УДК 615.276.073

РАНОЗАЖИВЛЯЩАЯ МАЗЬ, СОДЕРЖАЩАЯ ЭФИРНОЕ МАСЛО ЧАБРЕЦА

Толок А.Я., к.б.н., доцент, Батура Н.Р., ассистент, Беленичев И.Ф., к.фарм.н., научный сотрудник

Запорожский государственный университет

По нашим предварительным данным эфирное масло (ЭМ), полученное из травы чабреца, произрастающего в Запорожской области, обладает сильными антимикробными свойствами против штаммов Staphylococcus aureus 240, Bacillus anthracoides 1312, Bacterium pyocyaneum 165, Proteus vulgaris 261- III, Escherichia coli 675 [1].

Преимущества антибактериальных мазей, основанных на натуральных компонентах, очевидны, поэтому разработка нового средства, содержащего в своей основе растительные биологически активные соединения, всегда актуальна.

Цель работы – разработка мази на основе ЭМ чабреца, обладающей антимикробным и ранозаживляющим действием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изготовления экспериментальной мази использовали ЭМ, полученное из чабреца, заготовленного на территории Запорожской области в 1998 г. Стандартизацию ЭМ чабреца проводили определением основных антисептических компонентов, содержащихся в нем – тимола и карвакрола, по методике, разработанной А.Я.Толок и С.С.Артемченко [2]. Физико-химическая характеристика масла определялась по фармакопейным методам, предусмотренным Государственной фармакопеей СССР XI издания: цвет, вкус, запах, удельная плотность при 20^0С, кислотное число [4]. Стандартизацию мази проводили по содержанию фенолов, используя принцип этой же методики. Для извлечения фенолов из мази применяли 0,1 н водный раствор NaOH, ориентируясь на свойстве щелочей растворять в себе фенолы, переводя их в соли-феноляты. Из физических свойств мази определяли однородность и водородный показатель (pH) – требование ГФ СССР X и XI изданий [3,4].

Биологическую активность мазей проверяли в эксперименте на белых крысах линии Вистар обоего пола, массой 220-260 г. В качестве эталона сравнения использовали известную антибактериальную мазь «Левомиколь». Микробиологические исследования проводили по методу Н.Н. Клемпарской [5,6]. С этой целью делались бакотпечатки с модельной поверхности раны до лечения и после лечения исследуемой мазью. После термостатирования определяли колониеобразующие клетки в 1 $см^2$ (КОЕ/1 $см^2$) количество штаммов и диаметр зон задержки роста различных бактерий. Противовоспалительное и ранозаживляющее действие оценивали по динамике репаративных процессов. Общее состояние животных проверяли по биохимической картине периферической крови, взятой у животных из хвостовой вены.

Стабильность физико-химических и биологических свойств мази изучалась в динамике хранения в течение года с интервалами 3 мес. с использованием вышеперечисленных методов испытания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ И ИХ АНАЛИЗ

Экспериментальная мазь была приготовлена по общепринятой в галеновом производстве технологии с использованием мазевой основы вазелин:ланолин:вода в соотношении 50:35:15. После расплавления основы при 50^oС и охлаждении ее до 30^oС при постепенном перемешивании добавлялось ЭМ чабреца в количестве, обеспечивающем терапевтическое действие.

Физико-химическая характеристика ЭМ представлена в табл 1.

Таблица 1 – Физико-химическая характеристика эфирного масла чабреца

Год сбора сырья и получения ЭМ	Цвет	Вкус	Запах	Содержание простых фенолов в/г	Уд. плотность при 20^oС	Показатель преломления	Кислотное число	Эфирное число
1998	Св.-желт.	Резко-жгучий	Характерный тимольный	46,2	0,9486	1,4997	1,70	0

Результаты оценки мази по содержанию простых фенолов и возможности извлечения их из мази избранным нами экстрагентом представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Определение простых фенолов в экспериментальной мази

Содержание тимола в ЭМ, %	Содержание ЭМ в мази, %	Содержание тимола в мази, %	Определяемое содержание тимола в мази, %	Определяемый выход тимола в экстрагент из мази, %
46,2	0,3	0,138	0,134	97,1

Результаты табл. 2 свидетельствуют об оптимальности разработанных нами условий для экстракции простых фенолов из мази, позволяющих делать извлечение на 97,1 %.

Данные по антимикробной активности экспериментальной мази представлены в табл. 3.

Результаты табл. 3 свидетельствуют о явном преобладании антибактериальной активности у экспериментальной мази. Подсчет колоний различных бактерий на 10-е сутки наблюдения свидетельствует об отсутствии их при лечении мазью с ЭМ чабреца, что является положительным эффектом, в то время как использование хорошо известной мази «Левомиколь» при бакпосеве с раневой поверхности на 10-й день наблюдения еще показывает отрицательный результат – 14 КОЕ/1 см^2.

Таблица 3 – Антимикробная активность сравниваемых мазей

Показатели / Срок наблюдения	Экспериментальная мазь			Мазь «Левомиколь»		
Динамика показателей бактериологического исследования, КОЕ/1 см^2						
1-й день наблюдения	114,8			114,8		
5-й день наблюдения	24,1			71,4		
10-й день наблюдения	0			14,3		
Количественный состав микрофлоры	Первичные посевы	5-е сутки лечения	10-е сутки лечения	Первичные посевы	5-е сутки лечения	10-е сутки лечения
Staphylococcus aureus 209-P	14	6	0	14	13	1
Streptococcus epidermidis	16	2	0	17	9	0
Enterococcus hemoliticus	11	5	1	10	10	2
Proteus vulgaris 261-III	6	2	0	7	7	1
Bacterium coli 0_{III}	8	3	0	9	3	0

Данные ранозаживляющего действия сравниваемых мазей представлены в табл. 4.

