РАЗДЕЛ II. ФАРМАЦЕВТИКА

Семенова Е.Н., Кулешова С.И.

Определение антимикробной активности гентамицина в креме для наружного применения турбидиметрическим методом

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Россия, Москва)

doi:10.18411/sciencepublic-15-07-2019-05

idsp: sciencepublic-15-07-2019-05

Представлены результаты разработки турбидиметрической методики определения биологической активности гентамицина в креме для наружного применения. В ходе выполненных исследований были определены наиболее оптимальные условия турбидиметрического анализа (тест-микроорганизм, время инкубации и диапазон концентраций антибиотика, условия пробоподготовки стандартного и испытуемого образцов). Использование разработанной методики позволяет значительно сократить время проведения анализа.

По данным Государственного реестра лекарственных средств (ГРЛС) в нашей стране зарегистрировано более 1000 наименований антибактериальных лекарственных препаратов отечественного и зарубежного производства [1]. Антибактериальные средства в РФ включены в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов.

Одной из первых групп антибиотиков, введенных в медицинскую практику, является группа аминогликозидов, насчитывающая на сегодняшний день более 10 природных антибиотиков и несколько полусинтетических, полученных на их основе.

Среди аминогликозидных антибиотиков, гентамицин, вследствие сохранения чувствительности к нему большинства грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, находит широкое практическое применение. Основными показаниями к применению гентамицина являются инфекции мочевыводящих путей, легких и дыхательных путей, хирургические инфекции, раневые инфекции, ожоги III степени.

Оценивая место и значение гентамицина в современной антибиотикотерапии бактериальных инфекций, необходимо подчеркнуть, что препараты на его основе являются наиболее эффективными средствами лечения тяжелых гнойно-септических процессов, особенно вызываемых грамотрицательными микроорганизмами. Его преимущества перед другими широко применяемыми антибиотиками определяются активностью в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella spp* и др.), более быстрым проявлением бактерицидного эффекта, лучшим проникновением в очаг воспаления, редким выделением устойчивых к его действию штаммов. Комбинированное – местное (в виде кремов, мазей) и парентеральное применение гентамицина оказывается весьма эффективным при лечении гнойно-воспалительных процессов различной локализации [2].

Вместе с тем, следует учитывать достаточно серьезные нежелательные реакции (ото- и нефротоксичность, нейромышечная блокада), которые могут возникнуть в результате его передозировки. С другой стороны, использование противомикробных препаратов, в целом, сегодня требует особой осторожности в связи со стремительным распространением антибиотикорезистентности микроорганизмов. К этому, как правило, приводит применение некачественных антибиотиков и неизбирательное их использование [3]. Следовательно, особое внимание необходимо уделять вопросам

стандартизации и обеспечения качества антибактериальных препаратов, и вытекающей из этого их клинической безопасности и эффективности.

На сегодняшний день ведущими мировыми фармакопеями для количественного определения (антимикробной активности) антибиотиков группы аминогликозидов используются две разновидности биологического тестирования: метод диффузии в агар и турбидиметрический метод. В отечественной фармакопейной практике применяется только метод диффузии в агар, основанный на способности молекул антибиотиков диффундировать в агаровых средах и образовывать зоны угнетения, в которых не развиваются тест-микроорганизмы, чувствительные к испытываемому антибиотику. Несмотря на то, что метод диффузии в агар прост, не нуждается в сложном оборудовании, в связи с этим находит широкое применение, он характеризуется рядом недостатков: длительность проведения анализа; зависимость аналитического сигнала от свойств антибиотика (его растворимости, молекулярной массы и т.п.), не связанных с его активностью; чувствительность тест-культур к качеству используемого агара; сложность автоматизации и некоторые другие. С другой стороны, метод турбидиметрии отличается, наряду с другими положительными сторонами, оперативность и экономичность [4, 5].

Цель работы - разработать турбидиметрическую методику количественного определения гентамицина сульфата в креме для наружного применения.

Материалы и методы.

