

Дослідження мікробіологічної чистоти густого екстракту листа дуба черешчатого

Г.І.Кабачний, Т.П.Осолодченко, В.М.Кукіна, Д.І.Дмитрієвський

Національний фармацевтичний університет, кафедра заводської технології
Харків, Україна

Проведено валідацію методу підготовки проби для визначення мікробіологічної чистоти густого екстракту листа дубу черешчатого. Методом висівання на поверхню живильного середовища вивчена мікробіологічна чистота досліджуваного екстракту. Доведено, що за мікробіологічною чистотою густий екстракт листа дубу відповідає вимогам Державної фармакопеї України до об'єктів категорії 2.

Ключові слова: густий екстракт листа дуба, мікробіологічна чистота, валідація методики.

ВСТУП

У зв'язку із зростаючими проблемами в терапії інфекційних уражень шкіри перспективним напрямком сучасної фармацевтичної науки є створення та впровадження у медичну практику нових ефективних лікарських препаратів, які мають широкий спектр антимікробної дії [2, 3]. Виникнення явища резистентності до багатьох мікроорганізмів сучасних антибіотиків і антисептиків створює умови для активізації досліджень з пошуку нових субстанцій антимікробної дії [6-8]. Перспективними в цьому плані є речовини рослинного походження, оскільки при вираженій антимікробній дії вони мають значно менший спектр побічних явищ, які можуть виникнути при використанні антибіотиків та антисептиків [5].

Одним з ефективних антисептиків природного походження є густий екстракт листа дуба черешчатого (торгова марка «Фітор»), який виробляє ЗАТ «Фіторія» згідно з ТУ 15.8-01566330-085-2002. Результати попередніх досліджень з вивчення спектра антибактеріальної, ранозагоювальної та протизапальної дії встановили, що «Фітор» є перспективною субстанцією для створення но-

вої м'якої лікарської форми для лікування гнійно-запальних уражень шкіри.

На етапі розробки нового лікарського засобу великого значення має дослідження мікробіологічної чистоти лікарського засобу або субстанції [4]. У попередніх дослідженнях було встановлено, що густий екстракт листа дуба має виражену антимікробну активність, тому при визначенні мікробіологічної чистоти методом поверхневого висівання необхідно інактивувати антимікробну дію екстракту і провести валідацію методики підготовки проби. Також проведення досліджень з визначення мікробіологічної чистоти обумовлено тим, що незважаючи на те, що густий екстракт має антимікробну дію, у ньому можуть знаходитись мікроорганізми, до яких він є не чутливим.

Метою роботи було дослідити мікробіологічну чистоту густого екстракту листа дуба черешчатого та валідацію методики підготовки проби.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для дослідження був використаний густий екстракт листа дуба черешчатого (ТУ 15.8-01566330-085-2002), який отримують шляхом екстракції в автоклаві. Екстракт є густою рідиною темного кольору з вираженим специфічним запахом.

Дослідження мікробіологічної чистоти проводили згідно з Державною фармакопеєю України (ДФУ) методом поверхневого висівання [1]. Вибір методики обумовлений тим, що вона є найбільш простою, не потребує використання спеціального обладнання на відміну від методу фільтрації. Опис методу: у чашки Петрі вносили від 15 мл до 20 мл розплавленого густого живильного середовища для вирощування бактерій (МПА) або розплавленого густого живильного середовища для вирощування грибів (агар Сабуро). Температура середовища складала близько 45°C, після чого давали середовищу застигнути. Отримані чашки з поживним середовищем підсушували в

ТАБЛИЦЯ 1

Підготовка зразка для випробування та перевірки придатності методики

Штам для дослідження	Розведення 1:10		Розведення 1:25		Розведення 1:50	
	КУО сусп.	КУО досл.	КУО сусп.	КУО досл.	КУО сусп.	КУО досл.
Staphylococcus aureus ATCC 6538	78	5	71	84	38	25
Staphylococcus aureus ATCC 25923	103	13	123	145	92	81
Escherichia coli ATCC 25922	56	21	67	79	123	132
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	109	43	65	110	88	123
Bacillus subtilis ATCC 6633	122	54	156	12	108	111
Candida albicans ATCC 885/653	85	32	77	87	79	86

Примітки: КУО сусп. – кількість КУО в суспензії мікроорганізмів, КУО досл. – кількість КУО в досліджуваному зразку.

ламінарному струмені стерильного повітря або в термостаті. Точно відміряний об'єм підготовленого зразка (0,5 мл) розподіляли по поверхні живильного середовища. Для кожного розведення використовували не менше двох чашок Петрі з кожним живильним середовищем. Посіви інкубували при температурі 30-35°C для бактерій та 20-25°C для грибів протягом п'яти діб, якщо вірогідні результати випробування не будуть одержані за короткий час. Відбирали чашки, відповідні одному розведенню, для якого кількість колоній на одній чашці Петрі не перевищувала 300 колоній (100 колоній для грибів). Обчислювали середнє арифметичне значення числа колоній і визначали число колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1 г речовини, що досліджувалась. Також для ідентифікації стафілококу та синьогнійної палички було використано поживне середовище №8, а для ідентифікації ентеробактерій – бульйон Мозеля.

