

КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ СТЕРОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В СУХОМ ЭКСТРАКТЕ ХУДИИ И ТАБЛЕТКАХ С ЭТИМ ЭКСТРАКТОМ

И.В. Ярошенко, И.А. Журавель, Н.Е. Бурда, В.С. Кисличенко, Е.Н. Новосел

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: при помощи тонкослойной хроматографии (ТСХ) разработана методика определения стероидов в экстракте худии и таблетках с этим экстрактом. При помощи спектрофотометрического метода количественно определили содержание стероидов в экстракте худии и таблетках. Для таблеток была модифицирована методика количественного определения стероидных соединений.

Ключевые слова: стероиды, сухой экстракт, таблетки, худия.

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF STEROID COMPOUNDS IN EXTRACT OF HOODIA AND PILLS WITH THIS EXTRACT

I.V. Yaroshenko, I.O. Zhuravel, N.Ye. Burda, V.S. Kyslychenko, O.M. Novosel

National University of Pharmacy, Kharkiv

Summary: the methods of qualitative analysis of steroid compounds in extract of Hoodia and pills with this extract have been developed by means of thin-layer chromatography (TLC). Through a spectrophotometric method the of quantitative composition of steroid combinations in extract of Hoodia has been studied. Procedures of the quantitative analysis of steroid combinations in pills with extract of Hoodia have been modified.

Key words: steroids, dry extract, pills, Hoodia.

Рекомендована д-м біол. наук, проф. І.М. Кліщем

УДК 515.012/.0.14:615

ВИВЧЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ КРЕМУ ТА ГЕЛЮ НА ОСНОВІ ЦЕФТРИАКСОНУ ТА НІМЕСУЛІДУ

© **С.В. Бірюкова, В.О. Тарасенко, О.Б. Колоколова, Л.Л. Давтян**

Харківська медична академія післядипломної освіти

Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика

Резюме: проведено мікробіологічні дослідження методом дифузії в агар щодо визначення антимікробної активності досліджуваних лікарських засобів (крем, гель) з метою встановлення оптимальної концентрації діючих речовин.

Ключові слова: мікроорганізми, тест-культури, поживне середовище, лікарський засіб, цефтріаксон, німесулід, плівка, крем, гель.

Вступ. Сучасні концепції етіопатогенезу захворювань пародонта ґрунтуються на провідній ролі мікробного фактора в розвитку генералізованого пародонта і пов'язаного з ним запального процесу [5].

Мікробіологічні дослідження відіграють важливу роль для вивчення етіології різноманітних захворювань порожнини рота, їх профілактики та лікування. Патогенні мікроорганізми, що домінують в зубному нальоті, є першопричиною за-

пальних процесів в тканинах пародонта [3]. Вплив на патогенетичні ланцюги запалення в тканинах пародонта передбачає використання антибактеріальних та протизапальних засобів в комплексному лікуванні даної патології. Корекція дисбіотичного зсуву спрямована на ліквідацію надлишкового бактеріального обсіменіння порожнини рота шляхом застосування поєднання препаратів таких груп в одній лікарській формі. Тому предметом наших досліджень є встановлення концентрацій обраних нами лікарських засобів мікробіологічним методом [4, 5].

На кафедрі технології ліків та клінічної фармації розроблені м'які лікарські засоби для стоматології на основі цефтріаксону та німесулід, зокрема, крем та гель. Вибір діючих речовин обґрунтовано актуальністю проблеми та соціальним замовленням професорсько-викладацького складу кафедри терапевтичної стоматології НМАПО імені П.Л. Шупика (під керівництвом проф. Г.Ф. Білоклицької).

Мікробіологічні дослідження були проведені на кафедрі мікробіології Харківської медичної академії післядипломної освіти під керівництвом проф. С.В. Бірюкової та доц. О.Б. Колокової згідно з вимогами ДФУ та методичними рекомендаціями [1].

Методи дослідження. Матеріалами досліджень є гель та крем, що містять німесулід та цефтріаксон. У всіх зразках концентрація німесуліді складає 1,0 % (згідно з аналізом літератури). Нами проведені мікробіологічні дослідження щодо визначення оптимальної концентрації цефтріаксону. При цьому кількість цефтріаксону варіювала від 0,025 % до 0,1 %. Крок збільшення концентрації склав 2 рази (табл.1). Через відсутність препаратів, що містять похідні цефалоспоринові, як препарат порівняння використовували препарат Офлоксин (виробництво "Дарниця") з концентрацією офлоксацину 0,1 %.