Исследования были выполнены на препарате «Акридерм Гента, крем для наружного применения», Россия; стандартный образец (СО) гентамицин сульфат – GS EPCRS (активность - 17352 IU/vial, batch 14, действительный на момент исследования). Для приготовления основных растворов стандартного и испытываемого образцов использовали воду очищенную, полученную на установке «Millipore», рабочие растворы готовили с буфером №4 (ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар).

Микроорганизмы, питательные среды. В работе использовали следующие штаммы микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, (для турбидиметрического анализа); *Bacillus pumilus* NCTC 8241 (для метода диффузии в агар). Определение биологической активности методом диффузии в агар проводили по ОФС.1.2.4.0010.15.

Пробоподготовка. Точную навеску испытываемого образца (1,00000 г) помещали в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл, добавляли 1 мл спирта этилового 96 %, помещали на водяную баню с температурой 40 °С и тщательно перемешивали до растворения основы и образования однородной эмульсии. Полученную смесь количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл посредством 3 порций растворителя (буферный раствор, pH 8,0) и доводили до метки буферным раствором, pH 8,0. Получали основной раствор испытываемого образца с предполагаемой концентрацией 20 мкг/мл, из которого готовили рабочие растворы испытываемого образца с соответствующей концентрацией.

Определение антимикробной активности турбидиметрическим методом. Штаммы тест-микроорганизмов инкубировали в питательной среде при 37 ± 1 °С в течение 24 ч. В день испытания бульонную культуру разбавляли для достижения мутности суспензии $25 \pm 2\%$ (коэффициент пропускания) с использованием спектрофотометра Agilent 8453 (США) и длины волны 580 нм. Полученную суспензию использовали в качестве посевного материала. Для турбидиметрического анализа была выбрана трехдозная модель параллельных линий (3х3 дизайн; 3 дозы стандарта и 3 дозы образца). На каждые 1000 мл жидкой питательной среды прибавляли 10 мл посевного материала. Затем 9 мл инокулированной среды и 1 мл испытываемого или стандартного раствора (с соответствующей концентрацией 0,67; 1 и 1,5 мкг/мл) вносили в пробирку объемом 20 мл. После этого анализируемые смеси инкубировали

при 37 ± 1 ° С в течение 4,5 ч. Размножение микроорганизмов останавливали добавлением 0,5 мл 12% -ного раствора формальдегида к каждой из пробирок. Оптическую плотность взвеси микроорганизмов в пробирках с испытуемым и стандартными образцами определяли при длине волны 530 нм. Расчет биологической активности антибиотиков, математическую и статистическую обработку результатов осуществляли в соответствии с существующими рекомендациями [6] с помощью программных обеспечений Microsoft Office Excel и CombiStats, version 5.0.

Результаты и их осуждение.

Турбидиметрический анализ оценки биологической активности антибиотиков основан на взаимодействии между тест-микроорганизмом и антибиотиком. Это взаимодействие выражается в логарифмической зависимости степени угнетения роста бактериальной популяции от концентрации антибиотика. О задержке роста микроорганизмов судят по величине мутности среды, которая может быть фотометрически измерена после инкубации. В этой связи, важнейшим вопросом в турбидиметрическом биотестировании является выбор тест-микроорганизма, который должен быть чувствителен к испытуемому антибиотику, а также быстро и равномерно расти в жидкой питательной среде. Среди изученных тест-микроорганизмов был выбран штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, так как он характеризовался чувствительностью к гентамицину, не очень высокими ростовыми потребностями, и в проведенных многофакторных исследованиях давал более быстрый рост в отличие от штамма *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Последнее может быть связано с более длительной лаг-фазой *St. epidermidis* ATCC 12228, так как он метаболически менее активен и, по всей видимости, имеет небольшой арсенал адаптационных механизмов к изменяющимся условиям среды [7].

Выбранная нами для анализа модель параллельных линий предполагает, что: взаимосвязь между логарифмом доз и оптической плотностью взвеси тест-микроорганизмов должна быть представлена в виде прямой линии в диапазоне исследованных концентраций; прямая линия испытуемого образца должна быть параллельна соответствующей прямой линии стандартного образца [6]. Линейный отклик обычно происходит в ограниченном диапазоне концентраций антибиотика и определенной фазе роста тест-микроорганизма (фаза логарифмического роста), в которой микроорганизмы проявляют наибольшую чувствительность к действию антибиотиков.

