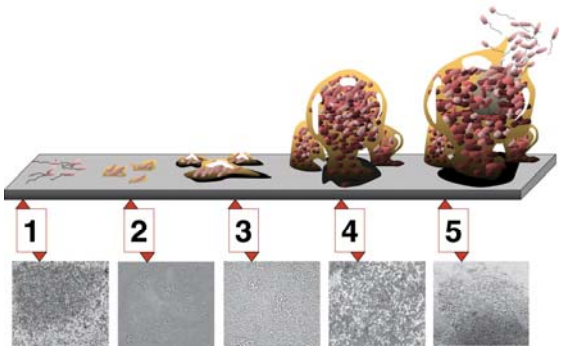
آب یکی از منابع بسیار پر کاربرد در صنعت داروسازی است. آب می‌تواند به عنوان یک ماده جانبی در فرایندهای تولید دارو یا جهت بازیابی محصول (Reconstitution) و نیز به عنوان محصول نهایی یا یک ماده شستشو دهنده در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار گیرد.

با توجه به خصوصیات و ویژگی هایی که آب باید مطابق استانداردهای فارماکوپه جهت مصارف دارویی داشته باشد، الزاماتی برای کنترل ویژگی های آن تعیین شده است. انواع

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، دکتر رامین اصغریان
(**email**: ramin3205@gmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۱/۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱/۲۶

آب با کیفیت‌های مختلف براساس انواع مصارف دارویی موجود است و کنترل کیفیت این آب بخصوص کنترل میکروبی، یک نگرانی بزرگ درصنعت داروسازی می باشد. برای همین منظور مواد ضدعفونی کننده مختلفی جهت ضدعفونی آب و کاهش بار میکروبی آن استفاده می‌شود.

میکروارگانیسم‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل آلودگی در سیستم های آبی به شمار می‌آیند که عموماً به شکل بیوفیلم در مقادیر زیادی تولید می‌شوند. با توجه به امکان تکثیر مجدد آنها، حذف بیوفیلم از سیستم به راحتی انجام نگرفته و باعث آلودگی قابل توجه آب می‌شوند، به عبارتی پس از تشکیل بیوفیلم، کارایی ضدعفونی کننده ها در حذف بیوفیلم کاهش می‌یابد و حتی روش‌های مکانیکی قادر به از بین بردن تمام بیوفیلم نمی‌باشد و باقیمانده آن به عنوان آغازگر رشد دوباره بیوفیلم عمل می‌کند و محدود کردن آن غیر ممکن به نظر می‌رسد (۳-۱). براین اساس اهمیت استفاده از یک روش موثر و مناسب در کنترل میکروبی آب و جلوگیری از رشد میکروبی و تشکیل بیوفیلم مشخص می شود.



شکل ۱. روند تشکیل بیوفیلم در سطح

نگهداری آب در سیستم‌های توزیع آب دارویی به روش‌های مختلفی انجام می‌شود. به طور کلی سیستم‌های آب‌سازی از نقطه نظر دمایی به سه روش نگهداری می‌شوند که شامل نگهداری در دمای بالاتر از ۷۰ درجه سانتی‌گراد، نگهداری در دمای کمتر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد و نگهداری در دمای معمولی است که در مورد اخیر احتمال و خطر آلودگی‌های بیولوژیکی افزایش می‌یابد. جهت کاهش این خطر، از عوامل نگهدارنده آب در سیستم‌های آب‌سازی استفاده می‌گردد. این عوامل شامل دستگاه مولد UV یا استفاده از ضدعفونی کننده هایی مثل ازن می‌باشد (۳). به طور کلی ضدعفونی کننده‌های شیمیایی به دو گروه بزرگ و اصلی تقسیم‌بندی می‌شوند: اکسیدکننده ها مانند کلر، کلرین دی اکسید، ازن و غیر اکسید کننده‌ها مانند ترکیبات آمونیوم ۴ ظرفیتی (سورفکتانت‌ها)، فرمالدهید، ترکیبات آنیونیک و غیرآنیونیک.

بسیاری از ضدعفونی کننده‌های شیمیایی مورد استفاده در سیستم آب‌سازی دارای باقیمانده بوده، لذا کاربری آنها را با مشکل مواجه می‌کند. در این تحقیق اثرات میکروب‌زدایی سه ضدعفونی کننده اکسیدکننده ازن، کلر و پراکسید هیدروژن مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

عمومی‌ترین روش گندزدایی کلرزنی می‌باشد که از دلایل عمده استفاده از آن می‌توان به مؤثر بودن در غلظت پایین، ارزان بودن، در دسترس بودن و نیز داشتن باقی‌مانده کم در آب پس از عمل گندزدایی اشاره نمود. اما با توجه به تشکیل ترکیبات آلی کلرینه و سایر ترکیبات سمی از جمله تری هالومتان‌ها استفاده از گندزداهای جدید روز به روز ابعاد گسترده‌تری می‌یابد.

