

Рекомендована д.ф.н., професором В.І.Чушовим

УДК 615.011:615.454.1:582.998

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ АНТИМІКРОБНИХ КОНСЕРВАНТІВ У ДИТЯЧОМУ ЖЕЛЕ З ЕХІНАЦЕЄЮ ПУРПУРОВОЮ

Д.І.Дмитрієвський, О.Д.Немятих, Т.П.Осолодченко

Національний фармацевтичний університет
Луганський державний медичний університет
Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова НАН України

Вивчена активність ряду антимікробних консервантів, введених у дитяче желе з ехінацеєю пурпурою. Встановлена висока антимікробна активність сорбінової кислоти в концентрації 0,1%, що в поєднанні з безпечністю її застосування у дітей вигідно відрізняє даний консервант від ряду інших речовин, здатних попереджати забруднення лікарських засобів мікроорганізмами.

На теперішній час в умовах різкого забруднення навколишнього середовища та посилення впливу факторів, що чинять патогенний вплив на імунітет (СНІД, наслідки аварії на ЧАЕС), проблема фармакологічної корекції імунологічної реактивності зростаючого організму визначається як одна з найбільш важливих і актуальних як для вітчизняної, так і для світової педіатрії [2, 3, 5].

Сучасний перелік імуностимулюючих препаратів представлений, перш за все, синтетичними засобами, на фоні застосування яких ймовірно надмірне втручання в функцію імунної системи і, як наслідок, виснаження останньої [9, 10].

Останні роки пильну увагу вітчизняних та закордонних учених привертає ехінацея пурпурова як перспективне джерело для створення нових імуномодулюючих засобів, що вигідно відрізняються від синтетичних аналогів біологічною спорідненістю до тканин організму, м'якою дією та низькою токсичністю [6-10]. Однак, переважна кількість лікарських засобів представлена спиртовмісними ліками, застосування яких обмежено в педіатричній практиці, що обумовлює доцільність створення та впровадження у фармацевтичне виробництво імуотропних засобів для дітей на основі рослин з роду Echinacea, зокрема ехінацеї пурпурою [3].

Проведеними раніше дослідженнями розроблена оригінальна дитяча лікарська форма — желе та встановлений оптимальний склад нового препарату ехінацеї пурпурою, що в якості допоміжних речовин передбачає застосування пектину

яблучного, кислоти лимонної, цукру, сиропу фруктового-ягідного та води очищеної.

Мета роботи полягала у дослідженні активності антимікробних консервантів у дитячому желе з ехінацеєю пурпурою.

Матеріали та методи

У роботі використовували поживні середовища виробництва Махачкалінського (Дагестанського) заводу поживних середовищ, а саме: тіогліколеве напіврідке середовище, рідке середовище Сабуро, твердий поживний агар та середовище Сабуро, середовище Чистовича, кров'яний агар, а також середовища Ендо та Мюллера-Хінтона. Кожна серія, що використовувалась в експерименті, перевірялась на ростові властивості [1].

В якості критерію оцінки антибактеріальної ефективності консервантів використовували логарифм зменшення числа колоній мікроорганізмів за певний період після контамінації [4].

Кожний дослідницький зразок інокулювали (10^6 КУО/мл) тест-штамами мікроорганізмів: Staphylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Candida albicans ATCC 885/653. Після контамінації препарат висівали на агар для визначення числа життєздатних клітин. Дослідження проводили в динаміці: через 0, 2, 7, 14, 28 діб з моменту внесення мікроорганізмів у модельну систему.

Визначення активності консервантів дифузійно в агар (метод колодязів та метод дисків) проводили у відповідності з рекомендаціями ВООЗ з використанням наступних тест-штамів: Staphylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 25922, Proteus vulgaris ATCC 4636, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Bacillus subtilis ATCC 6633, Candida albicans ATCC 885/653. Мікробне навантаження (10^6 мікробних клітин на 1 мл середовища) встановлювали за стандартами мутності ПІСК ім. Л.А.Тарасевича та MacFarland.