В ходе проведенных испытаний были выбраны оптимальные условия проведения анализа для количественного определения гентамицина сульфата турбидиметрическим методом (табл. 1).

Для подтверждения линейности и параллельности были построены графики зависимости «доза-реакция» для растворов стандартного и испытуемого образцов с использованием среднего значения оптической плотности взвеси тест-микроорганизма от концентрации антибиотика (рис. 1).

Таблица 1

Определение оптимальных условий количественного определения гентамицина турбидиметрическим методом

Параметр	Проанализированные условия	Выбранные условия
Тест-микроорганизм	<i>St. aureus</i> ATCC 6538P; <i>St. epidermidis</i> ATCC 12228;	<i>St. aureus</i> ATCC 6538P
Диапазон концентраций антибиотика (мкг/мл)	0,67; 1; 1,56 0,5; 1; 2; 4	0,67; 1; 1,56
Время инкубации (ч)	3,5; 4,5; 5,5;	4,5

Рисунок 1. Зависимость оптической плотности взвеси микроорганизмов от концентрации гентамицина.

Проведенный дисперсионный анализ показал правильность результатов опыта: значительную регрессию и отсутствие отклонений от линейности и параллельности, в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами» [6] (табл. 2).

Таблица 2

Результаты дисперсионного анализа определения биологической активности гентамицина турбидиметрическим методом.

Источник дисперсии (показатель)	Число степеней свободы	Сумма квадратов	Средний квадрат	F _{набл.}	F _{критич.}	
Регрессия	1	0,634800	0,634800	>1000	>8.1	(P=99%)
Параллельность	1	0,000300000	0,000300000	1,216	<4.35	(P=95%)
Линейность	2	0,000900000	0,000450000	1,824	<4.35	(P=95%)
Квадратичность	1	0,000900000	0,000900000	3,649	<4.35	(P=95%)
Разность квадратичностей	1	0,000000001	0,000000001	0,000	<4.35	(P=95%)

Проведенная сравнительная оценка биологических методов количественного определения гентамицина и статистический анализ показали, что метод диффузии в агар и турбидиметрический анализ могут считаться взаимозаменяемыми ($t_{расч.}=1,27 < t_{крит.}=2,78$). Вместе с тем, разработанная турбидиметрическая методика количественного определения гентамицина обладает преимуществами в отношении чувствительности и времени, затраченного на проведение анализа (табл. 3).

Таблица 3

Сравнительная оценка биологических методов количественного определения гентамицина

Метод анализа	Чувствительность, мкг/мл	Время выполнения анализа (инкубации), ч	Среднее содержание гентамицина в креме, %
Турбидиметрическая методика	0,67	4,5	97
Диффузия в агар	1,28	18-20	96

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований, разработана турбидиметрическая методика определения гентамицина в креме для наружного применения, позволяющая получать важную информацию об антимикробной активности лекарственного препарата. Подобраны условия пробоподготовки, тест-микроорганизм, время инкубации и диапазон концентраций антибиотика, оптимальные для проведения анализа.

1. Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации. [Электронный ресурс]. // <http://grls.rosminzdrav.ru/>
2. Навашин С.М., Фомина И.П., Сазыкин Ю.О. Антибиотики группы аминогликозидов. М.: Медицина, 1977.
3. Vakulenko S., Mobashery S. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003. V. 16(3). P. 430–450.
4. Олефир Ю.В., Семенова Е.Н., Кулешова С.И., Саканян Е.И., Процак С.А. Применение турбидиметрического метода анализа для стандартизации и оценки качества антибиотиков группы аминогликозидов и лекарственных препаратов на их основе. *Антибиотики и химиотерапия*, 2018, 63; 7-8.
5. Кулешова С.И. Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2015; 3: 13-7.
6. Государственная фармакопея РФ. - XIV изд. М.:ФЭМБ. 2019 г.
7. Колпакова С.Д., Колпакова Г.А. Исследование особенностей развития музейных и свежевыведенных из организма штаммов. *Вестник СамГУ Естественнонаучная серия*. 2005, 6, 184-193.