

Original article

Preparation and Evaluation of Microbial Resistance of Nortriptyline Mouthwash Based on Pharmaceutical Pharmacopoeia Standards with the Aim of Application in Oral Mucositis

Sadeghian Taher¹, Allahyari Saeideh^{2*}

1. Student Research Committee, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

* **Corresponding author.** Tel: +984533522437, Fax: +984533522197, E-mail: s.allahyari@arums.ac.ir

Article info

Article history:

Received: Mar 06, 2024

Accepted: May 09, 2024

Keywords:

Mouthwash

Nortriptyline

Microbial Resistance

Adsorption

ABSTRACT

Background: Oral mucositis as a complication of chemotherapy has posed significant challenges to the quality of life in cancer patients. Tricyclic antidepressants, including nortriptyline can control the pain caused by mucositis by inhibiting sodium channels. Since patient compliance and rapid drug effect are the goals of the proposed formulation, it was decided to prepare and evaluate a nortriptyline mouthwash according to the United States Pharmacopeia.

Methods: Based on the pharmacopeia, the necessary excipients in the nortriptyline mouthwash were determined, and the amount of each was specified. After validating the UV spectrophotometric technique, drug interaction with the mouthwash container was investigated. In addition to measuring the aqueous activity, necessary microbiological tests were also performed.

Results: The UV spectroscopy method validation for nortriptyline was performed at the obtained maximum absorption wavelength (238 nm). The findings of the investigation of the interaction of polyethylene terephthalate container with nortriptyline indicate almost no drug adsorption into the internal part of the mouthwash container over 28 days. The results of antibacterial and antifungal/antimycotic tests were within the standard range of the United States Pharmacopeia. The mouthwash's aqueous activity was also found to be 0.81, indicating an unfavorable environment for microbial growth.

Conclusion: This study has shown that the prepared nortriptyline mouthwash meets microbiological resistance standards and there is no interaction between the active drug ingredient and the proposed container. Therefore, this formulation can be suggested as a promising candidate for clinical exploration.

How to cite this article: Sadeghian T, Allahyari S. Preparation and Evaluation of Microbial Resistance of Nortriptyline Mouthwash Based on Pharmaceutical Pharmacopoeia Standards with the Aim of Application in Oral Mucositis. J Ardabil Univ Med Sci. 2024;24(1): 19-34.

Extended Abstract

Background: Cancer is a major threat to the health of people in different regions of the world. Although chemotherapy and high doses of drugs are the most common methods of dealing with cancer, they have many side effects for patients. Oral mucositis as a complication with severe pain has posed significant challenges to the quality of life of these cancer patients. Accordingly, no specific drug has received the approval of the Food and Drug Organization to treat this condition; but it is common to prescribe a series of drugs such as local anesthetics, systemic opioid analgesics and anti-inflammatory drugs to significantly reduce the pain in these people. Therefore, finding a way to reduce pain in these patients may improve their treatment process, and quality of life. Tricyclic antidepressants, including nortriptyline may control the pain caused by mucositis by inhibiting sodium channels. Since patient compliance and rapid drug effect are the goals of the proposed formulation, it was decided to prepare and evaluate a nortriptyline mouthwash according to the United States Pharmacopeia. It is necessary to say that oral mouthwash can be introduced as the most convenient formulation to reduce local pain quickly. Therefore, the authors decided to prepare a nortriptyline mouthwash, and analyze its *in-vitro* characteristics such as drug adsorption, and microbial resistance based on the pharmacopoeia protocols.

Methods: Due to the multiple use of the mouthwash formulation, it is necessary to add a series of protective substances. However, in order to minimize possible interactions between the drug and excipients, the addition of other substances such as color and sweeteners was avoided as much as possible. Necessary excipients in the nortriptyline mouthwash, and the amount of each were specified based on the United States pharmacopeia. Quantitative determination of nortriptyline was used by ultraviolet (UV) spectrophotometry system. Before the preparation of standard solutions, a diluted sample of this initial stock solution was

examined across the range of 200 to 400 nm to identify the drug's $\lambda_{\max}$. Inter-day and intra-day precision and accuracy were calculated according to the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines. After validating this method, drug interaction with the polyethylene terephthalate (PET) mouthwash container was investigated for 28 days. It is also important to say that in each section, sampling was done at least 3 times to ensure the precision and accuracy of the analyzing. The determination of water activity of nonsterile pharmaceutical dosage forms aids in decision relating to the antimicrobial effectiveness of preservative systems. Nonsterile dosage forms may have preservatives added to protect the growth of microorganisms inadvertently introduced during usage. In this study ethanol, methyl paraben and propyl paraben were used as antimicrobial preservatives. Therefore, in addition to water activity characterization, necessary microbiological tests were also performed based on the pharmacopeia criteria to confirm the potency of preservatives. Here, the antimicrobial effectiveness of prepared mouthwash was characterized based on the requirements of category 1 products for bacteria and yeast/molds. Here, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* were designated as standard organisms, and the experimental procedure was conducted for 28 days and microorganism counting was done at zero, 7, 14 and 28 days.

Results: Aqueous mouthwash of nortriptyline (0.1% w/v) was prepared with ethanol (10% v/v), methyl-paraben (0.1% W/V), and propyl-paraben (0.04% W/V) as excipients. UV spectrum of nortriptyline within distilled water illustrated the $\lambda_{\max}$ at 238.5 nm. The comparison of accuracy and relative standard deviation data indicated a robust agreement between the experimental and theoretical values. The linearity of the method was assessed based on the acquired regression data, which indicated a determination coefficient greater than 0.99. The results of the drug and polyethylene mouthwash container revealed that the most adsorption occurred at day 28 with 8% quantity. The

findings from the antimicrobial effectiveness of nortriptyline mouthwash elucidated acceptable results referred to the United States pharmacopeia. In this section, the non-sterile oral cavity medicinal products were targeted. Since this mouthwash is prepared with the aim of reducing pain in patients undergoing radiation therapy and chemotherapy, its antimicrobial efficiency was evaluated based on the first-class products with high microbial sensitivity (including injectable, ear, nose and eye products). The results showed a greater than 2.0 log reduction from the initial count at 7 days. Almost 4.0 log reduction was also seen from the initial count at 14 days and no increase from the 14 days' count at 28 days. There was no increase from the initial calculated count of *Candida albicans* at 7, 14, and 28 days. Based on that category, the prepared mouthwash formulation had optimum antimicrobial potency. The water activity of the prepared mouthwash was also obtained at 0.81, which was lower than the required amount for the growth of

Pseudomonas aeruginosa (0.97), and *Staphylococcus aureus* (0.86).

Conclusion: This study deals with the preparation and *in-vitro* evaluation of nortriptyline mouthwash. In this way, appropriate formulation components with standard microbial resistance levels were obtained. The current results indicated that the drug nortriptyline does not interfere with the proposed polyethylene terephthalate mouthwash container for a period of 28 days at room temperature. Based on the standard results of microbial/fungal resistance and water activity (0.81), it can be claimed that the prepared formulation will maintain its stability during consumption and will not be contaminated. The authors suggest conducting cell and animal experiments in future studies to find out the compatibility of this formulation with human body cells. On the other hand, extensive clinical studies are also suggested in this field to prove the theory of reducing the pain of oral mucositis following the consumption of this product.

