



УДК 615.076.7

ВИЗНАЧЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ ТА ПРОТИГРИБКОВОЇ АКТИВНОСТІ КОМПОНЕНТІВ НОВОГО ЛІКАРСЬКОГО СИРОПУ „ІНСПІРОН”

Я. І. Колісник, Н. Б. Скочиляс

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

Встановлено, що сироп „Інспірон” і такі його компоненти, як екстракт кореня солодки, натрію сахаринат, барвник оранжевий, ароматизатор, не проявляють ні антибактеріальної, ні протигрибкової активності. Сорбат калію повністю пригнічує ріст монокультур *S. aureus*, *A. niger*, *C. albicans* і змішаної культури тест-мікроорганізмів, фенспірид гідрохлорид – *B. subtilis* і *A. niger* та змішаної культури бактерій. Ванілін, метилпарагідроксibenзоат, пропілпарагідроксibenзоат мають протимікробну і протигрибкову активність щодо всіх досліджених мікроорганізмів. Найбільшу чутливість до консервантів ніпагіну та ніпазолу виявлено у *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *Z. rouxii*.

Ключові слова: антимікробна та протигрибкова активність, ніпагін, ніпазол.

ВСТУП

Забезпечення якості лікарських засобів у фармацевтичній галузі – це ціла концепція, що охоплює низку етапів: від фармацевтичної розробки, доклінічних, клінічних досліджень, виробництва, контролю якості, зберігання, поширення аж до надання інформації лікареві та пацієнтові. Усі ці етапи важливі, але початковим, на якому цілеспрямовано формується якість лікарських препаратів, є фармацевтична розробка. Саме на цьому етапі мають бути здійснені комплексні дослідження, в тому числі й мікробіологічні, які б переконливо довели, що обрана форма препарату, запропонований склад, технологічний процес, система упаковки повністю відповідають встановленим вимогам до лікарських засобів [7, 9].

Результати досліджень фармацевтичних препаратів за мікробіологічними показниками повинні бути максимально точними і надійними. Наприклад, при виконанні контрольних досліджень лікарського засобу без фактичних даних про наявність чи відсутність антимікробної дії препарату чи його компонентів виникає великий ризик отримати псевдонегативні результати аналізів щодо його мікробіологічної чистоти.

Вживання забруднених мікроорганізмами препаратів може викликати важкі токсикоінфекції та інтоксикації. Тому стабільність лікарських засобів є важливим показником їхньої якості. Вона забезпечує збереження їхніх терапевтичних або

профілактичних властивостей у процесі розподілу та зберігання. Стабільність не перевіряється на серійній продукції в межах вихідного, споживчого чи державного контролю якості, тому повинна бути об'єктом особливої уваги на етапах розробки та реєстрації препаратів [1, 5].

Для запобігання розмноженню мікроорганізмів у процесі зберігання та застосування лікарських засобів, особливо у випадку багатодозових контейнерів, до їх складу можуть бути введені антимікробні консерванти. Вони забезпечують стерильність лікарств або гранично допустиму кількість непатогенних мікроорганізмів у нестерильних лікарських препаратах [6, 8].

Метою нашої роботи було визначити антимікробну та протигрибкову активність сиропу „Інспірон” і його компонентів, з'ясувати ефективність дії антимікробних консервантів, що входять до складу досліджуваного препарату і визначають його стабільність у процесі зберігання та застосування.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження антимікробної та протигрибкової дії сиропу „Інспірон” та його компонентів проводили мікробіологічним методом, описаним у ДФУ 2.6.12, 2.6.13 [4], використовуючи такі тест-штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella abony* CIP 8039, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Aspergillus niger* ATCC 16404. Робочу суспензію мікроорганізмів, яка містила близько 100 КУО/мл, готували методом послідовних десятикратних розведень у буферному розчині з натрію хлоридом і пептоном. Для проведення експериментів використовували сухі поживні середовища фірми „Мерск”. Підготовку досліджуваних зразків проводили в такий спосіб: поміщали 1 г речовини у мірний посуд і доводили до 10 мл приготованою робочою суспензією тест-мікроорганізму. Із підготованих зразків висівали по 1 мл на чашки Петрі з відповідним поживним середовищем. 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. Після цього інкубували при температурі $(33\pm 1)^\circ\text{C}$ (бактерії) та $(23\pm 1)^\circ\text{C}$ (гриби). Щоб визначити вихідне мікробне навантаження, дослідження проводили аналогічно, за винятком внесення зразків речовин.

