

УДК 577.3:621.384.8:547.495.9

ФАРМАЦЕВТИЧНА СУМІСНІСТЬ ІНГРЕДІЄНТІВ У НОВОМУ ДЕЗІНФЕКТАНТІ "ЕПІДЕЗ-БАР'ЄР"

А.В. Лисиця, кандидат біологічних наук
Інститут сільського господарства Західного Полісся НААН України

Показано фармацевтичну сумісність інгредієнтів у новому дезінфектанті "Епідез-бар'єр", призначеному для застосування в зимовий період. Встановлено, що найоптимальніший результат можна отримати, застосовуючи карбамід в якості антифризу.

Вступ. Значна кількість патогенних мікроорганізмів може протягом тривалого часу витримувати низькі температури, наприклад, лептоспіри (*Leptospira*) за -30 – -70 °С зберігають життєздатність до 2 років [1]. Необхідність проведення знезаражувальних і карантинних заходів у зимовий період зменшується, але не зникає. Це, зокрема, обробка обладнання, взуття персоналу, транспортних засобів тощо.

Робочі розчини більшості дезінфектантів готують на водній основі, тому їх використання в холодний період року є досить обмеженим. Через кристалізацію як основної діючої речовини препарату, так і розчинника (води), застосування їх за "мінусових" температур або неможливе, або змушує додавати до розчинів велику кількість солі, зазвичай хлориду натрію. Між тим додавання NaCl призводить до погіршення якісних показників засобу, викликає корозію металу, можливим є осадження основної діючої речовини препарату, що знижує його біоцидну активність. Застосування в зимовий період такої перспективної групи дезін-

фектантів, як полімерні похідні гуанідину [2], стикається з аналогічними проблемами.

Крім NaCl можна застосовувати інші антифризи. Зокрема, в дезінфектанті "Віроцид" (виробник Бельгія) для виготовлення стійких до замерзання робочих розчинів, концентрації 1–3 % за діючими речовинами, використовуються великі кількості (до 40 %) пропіленгліколю або етиленгліколю [3]. Це суттєво підвищує вартість обробки. Крім того, "Віроцид" містить четвертинні амонієві сполуки (ЧАС), які при некоректному дозуванні можуть провокувати розвиток резистентних штамів мікроорганізмів [4]; до складу препарату також входить досить токсичний глутаровий альдегід.

Перед нами стояло завдання підібрати спеціальну антифризну добавку до вже відомого дезінфікуючого засобу "Епідез", що містить як основну діючу речовину полігексаметиленгуанідин (ПГМГ), сполуку з групи полімерних похідних гуанідину [5,6]. За хімічною будовою ПГМГ – це лінійний або розгалужений полімер, добре розчинний у воді, молекулярна маса заз-



вичай коливається в межах кількох тисяч а.о.м. За зовнішнім виглядом це напівпрозора склоподібна маса. ПГМГ володіє широким спектром бактерицидних, вірусцидних, фунгіцидних і альгіцидних властивостей [2,6].

Проте під час виготовлення будь-яких комплексних препаратів, що містять два чи більше інгредієнтів, виникає загроза їх потенційно можливої хімічної взаємодії. Часто питанню фармацевтичної сумісності не надають належної уваги. Недостатньо обґрунтоване, "механічне" комбінування різних діючих речовин може спричинити небажані наслідки, серед яких не лише часткова або повна втрата активності, але й набуття агресивних або токсичних властивостей [7].