تهیه و ارزیابی مقاومت میکروبی دهانشویه نورتریتلین بر اساس استانداردهای فارماکوپه دارویی با هدف کاربرد در موکوزیت دهانی

طاہر صادقیان^۱؛ سعیده اللہیاری^{۲*}

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲. گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۵۲۲۴۳۷ فاکس: ۰۴۵۳۳۵۲۲۱۹۷ پست الکترونیک: s.allahyari@arums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: موکوزیت دهانی به عنوان یک عارضه در روند درمانی سرطان، چالش‌های مهمی در کیفیت زندگی بیماران ایجاد کرده است. ضد افسردگی‌های سه حلقه‌ای از جمله نورتریتلین از طریق مهار کانال‌های سدیمی می‌توانند میزان درد ناشی از موکوزیت را کنترل کنند. از آنجایی که راحتی مصرف و نیز مشاهده‌ی سریع اثر دارویی از اهداف فرمولاسیون پیشنهادی است؛ تصمیم بر آن گرفته شد که دهانشویه‌ی نورتریتلین تهیه و براساس دستورالعمل فارماکوپه از نظر تداخل دارو با ظرف و میزان مقاومت میکروبی در حین مصرف بررسی شود.

روش کار: بر اساس فارماکوپه دارویی، مواد کمکی مورد نیاز در دهانشویه‌ی نورتریتلین تعیین و مقدار هر یک از آن‌ها مشخص گردید. پس از انجام معتبرسازی روش اسپکتروفتومتری فرابنفش، تداخل دارو با ظرف دهانشویه مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر اندازه‌گیری فعالیت آبی، آزمایش‌های میکروبی لازم نیز انجام شد.

یافته‌ها: معتبرسازی روش تعیین مقدار نورتریتلین در حداکثر طول موج جذبی بدست آمده (۲۳۸/۵ نانومتر) انجام گرفت. یافته‌های حاصل از بررسی تداخل ظرف پلی‌اتیلن ترفتالات با نورتریتلین، نشانگر عدم جذب دارو به بخش داخلی ظرف دهانشویه در ۲۸ روز می‌باشد. نتایج بررسی قدرت ضد باکتریایی و ضد مخمری/کپکی در محدوده‌ی استاندارد فارماکوپه ایالات متحده قرار داشت. میزان فعالیت آبی دهانشویه نیز ۰/۸۱ بدست آمده که بیانگر محیطی نامناسب برای رشد میکروارگانیسم‌ها بود.

نتیجه‌گیری: مطالعات پایه‌ای نشان داد که دهانشویه‌ی نورتریتلین تهیه شده استانداردهای مقاومت میکروبی را داشته و تداخلی بین ماده موثره دارویی و ظرف پیشنهادی وجود ندارد. در نتیجه می‌توان این فرمولاسیون را به عنوان یک کاندید امیدوارکننده برای کاوش‌های بالینی پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: دهانشویه، نورتریتلین، مقاومت میکروبی، جذب سطحی

دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۶ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۰

مقدمه

روش‌های مقابله با سرطان است، اما عوارض بسیاری را در کنار آن برای بیماران دارد. در این روش درمانی که معمولاً با هدف افزایش طول عمر بیمار، ممانعت از گسترش سرطان و نیز به عنوان یک درمان تسکینی

امروزه سرطان یک تهدید اصلی برای سلامتی مردم مناطق مختلف جهان است. اگرچه استفاده از شیمی درمانی و نیز دوزهای بالای دارویی، از جمله رایج‌ترین

انجام می‌گیرد [۱۰،۲] یک سری عوارض جانبی نیز قابل مشاهده خواهد بود. از جمله عوارض ناخواسته می‌توان به اثرات منفی بر سلول‌ها و بافت‌های سالم بدن اشاره کرد که منجر به نارسایی و سرکوب سیستم ایمنی، التهاب مخاط و دیگر موارد می‌گردد [۵-۳]. سرطان سر و گردن از جمله شایع‌ترین سرطان‌ها در ایران بوده که معمولاً توسط جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی و یا به شکل ترکیب چند روش تحت درمان قرار می‌گیرند [۷،۶]. از جمله شایع‌ترین عوارض جانبی ناشی از شیمی‌درمانی در این سرطان، موکوزیت دهانی می‌باشد که حداقل ۳ الی ۵ روز بعد از شیمی‌درمانی بروز می‌کند [۹،۸]. همچنین این عارضه در بیش از ۸۰ درصد بیماران در طول پرتودرمانی بروز نموده [۱۰] و منجر به التهاب و زخم‌شدگی مجاری گوارشی از حفره دهان تا مخرج می‌شود. یک شکل از موکوزیت، التهاب حفره دهانی (استوماتیت) است که واکنش التهابی بوده و با سرخی متوسط و تورم همراه است که در صورت شدید بودن، دردناک بوده و توام با خونریزی و عفونت ثانویه می‌باشد [۸]. درد به عنوان اولین نشانه شایع موکوزیت دهانی، نه تنها بر کیفیت زندگی بیماران، بلکه بر سلامتی، بقاء و روند درمان آن‌ها نیز موثر است. در برخی از موارد، شدت درد و احساس سوختگی و ناراحتی در فضای دهانی تا حدی است که می‌تواند منجر به قطع درمان توسط فرد بیمار گردد [۱۱،۷،۶]. طبق مطالعات انجام گرفته در راستای دارو درمانی موکوزیت ناشی از پرتودرمانی، هیچ داروی مشخصی جهت درمان این عارضه، تاییدیه سازمان غذا و دارو را دریافت نکرده است؛ اما به طور رایج می‌توان با تجویز یک سری از داروها از جمله بی‌حس‌کننده‌های موضعی، ضد دردهای سیستمیک اپیوئیدی و داروهای ضد التهاب میزان درد در این افراد را تا حد قابل توجهی کاهش داد [۱۲]. از جمله داروهایی که از دسته‌های ذکر شده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، می‌توان به عوامل اپیوئیدی [۱۵-۱۳]، لیدوکائین

[۱۶]، آنتی‌هیستامین‌ها (مثل دیفن‌هیدرامین)، آنتی‌اسیدها [۱۰]، دوکسپین [۱۷،۱۶] و دیکلوفناک [۱۸] اشاره کرد که به صورت تکی و یا ترکیبی بررسی شده‌اند. از آنجایی که ضد افسردگی‌های سه حلقه‌ای می‌توانند از طریق مهار کانال‌های سدیمی و افزایش سروتونین و نوراپی نفرین در سیناپس‌های نورونی، میزان درد را کنترل کنند؛ انتخاب دارو از این دسته دارویی نیز می‌تواند اثرات مطلوبی در روند بهبود بیماری داشته باشد. از این گروه دارویی، دوکسپین [۱۲] و آمی‌تریپتیلین [۶] در شکل دارویی دهانشویه مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج مطلوبی را کسب کرده‌اند. با توجه به اینکه نورتریپتیلین متابولیت فعال آمی‌تریپتیلین است، فرض بر آن گرفته شد که دهانشویه نورتریپتیلین، به شکل بهتری می‌تواند درد ناشی از موکوزیت دهانی را کاهش دهد.

برخی از میکروارگانیزم‌ها در فرآورده‌های چند بار مصرف و غیراستریل در طی مصرف یا بعد از تهیه می‌توانند علاوه بر کاهش اثرات ماده موثره دارویی، سلامتی فرد را نیز تهدید کنند. لذا بایستی قبل از شروع مصرف توسط بیماران، قدرت ضد میکروبی فرآورده تهیه شده براساس منابع معتبر دارویی مورد بررسی قرار گیرد. همچنین تهیه یک فرمولاسیون استاندارد از جمله مراحل تاثیرگذار در روند درمانی تلقی می‌شود. لذا در این مطالعه تصمیم بر آن گرفته شد تا علاوه بر آماده‌سازی استاندارد دهانشویه، تداخل دارو با ظرف مربوطه و نیز میزان مقاومت میکروبی آن براساس روش ذکر شده در فارماکوپه ایالات متحده (USP^۱) بررسی گردد. براساس نتایج این مطالعه می‌توان اجزای فرمولاسیون ضروری جهت تهیه دهانشویه پایدار را پیشنهاد کرد.