کلر ضدعفونی کننده‌ای موثر برروی طیف گسترده‌ای از میکرو ارگانیسم‌ها می‌باشد و در pH بین ۶ تا ۸ به خوبی فعال می‌باشد. H_2O_2 علیه طیف وسیعی از ویروس‌ها و باکتری‌ها، مخمرها و اسپورهای باکتری‌هایی موثر می‌باشد، ولی به طور کلی فعالیت آن علیه باکتری‌های گرم مثبت، بیشتر از گرم منفی‌ها می‌باشد، هرچند جهت ضدعفونی قارچ، اسپور و ویروس‌ها، نیازمند غلظت‌های بالاتری است. ولی از معایب آن این است که بر روی سطوح آلومینیومی، مسی، روی و برنجی نباید استفاده شود (۴، ۵).

نقش ازن در تصفیه آب و پساب به عنوان یک عامل اکسید کننده و یک ترکیب میکروب کش حائز اهمیت بوده و در محیط آبی خصوصیات مشابهی با کلر دارد. این دو ضدعفونی کننده به عنوان رقیب یکدیگر و در مواردی مکمل یکدیگر مطرح می‌باشند.

در این تحقیق، غلظتی از ضدعفونی کننده‌های ازن، کلر و هیدروژن پراکسید مورد بررسی قرار گرفت تا اثر آنها در کاهش تعداد میکروب‌ها با یکدیگر مقایسه گردد.

مواد و روشها

مواد مورد استفاده شامل محیط‌های کشت زیر بود:

Sabouraud dextrose Agar; Merck: 5438, Plate count agar; Merck: 5463, Soybean – casein digest agar medium; Merck: 5458, Soybean – casein digest broth medium; Merck: 5459.

ضد عفونی کننده‌ها شامل گاز ازن، محلول پراکسید هیدروژن ۳۰ ٪ Merck و کلر به صورت کلسیم هیپوکلریت ۷۰ بود. معرف‌های مورد استفاده نیز شامل قرص DPD no.4 معرف

جدول۱. نتایج اثربخشی پراکسید هیدروژن بر باکتری ها و قارچ های مورد آزمایش

			پراکسید هیدروژن		
میکروارگانیسم	غلظت (میلی گرم بر لیتر)	نمونه کنترل (CFU/ml)	زمان تماس (دقیقه)		
			۱	۱۰	۲۰
P. aeruginosa	۰/۱	۲×۱۰^۵	۲×۱۰^۵	$۱/۶ \times ۱۰^۵$	$۱/۵ \times ۱۰^۵$
	۰/۱۵	$۱/۵ \times ۱۰^۵$	$۱/۵ \times ۱۰^۵$	$۱/۵ \times ۱۰^۵$	$۱۰^۵$
	۱	$۱۰^۵$	$۱۰^۵$	$۱۰^۵$	۷×۱۰^۴
	۲	۷×۱۰^۵	$۵/۴ \times ۱۰^۵$	۵×۱۰^۵	۵×۱۰^۵
E.coli	۱	۶×۱۰^۵	۵×۱۰^۵	۵×۱۰^۵	۵×۱۰^۵
S. aureus	۰/۱۵	$۱۰^۵$	$۱۰^۵$	$۱۰^۵$	$۱۰^۵$
	۱	$۷/۵ \times ۱۰^۵$	$۷/۲ \times ۱۰^۵$	$۷/۵ \times ۱۰^۵$	$۷/۵ \times ۱۰^۵$
C.albicans	۱	۷×۱۰^۵	$۶/۵ \times ۱۰^۵$	$۶/۵ \times ۱۰^۵$	$۶/۵ \times ۱۰^۵$
A.niger	۱	۲×۱۰^۵	۲×۱۰^۵	۲×۱۰^۵	۲×۱۰^۵

ازن، قرص DPD no.1 معرف کلر ، قرص HR و PT معرف H_2O_2 و قرص DPD Glycine بود.

آزمایش به روش Dilution method صورت گرفت که مراحل آن به صورت زیر است:

۱) تهیه رقت 1ppm از مواد ضدعفونی کننده

۲) تهیه سوسپانسیون میکروبی از ۵ سوش مشخص با شمارش 10^7-106 cfu/ml

میکروارگانیزم‌های مورد استفاده شامل موارد زیر بود:
S. aureus;ATCC6538; PTCC1112. E. coli;ATCC8739; PTCC1330, P. aeruginosa; ATCC9027; PTCC1074, C. albicans;ATCC10231; PTCC5027, A. niger ATCC16404; PTCC: 5011.