Питання токсичності складових комбінованих дезінфікуючих засобів не просте. Зазвичай, інгредієнти підбирають з метою підсилення або продовження дії біоцидів, розширення спектру антимікробної активності, отримання ефекту синергізму тощо. Зокрема, ПГМГ інколи комбінують з ЧАС або альдегідами. Так, група російських дослідників визначила токсичну дію комплексного препарату, що містить ПГМГ-хлорид (ПГМГхл) та алкілбензилдиметиламонію хлорид (катамін АБ) з групи ЧАС, у співвідношенні 6:1 [8]. Виявилося, що LD₅₀ для щурів-самців становить 226 мг/кг, що в декілька разів менше від LD₅₀ для ПГМГхл за його ізольованого надходження та у 10 разів менше від LD₅₀ для чистого катаміну АБ. Тобто, зростання біоцидної активності комплексного препарату супроводжується значним підвищенням токсичності. В даному випадку ефект більш ніж адитивний. При хронічному 6-місячному ентєральному введенні цього препарату щурам встановлено порогову дозу на рівні 0,02 мг/кг, тобто, максимальна недіюча доза препарату за ПГМГхл становить

0,004 мг/кг. Разом з тим порогова доза для чистого ПГМГхл становить 0,5 мг/кг, а для ЧАС – 1 мг/кг. Суміш ПГМГхл та катаміну АБ в дозі 0,2 мг/л у хронічному експерименті пошкоджувала всі органи, що перевірялись (печінка, нирки, дванадцятипала кишка, статеві залози) [8]. Проте розробники подібних препаратів зазвичай наголошують, що загальний токсичний вплив не зростає, оскільки комбінований засіб можна застосовувати в значно менших дозах і концентраціях завдяки синергізму дії інгредієнтів.

У вітчизняному препараті "Кристал 1000" синергічний ефект досягається завдяки комбінації іншого полімерного похідного санідину, а саме полігексаметиленбігуанідину (ПГМБГ) з ЧАС і альдегідами (глюксалевий і глютаровий) [9]. У препараті "Славін" (виробник Білорусь) поєднано ПГМГхл і глютаровий альдегід [10]. Як вже згадувалось, альдегіди є досить токсичними сполуками. Наприклад, пари глютарового альдегіду подразнюють слизові очей, носа та гортані, можуть спричинити виробничу астму тощо. Тому в багатьох розвинених країнах його застосування обмежене. Але спокуса розширення спектру антимікробної активності дезінфектантів та можливість зменшення концентрації їх робочих розчинів змушує розробників і далі комбінувати різні біоциди.

Фармацевтичну несумісність інгредієнтів далеко не завжди можна визначити за явними ознаками хімічних реакцій (випадіння осаду, зміна кольору, газовиділення, помутніння тощо). Тому одним з найефективніших методів визначення стану молекул окремих біологічно активних сполук в сумішах є метод мас-спектрометрії (МС) [11,12]. Завдяки МС можна точно ідентифікувати всі складові багатоконпонентних або комплексних препаратів та визначити зміни їх хімічного

складу (розкладання молекул, утворення нових сполук тощо). Саме тому при підборі та випробуваннях антифризу для епідезу ми використали метод МС, зокрема, часопролітну плазмово-десорбційну МС (time-of-flight plasma desorption mass spectrometry або TOF-PDMS) з йонізацією зразка уламками поділу ядер каліфорнію 252 (^{252}Cf) [13]. Однією з основних переваг методу TOF-PDMS є можливість отримання на мас-спектрах чітких молекулярних та квазімолекулярних йонів (КМІ) окремих речовин та їх комплексів або похідних. У TOF-PDMS відбувається "м'яка" йонізація зразка, значна частина молекул органічних речовин зберігає цілісну структуру. Це дозволяє безпосередньо визначати стан молекул біологічно активних речовин у природних та штучних субстратах або субстанціях різного походження, в т. ч. у комплексних лікувально-профілактичних препаратах, дезінфектантах та ін.

