

МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 615.076.7

**ВИЗНАЧЕННЯ ТА НЕЙТРАЛІЗАЦІЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ
КОМПОНЕНТІВ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ “ІНСПІРОН”**

Я. Колісник, Н. Скочиляс

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: kolyaryna@yahoo.com*

На етапі фармацевтичної розробки нового лікарського засобу “Інспірон” вивчено антимікробну активність його компонентів і розроблено методи її нейтралізації. Сироп “Інспірон” і такі його складові, як екстракт кореня солодки, натрію сахаринат, ароматизатор мед-липа не проявляють ні антибактеріальної, ні протигрибкової активності. Виявлено, що фенспіриду гідрохлорид повністю пригнічує ріст тест-мікроорганізмів *B. subtilis*, *A. brasiliensis* і змішаної культури мікроорганізмів. Антимікробну активність фенспіриду гідрохлориду можна нейтралізувати методом мембранної фільтрації. Встановлено, що сорбат калію проявляє бактерицидну та фунгіцидну активність щодо *S. aureus*, *A. brasiliensis* і змішаної культури мікроорганізмів. Показано, що інгібуючу активність даної сполуки можна нейтралізувати, використовуючи розведення 1:50, а щодо змішаної культури мікроорганізмів – шляхом збільшення об’єму середовища удвічі. Ванілін, пропілпарагідроксibenзоат, метилпарагідроксibenзоат проявляють антимікробну активність щодо всіх досліджуваних мікроорганізмів. Для нейтралізації антимікробної активності даних компонентів лікарського засобу слід використовувати комбінований метод: розведення та додавання інактивуючого розчину.

Ключові слова: антибактеріальна та протигрибкова активність, нейтралізація.

На сучасному етапі розвитку фармацевтичної промисловості й у зв’язку із введенням на фармацевтичних підприємствах України правил належної виробничої (GMP) і лабораторної (GLP) практик змінюються підходи до контролю якості лікарських препаратів і субстанцій. Стерильність і мікробіологічна чистота ліків необхідні для їх безпечного застосування [6]. Потрапляння в продукт мікроорганізмів у процесі виробництва, зберігання чи використання спричиняє видиму втрату стабільності продукту (розшарування, утворення цвілі) або зниження терапевтичної ефективності лікарського препарату без наявних візуальних змін. Використання лікарських засобів, які містять мікроорганізми, може призвести не лише до зниження або відсутності терапевтичної дії препарату, а й до виникнення побічних реакцій і нових захворювань у пацієнта [1, 2].

Таким чином, починаючи з розробки нових фармацевтичних препаратів, на всіх етапах від виробництва до споживання необхідно оцінювати ймовірність ризику випуску неякісних засобів і удосконалювати систему контролю, яка забезпечить їхню якість. Особливе місце при цьому займають біологічні методи дослідження фармацевтичних препаратів, зокрема мікробіологічні. Враховуючи пряму залежність мікробіологічних показників з безпечністю лікарських засобів, результати дослідження фармацевтичної продукції повинні бути максимально точними та надійними.

Мікробіологічний контроль ліків є важливим для своєчасного виявлення контамінованих препаратів, а також для профілактики побічних реакцій, які можуть

виникати у разі їх використання. Лікарські засоби або окремі компоненти чи консерванти, які входять до їх складу, можуть пригнічувати ріст окремих видів мікроорганізмів – контамінантів, а це може вплинути як на терапевтичну ефективність і токсичність, так і на показники якості, наведені у специфікації [8, 10, 11].

Проблема розробки, обґрунтування і встановлення нормативів допустимого вмісту мікроорганізмів у лікарському засобі тісно пов'язана з вибором методів їх виявлення та ідентифікації, які обумовлюють ефективність аналізу. Однак такі дослідження можуть стримуватися низкою об'єктивних труднощів: якщо не розроблений системний і універсальний алгоритм мікробіологічного контролю різних категорій лікарських засобів, фармацевтичних субстанцій і допоміжних речовин, або відсутні адекватні до мети дослідження методики і схеми визначення мікробіологічної якості лікарських засобів [3, 5].