¹ United States Pharmacopeia

روش کار

مواد مصرفی

ماده موثره دارویی نورتریپتیلین از شرکت داروسازی ارسطو در ایران تهیه شد. اتانول، متیل پارابن، و پروپیل پارابن نیز توسط شرکت Merck آلمان تامین و مورد استفاده قرار گرفتند. محیط کشت ^۱SDA حاوی کلرامفنیکل و نیز ^۲TSA ساخت شرکت Ibresco کشور ایتالیا بودند. قارچ کاندیدا آلبیکنز (ATCC No.10231) و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC No.25923) نیز از شرکت Merck آلمان خریداری شدند.

معتبرسازی روش اسپکتروفتومتری UV^۳

تعیین مقدار ماده موثره دارویی توسط اسپکتروفتومتری UV (Jasco v 730, Japan) انجام شد. قبل از تهیه محلول‌های استاندارد، یک محلول استوک از نورتریپتیلین تهیه شد و جهت تعیین حداکثر طول موج جذبی (λ_{max}) در محدوده جذبی ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. رقت‌های مختلف از محلول استوک براساس قانون بیرلامبرت تعیین شدند (۲۰-۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر). سپس پارامترهای خطی بودن، صحت و دقت نیز براساس دستورالعمل ICH^۴ محاسبه گردید. دقت و صحت درون روز^۵ و بین روز^۶ به ترتیب در سه نقطه زمانی مختلف در همان روز و روزهای مختلف طبق

فرمول‌های زیر بررسی شدند. به طور کلی، برای هر غلظت ۹ تکرار ثبت شد.

فرمول ۱:

$$\%RSD = \frac{SD}{M}$$

در فرمول ۱، RSD^7 انحراف معیار نسبی، SD^8 انحراف معیار و M نشانگر میانگین می‌باشد.

فرمول ۲:

$$\%Accuracy = \frac{Calculated\ Conc.}{Actual\ Conc.} \times 100$$

با استفاده از فرمول ۲ می‌توان صحت^۹ داده‌ها را از روی نسبت غلظت محاسبه شده^{۱۰} به غلظت واقعی^{۱۱} محاسبه کرد.

تهیه و آماده‌سازی دهانشویه

اجزای محلول دهانشویه به شرح جدول ۱ است. مقادیر مربوط به مواد کمکی بر اساس دستورالعمل‌های ذکر شده در USP تعیین شدند. با توجه به چندبار مصرف بودن فرمولاسیون دهانشویه نیاز است تا یک سری مواد به عنوان محافظت کننده نیز اضافه گردد. اما جهت به حداقل رساندن تداخلات احتمالی بین دارو و مواد کمکی از افزودن موادی دیگر از جمله رنگ، مواد شیرین کننده تا حد امکان جلوگیری شد. لازم به ذکر است که تمامی مواد در آب مقطر حل و به حجم نهایی رسیدند.

⁷ Relative Standard Deviation

⁸ Standard Deviation

⁹ Accuracy

¹⁰ Calculated Concentration

¹¹ Actual Concentration

¹ Sabouraud Dextrose Agar

² Tryptone Soy Agar

³ Ultraviolet

⁴ International Conference on Harmonization

⁵ Intra-day

⁶ Inter-day

جدول ۱. اجزاء، مقادیر و نقش هر یک از مواد به کار رفته در دهانشویه نورتریپتیلین

شماره	اجزا موجود در دهانشویه	مقدار	نقش
۱	نورتریپتیلین	۰/۱ درصد وزنی حجمی	ماده موثره دارویی
۲	اتانول	۱۰ درصد حجمی حجمی	محافظت کننده
۳	متیل پارابن	۰/۱ درصد وزنی حجمی	محافظت کننده
۴	پروپیل پارابن	۰/۰۴ درصد وزنی حجمی	محافظت کننده

بررسی تداخل بین ظرف پیشنهادی دهانشویه و

نورتریپتیلین

ظرف پیشنهادی برای محلول دهانشویه از جنس پلی اتیلن ترفتالات (PET^۱) است. در این تست، دهانشویه تهیه شده به مدت ۲۸ روز در جای خشک، در دمای اتاق، و به دور از تابش مستقیم نور خورشید در ظرف پیشنهادی نگهداری شد. در روزهای مختلف نمونه برداری انجام گرفت و مقدار ماده نورتریپتیلین توسط معادله حاصل از کالیبراسیون، تعیین مقدار شد. لازم به ذکر است که نمونه برداری در هر مرحله به شکل ۳ بار تکرار انجام شد. سپس توسط فرمول ۳ درصد جذب سطحی دارو به ظرف (Adsorption) محاسبه گردید. در اینجا C_i و C_t به ترتیب غلظت اولیه دارو و غلظت در لحظه t می باشند.

فرمول ۳:

$$Adsorption(\%) = \frac{[C_i - C_t]}{C_i} \times 100$$

بررسی میزان مقاومت باکتریایی دهانشویه

میزان مقاومت میکروبی دهانشویه تهیه شده، براساس دستورالعمل ذکر شده در USP انجام گرفت. در این بخش فرآورده های دارویی غیراستریل که نحوه تجویز آن ها به شکل شستشوی داخل حفره دهانی است، هدف قرار داده شد. از آنجایی که این دهانشویه با هدف کاهش درد در بیماران تحت پرتودرمانی تهیه شده است، میزان کارایی ضد میکروبی آن براساس محصولات کلاس اول با حساسیت میکروبی بالا در USP (شامل فرآورده های تزریقی، گوش، بینی و چشم) ارزیابی شد. نمونه برداری از دهانشویه حاوی

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC No.25923) براساس USP بخش ۱۵، در روزهای صفر، ۷، ۱۴ و ۲۸ انجام گرفت. نمونه های حاصل در دمای $25 \pm 32/5^\circ C$ و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در محیط کشت TSA کشت داده شده (دستگاه انکوباتور: Memmert Incubator- IF160Plus/IN160Plus) و سپس مورد شمارش قرار گرفتند.

بررسی میزان مقاومت قارچی دهانشویه

شرایط و استانداردهای لازم برای انجام این آزمایش نیز براساس دستورالعمل USP انجام شد. در این مطالعه از محیط کشت SDA جهت کشت قارچ کاندیدا آلبیکنز (ATCC No.10231) استفاده شد. نمونه برداری از دهانشویه حاوی قارچ مذکور در روزهای صفر، ۷، ۱۴ و ۲۸ انجام گرفت. نمونه های حاصل در دمای $25 \pm 22/5^\circ C$ و حداقل ۴۴ ساعت تحت انکوباسیون (دستگاه انکوباتور مدل Memmert Incubator IF160Plus/IN160Plus) قرار داده شدند. سپس تعداد کلنی های حاصل توسط شاخص های موجود در USP مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تعیین میزان فعالیت آبی دهانشویه

میزان فعالیت آبی فرمولاسیون های غیراستریل می تواند یکی دیگر از عوامل موثر در کارایی قدرت مقاومت میکروبی فرآورده و پایداری آن باشد. این شاخص، نسبت فشار بخار آب محصول به فشار بخار آب خالص پس از رسیدن به حالت تعادل رطوبتی در همان درجه حرارت را نشان می دهد. این آزمایش توسط دستگاه سنجش فعالیت آب (مدل Novasina LabSwift Portable) و در دمای $25^\circ C$ انجام شد.

