

## Обґрунтування вибору консерванта при розробці гелю для лікування діабетичних виразок

Св.М.Коваленко, Т.П.Осолодченко

Національний фармацевтичний університет, ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України  
Харків, Україна

Метою роботи був вибір консерванта та його оптимальної концентрації при розробці стабільного лікарського засобу місцевої дії для лікування діабетичних виразок. Встановлено, що розроблений гель місцевої дії з тіоктовою кислотою та алантоїном потребує додаткового введення консерванта до його складу. На підставі проведених мікробіологічних досліджень в якості консерванта обґрунтовано введення натрію бензоату в концентрації 0,1%.

**Ключові слова:** консервант, антимікробна активність, гель, діабетичні виразки.

### ВСТУП

Нами розроблено склад гелю місцевої дії для лікування діабетичних виразок (ДВ) на основі тіоктової кислоти та алантоїну. Тіоктова кислота проявляє виражений антиоксидантний, гіпоглікемічний, детоксикуючий ефекти, а також проявляє протизапальну та анальгезуючу дію. Алантоїн проявляє протизапальну, репаративну та ранозагоючу дію [5, 6, 12, 14].

Відомо, що лікарські засоби зовнішньої дії з високим вмістом водної фази (гелі, креми о/в) є найбільш сприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів (культури: *St. Aureus*, *Ps. Aeruginosa*, *Pr. Vulgaris*, *B. Subtilis*).

Обов'язково при виборі консерванта для таких препаратів необхідно враховувати: терапевтичну активність засобу, ймовірну взаємодію з іншими складовими рецептури, ділянку його нанесення, його розчинність, а також зону активності в необхідному інтервалі рН.

Метою дослідження був вибір консерванта та його оптимальної концентрації при розробці стабільного лікарського засобу місцевої дії для лікування діабетичних виразок.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

При дослідженні використана методика оцінки ефективності антимікробних консервантів, наведена в ДФУ [5].

Метод базується на введенні в дослідні зразки певної кількості тест-мікроорганізмів та визначенні через певні проміжки часу в заражених зразках кількості мікроорганізмів. У відповідності з вимогами ДФУ для оцінки активності препаратів місцевої дії нами були використані наступні тест-штами: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Basillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Candida albicans* ATCC 885/653. Мікробна загрузка складала 10-7 мікробних клітин на 1 мл середовища та встановлювалася за стандартом McFarland. Дослідження проводили методом дифузії в агар, заснованим на здатності активно діючих речовин дифундувати в агар, який засівали заздалегідь культурами мікроорганізмів. Для дослідження використовували агар Мюлер-Хінтона. Метод дифузії препарату в агар проводили «колодязями». Визначення активності препаратів проводили на двох шарах щільного живильного середовища, розлитого в чашки Петрі.

У нижньому шарі використовували голодне незасіяне середовище (агар-агар, вода, солі). Нижній шар уявляв собою підложку висотою 10 мм, на яку суворо горизонтально встановлювали 3-6 тонкостінних циліндри з неіржавіючою сталі діаметром 8 мм та висотою 10 мм. Біля циліндрів заливали верхній шар, який складався з живильного агаризованого середовища, розплавленого та охолодженого до 40 С, в яке вносили відповідний стандарт добової культури тест-мікроба. Попередньо верхній шар добре перемішували до утворення однорідної маси. Після застигання циліндри стерильним пінцетом витягували та в лунку, що утворилася, за-

ТАБЛИЦЯ 1

**Дослідження антибактеріальної активності зразків гелю з консервантами:  
ніпагін, натрію бензоат, сорбінова кислота в концентрації 0,1%**

№ зразка	Діаметри зон затримки росту в мм, с=3					
	St.aureus	E.coli	Ps. aeruginosa	Pr. vulgaris	B.subtilis	C. albicans
1	зростання	зростання	зростання	зростання	зростання	зростання
2	17,17,18	15,16,16	зростання	зростання	17,17,18	зростання
3	19,18,19	19,18,18	14,14,13	12,12,11	19,20,18	15,15,16
4	18,19, 17	16,16,17	17,17,18	зростання	18,19,18	зростання

нурювали зразки гелів, яка досліджувалася з рахунком його об'єм (0,3 мл). Об'єм середовища для верхнього шару коливався від 14 мл до 16 мл. Чашки підсушували 30-40 хв. при кімнатній температурі та ставили до термостату на 18-24 год. [2, 5, 9].