Дослідження ефективності антимікробних консервантів у сиропі „Інспірон” проводили методом, описаним у ДФУ (5.1.3) [4]. Вивчали вплив ніпагіну та ніпазолу у концентрації 0,0057 г/мл, в якій вони входять до складу досліджуваного лікарського засобу, на патогенні й умовно-патогенні мікроорганізми: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Zygosaccharomyces rouxii* NCYC 381. Критерієм оцінки консервуючої дії було зниження кількості життєздатних клітин мікроорганізмів у препараті за певний період часу після його контамінації.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Мікробіологічні дослідження сиропу „Інспірон” (Категорія ЗА ДФУ 5.1.4) проводилися нами під час його фармацевтичної розробки, яка здійснювалася в дослідному центрі АТ „Галичфарм”. Фармакологічні властивості цього лікарського засобу зумовлені складним механізмом його дії, він має антибронхоконструкторні та протизапальні властивості. Даний лікарський препарат включає такі сполуки, як фенспірид гідрохлорид,

екстракт кореня солодки, сорбат калію, натрію сахаринат, метилпарагідроксibenзоат (ніпагін), пропілпарагідроксibenзоат (ніпазол), барвник оранжевий, ванілін, ароматизатор мед-липа.

Лікарські засоби або окремі компоненти, які входять до їх складу, можуть пригнічувати ріст мікроорганізмів-контамінантів. Визначення наявності чи відсутності антимікробної дії та її нейтралізація – важлива частина підготовчої роботи перед дослідженням препарату на мікробіологічну чистоту [2, 3].

На першому етапі нашої роботи ми визначали антимікробну та протигрибкову дію сиропу „Інспірон” і компонентів, які входять до його складу.

Виявлено, що препарат „Інспірон” і такі його компоненти, як екстракт кореня солодки, натрію сахаринат, барвник оранжевий, ароматизатор, не проявляли ні антибактеріальної, ні протигрибкової дії, оскільки у зразках із додаванням цих сполук спостерігався ріст досліджуваних мікроорганізмів, причому їхня кількість майже не відрізнялася від такої в контролі (табл. 1, 2). Сорбат калію пригнічував ріст монокультур *S. aureus*, *A. niger*, *C. albicans* і змішаної культури тест-мікроорганізмів, а кількість таких бактерій, як *B. subtilis* та *E. coli* була, відповідно, в 9,6 і 2,7 разу меншою, ніж у контролі.

Фенспірид гідрохлорид при розведенні 1:10 пригнічував ріст монокультур *B. subtilis* і *A. niger* та змішаної культури тест-мікроорганізмів, а кількість *S. aureus*, *E. coli* та *C. albicans* була, відповідно, в 4,9, 5,6 і 9,4 разу меншою, ніж у контролі.

Ванілін, метилпарагідроксibenзоат, пропілпарагідроксibenзоат мали протимікробну і протигрибкову дію щодо всіх досліджених мікроорганізмів (див. табл. 1 і 2).

Щоб готові лікарські засоби відповідали вимогам нормативних документів, необхідні заходи для забезпечення норм мікробіологічної чистоти при їхньому виробництві,

Таблиця 1. Визначення антимікробної та протигрибкової активності препарату „Інспірон” і сполук, що входять до його складу

Table 1. Determination of antibacterial and antifungal activity of „Inspiron” and its components

Досліджувані зразки	Тест-штами мікроорганізмів				
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<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				
Сироп „Інспірон”	87,0±7,9	76,0±7,1	68,0±6,2	40,0±3,5	75,0±7,1
Фенспірид 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
Барвник оранжевий	87,0±7,9	75,0±7,1	63,0±5,7	46,0±4,1	74,0±7,0
Ароматизатор мед-липа	88,0±8,4	74,0±6,8	62,0±5,6	46,0±4,1	76,0±7,2
Ванілін	–	–	–	–	–
Метилпарагідро-ксібензоат	–	–	–	–	–
Пропілпарагідро-ксібензоат	–	–	–	–	–
Контроль	83,0±7,9	77±7,2	67±5,9	44±4,1	75±7,1

Примітка. „–” – відсутність росту мікроорганізмів.