Зокрема, для уникнення хибних результатів при мікробіологічному контролі препаратів слід враховувати фактори, які можуть їх спричиняти. Наприклад, наявність антимікробної дії самих лікарських засобів або їх компонентів, а також наявність консервантів можуть перешкоджати виявленню мікроорганізмів [5].

Метою нашої роботи було визначити антибактеріальну та протигрибкову активність сиропу “Інспірон” і компонентів, які входять до його складу, а також розробити методи її нейтралізації для коректного визначення мікробіологічної чистоти цього лікарського засобу.

Матеріали та методи

Мікробіологічні дослідження лікарського засобу “Інспірон” проводилися методами, описаними в ДФУ [4]. У дослідженні використовували такі тест-штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella abony* CIP-8039, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, одержаних із Державної колекції патогенних мікроорганізмів ВІСК ім. Л.А. Тарасевича, Москва; Чеської Колекції Мікроорганізмів та НДІ мед. мікології, Санкт-Петербург. Суспензію бактеріальних культур, що містили близько 100 КУО/мл, готували методом послідовних десятикратних розведень у буферному розчині з натрію хлоридом і пептоном (рН 7,0).

Підготовку досліджуваних зразків проводили таким чином: поміщали 1 г речовини у мірний посуд, доводили до 10 мл буферним розчином та інокулювали приготованою робочою суспензією тест-мікроорганізму із розрахунку 100 КУО/мл. Згідно з вимогами ДФУ (2.6.12) 1 мл підготованого зразка висівали на чашки Петрі зі соєво-казеїновим агаром (для бактерій) і сабуро-декстрозним агаром (для грибів) [4]. Для проведення експериментів використовували сухі поживні середовища фірми “Merck”. Для виявлення росту змішаної культури мікроорганізмів *E. coli*, *S. abony*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* 10 мл зразка, який містив по 100 КУО бактерій, вносили у відповідні поживні середовища (згідно з ДФУ п. 2.6.13) [4]. Вихідне мікробне навантаження визначали згідно з вищеописаною методикою, за винятком внесення досліджуваних зразків. Інкубацію посівів проводили при температурі (33±1)°С (бактерії), (23±1)°С (гриби).

З метою нейтралізації антимікробної дії компонентів сиропу “Інспірон” проводили подальші дослідження із застосуванням таких методів: збільшення об'єму розчинника (розведення), додавання до середовищ різних концентрацій неспецифічних інактиваторів (твін-80, соєвий лецитин, гістидину гідрохлорид), метод мембранної фільтрації з використанням різних об'ємів 0,9% розчину натрію хлориду [4, 7, 9, 12].

Результати і їхнє обговорення

Важливою частиною підготовчої роботи перед дослідженням препарату на мікробіологічну чистоту є визначення антибактеріальних і протигрибкових властивостей

лікарського засобу. Відповідно до вимог ДФУ 1.4. [4] кількість мікроорганізмів у зразках із додаванням досліджуваних сполук не повинна відрізнятися більше, ніж у два рази від вихідного мікробного навантаження. Також в умовах дослідження сполуки не повинні пригнічувати ріст змішаної культури мікроорганізмів.

Результати вивчення антимікробної активності лікарського сиропу “Інспірон” і його компонентів наведені у табл. 1, 2. Виявлено, що препарат “Інспірон” не має ні антибактеріальної, ні протигрибкової дії, оскільки у зразках із додаванням цього лікарського засобу спостерігався ріст досліджуваних мікроорганізмів, причому їхня кількість майже не відрізнялась від такої в контролі (табл. 1, 2). Фармакологічні властивості цього лікарського засобу зумовлені складним механізмом його дії, він має протизапальні та антибронхоконструкторні властивості.

Таблиця 1

Антибактеріальна та протигрибкова активність сиропу “Інспірон”
і сполук, що входять до його складу