۳)در معرض قرار دادن ضدعفونی کننده با سوسپانسیون میکروبی به مدت ۱، ۱۰ و ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ - ۲۰ درجه سانتیگراد.

۴)کشت سوسپانسیون میکروبی در محیط کشت مناسب به منظور تعیین تعداد میکرارگانیزم های زنده.

۵)شمارش تعداد کلنی ها درمحیط کشت پس از مدت زمان مناسب.

این روش برای سنجش حساسیت میکروب های مختلف به یک ماده شیمیایی مناسب است و نسبت به ضریب فنل کاربرد وسیع‌تری دارد. غلظت، pH، زمان تماس، دما، نوع میکروارگانیزم و حضور مواد آلی در آب از عوامل موثر در عملکرد ماده ضدعفونی کننده در سیستم آب‌سازی می‌باشد (۶). براین اساس در این تحقیق شرایط و عوامل فوق برای هر سه نمونه ضدعفونی کننده یکسان درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج قدرت ضد میکروبی ضدعفونی کننده هیدروژن پراکسید در جدول ۱ نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده، غلظت ppm ۱ پراکسید هیدروژن در مدت زمان حداکثر ۲۰ دقیقه، قادر به از بین بردن میکروارگانیسم های فوق نبود. به عبارتی، با غلظت ppm ۱ و در مدت زمان ۲۰ دقیقه فاقد اثر میکروب کشی بود. نتایج قدرت ضد میکروبی ضدعفونی کننده کلر در جدول ۲ نشان داده شده است. همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌گردد، غلظت ppm ۱ کلر قادر به کاهش حدود Log ۳-۱ بار میکروبی بود، ولی بر روی قارچها تاثیر چندانی ندارد. نتایج قدرت ضد میکروبی ضدعفونی کننده ازن در جدول ۳ نشان داده شده است. همان طوری که در جدول ۳ مشاهده می‌گردد، غلظت ppm ۱ ازن، نسبت به غلظت‌های مشابه از کلر و H_2O_2 بسیار موثرتر بود، به طوری که قادر به کاهش حدود log ۵ از جمعیت باکتریایی بود، همچنین بر روی قارچ C.albicans نیزموثر بود و قادر به کاهش حدود log ۱ از آن بود.

بحث

ازن یکی از اشکال آلوتروپی اکسیژن بوده و گازی بی رنگ با بوی تند و ناپایدار می‌باشد. این ترکیب یک اکسید کننده قوی بوده و بسیار قوی‌تر از اسید هیپوکلرو (ماده موثر گندزدایی

جدول۲. نتایج اثربخشی کلر بر باکتری ها و قارچ های مورد آزمایش

کلر				
میکروارگانیسم	غلظت (میلی گرم بر لیتر)	نمونه کنترل (CFU/ml)	زمان تماس (دقیقه)	
			۱	۱۰	۲۰
p.aeruginosa	۱	۲× ۱۰^۵	۵/۲ × ۱۰^۴	۴/۸ × ۱۰^۴	۱۰^۴
	۲	۱/۹× ۱۰^۵	۴/۵× ۱۰^۳	۵× ۱۰^۲	۳× ۱۰^۱
E.coli	۱	۳ × ۱۰^۵	۱/۳× ۱۰^۴	۱/۵× ۱۰^۳	۶ × ۱۰^۲
S. aureus	۰/۱	۱۰^۵	۱۰^۵	۱۰^۵	۱۰^۵
	۱	۱۰^۵	۵/۲× ۱۰^۳	۳/۸× ۱۰^۳	۳× 10^3
C.albicans	۱	۱۰^۵	۶× ۱۰^۴	۶ × ۱۰^۴	۶ × ۱۰^۴
A.niger	۱	۴ × ۱۰^۵	۴ × ۱۰^۵	۴ × ۱۰^۵	۳ × ۱۰^۵