¹ Poly Ethylene Terephthalate

یافته‌ها

معتبرسازی روش اسپکتروفتومتری UV

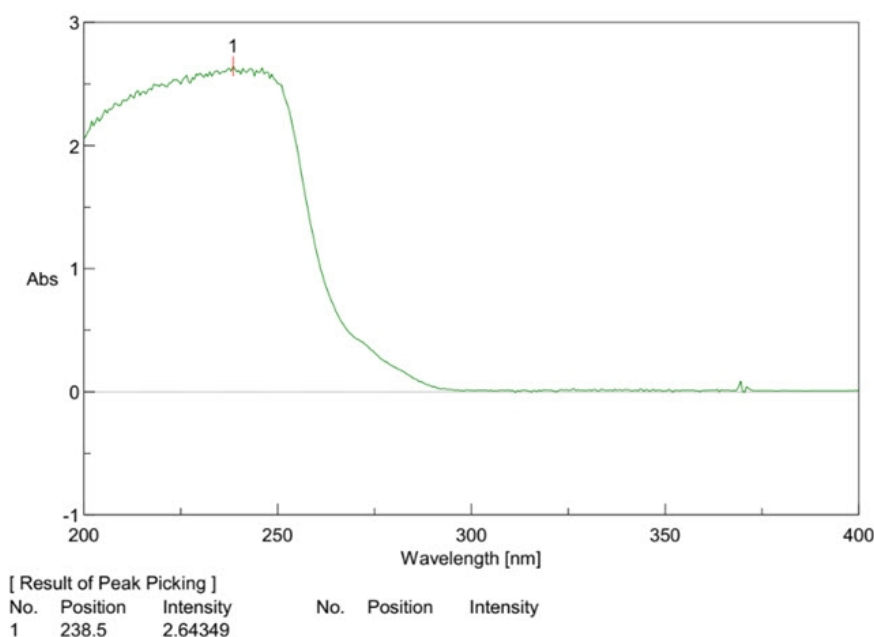
مطابق شکل ۱ حداکثر طول موج جذبی نورتریپتیلین در آب مقطر ۲۳۸/۵ نانومتر بدست آمد. پس از انجام کالیبراسیون اسپکتروفتومتری UV طبق دستورالعمل معتبرسازی ICH، معادله نهایی زیر حاصل شد.

$$y = 0.046x + 0.0078$$

فرمول ϵ :

$$R^2 = 0.992$$

در فرمول ϵ ، محور عمودی (y) مربوط به جذب و محور افقی (x) غلظت دارو بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر است. R^2 نیز نشان‌دهنده خطی بودن ارتباط بین این دو متغیر وابسته (جذب) و مستقل (غلظت) در محدوده غلظت ۲/۵ تا ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. داده‌های حاصل از بررسی صحت و دقت نیز به تفصیل در جدول ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱. اسپکتروم UV نورتریپتیلین در آب

جدول ۲. پارامترهای دقت و صحت حاصل از معتبرسازی روش تعیین مقدار نورتریپتیلین توسط اسپکتروفتومتری UV

مطابق با دستورالعمل ICH

غلظت نورتریپتیلین (μg/mL)	بین روز		درون روز	
	دقت (RSD%)	صحت (%)	دقت (RSD%)	صحت (%)
۲/۵	۱/۲۹	۱۰۳/۲۹	۱/۱۱	۹۸/۷۴
۵	۱/۰۷	۸۶/۴۵	۰/۸۹	۹۰/۱۱
۱۰	۰/۶۹	۱۰۸/۶۰	۰/۶۲	۱۰۷/۷۷
۲۰	۰/۲۴	۹۸/۵۷	۰/۲۹	۹۸/۵۸

ظرف در مدت ۲۸ روز انجام شد. شکل ۲ نتایج حاصل از وجود جذب سطحی دارو به ظرف را به تفصیل نشان می‌دهد. مطابق نمودار در روزهای مختلف مقدار کمی جذب مثبت دیده می‌شود و حداکثر میزان

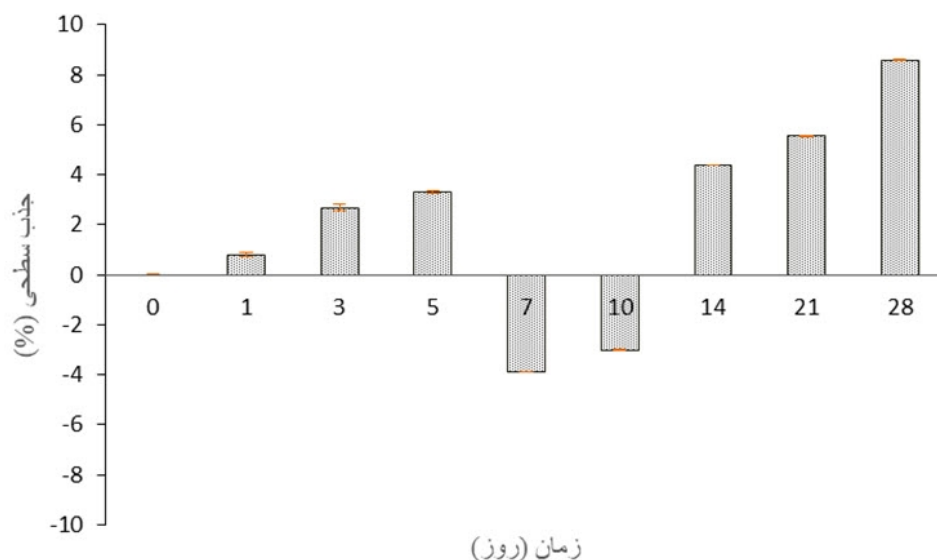
بررسی تداخل بین ظرف پیشنهادی دهانشویه و

نورتریپتیلین

بررسی تداخل بین ظرف دهانشویه از جنس PET و نورتریپتیلین از طریق نمونه‌برداری از محلول درون

معیار در هر روز نیز به شکل نوار خط^۱ در بالای هر نمودار نشان داده شده است.

^۱ Error Bar



شکل ۲. نمودار جذب سطحی دارو به ظرف دهانشویه از جنس پلی اتیلن ترفتالات (PET) در ۲۸ روز

بررسی میزان مقاومت باکتریایی دهانشویه

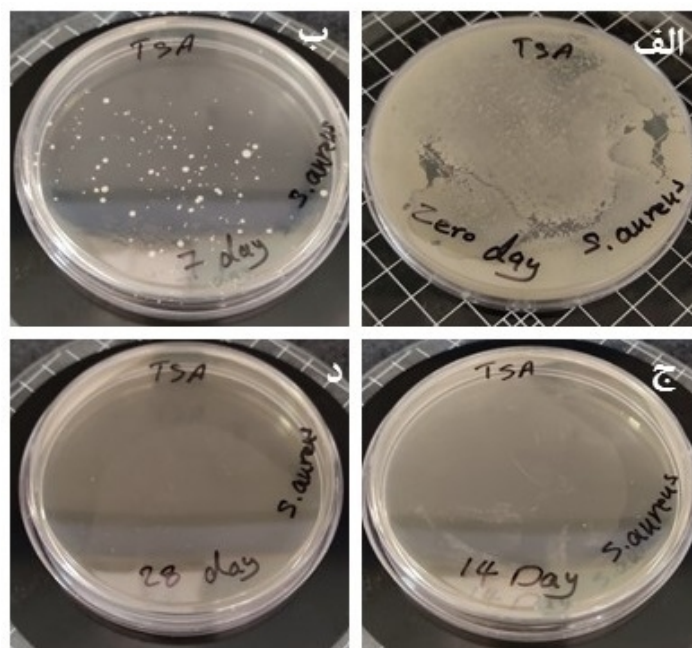
نتایج مربوط به تست مقاومت میکروبی در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در جدول ۳ آورده شده است. همانطور که مشاهده می شود، میزان کاهش بار میکروبی در مدت ۷ و ۱۴ روز به ترتیب ۲ و ۴ واحد لگاریتمی می باشد. از روز ۱۴ تا ۲۸ نیز هیچ گونه رشد باکتری مشاهده نشده است (شکل ۳).