Таблиця 2. Антимікробна активність компонентів препарату „Інспірон” щодо змішаної культури мікроорганізмів

Table 2. Antibacterial activity of components of „Inspiron” towards mixed culture of microorganisms

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 abony</i> CIP-8039
		Наявність чи відсутність росту			
Фенспірид гідрохлорид	у 100мл с-ща	–	–	–	–
Сорбат калію	„–“	–	–	–	–
Екстракт кореня солодки	„–“	+	+	+	+
Натрію сахаринат	„–“	+	+	+	+
Барвник оранжевий	„–“	+	+	+	+
Ванілін	„–“	–	–	–	–
Ароматизатор мед-липа	„–“	+	+	+	+
Метилпарагідро-ксибензоат	„–“	–	–	–	–
Пропілпарагідро-ксибензоат	„–“	–	–	–	–
Сироп „Інспірон”	„–“	+	+	+	+
Контроль		+	+	+	+

зберіганні та застосуванні. Для стерильних лікарських засобів це, перш за все, вибір і валідація методу стерилізації, належні умови виробництва, визначення вимог до первинного упакування матеріалу, мікробіологічної чистоти вихідної сировини, обмеження терміну придатності після першого розкриття упаковки. Для нестерильних лікарських засобів, крім належних умов виробництва, основним фактором, який забезпечує мікробіологічну чистоту при виробництві, зберіганні та застосуванні готового лікарського засобу, є ефективність дії антимікробних консервантів [8, 9]. При цьому у відповідності зі сучасними вимогами на етапі реєстрації препарату необхідно представити експериментальні дані, які підтверджують ефективність антимікробних консервантів [6].

Критерієм оцінки ефективності консерванта у лікарській формі слугує зниження кількості життєздатних клітин тест-мікроорганізмів у препараті за певний період часу після його контамінації. У відповідності з вимогами ДФУ логарифм зниження кількості життєздатних клітин бактерій через 14 діб має становити не менше трьох, у подальшому кількість життєздатних клітин бактерій не повинна збільшуватися; логарифм зниження кількості життєздатних клітин грибів через 14 діб має становити не менше одиниці, в подальшому кількість життєздатних клітин грибів не повинна збільшуватися.

Експериментально показано (див. рисунок), що ніпагін і ніпазол, які входять до складу сиропу „Інспірон”, у досліджуваній концентрації в умовах високого мікробного навантаження 10^5 – 10^6 КУО/мл проявляють згубну дію на деякі грампозитивні та грамнегативні бактерії, а також дріжджоподібні та цвільові гриби. Так, життєздатні клітини *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *Z. rouxii* не виявлялися через дві доби. Логарифм числа КУО/мл *S. aureus* через 2 доби становив 5,23 порівняно з вихідним значенням 6,96. Після 7 діб життєздатні клітини цього тест-мікроорганізму не виявлялися. Логарифм

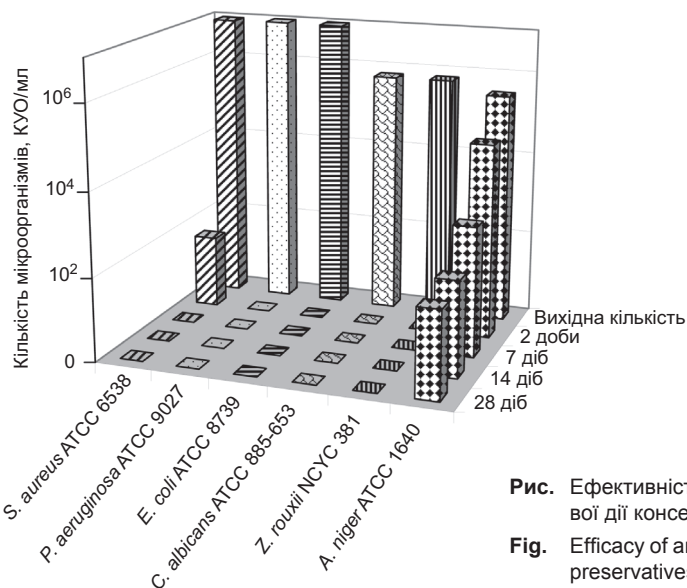


Рис. Ефективність антимікробної та протигрибкової дії консервантів ніпагіну і ніпазолу

Fig. Efficacy of antibacterial and antifungal activity of preservatives nipagin and nipazole

числа життєздатних клітин *A. niger* через 2 доби становив 0,86, через 7 діб – 2,43, через 14 діб – 3,26, а через 28 діб – 3,45 (lg числа КУО/мл вихідної концентрації 5,53).

ВИСНОВКИ

Отже, сироп „Інспірон” і такі його компоненти, як екстракт кореня солодки, натрію сахаринат, барвник оранжевий, ароматизатор не мали ні антибактеріальної, ні протигрибкової дії. Сорбат калію повністю пригнічував ріст монокультур *S. aureus*, *A. niger*, *C. albicans* і змішаної культури тест-мікроорганізмів, а кількість бактерій *B. subtilis* та *E. coli* була меншою, ніж у контролі. Фенспірид гідрохлорид пригнічував ріст монокультур *B. subtilis* і *A. niger* та змішаної культури тест-мікроорганізмів, а кількість *S. aureus*, *E. coli* та *C. albicans* була нижчою, порівняно з такою у контролі. Ванілін, метилпарагідроксibenзоат, пропілпарагідроксibenзоат мали протимікробну і протигрибкову дію щодо всіх досліджених мікроорганізмів.