Наприклад, під час розробки нового антисептика для лікування перитоніту, як основні діючі речовини було використано декаметоксин (група ЧАС) і перекис водню (H_2O_2). Під час лабораторних випробувань постало питання фармацевтичної сумісності інгредієнтів. Метод TOF-PDMS використовувався для проведення тривалого моніторингу стану молекул цих речовин в сумішах. Зразки містили постійну кількість декаметоксину і різні концентрації H_2O_2 (від 0,00625 до 0,2 %). Дослідження показали, що при вмісті H_2O_2 0,2% молекули декаметоксину у водних розчинах руйнуються вже протягом 3 місяців, при 0,1 % – 6 місяців. Декаметоксин у суміші зберігався більш тривалий час лише в зразках, де вихідні концентрації H_2O_2 становили 0,05 % і менше. Через два роки декаметоксин було виявлено лише в зразку, де початкова концентрація H_2O_2 становила 0,00625 %. Оскільки концентрації перекису водню нижчі за 0,1 %

використовувати терапевтично недоцільно, було визнано, що готувати подібні антисептичні суміші необхідно *ex tempore* [14].

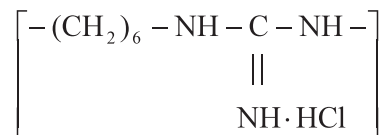
Для нового дезінфікуючого засобу "Епідез-бар'єр" в якості антифризу було випробувано низку речовин з метою зниження температури замерзання водних розчинів ПГМГ. Найбільш оптимальною виявилася композиція з карбамідом [15], що дозволило знизити температуру початку кристалізації водного розчину дезінфектанта до -16°C .

Метою досліджень було визначити (за допомогою методу МС) фармацевтичну сумісність інгредієнтів в комбінованому дезінфектанті "Епідез-бар'єр", призначеному для використання в зимовий період.

Матеріали і методика досліджень.

Дослідження проводили на мас-спектрометрі біохімічному "МСБХ-01" з йонізацією зразка уламками ділення ядер ^{252}Cf (АТ "SELMІ", м. Суми, Україна). Підготовка зразків до мас-спектрометричних досліджень і самі експерименти проводилися за випробуваними методиками валідованими для методу TOF-PDMS [12,16]. Під час підготовки зразків використовували спеціальний пристрій "УНП-2" (АТ "SELMІ", м. Суми, Україна).

Випробовували солі ПГМГхл і ПГМГ малеат (ПГМГм) (ПП "Терміт", м. Рівне, Україна) та їх водні суміші в різних пропорціях з карбамідом $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ кваліфікації х. ч. (ТОВ "Хімлаборреактив", Україна). Зразки розчиняли в дистильованій воді, в окремих випадках також застосовували етанол і ацетон. Мономер молекули полікатіону ПГМГхл має таку структуру:



Мас-спектри препаратів знімали в день розведення, а також після витрим-

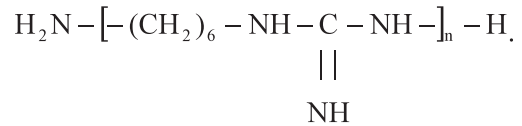


ки в розчині за кімнатної температури в темному місці періодично протягом визначеного терміну моніторингу (12 місяців). При проведенні аналізів знімали мас-спектри як позитивних, так і негативних йонів. Більшість сполук утворює за йонізації в TOF-PDMS значну кількість саме позитивно заряджених йонів, тому спектри в "+" йонах легше аналізувати та інтерпретувати. Об'єм накопичуваних даних подій розпаду ^{252}Cf (стартів) становив від 4 000 до 12 000, ширина каналу детектування 1 нс/канал, режим віднімання постійного фону. На рисунку показано мас-спектри, отримані за допомогою спеціальної комп'ютерної програми керування, накопичення та обчислення даних (МСБХ, версія 4.0/м). На осі абсцис відкладається m/z , тобто, відношення маси йону (m) до його заряду (z), для однозарядних йонів це фактично їх маса; по осі ординат – кількість накопичених йонів (інтенсивність піків).