Досліджувані зразки	Тест-штами мікроорганізмів				
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653
	Кількість мікроорганізмів, КУО/мл				
Сироп “Інспірон”	87,0±7,9	76,0±7,1	68,0±6,2	40,0±3,5	75,0±7,1
Фенспіриду гідрохлорид	17,0±1,3	–	12,0±0,8	–	8,0±0,6
Сорбат калію	–	8,0±0,7	25,0±1,9	–	–
Екстракт кореня солодки	83,0±7,7	74,0±6,9	68,0±6,3	46,0±4,1	75,0±7,2
Натрію сахаринат	82,0±7,6	75,0±6,9	68,0±6,2	45,0±4,2	70,0±6,7
Ароматизатор “Мед-липа”	88,0±8,4	74,0±6,8	62,0±5,6	46,0±4,1	76,0±7,2
Ванілін	–	–	–	–	–
Метилпарагідроксибензоат	–	–	–	–	–
Пропілпарагідроксибензоат	–	–	–	–	–
Контроль	83,0±7,9	77,0±7,2	67,0±5,9	44,0±4,1	75,0±7,1

Примітка. “–” – відсутність росту тест-мікроорганізмів.

Згідно з ДФУ [4], під час мікробіологічного контролю лікарських засобів потрібно визначати і антимікробну активність їх компонентів, причому для досліджень беруть строго визначені концентрації даних сполук, які є вищими за ті, що входять до фармацевтичних препаратів. Тому нашим завданням було визначити антибактеріальну і протигрибкову дію компонентів сиропу “Інспірон”. До складу даного лікарського препарату входять фенспіриду гідрохлорид, сорбат калію, екстракт кореня солодки, натрію сахаринат, ароматизатор “Мед-липа”, метилпарагідроксибензоат (ніпагін), пропілпарагідроксибензоат (ніпазол), ванілін.

Результати досліджень показали (табл. 1, 2), що такі компоненти “Інспірону”, як екстракт кореня солодки, натрію сахаринат, ароматизатор “Мед-липа” не проявляли ні антибактеріальної, ні протигрибкової дії.

Сорбат калію повністю пригнічував ріст монокультур *S. aureus*, *A. brasiliensis*, *C. albicans* і змішаної культури мікроорганізмів, а кількість клітин таких бактерій як *B. subtilis* та *E. coli* була, відповідно, в 9,6 і 2,7 рази меншою, ніж у контролі. Фенспіриду гідрохлорид виявив бактерицидну і фунгіцидну дію на мікроорганізми *B. subtilis*, *A. brasiliensis*, а також на змішану культуру бактерій, а значення КУО/мл для *S. aureus*, *E. coli* та *C. albicans* при додаванні даної сполуки були, відповідно, в 4,9, 5,6 і 9,4 рази меншими, ніж у контролі.

Ванілін, метилпарагідроксибензоат, пропілпарагідроксибензоат мали антибактеріальну і протигрибкову активність стосовно всіх досліджених мікроорганізмів (табл. 1, 2).

Таблиця 2

Антимікробна активність компонентів лікарського засобу “Інспірон” щодо змішаної культури мікроорганізмів і її нейтралізація шляхом розведення

Досліджувані зразки	Розведення	Змішана культура мікроорганізмів				
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Salmonella abortus</i> CIP-8039	
		Наявність чи відсутність росту				
Фенспіриду гідрохлорид	у 100 мл с-ща	–	–	–	–	–
Сорбат калію	“_“	–	–	–	–	–
Екстракт кореня солодки	“_“	+	+	+	+	+
Натрію сахаринат	“_“	+	+	+	+	+
Ванілін	“_“	–	–	–	–	–
Ароматизатор “Мед-ліпа”	“_“	+	+	+	+	+
Метилпарагідроксибензоат	“_“	–	–	–	–	–
Пропілпарагідроксибензоат	“_“	–	–	–	–	–
Сироп “Інспірон”	“_“	+	+	+	+	+
Контроль		+	+	+	+	+
Фенспіриду гідрохлорид	у 200 мл с-ща	–	–	–	–	–
Сорбат калію	“_“	+	+	+	+	+
Ванілін	“_“	–	–	–	–	–
Метилпарагідроксибензоат	“_“	–	–	–	–	–
Пропілпарагідроксибензоат	“_“	–	–	–	–	–
Контроль		+	+	+	+	+

Примітка. “+” – характерний ріст тест-мікроорганізму на відповідному селективному середовищі; “_“ – відсутність росту тест-мікроорганізму на відповідному селективному середовищі.