При оцінці нових антибактеріальних речовин, а також при вивченні антибіотикостійкості штамів використовувалися наступні критерії:

- відсутність зон затримки росту мікроорганізмів біля лунки, а також зони затримки до 10 мм вказують на те, що мікроорганізм нечутливий до внесеного в лунку зразка гелів;
- зони затримки росту діаметром 10-15 мм вказують на малу чутливість культури до концентрації досліджуваного консерванта;
- зони затримки росту діаметром 15-25 мм розцінюються як показник чутливості мікроорганізму до зразків гелю, що досліджується;
- зони затримки росту, діаметр яких не перевищує 25 мм, свідчать про високу чутливість мікроорганізмів до лікарського засобу, що вивчається.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі досліджень з вибору консервантів нами досліджувалися зразки гелів з консервантами, які найчастіше використовуються при розробці засобів місцевої дії: ніпагін, натрію бензоат та кислота сорбінова.

Для аналізу було зроблено чотири зразки: №1 — гель без консерванта; №2 — гель з

0,1% ніпагіну; №3 — гель з 0,1% натрію бензоату; №4 — гель з 0,1% кислотою сорбіновою. Дані результатів дослідження антибактеріальної активності досліджуваних зразків наведені в табл. 1.

Як видно з табл. 1, розроблений гель без додавання консервантів (зразок №1) має мікробну контамінацію в процесі зберігання, що обумовлює обов'язкове введення консервантів.

Зразки №2 та №4 (з ніпагіном та сорбіновою кислотою) виключені нами з подальших досліджень, тому що при проведенні експерименту спостерігався ріст *Ps. Aeruginosa*, *Pr. vulgaris* та *C. albicans*, що не відповідає вимогам ДФУ.

З наведених у табл. 1 даних видно, що зразок №3 (з натрію бензоатом) є найбільш перспективним для подальшого дослідження, тому що мав найбільшу мікробіологічну активність до культур, що вивчалися.

Наступним етапом було обґрунтування оптимальної концентрації консерванта розробленого гелю — натрію бензоату.

Для цього дослідження було зроблено чотири зразки: №1 — гель з 0,05% натрію бензоатом; №2 — гель з 0,1% натрію бензоатом; №3 — гель з 0,2% натрію бензоатом.

Дані проведеного експерименту наведені в табл. 2.

З наведених в табл. 2 даних можна зробити висновок, що зразок гелю №2 з консервантом в концентрації 0,1% є найбільш придатним для створення стабільного лікарського засобу. Подальше збільшення концентрації (зразок №3) суттєво не збільшувало антибактеріальну ак-

ТАБЛИЦЯ 2

**Дослідження антибактеріальної активності зразків гелю з натрію бензоатом  
у різних в концентраціях**

№ зразка	Діаметри зон затримки росту в мм, с=3					
	St.aureus	E.coli	Ps. aeruginosa	Pr.vulgaris	B.subtilis	C.albicans
1	20,22,21	20,19,18	зростання	12,11,11	15,15,17	12,13,12
2	19,18,19	19,18,18	14,14,13	12,12,11	19,20,18	15,15,16
3	12,12,11	16,16,17	14,14,13	12,11,11	14,14,15	15,15,16