با توجه به استانداردهای ذکر شده در USP (جدول ۴)، دهانشویه تهیه شده قدرت مقاومت میکروبی مناسبی را نشان می دهد. با توجه به مواد موجود در دهانشویه تهیه شده، می توان این نتیجه را به حضور نگهدارنده ها (متیل پارابن و پروپیل پارابن) و اتانول نسبت داد.

جدول ۳. نتایج بار میکروبی دهانشویه حاوی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مدت ۲۸ روز

زمان نمونه گیری	شمارش باکتری های زنده (CFU) ^۱	شمارش باکتری های زنده (Log ₁₀)
روز صفر	1×10^4	۴
روز هفتم	$< 1 \times 10^2$	≤ 2
روز چهاردهم	صفر	-
روز بیست و هشتم	صفر	-

1. Colony Forming Unit



شکل ۳. نتایج بار میکروبی دهانشویه آلوده شده به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مدت ۲۸ روز (محیط کشت TSA (Tryptone Soy Agar) (الف: روز صفر، ب: روز ۷، ج: روز ۱۴، د: روز ۲۸)

جدول ۴. دستورالعمل ذکر شده USP در مورد کارایی میزان مقاومت میکروبی (بخش ۵۱) برای محصولات کلاس اول با حساسیت میکروبی بالا

For Category 1 Products	
Bacteria	Not less than 1.0 log reduction from the initial calculated count at 7 days, Not less than 3.0 log reduction from the initial count at 14 days, and no increase from the 14 days' count at 28 days
Yeast and molds	No increase from the initial calculated count at 7, 14, and 28 days.

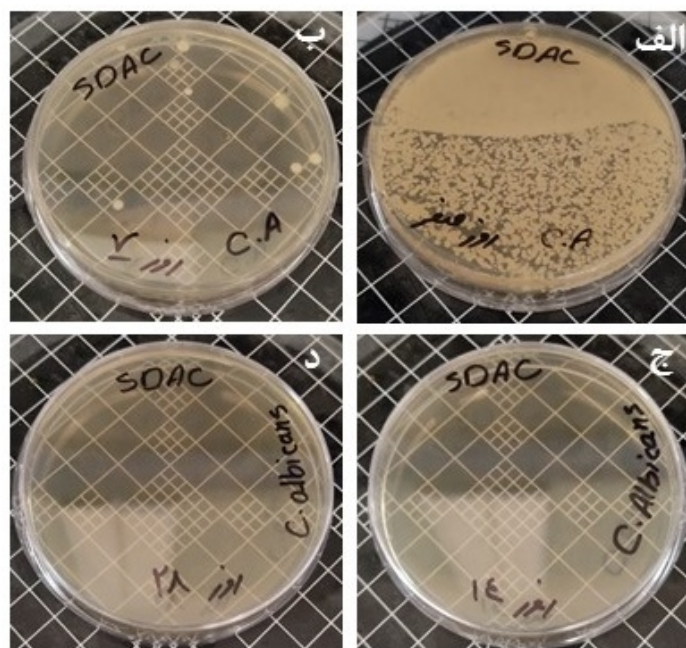
بررسی میزان مقاومت قارچی دهانشویه

با روز آغاز آزمایش، حاکی از عدم افزایش تعداد کلنی‌ها می‌باشد که مطابق با دستورالعمل USP بخش ۵۱ (جدول ۴) است.

نتایج مربوط به تست فعالیت مخمری/ کپکی با کاندیدا آلبیکنز در جدول ۵ و شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج کسب شده در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸ در مقایسه

جدول ۵. نتایج بار میکروبی دهانشویه حاوی قارچ کاندیدا آلبیکنز در مدت ۲۸ روز

زمان نمونه‌گیری	شمارش میکروارگانیسم‌های زنده (CFU)	شمارش میکروارگانیسم‌های زنده (Log ₁₀)
روز صفر	2×10^3	۳/۳
روز هفتم	< ۱۰	≤ ۱
روز چهاردهم	صفر	-
روز بیست و هشتم	صفر	-



شکل ۴. نتایج بار میکروبی دهانشویه آلوده شده به قارچ کاندیدا آلبیکنز در مدت ۲۸ روز (محیط کشت Sabouraud Dextrose Agar) (الف: روز صفر، ب: روز ۷، ج: روز ۱۴، د: روز ۲۸)

بررسی میزان فعالیت آبی دهانشویه

مطابق با دستورالعمل‌های مشخص شده در فارماکوپه دارویی ایالات متحده در بخش ۱۱۱۲ که به "کاربرد تعیین فعالیت آب در محصولات دارویی غیراستریل" می‌پردازد، ارزیابی فعالیت آب برای میکروارگانیسم‌های منفرد انجام شد. در این مطالعه میزان فعالیت آب برای فرمولاسیون دهانشویه ۰/۸۱ بدست آمد.

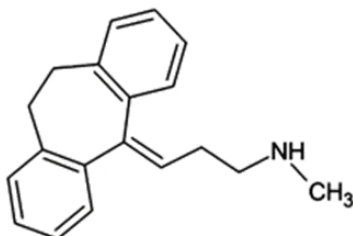
بحث

این مطالعه به تهیه دهانشویه نورتریپتیلین و بررسی برون تنی آن پرداخته است. جهت بررسی وجود احتمال جذب دارو به سطح داخلی ظرف بایستی روش تعیین مقدار دارو معتبرسازی شود. بدین ترتیب پس از گرفتن محدوده جذبی UV از دارو، حداکثر طول موج جذبی نورتریپتیلین ۲۳۸/۵ نانومتر بدست آمد. مونوگراف مربوط به نورتریپتیلین در USP، و نیز مطالعات دیگر حداکثر طول موج مربوط به نورتریپتیلین در آب مقطر را ۲۳۹ نانومتر بیان کرده‌اند [۱۹،۲۰] که در جهت تایید این یافته است.

داده‌های حاصل از بررسی صحت و دقت نیز به ترتیب حاکی از وجود یک رابطه متناسب بین داده‌های آزمایشگاهی و نظری و نیز کم بودن اختلاف بین تکرار آزمایش‌ها است. بررسی نتایج حاصل از دقت و صحت بین روزی و درون روزی (جدول ۲) هم حاکی از معتبر بودن روش تعیین مقدار دارو می‌باشد. زیرا که داده‌های حاصل در محدوده تعریف شده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا است. مطابق با استانداردهای ذکر شده در این سازمان، میزان RSD بایستی کوچکتر یا مساوی ۳٪ باشد. از طرفی محدوده قابل قبول برای صحت نیز باید بین ۸۰ تا ۱۲۰٪ بدست آید [۲۱].