Методом колодязів дослідження проводили на двох шарах щільного поживного середовища, роз-

Таблиця 1

Активність антимікробних консервантів

Консервант	Концентрація, %	Логарифм зменшення числа мікроорганізмів				
		первинний посів	2 доби	7 діб	14 діб	28 діб
<i>Staphylococcus aureus</i>						
—			2,01	2,92	3,4	4,45
Сорбінова кислота	0,1	0,59	1,91	3,33	3,6	НВ
Сорбінова кислота	0,05		1,92	3,4	НВ	НВ
Калію сорбат	0,1		1,82	3,05	3,36	4,44
Ніпагін+ніпазол (3:1)	0,1		1,78	3,27	НВ	НВ
Ніпагін + ніпазол (3:1)	0,05		2,82	3,12	НВ	НВ
Натрію бензоат	0,1		2,96	2,96	НВ	НВ
Кислота бензойна	0,1		3,12	НВ	НВ	НВ
Натрію саліцилат	0,13		3,03	НВ	НВ	НВ
Спирт етиловий 96%	3		3,01	3,67	НВ	НВ
<i>Escherichia coli</i>						
—			3,14	НВ	НВ	НВ
Сорбінова кислота	0,1	0,94	3,28	НВ	НВ	НВ
Сорбінова кислота	0,05		2,09	3,62	НВ	НВ
Калію сорбат	0,1		3,34	НВ	НВ	НВ
Ніпагін + ніпазол (3:1)	0,1		2,11	3,82	НВ	НВ
Ніпагін + ніпазол (3:1)	0,05		2,13	3,58	НВ	НВ
Натрію бензоат	0,1		3,27	НВ	НВ	НВ
Кислота бензойна	0,1		3,2	НВ	НВ	НВ
Натрію саліцилат	0,13		3,14	НВ	НВ	НВ
Спирт етиловий 96%	3		2,14	НВ	НВ	НВ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						
—			2,12	3,57	3,84	4,34
Сорбінова кислота	0,1	0,67	2,33	3,6	3,79	НВ
Сорбінова кислота	0,05		2,3	3,66	3,97	НВ
Калію сорбат	0,1		2,07	2,7	3,66	3,7
Ніпагін + ніпазол (3:1)	0,1		2,12	3,38	3,7	НВ
Ніпагін + ніпазол (3:1)	0,05		2,1	3,63	НВ	НВ
Натрію бензоат	0,1		2,25	3,92	3,92	НВ
Кислота бензойна	0,1		2,49	3,9	НВ	НВ
Натрію саліцилат	0,13		2,47	3,7	НВ	НВ
Спирт етиловий 96%	3		2,17	3,84	НВ	НВ
<i>Candida albicans</i>						
—			1,93	3,05	3,44	4,09
Сорбінова кислота	0,1	0,69	2,03	3,31	3,49	4,09
Сорбінова кислота	0,05		0,8	2,72	3,16	3,79
Калію сорбат	0,1		1,8	2,28	3,25	3,92
Ніпагін + ніпазол (3:1)	0,1		0,96	2,25	3,44	3,92
Ніпагін + ніпазол (3:1)	0,05		2,14	3,31	3,44	3,92
Натрію бензоат	0,1		2,14	3,31	3,44	3,92
Кислота бензойна	0,1		1,89	3,19	3,55	НВ
Натрію саліцилат	0,13		1,84	3,35	3,7	4,39
Спирт етиловий 96%	3		1,76	3,43	3,7	НВ

Примітки: 1. — застосування методу пастеризації; 2. НВ — мікроорганізми або гриби не виділяються.

литого в чашки Петрі. На нижній шар висотою 10 мм з незасіяного середовища (агар-агар, вода, солі) встановлювали горизонтально 3-6 тонкостінних циліндрів з нержавіючої сталі діаметром 8 мм та висотою 10 мм. Навкруги циліндрів заливали верхній шар (14-16 мл), що складався з розплавленого та охолодженого до 40°C поживного агаризованого середовища з відповідним стандартом добової культури тест-мікроба. Попередньо

верхній шар ретельно перемішувався до утворення однорідної маси. Після застигання циліндри обережно виймали стерильним пінцетом і в утворені лунки вносили досліджувані зразки желе. Чашки підсушували протягом 30-40 хв при кімнатній температурі та поміщали в термостат (37°C) на 18-24 год. При оцінці антибактеріальних властивостей визначали діаметр зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунки.