ТАБЛИЦЯ 3

Антимікробна активність зразка гелю з натрію бензоатом

Експозиція	Вимоги ДФУ		Логарифм числа мікроорганізмів (КУО/мл)			
	Число бактерій КУО/мл Lg*	Число грибів КУО/мл Lg*	St.aureus	Ps. aeruginosa	C. albicans	Aspergillus niger
Мікробна загрузка	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	2,5×10 <sup>5</sup> (5,30)	2,5×10 <sup>5</sup> (5,39)	2,5×10 <sup>5</sup> (5,39)	2,5×10 <sup>5</sup> (5,39)
Первинний посів Lg	-	-	4,8×10 <sup>4</sup> (0,62)	4,9×10 <sup>4</sup> (0,61)	5,1×10 <sup>4</sup> (0,69)	5,1×10 <sup>4</sup> (0,69)
2 доби	2	-	2,1×10 <sup>2</sup> (2,98)	2,1×10 <sup>3</sup> (2,07)	2,2×10 <sup>3</sup> (2,05)	1,9×10 <sup>3</sup> (2,12)
7 діб	3	-	НВ	0,6×10 <sup>2</sup> (3,62)	0,2×10 <sup>2</sup> (4,09)	0,9×10 <sup>2</sup> (3,44)
14 діб	-	2	НВ	НВ	НВ	НВ
28 діб	НЗ	НЗ	НВ	НВ	НВ	НВ

**Примітки:** Lg \* – Lg зменшення; НЗ – мікроорганізми не збільшуються; НВ – мікроорганізми або гриби не виділяються.

тивність розробленого гелю, тобто було недоцільно збільшувати концентрації консерванта.

Також критерієм оцінки ефективності вважається зменшення числа життєздатних колоній клітин мікроорганізмів за визначений період після контамінації. У відповідності до вимог ДФУ, в препаратах для місцевої дії використовується логарифм зменшення числа життєздатних колоній бактерій, через дві доби він повинен складати не менше двох, через сім діб — не менше трьох, у подальшому число життєздатних клітин бактерій не повинне збільшуватися. Логарифм зменшення числа життєздатних клітин грибів за 14 діб не повинен складати не менше двох. Ці показники відповідають критерію «А».

У відповідності до критерію «В» у препаратах для місцевого застосування логарифм кількості життєздатних колоній за 14 діб повинен складати не менше трьох, у подальшому число життєздатних колоній не повинне збільшуватися. Логарифм зменшення числа життєздатних грибів за 14 діб повинен складати не менше 1 та в подальшому не збільшуватися. Після контамінації мікроорганізмами зразок досліджуваного гелю через певні проміжки часу висівали на агар для визначення числа життєздатних клітин. Відсутність росту на агарі або незбільшення кількості колоній після 14 днів інкубації вказують на те, що розроблений гель відповідає вимогам ДФУ [5, 9].

Наявність життєздатних клітин мікроорганізмів та грибів на 28 добу дослідження вказують, що препарат не відповідає критеріям «А» або «В» та не відповідає вимогам ДФУ [5, 9]. У табл. 3 наведені критерії оцінки зразка гелю з консервантом 0,1% натрію бензоату у вигляді логарифму зменшення числа життєздатних

бактерій. Розроблений гель з 0,1% натрію бензоатом в якості консерванта інокуювали визначеною кількістю тест-штамів. Облік проводили на 2, 7, 14 та остаточно на 28 добу.

Як показують дані табл. 3, після 7 діб культивування логарифм числа життєздатних клітин *Candida albicans* складав 4,09 та *Aspergillus niger* — 3,44. Клітини грибів не виділялися після 14 та 28 діб культивування. Після 2 діб культивування логарифм числа життєздатних клітин *Staphylococcus aureus* складав 2,98, *Pseudomonas aeruginosa* — 2,07. На 7 добу та в подальшому *Staphylococcus aureus* не виділявся. Логарифм числа життєздатних клітин *Pseudomonas aeruginosa* після 7 діб контамінації складав 3,62. На 14 та 28 добу інкубації мікроорганізм не реєструвався. Дослідження даного зразка гелю показало, що він відповідає критерію «А» відповідно вимогам ДФУ.

## ВИСНОВОК

Встановлено, що розроблений гель місцевої дії з тіоктовою кислотою та алантоїном потребує додаткового введення консерванта до його складу.

На підставі проведених мікробіологічних досліджень в якості консерванта обґрунтовано введення натрію бензоату в концентрації 0,1%.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Бахарев И.В. Синдром диабетической стопы: диагностика, лечение, профилактика / И.В.Бахарев, Ю.А.Редькин // Сахарный диабет. — 2003. — №1. — С. 14-18.
2. Бактеріологічний контроль поживних середовищ. Інформаційний лист МОЗ України №05.4.1/1670. — К., 2001. — 10 с.