Для уникнення псевдонегативних результатів аналізів щодо мікробіологічної чистоти лікарських засобів необхідно розробити точну схему нейтралізації антимікробної активності препарату чи його компонентів [3–5]. Тому на наступному етапі нашої роботи необхідно було підібрати методи нейтралізації антибактеріальної та протигрибкової активностей сорбату калію, фенспіриду гідрохлориду, ваніліну, метилпарагідроксибензоату та пропілпарагідроксибензоату.

Експериментально показано, що антимікробну активність сорбату калію можна нейтралізувати, використовуючи розведення 1:50, а щодо змішаної культури бактерій – шляхом збільшення об’єму поживних середовищ у 2 рази (табл. 3, 2).

Фенспіриду гідрохлорид добре розчинний у воді, що дало змогу для подальшої нейтралізації його антимікробної активності використати метод мембранної фільтрації. Підібрано об’єм 500 мл 0,9% розчину NaCl, використання якого знімало інгібуючу дію фенспіриду гідрохлориду на мікроорганізми і спостерігався ріст досліджуваних бактерій та грибів (табл. 4 і 5).

Антимікробну активність ваніліну, метилпарагідроксибензоату, пропілпарагідроксибензоату не вдалося нейтралізувати шляхом розведень (див. табл. 2, 3). Додавання розчину з 50 мл/л твіну-80, 50 г/л соєвого лецитину, 1 г/л гістидину гідрохлориду також не інактивувало антибактеріальну і протигрибкову активність цих компонентів препарату (табл. 6, 7). Так, ванілін навіть у присутності 50 г/л соєвого лецитину пригнічував ріст досліджуваних мікроорганізмів: кількість клітин *S. aureus* – у 2,7, *B. subtilis* – у 2,1, *E. coli* – у

2,4, *A. brasiliensis* – у 19,0, *C. albicans* – у 10,0 разів була нижчою, ніж у контролі. Метилпарагідроксibenзоат за даних умов також виявляв антимікробну активність: кількість *S. aureus* – у 4,3, *B. subtilis* – у 3,4, *E. coli* – у 2,0, *A. brasiliensis* та *C. albicans* у 3,6 разу була меншою, ніж у контролі. У присутності 50 г/л соєвого лецитину пропілпарагідроксibenзоат пригнічував ріст досліджуваних бактерій та грибів і значення КУО/мл було нижчим у 2,9 разу – для *S. aureus*, у 2,7 – *B. subtilis* і *E. coli*, у 4,1 – *A. brasiliensis* та у 6,2 разу – *C. albicans*, ніж у контролі (табл. 6). Антимікробну активність пропілпарагідроксibenзоату, метилпарагідроксibenзоату, ваніліну відносно змішаної культури мікроорганізмів також не вдалося нейтралізувати шляхом додавання інактивуючого комплексу (табл. 7). Тільки після застосування комбінованого методу нейтралізації антимікробної активності, а саме використовуючи розведення та додавання розчину з 50 мл/л твіну-80, 50 г/л соєвого лецитину, 1 г/л гістидину гідрохлориду, вдалось інгібувати антибактеріальну та протигрибкову активність вищезгаданих компонентів лікарського засобу (табл. 8, 9).

Таблиця 3

Вплив розведення компонентів препарату “Інспірон”
на їхню антибактеріальну та протигрибкову активність

Досліджувані зразки	Розведення	Тест-штами мікроорганізмів				
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653
		Кількість мікроорганізмів, КУО/мл				
Фенспіриду гідрохлорид	1:50	29,0±1,9	–	32,0±2,0	–	17,0±0,3
Сорбат калію	1:50	88,0±8,3	92,0±8,9	74,0±7,1	43,0±4,0	86,0±8,2
Ванілін	1:50	–	–	–	–	–
Метилпарагідроксibenзоат	1:50	–	–	–	–	–
Пропілпарагідроксibenзоат	1:50	–	–	–	–	–
Контроль		83,0±8,8	96,0±9,2	78,0±7,3	49,0±4,4	84,0±8,1
Фенспіриду гідрохлорид	1:100	54,0±1,2	10,0±0,8	56,0±2,2	19,0±1,7	28,0±1,5
Ванілін	1:100	–	–	–	–	–
Метилпарагідроксibenзоат	1:100	–	–	–	–	–
Пропілпарагідроксibenзоат	1:100	–	–	–	–	–
Контроль		83,0±8,7	95,0±8,9	79,0±7,7	49,0±4,5	84,0±7,8

Примітка. “–” – відсутність росту тест-мікроорганізмів.