دهانشویه نورتریپتیلین به شکل محلول شفاف مطابق جدول ۱ تهیه شد. به استناد اینکه دهانشویه آمی‌تریپتیلین به صورت محلولی با غلظت ۰/۱ درصد مورد بررسی قرار گرفته است [۶]، و نیز نورتریپتیلین متابولیت فعال آمی‌تریپتیلین است؛ غلظت ۰/۱ درصد وزنی حجمی از آن انتخاب شد. بر طبق گزارش‌های قبلی، اتانول ۱۰ تا ۱۸ درصد حجمی حجمی، نقش محافظت‌کنندگی مناسبی را ایفا می‌کند [۲۲]؛ اما با

از اتانول می‌تواند از طریق افزایش محلولیت، جذب سطحی دارو به ظرف را کاهش دهد [۲۵].



شکل ۵. ساختار شیمیایی نورتریتلین

از طرفی بار سطحی مواد یکی از عوامل موثر در جذب سطحی دارو به ظروف است [۲۶]، که pH محیط می‌تواند تاثیر بسزایی بر بار سطحی آن‌ها داشته باشد. با توجه به اینکه pH محیط دهانشویه در دمای اتاق حدود ۵ بدست آمد، پس داروی نورتریتلین با pK_a برابر با ۱۰/۴ در محیط مربوطه با شکل یونی با بار مثبت خواهد بود. پلاستیک‌ها از جمله PET معمولاً سطح هیدروفوب داشته و به سختی تحت تاثیر pH محیط قرار می‌گیرند [۲۶-۲۸]. به همین جهت مهمترین نیرویی که سبب جذب دارو به سطوح پلاستیکی خواهد شد، از نوع واکنش‌های آبگریزی^۲ است. در نتیجه انتظار می‌رود واکنش قوی بین دارو با بار مثبت و سطح ظرف وجود نداشته باشد. مطابق داده‌های حاصل از بررسی جذب دارو به ظرف دهانشویه (شکل ۲)، میزان جذب سطحی دارو به ظرف PET بسیار ناچیز بوده و بیشترین مقدار آن حدود ۸ درصد در روز ۲۸ می‌باشد. با توجه به اینکه سازمان غذا و داروی آمریکا، حداکثر جذب غیراختصاصی دارو به سطح ظرف را ۱۵٪ گزارش کرده است [۲۶]، داده‌های حاصل از این مطالعه نیز در محدوده قابل قبول می‌باشند. در مطالعه ای دیگر که بر روی میزان جذب داروهای مختلف بر روی ظروف پلاستیکی از جنس پلی‌پروپیلن و پلی‌استایرن انجام شده بود، حداکثر جذب سطحی قابل قبول را ۱۰٪ گزارش

توجه به اینکه سازمان غذا و داروی آمریکا برای فرآورده‌های داخل دهانی ۱۰ درصد حجمی حجمی از اتانول را پیشنهاد کرده است، به همین جهت در این مطالعه همان ۱۰ درصد از الکل به فرآورده اضافه شد. حضور اتانول در فرآورده سبب افزایش محلولیت نورتریتلین نیز خواهد شد. با توجه به چند بار مصرف بودن فرآورده، نیاز است تا جهت افزایش مقاومت میکروبی مواد محافظت کننده دیگری به جز اتانول نیز افزوده شود. مطابق با بخش ۳۴۱ از فارماکوپه USP مقدار قابل استفاده از متیل پارابن و پروپیل پارابن، به ترتیب حداقل ۰/۱۵ و ۰/۰۲ و حداکثر ۰/۲ و ۰/۰۶ درصد وزنی درصد وزنی می‌باشد. لذا ۰/۱ درصد وزنی حجمی از متیل پارابن و ۰/۰۴ درصد وزنی حجمی نیز از پروپیل پارابن به سایر اجزای دهانشویه اضافه و با آب مقطر به حجم نهایی رسیدند.

محلول دهانشویه شفاف نورتریتلین در ظرف PET ریخته شده و در دمای اتاق، در محیطی خشک و دور از تابش مستقیم نور آفتاب برای مطالعات بعدی نگهداری شد. PET یک پلاستیک پلی‌استر و از پرمصرف‌ترین مواد بسته‌بندی قابل بازیافت است. با توجه به شفافیت عالی، وزن سبک، خواص مانع گاز و آب، استحکام ضربه، مقاومت در برابر اشعه ماوراء بنفش و نشکن بودن (در مقایسه با بطری شیشه‌ای)، استفاده از آن به عنوان بسته‌بندی در حال افزایش است [۲۳]. با توجه به اینکه تا به امروز در خصوص وجود جذب سطحی نورتریتلین به بدنه داخلی ظرف دهانشویه از جنس PET اشاره‌ای نشده است، در این مطالعه به این موضوع مهم نیز پرداخته شده است. نورتریتلین با ساختار شیمیایی نشان داده شده در شکل ۵، یک داروی ضد افسردگی با محلولیت ۱ در ۹۰ قسمت از آب و ۱ در ۳۰ قسمت از اتانول است. طبق جدول محلولیت USP این ماده در دسته داروهای کم محلول^۱ قرار می‌گیرد [۲۴]. حضور ۱۰٪ حجمی

^۱ Sparingly Soluble

^۲ Hydrophobic Interactions

کردند [۲۶]. از طرفی جذب ۸٪ از دارو به ظرف را نمی‌توان به تخریب دارو نسبت داد، زیرا که نورتریپتیلین در محلول‌های آبی و در pH حدود ۵ پایدار است [۲۹،۳۰]. در روزهای ۷ و ۱۰ نیز مقدار ناچیزی جذب منفی دیده می‌شود که احتمالاً مربوط به خطای دستگاه در روزهای مختلف و یا پس داده شدن دارو به درون محلول [۳۱] است. زیرا که انتظار می‌رود نیروهای آب‌گریزی نیز در واکنش و جذب دارو به ظرف در حد بسیار کم وجود داشته باشند. نتایج حاصل از بررسی قدرت ضد باکتریایی دهانشویه (جدول ۳، شکل ۳) در محدوده استاندارد تعریف شده توسط فارماکوپه (جدول ۴) می‌باشد که می‌توان به وجود متیل پارابن، پروپیل پارابن و اتانول در غلظت‌های مناسب نسبت داد. مقالات نشان می‌دهند که حضور همزمان چندین نگهدارنده به دلیل ایجاد اثرات هم‌افزایی می‌توانند قدرت ضد میکروبی قابل قبولی از خود نشان دهند. از محافظت‌کننده‌های رایج در فرآورده‌های دهانشویه می‌توان به سدیم بنزوات و پارابن‌ها (متیل، اتیل) اشاره کرد [۳۲]. با توجه به اینکه pH فرآورده تهیه شده حدود ۵ است و محدوده اثر پارابن‌ها (بین ۳ تا ۸) وسیع‌تر از سدیم بنزوات (۲/۵ تا ۴) می‌باشد، در این مطالعه استفاده از پارابن‌ها ترجیح داده شد [۳۳]. از طرفی حضور همزمان متیل پارابن و پروپیل پارابن در فرآورده‌های دهانی رایج‌تر بوده و اثرات ضد میکروبی بهتری را نشان می‌دهند [۳۴،۳۵]. در خصوص اتانول نیز بایستی به این نکته اشاره کرد که ۱۰ درصد اتانول موجود در فرآورده دهانشویه قدرت ضد میکروبی مناسبی را از خود نشان می‌دهد [۲۲،۳۶].