جدول۳. نتایج اثربخشی ازن بر باکتری ها و قارچ های مورد آزمایش

ازن				
میکروارگانیسم	غلظت (میلی گرم بر لیتر)	نمونه کنترل (CFU/ml)	زمان تماس (دقیقه)	
			۱	۱۰	۲۰
P. aeruginosa	۰/۱	۳/۴ × ۱۰^۵	۱ × ۱۰^۵	۹ × ۱۰^۴	۷ × ۱۰^۴
	۱	۱/۱ × ۱۰^۵	۰	۰	۰
E.coli	۱	۵/۵ × ۱۰^۵	۰	۰	۰
S.aureus	۱	۸ × ۱۰^۵	۰	۰	۰
C.albicans	۱	۶ × ۱۰^۵	۶ × ۱۰^۴	۶ × ۱۰^۴	۵/۵ × ۱۰^۴
A. niger	۱	۵ × ۱۰^۵	۱/۵ × ۱۰^۵	۱/۲ × ۱۰^۵	۱/۲ × ۱۰^۵

کلر در آب) می‌باشد. حلالیت ازن در آب ۱۲ مرتبه کمتر از حلالیت کلر بوده و محلول آبی آن نیز ناپایدار می‌باشد، ولی ۱۳ بار سریع‌تر از اکسیژن در آب حل می‌شود (۷). با توجه به خاصیت الکترون کشندگی اکسیژن، ازن تمایل بسیار زیادی به کاهش عدد اکسایش یکی از اکسیژن‌های خود دارد، همچنین می‌توان گفت ازن اکسنده‌ای بسیار قوی است، به گونه‌ای که پتانسیل کاهشی آن در برابر الکترود استاندارد هیدروژن، رقم بالای ۲/۰۷ mv است.

خصوصیات میکروب کشی ازن بیانگر پتانسیل بالای اکسیداسیون آن می‌باشد. تحقیقات نشان می‌دهد که گندزدایی توسط ازن، حاصل اثر مستقیم آن بر باکتری‌ها و تجزیه دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد که از این نظر با مکانیسم عمل کلر در فرایند گندزدایی متفاوت است. غلظت ppm ۱ ازن، نسبت به غلظت‌های مشابه از کلر و پراکسید هیدروژن بسیار موثرتر بوده، به طوری که در مدت حدود ۲۰ دقیقه قادر به کاهش حداقل Log ۵ از جمعیت باکتریایی است.

همچنین بر روی قارچ C.albicans نیز موثر بوده و قادر به کاهش حدود Log ۱ از آن می‌باشد. این در حالی است که غلظت ppm ۱ پراکسید هیدروژن در مدت زمان حداکثر ۲۰ دقیقه، قادر به از بین بردن میکروارگانیسم های مورد آزمایش نیست (جدول ۲) همچنین غلظت ppm ۱ کلر، قادر به کاهش Log ۳-۱ از جمعیت میکروبی در مدت زمان حداکثر ۲۰ دقیقه می‌باشد. بر این اساس، هرچند کلر در مقایسه با پراکسید هیدروژن در شرایط یکسان، اثرات میکروب کشی بیشتری داشته، ولی قدرت اثر ازن در حذف میکروارگانیزم‌های مختلف و در شرایط یکسان بیشتر از کلر و پراکسید هیدروژن است.

این نتایج در تحقیقات دیگری نیز به اثبات رسیده است، با توجه به قدرت بالای گندزدایی ازن در مقایسه با کلر (۲۵ برابر) و سایر گندزداها، زمان کمتری جهت تکمیل فرایند گندزدایی به هنگام استفاده از ازن نیاز است. بررسی‌ها همچنین بیانگر توانایی بیشتر ازن در از بین بردن ویروس‌ها در مقایسه با کلر است (۸). یکی از مهم‌ترین مزایای O_3 واکنش آن با H_2O و تشکیل پراکسید هیدروژن H_2O_2 یا دقیق‌تر

$(HO-)^2$ می‌شود که که این رادیکال‌ها به نوبه خود برای حمله مولکولی) و اکسیداسیون آنها به کار می‌رود.
به ترکیبات آلی مقاوم (مقاوم در مقابل واکنش مستقیم با ازن

REFERENCES

1. USP32; NF25, Water for pharmaceutical use. 2008; 1231: 1-50.
2. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. 2004; 2: 95–108.
3. Anita M, Barbara P, Thomas P. GMP Manual: part 5. Pharmaceutical water. 2008; 1-5.89.
4. Hammond CR. The elements, in handbook of chemistry and physics. 2000; 81: 19-98.
5. Jones CW, Clark JH. Applications of hydrogen peroxide and derivatives. Royal Society of Chemistry, 1999, 1-260.
6. Rutala WA, Weber DJ, CDC-Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. 2008; 31: 107-17.
7. Pontius FW, McGraw H, editors. Water quality and treatment. Fourth ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1990.
8. DeMers LD, Renner, RC, editors. Alternative Disinfection Technologies for Small Drinking Water Systems. Denver: AWWA and AWWARF CO; 1992.