Найбільшу чутливість до консервантів ніпагіну та ніпазолу виявлено у *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *Z. rouxii*. Ефективність антимікробних речовин була високою також і щодо *S. aureus*. Найменш виражена активність спостерігалася щодо *A. niger*, однак ефективність антифунгальної дії щодо цього тест-мікроорганізму відповідає вимогам, наведеним у діючій ДФУ. Тому введення до складу препарату додаткового антимікробного консерванта недоцільне.

1. Гунар О.В. Определение и нейтрализация антимикробного действия лекарственных средств. **Фармация**, 2004; 3: 5–7.
2. Гунар О.В., Каламова Н.И., Евтушенко Н.С. Определение антимикробного действия лекарственных средств – практические подходы. **Фармация**, 2002; 2: 4–7.
3. Гунар О.В., Каламова Н.И., Евтушенко Н.С. Особенности контроля качества некоторых лекарственных средств с противогрибковым действием по показателю „микробиологическая чистота”. **Хим.-фарм. журн.**, 2003; 1: 46–48.
4. **Державна Фармакопея України/ДП „Науково-експертний фармакопейний центр”**. Харків: РІРЕГ, 2001. 556 с.

5. Жемерова Е.Г., Кобзарь А.И., Хованская Н.П. К вопросу контроля микробиологической чистоты лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ. Сообщение 1. Проверка пригодности методик определения общего числа жизнеспособных аэробных микроорганизмов. **Фармаком**, 2002; 3: 51–55.
6. Ляпунов Н.А., Жемерова Е.Г., Безуглая Е.П. и др. Антимикробные консерванты в составе готовых лекарственных средств. **Фармация**, 2004; 1: 13–15.
7. Мошкова Л.В., Грицаенко И.С., Нужника Л.Г. Современные проблемы фармацевтической науки и практики. **Научные труды НИИФ**, 1999; 38 (1): 3–7.
8. **Надлежащая производственная практика лекарственных средств.** Активные фармацевтические ингредиенты. Готовые лекарственные средства. Руководства по качеству. Рекомендации PIC/S / Под ред. Ляпунова Н.А. Киев: МОРИОН, 2001. 472 с.
9. **Фармакологія** / Під ред. Чекман І.С. Київ: Вища школа, 2001. 598 с.

DETERMINATION OF ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF COMPONENTS OF NEW SYRUP „INSPIRON”

Ya. Kolisnyk, N. Skochilyas

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine

It was established that syrup „Inspiron” and such its components as extract of Glycyrrhiza root, sodium saccharinate, orange colorant and aromatizer have no antibacterial and antifungal activity. Potassium sorbate completely inhibited possess growth of *S. aureus*, *A. niger*, *C. albicans* monoculture, and mixed culture of test microorganisms. Fenspiride hydrochloride has suppressive action on *B. subtilis*, *A. niger* and mixed culture of bacteria. Vanillin, methyl *p*-hydroxybenzoate, propyl *p*-hydroxybenzoate have antifungal and antibacterial activity regarding all studied microorganisms. *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *Z. rouxii* have the greatest sensivity to preservatives nipagin and nipasole.

Key words: antibacterial activity, antifungal activity, nipagin, nipasole.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ И ПРОТИВОГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТИ КОМПОНЕНТОВ НОВОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СИРОПА „ИНСПИРОН”

Я. И. Колісник, Н. Б. Скочиляс

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина*

Установлено, что сироп „Инспирон” и такие его компоненты, как экстракт корня солодки, натрия сахаринат, краситель оранжевый, ароматизатор, не обладают ни антибактериальной, ни противогрибковой активностью. Сорбат калия полностью ингибирует рост монокультур *S. aureus*, *A. niger*, *C. albicans* и смешанной культуры тест-микроорганизмов, фенспирид гидрохлорид – *B. subtilis* и *A. niger* и смешанной культуры бактерий. Ванилин, метилпарагидроксibenзоат, пропилпарагидроксibenзоат имеют антимикробную и противогрибковую активность относительно всех исследованных микроорганизмов. Наибольшая чувствительность к консервантам нипагину и нипазолу обнаружена у *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *Z. rouxii*.

Ключевые слова: антимикробная и протигрибковая активность, нипагин, нипазол.

Одержано: 26.06.2009