Результати досліджень та їх обговорення. Мас-спектрометричні випробування композицій, що містили ПГМГхл з карбамідом і ПГМГм з карбамідом показали, що ці сполуки є хімічно (фармацевтично) сумісними. Більш інформативні мас-спектри нами отримано для солі ПГМГ з малеїною (дис-бутадієною) кислотою в позитивних йонах. Це пов'язано з особливостями йонізації в TOF-PDMS. Відомо, що малеїнова кислота може використовуватися як антиоксидант або радіопротектор. У нашому випадку її молекула виступає акцептором електрона, що сприяє утворенню і виходу з матриці позитивних йонів олігомерів ПГМГ.

На мас-спектрі чистого ПГМГм в "+" йонах (рис., а) виявлено низку послідовних піків олігомерів, що відрізняються на розмір одного мономера $\Delta m/z \sim 141$. Це зокрема, m/z 301, 442, 583, 724, 865, 1006. Так, m/z 301 належить димеру

($n = 2$), що містить по краях $-\text{NH}_2$ і $-\text{N}$ групи, а також H^+ біля однієї з гуанідинових груп. Цей протон і надає всій молекулі позитивний заряд при йонізації. Структура найменшого з олігомерів ПГМГ має такий вигляд:



Якщо мономер позначити як M , то отриманий йон можна записати у вигляді $[2M+\text{H}^+]^+$; m/z 442 належить КМІ (або протонованому) йону $[3M+\text{H}^+]^+$; m/z 583, відповідно, $[4M+\text{H}^+]^+$; m/z 724 – $[5M+\text{H}^+]^+$; m/z 865 – $[6M+\text{H}^+]^+$ і т. д., або $n = 2, 3, 4, 5, 6$. Помітно, що інтенсив-

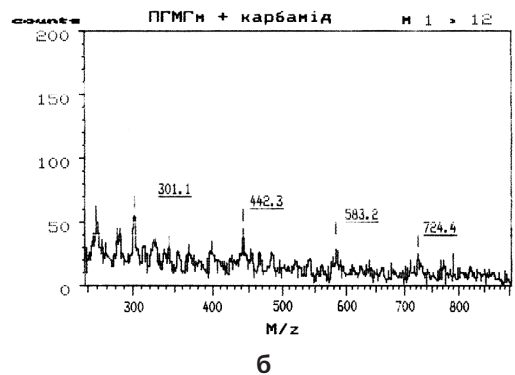
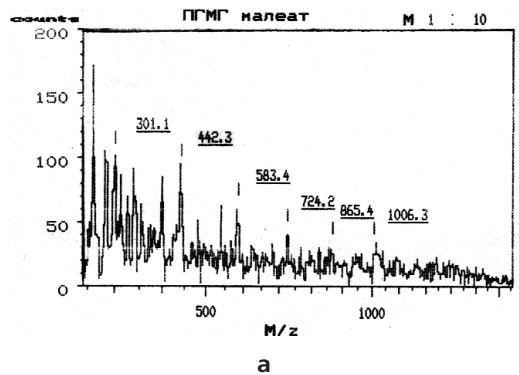


Рис. Мас-спектри TOF-PDMS: а – ПГМГ малеат 1%, б – ПГМГ малеат в суміші з карбамідом ("Епідез-бар'єр") через 12 місяців

ність піків для йонів з більшими масами поступово падає і це також є особливістю йонізації в TOF-PDMS.

На мас-спектрі суміші ПГМГм з карбамідом через 12 місяців в "+" йонах також наявні всі характерні піки олігомерів ПГМГ – m/z 301, 442, 583 і 724 (рис., б). Характер спектра практично не змінився. Можна стверджувати, що основна діюча речовина препарату (ПГМГ) не зазнала змін, новоутворень також не виявлено. Таким чином, проведені МС-випробування композицій солей ПГМГ з карбамідом підтвердили фармацевтичну сумісність інгредієнтів.