حضور همزمان چندین نگهدارنده نه تنها باعث افزایش قدرت ضد میکروبی می‌شوند، بلکه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها را پوشش می‌دهند که مطالعات دیگر نیز در جهت تایید این یافته‌ها می‌باشند [۳۷]. متیل پارابن و پروپیل پارابن در pH محدوده ۳ تا ۸ فعال هستند [۳۳،۳۸] و بدین ترتیب در دهانشویه تهیه شده

با pH ۵ نیز توانسته‌اند فعالیت ضد قارچی خوبی نیز از خود نشان دهند. مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که متیل پارابن و پروپیل پارابن هر دو به شکل وابسته به غلظت، اثر مهاری بر روی فعالیت متابولیکی بیوفیلم حاصل از کاندیدا آلبیکنز می‌گذارند. همچنین بیان کردند که تاثیر مهاری متیل پارابن حدود ۲۵٪ بیشتر از پروپیل پارابن است [۳۹]. از طرفی حضور اتانول در ایجاد اثرات ضد قارچی حائز اهمیت است. محققین نشان دادند که انکوباسیون فرآورده با اتانول ۳۰٪ به مدت ۴ ساعت توانسته است از رشد کاندیدا آلبیکنز جلوگیری کند [۴۰]. همچنین اتانول همانند متیل پارابن و پروپیل پارابن به شکل وابسته به غلظت عمل می‌کند. مطالعات نشان می‌دهند که اتانول ۴٪ در مدت زمان ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تاثیر مهاری قابل توجهی بر میزان رشد بیوفیلم روی کاندیدا آلبیکنز (ATCC10231) داشته و با افزایش غلظت، تاثیر آن نیز بیشتر می‌شود [۴۱،۴۲].

با توجه به بخش ۱۱۱۱ در USP، فرمولاسیون دهانشویه باید محیطی نامناسب برای رشد سودوموناس آئروژینوزا (فعالیت آبی ۰/۹۷) و استافیلوکوکوس اورئوس (فعالیت آبی ۰/۸۶) باشد. از آنجایی که مقدار فعالیت آبی دهانشویه تهیه شده (۰/۸۱) کمتر از میزان آب مورد نیاز برای رشد این دو نوع میکروارگانیسم گرم منفی و گرم مثبت است، پس می‌توان در کنار سایر تست‌های انجام گرفته این ادعا را کرد که دهانشویه تهیه شده محیطی نامناسب برای رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. در اینجا باید به این نکته اشاره کرد که تا به امروز تعیین فعالیت آبی برای فرمولاسیون‌های متنوع دهانشویه در مقالات معتبر انتشار نیافته و تنها استانداردهای لازم در منابع فارماکوپه ذکر شده است. این مفهوم در سال ۱۹۵۳ میلادی توسط اسکات^۱ برای فرمولاسیون‌های دارویی در جهت اندازه‌گیری میزان آب در دسترس برای

^۱ Scott

فرمولاسیون تهیه شده در حین مصرف پایداری خود را حفظ کرده و دچار آلودگی نخواهد شد.

پیشنهادهات

به طور کلی، این مطالعه با هدف تهیه دهانشویه نورتریپتیلین و بررسی مطالعات پایه‌ای این فرمولاسیون و برخی از خواص برون‌تنی آن بود. لذا پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آینده آزمایش‌های سلولی و حیوانی نیز انجام گیرد تا به میزان سازگاری این فرمولاسیون با سلول‌های بدن انسان نیز پی برد. از طرفی مطالعات بالینی گسترده‌ای نیز در این زمینه پیشنهاد می‌گردد تا نظریه کاهش درد موکوزیت دهانی به دنبال مصرف این فرآورده به اثبات برسد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل کار تحقیقاتی با کد اخلاق IR.ARUMS.REC.1402.005 می‌باشد، لذا نویسندگان از حمایت‌های دانشگاه علوم پزشکی اردبیل کمال تشکر و قدردانی را دارند.

رشد میکروارگانیسم‌ها بیان شد [۴۳]. اگرچه بررسی فعالیت آبی بهترین معیار برای رشد میکروبی است [۴۴]، اما بر طبق دستورالعمل ICH Q6A جهت ترخیص یک محصول دارویی تنها بررسی میزان فعالیت آبی کافی نبوده و بایستی تست‌های تکمیلی در خصوص مقاومت میکروبی فرآورده انجام گیرد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه به تهیه و بررسی برون تنی دهانشویه نورتریپتیلین پرداخته است. بدین ترتیب که اجزای فرمولاسیونی مناسب با میزان مقاومت میکروبی استاندارد تهیه شد تا در مطالعات آینده بتوان فاز بالینی آن را نیز مورد بررسی قرار داد. نتایج حاضر حاکی از آن است که داروی نورتریپتیلین با ظرف پیشنهادی دهانشویه از جنس پلی‌اتیلن ترفتالات در مدت زمان ۲۸ روز و در دمای اتاق تداخلی ندارد. باستناد نتایج استاندارد مقاومت میکروبی/قارچی و فعالیت آبی (۰/۸۱)، می‌توان این ادعا را کرد که

References

- 1- Alfarouk KO, Stock C-M, Taylor S, Walsh M, Muddathir AK, Verduzco D, et al. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell Int.* 2015;15(1):71.
- 2- Allahyari S, Zahednezhad F, Khatami M, Hashemzadeh N, Zakeri-Milani P, Trotta F. Cyclodextrin nanosponges as potential anticancer drug delivery systems to be introduced into the market, compared with liposomes. *J Drug Deliv Technol.* 2022;67:102931.
- 3- Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell.* 2002;108(2):153-164.
- 4- Allen G, Logan R, Revesz T, Keefe D, Gue S. The prevalence and investigation of risk factors of oral mucositis in a pediatric oncology inpatient population; a prospective study. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2018;40(1):15-21.
- 5- Kiaie SH, Mojarad-Jabali S, Khaleseh F, Allahyari S, Taheri E, Zakeri-Milani P, et al. Axial pharmaceutical properties of liposome in cancer therapy: Recent advances and perspectives. *Int J Pharm.* 2020;581:119269.
- 6- Kakoei S, Pardakhty A, Hashemipour MA, Larizadeh H, Kalantari B, Tahmasebi E. Comparison the pain relief of amitriptyline mouthwash with benzydamine in oral mucositis. *J Dent (Shiraz).* 2018;19(1):34-40.
- 7- Naidu MU, Ramana GV, Rani PU, Mohan IK, Suman A, Roy P. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis--complicating the treatment of cancer. *Neoplasia.* 2004;6(5):423-431.
- 8- Pulito C, Cristaudo A, Porta C, Zapperi S, Blandino G, Morrone A, et al. Oral mucositis: the hidden side of cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1):210.