3. Беликов О.Е. Консерванты в косметике и средствах гигиены / О.Е.Беликов, Т.П.Пучкова. — М.: Школа косметических химиков, 2003. — 250 с.
4. Грекова Н.М. Хирургия диабетической стопы / Н.М.Грекова, В.Н.Бордуновский. — М., 2009. — 188 с.
5. Дибиров М.Д. Современные возможности консервативного и хирургического методов лечения гнойно-некротических поражений стоп у больных сахарным диабетом / М.Д.Дибиров, Д.И.Черкезов, Р.А.Манушарова // РМЖ. — 2005. — Т.13, №28. — С. 1915-1918.
6. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. — Х.: РІРЕР, 2001. — 556 с.
7. Коваленко С.М. Обґрунтування складу гелю з тиоктовою кислотою та алантоїном / С.М.Коваленко, І.І.Баранова / Актуальні питання медичної науки та практики: Зб. наук. пр. ДЗ «ЗМАПО МОЗ України». — Вип. 78, Т.2, кн. 2. — Запоріжжя, 2011. — С. 139-146.
8. Коваленко С.М. Розробка технології гелю з тиоктовою кислотою та алантоїном для лікування діабетичних виразок / С.М.Коваленко, І.І.Баранова / Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. — 2011. — Вип. XXIV, №3. — С. 32-35.
9. Комелягина Е.Ю. Факторы риска и профилактика синдрома диабетической стопы / Е.Ю.Комелягина, М.Б.Анциферов // РМЖ — 2003. — Т.11, №27. — С. 1503-1507.
10. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: метод. рек. — К., 2004. — 38 с.
11. American diabetes association: standards of medical care in diabetes 2008 // Diabetes Care. — 2008. — Vol. 31. — №1. — P. 12-54.
12. Boulton A.J.M. International collaboration on the diabetic foot: a 15-year progress report / A.J.M.Boulton // Diabet Metab Res Rev. — 2004. — Vol. 20. — №1. — P. 2-3.
13. Efficacy of DL-alpha lipoic acid against systemic inflammation-induced mice: antioxidant defense system / E.P.Jesudason., J.G.Masilamoni, C.E.Jebaraj [et al.] // Mol. Cell Biochem. — 2008. — Vol. 313. — №1-2. — P. 113-123.
14. Huizinga M. Weight-loss pharmacotherapy: a brief review / M.Huizinga // Clinical Diabetes. — 2007. — Vol. 25. — №4. — P. 135-140.
15. Alpha-lipoic acid attenuates hyperglycemia and prevents glomerular mesangial matrix expansion in diabetes / M.F.Melhem, P.A.Craven, J.K.Liachenko [et al.] // J. Am. Soc. Nephrol. — 2002. — Vol. 12. — №4. — P. 108-116.

**Св.Н.Коваленко, Т.П.Осолодченко. Обоснование выбора консерванта при разработке геля для лечения диабетических язв. Харьков, Украина.**

**Ключевые слова:** консервант, антимикробная активность, гель, диабетические язвы.

Целью работы был выбор консерванта и его оптимальной концентрации при разработке стабильного лекарственного средства местного действия для лечения диабетических язв. Установлено, что разработанный гель местного действия с тиоктовой кислотой и аллантоином нуждается в дополнительном введении консерванта в его состав. На основании проведенных микробиологических исследований в качестве консерванта обосновано введение натрия бензоата в концентрации 0,1%.

**Sv.N.Kovalenko, T.P.Osolodchenko. Ground of choice preservative at development of gel for treatment of diabetic ulcers. Kharkiv, Ukraine.**

**Key words:** preservative, antimicrobial activity, gel, diabetic ulcers.

The purpose of the work was a choice of preservative and its optimum concentration at development of stable medication of local action for treatment of diabetic ulcers. It is set that the developed gel of local action with thiocctic acid and allantoinom needs additional introduction of preservative in to his composition. On the basis of the conducted microbiological researches as preservative grounded introduction of sodium of benzoate in a concentration 0,1%.

Надійшла до редакції 10.12.2011 р.