Ці результати добре узгоджуються з отриманими нами раніше даними щодо антимікробної дії препарату "Епідез-бар'єр". Мікробіологічні випробування на тестових штаммах мікроорганізмів *Escherichia coli* і *Staphylococcus aureus* показали, що активність ПГМГхл у новому препараті не зменшилась. Бактерицидна дія виявлялась вже в концентрації 0,1% (за ПГМГхл) за мінімальної 15 хв експозиції [17]. У випадку *S. aureus* і пліснявих грибів роду *Aspergillus* Епідез-бар'єр виявився навіть більш ефективним ніж чистий ПГМГхл.

Як антифризи нами також випробувались інші речовини, що можуть знижувати температуру замерзання водних розчинів. Зокрема, досліджували композиції ПГМГхл та ПГМГм з диметилсульфоксидом та ін. спорлуками, проте вони показали гірші результати [17].

Отже, новий дезінфектант "Епідез-бар'єр" успішно пройшов випробування. Він хімічно не агресивний, не токсичний, екологічно безпечний, здатний до

біорозкладання. Це особливо важливо, якщо враховувати постійно зростаюче хімічне навантаження на природні екосистеми і агроценози. Використання карбаміду як антифризу дозволило, порівняно з аналогами, суттєво знизити вартість обробки. Можливе замерзання за дуже низьких температур (нижче -20 °C) і подальше розмерзання не впливає на якісні показники дезінфектанту.

Насамкінець варто додати, що препарати на основі полімерних похідних гуанідину відповідають вимогам "зеленої" хімії. Їх доцільно застосовувати при створенні агротехнологій за сучасними екологічними стандартами. Наприклад, ПГМГхл може бути використаний у процесі виробництва гранульованих добрив, оскільки одноразової обробки 1 % розчином препарату достатньо для повного знезараження контамінованого сальмонелою пташиного посліду [18].

Висновки

Інгредієнти в комбінованому дезінфектанті "Епідез-бар'єр", призначеному для використання в зимовий період, є фармацевтично сумісними.

Додавання до основної діючої речовини ПГМГхл карбаміду в якості антифризу знижує температуру початку кристалізації водного розчину дезінфектанту до -16 °C і, в окремих випадках, покращує його антимікробні характеристики.

За допомогою вперше знятих мас-спектрів TOF-PDMS композицій полімерних похідних гуанідину з антифризами виявлено низку послідовних піків олігомерів ПГМГ, що відрізняються на розмір одного мономера – $\Delta m/z \sim 141$.

Література

1. Малахов Ю.А., Панин А.Н., Соболева Г.Л. Лептоспироз животних. — Ярославль: ДИА-пресс, 2000. — 222 с.
2. Воинцева И.И., Гембицкий П.А. Полигуанидины — дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционных материалах. — М.: ЛКМ-пресс, 2009. — 304 с.
3. Аракелова Н.Т., Троицкая Е.В. Организация дезинфекционных барьеров в животноводстве // Ветеринария. — 2009. — № 4. — С. 14—15.