Таблиця 4

Антимікробна активність фенспіриду гідрохлориду залежно від об’єму промивної рідини,
використаного для мембранної фільтрації

Досліджувані зразки	Об’єм промивної рідини (NaCl, 0,9%, мл)	Тест-штами мікроорганізмів				
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653
		Кількість мікроорганізмів, КУО/мл				
Фенспіриду гідрохлорид	100	–	–	7,0±0,8	–	6,0±0,8
	300	–	15,0±1,4	21,0±1,9	7,0±0,4	10,0±0,9
	500	65,0±5,2	74,0±6,6	61,0±5,9	43,0±3,5	54,0±5,3
Контроль		88,0±8,3	92,0±8,9	74,0±7,1	43,0±4,0	86,0±8,2

Примітка. “–” – відсутність росту тест-мікроорганізмів.

Таблиця 5

Вплив мембранної фільтрації та розведення у 200 мл середовища на інгібуючу дію фенспіриду гідрохлориду щодо змішаної культури мікроорганізмів

Досліджувані зразки	Об'єм промивної рідини (NaCl, 0,9%, мл)	Змішана культура мікроорганізмів			
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Salmonella abony</i> CIP - 8039
Наявність чи відсутність росту					
Фенспіриду гідрохлорид	100	-	-	-	-
	300	-	+	-	-
	500	+	+	+	+
Контроль		+	+	+	+

Примітка. “-” – відсутність росту тест-мікроорганізмів.

Таблиця 6

Антибактеріальна та протигрибкова активність компонентів препарату “Інспірон” залежно від концентрації лецитину в інактивуючому розчині

Досліджувані зразки	Концентрація лецитину, %	Тест-штами мікроорганізмів				
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653
Кількість мікроорганізмів, КУО/мл						
Ванілін	0,3	-	-	-	-	-
	1	-	4,0±0,3	15,0±1,2	-	-
	3	4,0±0,3	41,0±3,8	28,0±2,1	12,0±0,8	5,0±0,4
	5	29,0±2,3	45,0±4,2	36,0±3,1	3,0±0,2	8,0±0,7
Метилпарагідроксибензоат	0,3	5,0±0,4	10,0±0,9	3,0±0,2	-	-
	1	11,0±0,9	7,0±0,6	36,0±2,9	-	-
	3	16,0±1,1	36,0±3,2	35,0±3,1	8,0±7,7	18,0±1,4
	5	18,0±1,5	28,0±2,4	43,0±4,1	16,0±1,3	22,0±1,9
Пропілпарагідроксибензоат	0,3	-	11,0±0,8	-	-	-
	1	-	26,0±2,1	15,0±1,2	-	-
	3	24,0±2,1	32,0±2,9	24,0±2,1	12,0±1,1	9,0±0,8
	5	27,0±2,6	35,0±3,2	31,0±2,9	14,0±1,0	13,0±0,9
Контроль		78,0±7,6	95,0±9,1	85,0±8,2	57,0±5,3	80,0±7,8

Примітка. “-” – відсутність росту тест-мікроорганізмів.

Таблиця 7

Антибактеріальна активність ваніліну, метилпарагідроксибензоату і пропілпарагідроксибензоату за впливу розчину з різними концентраціями соєвого лецитину

Досліджувані зразки	Концентрація лецитину, %	Змішана культура мікроорганізмів			
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Salmonella abony</i> CIP-8039
Наявність чи відсутність росту					
Ванілін	0,3	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
Метилпарагідроксибензоат	5	-	+	-	+
	0,3	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
Пропілпарагідроксибензоат	3	-	-	-	-
	5	-	+	-	-
	0,3	-	-	-	-
Контроль	1	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	5	-	+	-	+
		+	+	+	+

Примітка. “+” – характерний ріст тест-мікроорганізму на відповідному селективному середовищі; “-” – відсутність росту тест-мікроорганізму на відповідному селективному середовищі.