Таблиця 2

Визначення антибактеріальної активності консервантів методом колодязів

Консервант	Концентрація, %	Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів, мм					
		Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Proteus vulgaris	Pseudomonas aeruginosa	Bacillus subtilis	Candida albicans
—		x	x	x	x	x	x
Сорбінова кислота	0,1	13,2±0,4	12,6±0,4	x	x	14,6±0,2	x
Сорбінова кислота	0,05	x	x	x	x	x	x
Калію сорбат	0,1	13,2±0,4	12,2±0,4	x	x	14,0±0,3	x
Ніпагін + ніпазол (3:1)	0,1	x	x	x	x	x	x
Ніпагін + ніпазол (3:1)	0,05	x	x	x	x	x	x
Натрію бензоат	0,1	x	x	x	x	x	x
Кислота бензойна	0,1	x	x	x	x	x	x
Натрію саліцилат	0,13	x	x	x	x	x	x
Спирт етиловий 96%	3	17,4±0,5	14,8±0,4	12,6±0,2	15,8±0,4	19,2±0,4	x

Примітки: 1. — застосування методу пастеризації; 2. НВ — мікроорганізми або гриби не виділяються.

Методом дисків активність визначали на щільному поживному середовищі, розлитому в один шар по чашці Петрі. На поверхню агару наносили 1 мл мікробної зависі, яку розподіляли стерильним шпателем по поверхні чашки. Через 30 хв на поверхню агару розміщували диски, які попередньо готували з фільтрувального паперу діаметром 0,5 см, стерилізували при температурі 170°C протягом 1,5 год, просичували відповідним зразком та підсушували. На поверхню чашки Петрі поміщали 7-8 дисків.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за програмою “Statgraphics” згідно з вимогами ДФУ [4].

Результати та їх обговорення

Як свідчать отримані дані, всі дослідні зразки відповідають критеріям оцінки ефективності антимікробних консервантів, рекомендованих ДФУ щодо лікарських засобів для орального застосування (табл. 1).

У відношенні *Staphylococcus aureus* найбільш виражену активність проявили кислота бензойна та натрію саліцилат, на фоні застосування яких через 7 діб з моменту початку культивування

колонії даного штаму не реєструвалось. У досліджуваній площині не можна обійти увагою також сорбінову кислоту, суміш ніпагіну та ніпазолу, а також спирт етиловий: при їх введенні в зразок на 7 добу інкубації логарифм зменшення числа життєздатних клітин склав понад 3, а на більш віддалених термінах спостереження мікроорганізми не виділялись.

Дослідженнями встановлено, що максимальну активність у моделюємих умовах консерванти реалізують у частині зменшення числа життєздатних клітин *Escherichia coli*. Так, вже на 7-добовій відмітці експерименту колонії даного мікроорганізму зафіксовані лише в умовах застосування сорбінової кислоти в мінімальній концентрації та суміші ніпагіну та ніпазолу.

Порівняльна характеристика антимікробної дії стосовно впливу на ріст колоній *Pseudomonas aeruginosa* дозволяє відмітити калію сорбат, що за даних умов реалізував мінімальну здатність зменшувати кількість життєздатних клітин.

Як видно з табл. 2, через 14 діб з моменту контамінації величини логарифму зменшення числа життєздатних клітин *Candida albicans* в усіх

Таблиця 3

Визначення антибактеріальної активності консервантів методом дисків

Консервант	Концентрація, %	Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів, мм					
		Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Proteus vulgaris	Pseudomonas aeruginosa	Bacillus subtilis	Candida albicans
—		x	x	x	x	x	x
Сорбінова кислота	0,1	12,3±0,3	11,3±0,3	8,66±0,33	8,66±0,33	14,6±0,3	10,00±0,58
Сорбінова кислота	0,05	x	x	x	x	x	x
Калію сорбат	0,1	14,0±0,0	12,3±0,3	8,33±0,33	10,00±0,08	14,0±0,0	9,33±0,33
Ніпагін + ніпазол (3:1)	0,1	x	x	x	x	10,3±0,3	x
Ніпагін + ніпазол (3:1)	0,05	x	x	x	x	x	x
Натрію бензоат	0,1	8,66±0,33	x	x	x	10,66±0,33	x
Кислота бензойна	0,1	x	x	x	x	x	x
Натрію саліцилат	0,13	x	x	x	x	x	x
Спирт етиловий 96%	3	17,4±0,5	14,8±0,4	12,6±0,2	15,8±0,4	19,2±0,4	x

Примітки: 1. — застосування методу пастеризації; 2. НВ — мікроорганізми або гриби не виділяються.