Для валідації методики підготовки проби були використані наступні тест-штами мікроорганізмів: Staphylococcus aureus ATCC 6538, Staphylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, Bacillus subtilis ATCC 6633, Candida albicans ATCC 885/653.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Перед дослідженням мікробіологічної чистоти необхідно провести підготовку проб і експериментально довести, що підготовлена проба не володіє антимікробними властивостями. Із цією

метою були виготовлені три розведення густого екстракту: 1:10, 1:25 та 1:50. Для цього використовували буферний розчин. Кожне з отриманих розведень засівали стандартизованою сумішшю мікроорганізмів з урахуванням того, щоб 1 г отриманого розведення містив близько 100 КУО. Після цього робили висів на поверхні чашок Петрі, які інкубували за належних умов, та робили підрахунок КУО. Результати з валідації методики підготовки проби наведені в табл. 1.

Отримані дані свідчать, що в розведенні 1:10 густий екстракт листя дуба черешчатого ще має антимікробні властивості, про що свідчить зменшення титру мікроорганізмів в інокульованому зразку у порівнянні з контролем. У розведенні 1:25 екстракт втрачає антимікробні властивості, оскільки кількість мікроорганізмів в інокульованому зразку та контролі знаходиться на одному рівні. Таким чином, для перевірки густого екстракту листя дуба на мікробіологічну чистоту слід застосовувати його розведення 1:25, яке і було використано для подальших досліджень.

Результати досліджень мікробіологічної чистоти густого екстракту листя дуба черешчатого наведені в табл. 2.

Оскільки досліджуваний екстракт є перспективною субстанцією для створення на її основі нових високоефективних лікарських засобів, в якості критерію мікробіологічної чистоти були обрані вимоги ДФУ, а саме вимоги до субстанції і допоміжних речовин для виробництва готових лікарських засобів, що піддаються стерилізації; готових лікарських засобів для місцевого, трансдермального, інтравагінального застосуван-

ТАБЛИЦЯ 2

Дослідження мікробіологічної чистоти густого екстракту листя дуба

Критерій	Вимоги ДФУ	Результати досліджень	Відповідність ДФУ
Загальна кількість життєздатних аеробів в 1 г	≤10 ²	5	відповідає
Наявність ентеробактерій	відсутні	відсутні	відповідає
Наявність Pseudomonas aeruginosa	відсутні	відсутні	відповідає
Наявність Staphylococcus aureus	відсутні	відсутні	відповідає

ня, для введення у порожнини вуха, носа і застосування в ротовій порожнині; готових лікарських засобів для інгаляції (категорія 2) [1]. Отримані результати досліджень свідчать, що густий екстракт листя дуба черешчатого за критерієм мікробіологічної чистоти відповідає вимогам ДФУ.

ВИСНОВКИ

1. Проведена валідація підготовки проби для визначення мікробіологічної чистоти густого екстракту листя дуба черешчатого, у результаті чого встановлено, що для дослідження мікробіологічної чистоти екстракт листя дуба повинен використовуватись у розведенні 1:25.

2. Експериментально встановлено, що густий екстракт листя дуба за критерієм мікробіологічної чистоти відповідає вимогам ДФУ до об'єктів категорії 2.

ЛІТЕРАТУРА

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Х.: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
2. Динамика антибиотикорезистентных возбудителей гнойно-септических процессов в стационаре скорой помощи / Д.Д.Меньшиков, Р.Ф.Астафьева, И.В.Груненкова [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. — 2002. — №8. — С. 12-15.
3. Навашин С.М., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия: Справочник. — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 1982. — 496 с.
4. Панкрушева Т.А. Микробиологические аспекты исследования суппозиторий с офлоксацином / Т.А.Панкрушева, Е.А.Рудько, О.А.Медведева // Вестник ВГК. — 2004. — №2. — С. 254-257.
5. Черних Ю.В. Розробка складу та технології вагінальних супозиторіїв з прополісом та олією обліпиховою: автореф. дис. ... канд.фарм.наук: 15.00.01. «Технологія ліків та організація фарм. справи» / Ю.В.Черних. — К., 2008. — 23 с.
6. Alanis A.J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era / A.J.Alanis // Archives of medical research. — 2005. — №36. — P. 697-705.
7. Bacterial resistance: a sensitive issue complexity of the challenge and containment strategy in Europe / W.T.Jansen, J.T. van der Bruggen, J.Verhoef, A.C.Fluit // Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. — 2006. — Vol. 9. — №3. — P. 123-133.
8. Croft A.C. Update on the antibacterial resistance crisis / A.C.Croft, A.V.D'Antoni, S.L.Terzulli // Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research. — 2007. — Vol. 13. — №6. — P. 103-118.

Г.И.Кабачный, Т.П.Осолодченко, В.М.Куккина, Д.И.Дмитриевский. Исследование микробиологической чистоты густого экстракта листьев дуба черешчатого. Харьков, Украина.

Ключевые слова: густой экстракт листьев дуба, микробиологическая чистота, валидация методики.

Проведена валідація метода підготовки проби для определения микробиологической чистоты густого экстракта листьев дуба черешчатого. Методом посева на поверхность питательной среды изучена микробиологическая чистота исследуемого экстракта. Доказано, что по микробиологической чистоте густой экстракт листьев дуба соответствует требованиям Государственной фармакопеи Украины для объектов категории 2.

G.I.Kabachniy, T.P.Osolodchenko, V.M.Kukkina, D.I.Dmitrievskiy. Research of microbiological cleanness of thick extract of leaves of Quercus robur. Kharkiv, Ukraine.

Key words: thick extract of leaves of quercus, microbiological cleanness, validation methods.

Validation method of preparation of test for determination of microbiological cleanness of thick extract of leaves Quercus robur is conducted. The microbiological cleanness of extract by the method of sowing on the surface of substratum is investigated. It is well proven that on a microbiological cleanness thick extract of leaves Quercus robur compliance with the requirements of State Pharmacopoeia of Ukraine.

Надійшла до редакції 10.03.2010 р.