Таблиця 8

Вплив розведення і додавання 5% лецитину, 5% твіну – 80, 0,1% L-гістидину гідрохлориду на антимікробну активність компонентів препарату “Інспірон”

Досліджувані зразки	Розведення	Тест-штами мікроорганізмів				
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653
Кількість мікроорганізмів, КУО/мл						
Ванілін	1:50	35,0±3,2	51,0±4,8	42,0±3,7	37,0±3,4	33,0±3,1
Метилпарагідроксибензоат	1:50	43,0±3,9	32,0±2,7	51,0±4,6	22,0±2,0	48,0±4,3
Пропілпарагідроксибензоат	1:50	36,0±3,3	34,0±3,1	58,0±5,7	22,0±1,8	35,0±3,2
Ванілін	1:100	58,0±5,5	72,0±6,8	70,0±6,8	44,0±4,1	63,0±5,9
Метилпарагідроксибензоат	1:100	75,0±7,2	92,0±8,9	83,0±7,8	54,0±5,1	81,0±7,7
Пропілпарагідроксибензоат	1:100	73,0±6,9	95,0±9,2	86,0±8,3	57,0±5,4	81,0±7,8
Контроль		77,0±7,4	95,0±9,2	84,0±8,1	56,0±5,3	79,0±7,5

Таблиця 9

Вплив розведення у 200 мл середовища та додавання інактивуючого комплексу на антибактеріальну активність ваніліну, метилпарагідроксибензоату і пропілпарагідроксибензоату

Досліджувані зразки	Змішана культура мікроорганізмів			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Salmonella abony</i> СІР - 8039
	Наявність чи відсутність росту			
Ванілін	+	+	+	+
Метилпарагідроксибензоат	+	+	+	+
Пропілпарагідроксибензоат	+	+	+	+
Контроль	+	+	+	+

Примітка. “+” – характерний ріст тест-мікроорганізму на відповідному селективному середовищі.

Встановлено, що сироп “Інспірон” і такі його компоненти як екстракт кореня солодки, натрію сахаринат, ароматизатор “Мед-липа” не проявляють ні антибактеріальної, ні протигрибкової активності. Сорбат калію повністю пригнічував ріст монокультур *S. aureus*, *A. brasiliensis* і змішаної культури тест-мікроорганізмів, а значення КУО/мл для *S. aureus*, *E. coli* та *C. albicans* були, відповідно, в 4,9, 5,6 і 9,4 разу меншими, ніж у контролі. Показано, що інгібуючу активність даної сполуки можна нейтралізувати, використовуючи розведення 1:50, а відносно змішаної культури мікроорганізмів – шляхом збільшення об’єму середовища у 2 рази. Фенспіриду гідрохлорид проявив бактерицидну і фунгіцидну дію на мікроорганізми *B. subtilis*, *A. brasiliensis*, а також на змішану культуру бактерій. Для нейтралізації антимікробної активності фенспіриду гідрохлориду слід використовувати метод мембранної фільтрації з використанням 5 порцій по 100 мл 0,9% розчину NaCl.

Ванілін, метилпарагідроксибензоат, пропілпарагідроксибензоат мають антибактеріальну і протигрибкову дію відносно всіх досліджених мікроорганізмів. Нейтралізувати антимікробну активність даних компонентів лікарського засобу можна завдяки поєднанню методів розведення та інактивації розчином з 50 мл/л твіну-80, 50 г/л соєвого лецитину, 1 г/л гістидину гідрохлориду.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гунар О. В., Каграманова К. А., Сахно Н. Г. Требования к микробиологическому качеству лекарственных средств и процедур испытания в различных фармакопеех // Фармация. 2010. № 6. С. 9–14.
2. Гунар О. В. Микрофлора лекарственных средств и различные аспекты ее изучения // Хим.-фарм. журнал. 2011. № 2. С. 31–40.
3. Гунар О. В. Отражение научных и практических аспектов фармацевтической микробиологии в системе микробиологического контроля качества лекарственных средств // Вопросы биол., мед. и фарм. химии. 2010. № 12. С. 19–22.
4. Державна Фармакопея України. 1-е вид. Доп. 4. Х.: ДП „Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”, 2011. 540 с.