модельних системах перевищили 3, а на 28-добовій відмітці спостереження найбільш активними виявились кислота сорбінова (0,1%) та натрію саліцилат, де значення аналізованого показника склали понад 4.

Результати дослідження антимікробної активності вивчаємих консервантів методом колодязів вказують на чутливість культур *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* до обраної концентрації сорбінової кислоти та калію сорбату, на що вказує зона затримки росту діаметром понад 12 мм (табл. 2). Слід зазначити, що у змодельованих умовах виявлена висока чутливість мікроорганізмів до етанолу, в умовах введення якого діаметр зон затримки росту аналізованих штамів бактерій знаходиться в межах від 12 до 19 мм.

Вивчення ефективності консервантів більш чутливим методом дисків дозволило виділити сорбінову кислоту та калію сорбат: відповідні досліджувані зразки володіють антибактеріальною ак-

тивністю у відношенні *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* і дещо менш виражені властивості проявляють відносно *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* (табл. 3).

ВИСНОВКИ

1. Дослідженнями щодо вивчення антимікробної активності консервантів, введених у модельні зразки з дитячим желе ехінацеї пурпурової, встановлена ефективність всіх аналізованих речовин, на фоні застосування яких лікарський засіб у повній мірі відповідає рекомендованим ДФУ величинам логарифму зменшення числа життєздатних мікроорганізмів.

2. Найбільш прийнятним консервантом для оригінальної лікарської форми представляється кислота сорбінова в концентрації 0,1%, що, передусім, обумовлено її високою антимікробною активністю, фізіологічною безпечністю, органолептичною нейтральністю, а також особливістю повної утилізації в організмі з утворенням енергії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бактеріологічний контроль поживних середовищ. Інформаційний лист МОЗ України №05.4.1/1670. — К., 2001.
2. Весельський В.Л., Медведовська Н.В., Кульчицька К.К. // Вісник соц. гігієни та організації охорони здоров'я. — 2006. — №2. — С. 5-10.
3. Гудзенко О.П., Немятих О.Д. // Фарм. журн. — 2008. — №6. — С. 26-31.
4. Державна фармакопея України. Доп. 1 / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". — 1-е вид. — Х.: PIPEP, 2001. — 520 с.
5. Дмитрієвський Д.І., Немятих О.Д. // Фармаком. — 2008. — №3. — С. 41-46.
6. Percival S.S. // *Biochem. Pharmacol.* — 2000. — Vol. 60. — P. 155-158.
7. Raso G.M., Pacilio M., Di Carlo G. et al. // *J. Pharm. Pharmacol.* — 2002. — Vol. 54. — P. 1379-1383.
8. Stevenson L.M., Matthias A., Banbury L. et al. // *Molecules.* — 2005. — Vol. 31, №10 (10). — P. 1279-1285.
9. Sullivan A.M., Laba J.G., Moore J.A., Lee T.D. // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* — 2008. — Vol. 30, №3. — P. 553-574.
10. Tierra M. // *J. Herb. Pharmacother.* — 2007. — Vol. 7, №2. — P. 79-89.

УДК 615.011.17:615.454.1:582.998

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ КОНСЕРВАНТОВ В ДЕТСКОМ ЖЕЛЕ С ЭХИНАЦЕЕЙ ПУРПУРНОЙ

Д.И.Дмитриевский, О.Д.Немятых, Т.П.Осолодченко

В работе изучена активность ряда антимикробных консервантов, введенных в детское желе с эхинацеей пурпурной. Установлена высокая антимикробная активность сорбиновой кислоты в концентрации 0,1%, что в сочетании с безопасностью ее применения у детей выгодно отличает данный консервант от ряда других веществ, способных предупреждать загрязнение лекарственных средств микроорганизмами.

UDC 615.011.17:615.454.1:582.998

RESEARCH OF THE ACTIVITY OF ANTIMICROBIAL PRESERVATIVES IN A JELLY WITH ECHINACEA PURPUREA FOR CHILDREN

D.I.Dmitrievskiy, O.D.Nemyatykh, T.P.Osolodchenko

The activity of a number of antimicrobial preservatives incorporated into a jelly with *Echinacea purpurea* for children has been investigated. A high antimicrobial activity of sorbic acid has been found in the concentration of 0.1%, and therefore, the given preservative in the combination with safety of its application for children advantageously distinguishes from a number of other substances that are capable to prevent drug contamination by microorganisms.