Таблиця 1. Концентрація діючих речовин в досліджуваних зразках

№ зразка	Основа	Лікарський засіб	Концентрація, %	
			Німесулід	Цефтріаксон
1	Суспензійно-емульсійна основа м/в	крем	1,0	0,025
2			1,0	0,05
3			1,0	0,1
4		гель	1,0	0,025
5			1,0	0,05
6			1,0	0,1

Як тест-культуру, що рекомендовані ДФУ, використовували як музейні штами (*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 10031), так і штами тих самих мікроорганізмів, що були виділені у хворих із патологічними вогнищами запалення.

У дослідженні використовували стерильне поживне середовище, яке мало відповідні ростові властивості. Поживними середовищами слугували агар АГВ (агар Гвинталя-Ведьминой) для *E. Coli*, а для *K. pneumoniae* – соєво-казеїновий агар (СКА). Поживні середовища перевіряли на стерильність та на ростові властивості згідно з вимогами ДФУ.

При проведенні мікробіологічних досліджень важливим моментом є товщина агарового шару в чашці Петрі. Дотримання цих вимог необхідне в зв'язку з тим, що розмір та форма зони пригнічення росту тест-культур залежать від глибини та рівномірності агарового шару. Встановлено, що оптимальна товщина агарового шару повинна дорівнювати $(4,0 \pm 0,5)$ мм, що досягається при внесенні в чашку Петрі діаметром 90 мм 20 мл агару, діаметром 100 мм – 25 мл агару та діаметром 150 мм – 60 мл агару.

Суспензію мікроорганізмів готували за допомогою приладу Денситометр "Densimat", який вимірює густину в одиницях Мак Фарланда. Відбирали гладкі, або рівномірно пігментовані колонії, з характерним ростом і тинкторіальними властивостями при зафарбовуванні за Грамом, пересіювали їх на щільне живильне середовище того ж складу та інкубували залежно від виду мікроорганізмів: протягом 18 – 24 год або 24 – 48 год, відповідно, для аеробних та анаеробних бактерій.

Мікробіологічні дослідження включали такі етапи: підготовлену суспензію (1 мл) з невідомою бактеріальною концентрацією вносили в підготовлену ампулу API (з 5 мл 0,85 % розчином NaCl) та перемішували, потім поміщали ампулу в зчитувачий блок і реєстрували цифрове значення Мак Фарланда. Якщо дане значення було менше 0,5, виймали ампулу з прибору та додавали необхідну кількість бактеріальної суспензії. Якщо кількість інокуляту перевищувала найбільше значення 7, то розбавляли суспензію і повторювали ще раз, використовуючи іншу ампулу. Причому ампула повинна бути чис-

τοο ζοβή τα προτέρτοο перед використанням (ταβλ. 2).

Οβοβ'язκοο проводилося тестування приладу: брали ампули McFarland Standart 6 шт по 5 мл (0,5, 1, 2, 3, 4, 5) та по черзі поміщали їх в денси-

мат. Тестування проводили кожен раз після чищення приладу.

Отримані результати порівнювали з даними, наведеними в таблиці 2 та склали пропорцію відповідно до одержаних результатів.

Таблиця 2. Відповідність одиниць Мак Фарланду оптичної густині

Стандарт Мак Фарланда	Бактеріальна концентрація Ч10 ⁸ мл	Теоретична оптична густина при 550 нм
0,5	1,5	0,125
1	3	0,25
2	6	0,50
3	9	0,75
4	12	1,00
5	15	1,25
6	18	1,50
7	21	1,75

Результати показують, яку кількість концентрованого інокуляту потрібно взяти для внесення в поживне середовище, щоб досягти потрібної концентрації мікроорганізмів в 1 мл поживного середовища.

У частину розплавленого поживного середовища при температурі 48-50 °С вносили суспензію мікроорганізмів до концентрації 10⁷ КУО/мл (колонієутворюючі одиниці). За допомогою обертового столика на попередньо застиглий стерильний агаровий шар наносили по 5 мл інокульованого поживного середовища і залишали при кімнатній температурі до застигання агару.

За допомогою стерильного стержня з внутрішнім діаметром 6 мм робили лунки в двошаровій товщі агаризованого поживного середовища. Після цього в лунки вносили по 50 мкл зразків опрацьованих ЛЗ та препарат порівняння Офлоксин, інкубували в термостаті 18-24 год при температурі 30-35 °С. Діаметри зон затримки росту тест-культур вимірювали штангенциркулем з точністю до 1 мм.