5. Жернокльов В. М., Тисячна О. В. Схеми розробки методик визначення мікробіологічної чистоти нерозчинних у воді лікарських засобів, що мають антимікробну дію, за тестом «Визначення загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів» // Фармацевт. журнал. 2009. № 3. С. 78–85.
6. Одегова Т. Ф., Гунар О. В. Микробиологическая чистота – один из основных параметров стандартов GMP и GLP // Фармация. 2010. № 5. С. 8–9.
7. British Pharmacopoeia. London: Vol. I & II, 2009. 10952 p.
8. Clontz L. Microbial Limit and Bioburden Tests: Validation Approaches and Global Requirements - 2nd ed. CRC Press, 2009. 325 p.
9. European Pharmacopoeia – 7-ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2011. 3256 p.
10. Gunar O. V. Aspects of investigating microflora contamination of drugs // Pharmaceutical Chem. J. 2011. Vol. 45. N 2. P. 93–102.
11. Jimenez L. Microbial contamination control in the pharmaceutical industry. New York: Marcel Dekker, Inc., 2004. 310 p.
12. USP Pharmacist's Pharmacopoeia. - 2-ed. Rockville: The United State Pharmacopoeia. Inc., 2008. 1519 p.

Стаття: надійшла до редакції 14.09.12

доопрацьована 24.10.12

прийнята до друку 26.10.12

DETERMINATION AND NEUTRALIZATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE COMPONENTS OF MEDICINAL PRODUCT “INSPIRON”

Ya. Kolisnyk, N. Skochylyas

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: kolyaryna@yahoo.com*

The investigation of antimicrobial activity of components of new medicinal product “Inspiron” and methods of its neutralization have been done on the stage of pharmaceutical development. It was determined that “Inspiron” syrup and such components as liquorice root extract, sodium saccharinates, and honey-linden flavor does not show neither antifungal nor antibacterial activity. It was revealed that fenspiride hydrochloride completely inhibits growth of such test-microorganisms as *B. subtilis*, *A. brasiliensis* and of a mixed culture of microorganisms. Antimicrobial activity of fenspiride hydrochloride can be neutralized by the method of membrane filtration. Antimicrobial activity of potassium sorbate to *S. aureus*, *A. brasiliensis*, *C. albicans* and a mixed culture of microorganisms was revealed. It was shown that inhibition activity of this compound could be neutralized by a 1:50 dilution, and to mixed culture of microorganisms by 2-fold increasing of growth medium volume. Vanillin, propyl parahydroxybenzoate and methyl parahydroxybenzoate show antimicrobial activity to all investigated microorganisms. Neutralization of inhibition action of these components of investigated product can be achieved using combined method of neutralization of antimicrobial activity. It includes product dilution by 1:100 and addition of solution with inactivators.

Keywords: antibacterial and antifungal activity, neutralization.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ И НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ
КОМПОНЕНТОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА “ИНСПИРОН”****Я. Колісник, Н. Скочиляс**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: kolyaryna@yahoo.com*

На этапе фармацевтической разработки нового лекарственного средства “Инспирон” изучена антимикробная активность **компонентов, входящих в его состав**. Установлено, что сироп “Инспирон” и такие его компоненты, как экстракт корня солодки, натрия сахаринат, ароматизатор мёд-липа не проявляют антибактериальную, противогрибковую активность. Выявлено, что фенспирида гидрохлорид полностью подавляет рост тест-микроорганизмов *B. subtilis*, *A. brasiliensis* и смешанной культуры микроорганизмов. Противомикробное действие фенспирида гидрохлорида можно нейтрализовать методом мембранной фильтрации. Установлено бактерицидное и фунгицидное действие сорбата калия относительно *S. aureus*, *A. brasiliensis*, *C. albicans* и смешанной культуры микроорганизмов. Показано, что ингибирующее действие данного соединения можно нейтрализовать, используя разведения 1:50, а относительно смешанной культуры микроорганизмов – путем увеличения объема питательных сред в 2 раза. Ванилин, пропилпарагидроксibenзоат, метилпарагидроксibenзоат проявляют антимикробную активность **относительно всех исследуемых микроорганизмов**. Снятие угнетающего действия данных компонентов лекарственного средства можно достичь благодаря комбинированному методу нейтрализации антимикробной активности: разведению и добавлению инактивирующего раствора.

Ключевые слова: антибактериальная и противогрибковая активность, нейтрализация.