- 9- Ala S, Zamani N, Akbari J, Salehifar E, Janbabai G, Koulaeinejad N. Efficacy of gabapentin mouthwash in managing oral mucositis pain in patients undergoing chemotherapy: a prospective, randomised, double-blind, controlled clinical trial. *Scott Med J*. 2020;65(1):12-18.
- 10-Sio TT, Le-Rademacher JG, Leenstra JL, Loprinzi CL, Rine G, Curtis A, et al. Effect of doxepin mouthwash or diphenhydramine-lidocaine-antacid mouthwash vs placebo on radiotherapy-related oral mucositis pain: The alliance A221304 randomized clinical trial. *JAMA*. 2019;321(15):1481-1490.
- 11-Pérez-Nicolás C, Pecci-Lloret MP, Guerrero-Gironés J. Use and efficacy of mouthwashes in elderly patients: A systematic review of randomized clinical trials. *Ann Anat*. 2023;246:152026.
- 12-Epstein JB, Epstein JD, Epstein MS, Oien H, Truelove EL. Doxepin rinse for management of mucositis pain in patients with cancer: one week follow-up of topical therapy. *Spec Care Dentist*. 2008;28(2):73-77.
- 13-Cerchiatti LC, Navigante AH, Körte MW, Cohen AM, Quiroga PN, Villaamil EC, et al. Potential utility of the peripheral analgesic properties of morphine in stomatitis-related pain: a pilot study. *Pain*. 2003;105(1-2):265-273.
- 14-Sarvzadeh M, Hemati S, Meidani M, Ashouri M, Roayaei M, Shahsanai A. Morphine mouthwash for the management of oral mucositis in patients with head and neck cancer. *Adv Biomed Res*. 2015;4:44.
- 15-Vayne-Bossert P, Escher M, de Vautibault CG, Dulguerov P, Allal A, Desmeules J, et al. Effect of topical morphine (mouthwash) on oral pain due to chemotherapy- and/or radiotherapy-induced mucositis: a randomized double-blinded study. *J Palliat Med*. 2010;13(2):125-128.
- 16-Leenstra JL, Miller RC, Qin R, Martenson JA, Dornfeld KJ, Bearden JD, et al. Doxepin rinse versus placebo in the treatment of acute oral mucositis pain in patients receiving head and neck radiotherapy with or without chemotherapy: a phase III, randomized, double-blind trial (NCCTG-N09C6 [Alliance]). *J Clin Oncol*. 2014;32(15):1571-1577.
- 17-Epstein JB, Epstein JD, Epstein MS, Oien H, Truelove EL. Oral doxepin rinse: The analgesic effect and duration of pain reduction in patients with oral mucositis due to cancer therapy. *Anesth Analg*. 2006; 103(2):465-70.
- 18-Brennan PA, Lewthwaite R, Sakthithasan P, McGuigan S, Donnelly O, Alam P, et al. Diclofenac mouthwash as a potential therapy for reducing pain and discomfort in chemo-radiotherapy-induced oral mucositis. *J Oral Pathol Med*. 2020;49(9):956-959.
- 19-Karunakaran A, Vanitha S, Swarna K, Sudha S, Sangeetha V, Munusamy J, et al. Development and validation of UV-spectroscopic method for the estimation of nortriptyline hydrochloride in bulk and in tablet dosage form. *Int J Pharm H. Care Res*. 2018;6(1):30-37
- 20-Maršálek R, Švidrnoch M. The adsorption of amitriptyline and nortriptyline on activated carbon, diosmectite and titanium dioxide. *Environ Chall*. 2020;1:100005.
- 21-Indrayanto G. Application of accuracy and precision evaluations based on the current United States and Indonesian pharmacopoeias: A critical review. *Makara J Sci*. 2022;26:227-237.
- 22-Dobrev V, Spasov H, Dobrev G. Ethanol, sugar and potassium sorbate effects on *Zygosacharomyces bailii* growth in white wine using response surface methodology. *J Hyg Eng Des*. 2021:71-76
- 23-Nisticò R. Polyethylene terephthalate (PET) in the packaging industry. *Polym Test*. 2020;90:106707.
- 24-Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug solubility: Importance and enhancement techniques. *Int Sch Res Notices*. 2012;2012:195727.
- 25-Kishani S, Vilaplana F, Ruda M, Hansson P, Wågberg L. Influence of solubility on the adsorption of different xyloglucan fractions at cellulose–water interfaces. *Biomacromolecules*. 2020;21(2):772-782.
- 26-Fukazawa T, Yamazaki Y, Miyamoto Y. Reduction of non-specific adsorption of drugs to plastic containers used in bioassays or analyses. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010;61(3):329-333.
- 27-Palmgrén JJ, Mönkkönen J, Korjamo T, Hassinen A, Auriola S. Drug adsorption to plastic containers and retention of drugs in cultured cells under in vitro conditions. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006;64(3):369-378.

- 28-Primc G, Mozetič M. Hydrophobic recovery of plasma-hydrophilized polyethylene terephthalate polymers. *Polymers (Basel)*. 2022;14(12):2496.
- 29-Chen Y, Liang J, Liu L, Lu X, Deng J, Pozdnyakov IP, et al. Photosensitized degradation of amitriptyline and its active metabolite nortriptyline in aqueous fulvic acid solution. *J Environ Qual*. 2017;46(5):1081-1087.
- 30-Hale JL. Nortriptyline hydrochloride. In: Florey K, editor. *Analytical Profiles of Drug Substances*. 1: Academic Press; 1972. p. 233-247.
- 31-Wagstaff A, Petrie B. Enhanced desorption of fluoxetine from polyethylene terephthalate microplastics in gastric fluid and sea water. *Environ Chem Lett*. 2022;20(2):975-982.
- 32-Vranić E, Lacević A, Mehmedagić A, Uzunović A. Formulation ingredients for toothpastes and mouthwashes. *Bosn J Basic Med Sci*. 2004;4(4):51-58.
- 33-Aalto TR, Firman MC, Rigler NE. p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives. I. Uses, antibacterial and antifungal studies, properties and determination. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc*. 1953;42(8):449-457.
- 34-Zhou X, Qiao K, Wu H, Zhang Y. The impact of food additives on the abundance and composition of gut microbiota. *Molecules*. 2023;28(2):631.
- 35-Croitoru M, Miklos A, Erzsebet F, Coman MM, Fülöp I. Evaluation of the ingestion of parabens during the use of dental care products by healthy human volunteers. *Farmacia*. 2016;64:594-598.
- 36-Brookes Z, McGrath C, McCullough M. Antimicrobial mouthwashes: An overview of mechanisms—what do we still need to know? *Int Dent J*. 2023;73:64-68.
- 37-Neves ER, Schäfer S, Phillips A, Canejo J, Macedo MF. Antifungal effect of different methyl and propyl paraben mixtures on the treatment of paper biodeterioration. *Int Biodeterior*. 2009;63(3):267-72.
- 38-Stjepanovic AN, Todorovic NB, Tesic TZ, Komazec ZS, Canji-Panic JM, Lalic-Popovic MN. Pharmaceutical excipients with potential to cause adverse effects in paediatric nasal medicines. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2022;133:105225.
- 39-Miceli MH, Bernardo SM, Ku TS, Walraven C, Lee SA. In vitro analyses of the effects of heparin and parabens on *Candida albicans* biofilms and planktonic cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):148-153.
- 40-Peters BM, Ward RM, Rane HS, Lee SA, Noverr MC. Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(1):74-82.
- 41-Chauhan NM, Raut JS, Karuppayil SM. A morphogenetic regulatory role for ethyl alcohol in *Candida albicans*. *Mycoses*. 2011;54(6):697-703.
- 42-Mukherjee PK, Mohamed S, Chandra J, Kuhn D, Liu S, Antar OS, et al. Alcohol dehydrogenase restricts the ability of the pathogen *Candida albicans* to form a biofilm on catheter surfaces through an ethanol-based mechanism. *Infect Immun*. 2006;74(7):3804-3816.
- 43-Chirife J, Fontana AJ. Introduction: Historical highlights of water activity research. In: Barbosa-Cánovas GV, Fontana AJ, Schmidt SJ, Labuza TP, editors. *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*, Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. 2020:1-11.
- 44-Syamaladevi RM, Tang J, Villa-Rojas R, Sablani S, Carter B, Campbell G. Influence of water activity on thermal resistance of microorganisms in low-moisture foods: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2016;15(2):353-70.