Результати й обговорення. При вимірюванні (з точністю до 1мм) зон затримки росту тест-культур орієнтувалися на зону повного пригнічення видимого росту тест-мікроорганізмів (табл. 3).

Таблиця 3. Зони пригнічення росту тест-мікроорганізмів

№ за/п зразка	Діаметр зони пригнічення росту тест-штаму (мм)		Середнє статистичне	
	10 ⁷ КУО/мл в верхньому шарі поживного середовища			
	АГВ (E. coli)	СКА (K. pneumoniae)	АГВ (E.coli)	СКА (K.pneumoniae)
1	24,3	25,3	24,2 ± 0,1	25,7 ± 0,1
	24,0	26,4		
	24,7	26,3		
	24,2	25,1		
	23,9	25,5		
2	30,0	27,0	30,9 ± 0,2	27,8 ± 0,2
	29,7	27,6		
	31,4	28,2		
	32,5	27,3		
	30,9	28,7		
3	28,4	25,6	28,7 ± 0,1	25,9 ± 0,1
	28,1	25,9		
	29,3	26,1		
	28,8	26,3		
	29,0	25,7		
4	28,0	26,5	28,2 ± 0,2	26,5 ± 0,1
	27,6	27,1		
	29,1	26,7		
	28,8	25,8		
	27,5	26,2		
5	30,9	29,3	31,5 ± 0,3	30,0 ± 0,4
	31,2	29,1		
	31,6	30,0		
	32,0	31,0		
	31,7	30,7		

№ за/п зразка	Діаметр зони пригнічення росту тест-штаму (мм)		Середнє статистичнє	
	10 ⁷ КУО/мл в верхньому шарі поживного середовища			
6	27,3	25,5	27,7 ± 0,2	25,7 ± 0,2
	27,9	26,1		
	28,1	25,8		
	27,5	25,4		
	27,7	25,7		
Препарат порівняння	23,3	24,9	23,4 ± 0,1	24,1 ± 0,1
	24,1	25,3		
	23,6	23,4		
	22,9	22,7		
	23,0	24,4		

Аналіз отриманих даних показав, що при збільшенні концентрації цефтріаксону від 0,025 до 0,1 % призводить до поступового, але незначного збільшення зон пригнічення росту тест-культур. Так, при концентрації цефтріаксону 0,025 % діаметр зон пригнічення складає 24,2 мм (зразок 1) та 28,2 мм (зразок 4) для *E. coli* і 25,7 і 26,5 мм для *K. pneumoniae* відповідно. Збільшення концентрації цефтріаксону в 2 рази (від 0,025 до 0,05 %) призводить до збільшення зон пригнічення росту, відповідно, для крему та гелю в 1,3 та 1,1 рази для *E. coli* та в 1,2 і 1,1 рази для *K. pneumoniae*. При цьому зони пригнічення змінюються від 24,2 до 30,9 мм (крем) та від 28,2 до 31,5 мм (гель) для *E. coli* та від 25,7 до 27,8 мм (крем) і від 26,5 до 30,0 мм (гель) для *K. pneumoniae*. Подальше збільшення концентрації цефтріаксону від 0,05 до 0,1% не призводить до значного збільшення антимікробної активності лікарського засобу. При цьому діаметри зон затримки росту складають 28,7 мм (зразок 3) та 25,9 мм (зразок 6) для *E. coli* та 25,9 мм і 25,7 мм для *K. pneumoniae* відповідно. Отже,

нами обрана концентрація цефтріаксону у кількості 0,05 % у складі крему та гелю.

Необхідно відмітити, що зразки 2 та 5 виявляють значно більшу антимікробну активність, ніж препарат порівняння. Так, зона пригнічення росту тест-культур складає 23,4 для *E. coli* та 24,1 для *K. pneumoniae*, що відповідає зонам пригнічення зразків з концентрацією цефтріаксону 0,025 %. Аналізуючи даний результат, можна зробити висновок, що поєднання в одній лікарській формі субстанції антибактеріальної та протизапальної дії призводить до потенціуючої антимікробної дії лікарського засобу. Отже, зразки 2 та 5 з концентрацією цефтріаксону 0,05 % виявляють більш виражену антимікробну активність, ніж препарат порівняння.

Для більш точного встановлення оптимальної концентрації цефтріаксону нами проведені подальші дослідження щодо деталізації концентрації. Нами обрані зразки ЛЗ 2 та 5 із вмістом цефтріаксону від 0,03 до 0,1 % з кроком збільшення цефтріаксону 0,01 %.

Отримані результати наведено в таблиці 4.