4. In vitro study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility / L.E. Moore, R.G. Ledder, P. Gilbert, A.J. McBain // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – 74, № 15. – P. 4825–4834.
5. Пат. 34286 Україна, МПК (2006) А 61 К 33/00. Засіб дезінфікуючий Епідез / Лисиця А.В., Степаняк І.В., Мандигра М.С., Мандигра Ю.М.; заявник і власник патенту Інституту епізоотології УААН. – № у 2008 01694; заявл. 08.02.2008; опубл. 11.08.2008, Бюл. № 15.
6. Використання полігексаметиленгуанідину для дезінфекції / Мандигра М.С., Степаняк І.В., Лисиця А.В., Мандигра Ю.М. // Аграрний вісник Причорномор'я: Зб. наук. праць. – Одеса: СМІЛ, 2008. – Вип. 42. – Ч.2. – С. 69–73.
7. Хімічна сумісність біологічно активних речовин / Лисиця А.В., Бялецький С.А., Мандигра М.С. та ін. – Рівне: ІЕ УААН, 1998. – 65 с.
8. Изучение комбинированного токсического действия полигексаметиленгуанидина гидрохлорида и четвертичного аммонийного соединения / Мамонов Р.А., Беляева Н.Н., Тульская Е.А., Одинцов Е.Е. // Вестник Рос. воен.-мед. академии. – 2008. – № 3 (23). – Прил. 2. – С. 457–458.
9. www.insyntez.com.ua, жовтень 2012 р.
10. Гренкова Т.А., Шереметьева С.В., Круц К.Г. Перспективные комплексные дезинфицирующие средства на основе солей полигуанидина // Поликлиника. – №4. – 2005. – С. 28.
11. Лисиця А.В. Ідентифікація біологічно активних речовин в складних сумішах за допомогою плазмово-десорбційної мас-спектрометрії // Наук. вісник НАУ. – 1998. – Вип. 11. – С. 166–170.
12. Пат. 47720 А Україна, МПК G01N33/50. Спосіб визначення хімічної сумісності біологічно активних речовин за допомогою мас-спектрометрії / А.В. Лисиця, М.С. Мандигра (UA). – 2001085672; заявл. 09.08.2001; опубл. 15.07.2002, Бюл.№7.
13. Macfarlane R.D., Torgerson D.F. 252-Cf-Plasma Desorption Time-of-Flight Mass Spectroemtry // Int. J. Mass Spectrom. Ion Ph. – 1976. – 21. – P. 81–92.
14. Палій Г.К., Лисиця А.В. Деякі результати клінічних і мас-спектрометричних випробувань препарату для лікування перитоніту // Мат. наук.-метод. семінару "Лабораторна вет. медицина: фіз.-хім. методи досліджень". – Рівне: ІЕ УААН, 1998. – С. 203–207.
15. Пат. № 63862 Засіб дезінфікуючий стійкий до замерзання "Епідез-бар'єр", МПК А61К 33/18 (2006.01) / М.С. Мандигра, С.П. Сергійчик, А.В. Лисиця, Р.І. Зінкевич, Ю.М. Мандигра-Мельник // 201102987. – заявл. 14.03.2011; опубл. 25.10.2011, Бюл. № 20.
16. Мандигра М.С., Лисиця А.В., Дмитрієв І.М. Метод мас-спектрометрії як один із підходів до розробки і випробування нових лікувально-профілактичних препаратів // Наук.-техн. бюл. Інституту біології тварин і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів. – 2005. – Вип. 6. – № 3. – С. 259–264.
17. Морозостійкий дезінфектант епідез-бар'єр / Лисиця А.В., Бойко О.П., Мандигра Ю.М., Романішина О.О., Андрущук І.Л. // Наук. вісник вет. мед.: Зб. наук. праць. – Біла Церква, 2012. – С. 93–95.
18. Лисиця А.В., Мандигра Ю.М., Романішина О.О. Дезінфікуючі засоби на основі полімерних похідних гуанідину: Методичні рекомендації / Затв. наук.-метод. радою держ. ветфітосан. служби України, пр. № 4 від 21.12.2011 р. – Рівне: ІЕ НААН, 2012. – 20 с.

АННОТАЦІЯ

Лисиця А.В. Фармацевтическая совместимость ингредиентов в новом дезинфектанте "Эпидез-барьер" // Биоресурсы и природопользование. – 2013. – 5, № 3–4. – С. 22–27.

Определена фармацевтическая совместимость ингредиентов в новом дезинфектанте "Эпидез-барьер", который предназначен для использования в зимний период. Установлено, что наиболее оптимальные результаты можно получить при использовании карбамида в качестве антифриза.

SUMMARY

A. Lysytsya. Pharmaceutical compatibility of ingredients in new disinfectant "Epidex-barrier" // Biological Resources and Nature Management. – 2013. – 5, № 3–4. – P. 22–27.

Pharmaceutical compatibility of ingredients has been defined in new disinfectant "Epidex-barrier" intended for use in winter. It was determined that the most optimum results can be obtained using the carbamide as antifreeze.