Таблиця 4. Зони пригнічення росту тест-мікроорганізмів (n=6)

Лікарський засіб	Концентрація цефтріаксону, %	Діаметр зони пригнічення росту тест-штаму (мм)	
		АГВ (<i>E. coli</i>)	СКА (<i>K. pneumoniae</i>)
10 ⁷ КУО/мл у верхньому шарі поживного середовища			
крем	0,03	23,2 ± 0,1	26,6 ± 0,1
	0,04	27,3 ± 0,2	26,9 ± 0,1
	0,05	31,2 ± 0,3	28,5 ± 0,2
	0,06	30,8 ± 0,2	27,8 ± 0,2
	0,07	29,8 ± 0,3	27,1 ± 0,1
	0,08	28,9 ± 0,2	26,9 ± 0,3
	0,09	28,4 ± 0,2	26,4 ± 0,1
гель	0,1	27,9 ± 0,1	25,5 ± 0,1
	0,03	28,8 ± 0,1	26,2 ± 0,2
	0,04	29,3 ± 0,2	27,3 ± 0,2
	0,05	31,5 ± 0,2	30,9 ± 0,4
	0,06	31,0 ± 0,4	29,4 ± 0,3
	0,07	29,3 ± 0,2	28,9 ± 0,2
	0,08	28,7 ± 0,3	28,0 ± 0,3
	0,09	28,0 ± 0,2	27,6 ± 0,2
0,1	27,4 ± 0,2	25,1 ± 0,1	

Аналіз одержаних результатів, які наведено в таблиці 4, свідчить, що зони пригнічення росту тест-культур в межах обраних концентрацій збільшуються від 23,2 до 31, 2 для E. coli та від 26,6 до 28,5 для K. Pneumoniae для крему та від 28,8 до 31, 0 для E. coli та від 26,2 до 30,9 для K. Pneumoniae для гелю. При подальшому збільшенні концентрації цефтріаксону відбувається поступове зменшення зон пригнічення росту тест-культур, а саме до 27,9 для E. coli та до 25,5 для K. Pneumoniae для крему; та до 27,4 для E. coli та до 25,1 для K. Pneumoniae для гелю.

Тому дані результати є підтвердженням попередніх досліджень для МЛЗ (крему та гелю), що встановили концентрацію цефтріаксону 0,05 %.

Висновки. Таким чином, проведені мікробіологічні дослідження щодо встановлення ефективної терапевтичної концентрації композиції цефтріаксон – німесулід у складі опрацьованого лікарського засобу для комплексного лікування запальних захворювань пародонта показали, що композиція з концентрацією цефтріаксону та німесуліду 0,05 % та 1,0 %, відповідно, має оптимальну антимікробну активність.

Література

1. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890-04). – С. 314-316.
2. Клиника микробиологической антимикробной химиотерапии. – 2004. – Том 6, № 4.
3. Державна фармакопея України – Х.: PIPEГ, 2001.

– 556 с.

4. Kornman K.S. di Giovine F.S. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis // Ann. Periodontol. – 1998. – P. 327-338.
5. Kreici S.B., Bissada N.F. Periodontitis – The risks of its development // Gen. Dent. – 2000. – N 2. – P. 430-436.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ КРЕМА И ГЕЛЯ НА ОСНОВЕ ЦЕФТРИАКСОНА И НИМЕСУЛИДА

С.В. Бирюкова, В.О. Тарасенко, О.Б. Колоколова, Л.Л. Давтян

Харьковская медицинская академия последипломного образования

Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика

Резюме: проведены микробиологические исследования методом диффузии в агар относительно определения антимикробной активности исследуемых лекарственных средств (крем, гель) с целью определения оптимальной концентрации действующих веществ.

Ключевые слова: микроорганизмы, тест-культуры, живительная среда, лекарственное средство, цефтриаксон, нимесулід, пленка, крем, гель.

STUDYING OF ANTIMICROBIC ACTIVITY OF CREAM AND GEL ON THE BASIS OF CEFTRIAXONE AND NIMESULIDE

S.V. Biryukova, V.O. Tarasenko, O.B. Kolokolova, L.L. Davtyan

Kharkiv Medical Academy of Post-Graduate Education

National Medical Academy of Post-Graduate education by P.L. Shupyk

Summary: microbiological research by method of diffusion into agar, regarding the definition of antimicrobial activity of explored medical products (cream, gel) with the purpose of establishment of optimum concentration of active substances has been carried out.

Key words: microorganisms, test-cultures, nutrient medium, medical product, ceftriaxone, nimesulide, film, cream, gel.