Таблица 4 – Противовоспалительное и ранозаживляющее действие сравниваемых мазей

Критерии эффективности	Время действия мазей, сутки	
	Экспериментальная мазь	Мазь «Левомиколь»
Ликвидация перифокального отека и инфильтрации тканей вокруг раны	3 – 4	6
Ликвидация гнойного отделяемого из раны	4 – 5	7
Появление грануляции	5	8

Исследования противовоспалительного и ранозаживляющего действия сравниваемых мазей также выгодно отличают экспериментальную мазь.

Динамика изменения биохимических показателей периферической крови крыс при развитии заболевания и лечении их исследуемыми мазями представлены в табл. 5.

Таблица 5 – Состояние периферической крови крыс в период поражения и лечения сравниваемыми мазями

Сроки наблюдения, сутки	Левомиколь					Экспериментальная мазь				
	Нормы для биохимических показателей крови крыс									
	1,6 ± 0,3 Э	0,60± 0,3 НП	43,2± 2,5 НС	45,0± 4,4 Л	4,1± 0,8 М	1,6± 0,3 Э	0,60± 0,3 НП	43,2± 2,5 НС	45,0± 4,4 Л	4,1± 0,8 М
1	7,8± 0,3	0,90± 0,1	44,7± 2,5	88,1± 4,4	7,2± 0,8	7,9± 0,3	1,1± 0,2	45,2± 2,3	89,1± 3,7	7,6± 0,9
5	6,2± 0,2	0,71± 0,2	43,2± 2,0	70,2± 3,8	6,4± 0,7	5,0± 0,3	0,61± 0,1	43,1± 1,7	57,2± 2,7	5,0± 0,7
10	4,3± 0,3	0,71± 0,2	43,2± 3,7	62,5± 3,0	5,0± 0,6	2,8± 0,2	0,62± 0,2	43,1± 1,5	48,5± 3,0	4,7± 0,2

Принятые в таблице 5 сокращения: Э – эозинофилы; НП – нейтрофилы палочкоядерные; НС – нейтрофилы сегментоядерные; Л – лейкоциты; М – моноциты.

Биохимические показатели крови, особенно эозинофилы и лейкоциты – маркеры воспалительных процессов, также свидетельствуют о наступлении выздоровления у крыс на 10-й день обследования, пролеченных экспериментальной мазью. При этом на 5-й день картина крови у этих же крыс была одинаковой с биохимией крови крыс, пролеченных мазью «Левомиколь» на 10-й день наблюдения, что также указывает на превосходство активности экспериментальной мази по скорости заживления гнойных ран примерно в 2 раза при сравнении с эталоном.

Для изучения стабильности свойств мази была приготовлена новая серия в количестве 1,0 кг. Использовалось ЭМ, полученное из травы чабреца, заготовленного на территории Запорожской области в 1999 г. Стабильность показателей проверяли через каждые 3 месяца хранения мази.

Результаты стабильности физико-химических свойств мази представлены в табл. 6.

Таблица 6 – Изучение стабильности физико-химических свойств экспериментальной мази

Определяемые показатели	Срок наблюдения, мес.				
	Исх.	3	6	9	12
Однородность	однородна	однородна	однородна	однородна	однородна
pH	7,12	7,12	7,0	6,95	6,95
Простые фенолы,%	0,1265	0,1265	0,1265	0,1260	0,1068
% сохр. простых фенолов от исходного содержания в мази	100	100	100	99,6	84,46

Анализ физико-химических свойств мази может гарантировать исходную активность мази до 9-ти месяцев ее хранения. Через год хранения содержание биологически активных соединений понижается на 16%, что не должно существенно снижать терапевтическое действие мази.

Результаты микробиологических исследований представлены в таблицах 7-9.

Таблица 7 – Исследование качественного состава микрофлоры раны в процессе лечения крыс экспериментальной мазью

Сроки хранения и наблюдения	Микроорганизмы (колонии)				
	Staphyloco-ccus aureus	Streptococcus epidermidis	Enterococcus hemoliticus	Proteus vulgaris	Bacterium coli
Исходная Первичные посевы 5-е сутки лечения 10-е сутки лечения	 10 6 0	 16 2 0	 14 5 0	 9 2 0	 6 3 0
3 месяца Первичные посевы 5-е сутки 10-е сутки	 12 7 0	 10 1 0	 11 4 0	 8 2 0	 5 3 0
6 месяцев Первичные посевы 5-е сутки 10-е сутки	 9 5 2	 - - -	 9 3 1	 5 2 1	 4 2 0
9 месяцев Первичные посевы 5-е сутки 10-е сутки	 9 5 2	 - - -	 9 3 1	 5 3 1	 5 2 0
12 месяцев Первичные посевы 5-е сутки 10-е сутки	 9 5 2	 - - -	 9 3 1	 5 3 1	 5 2 0

Эталонная мазь «Левомиколь»

Исходная Первичные посевы 5-е сутки 10-е сутки	 14 13 1	 17 9 0	 10 10 2	 7 7 1	 9 3 0

Примечание: в седьмой и последующих таблицах прочерк (-) указывает на то, что параметр не определялся.

Данные таблицы 7 свидетельствуют о незначительном снижении активности мази через год ее хранения, при этом она не уступает по активности свежей мази – эталону «Левомиколь».

Таблица 8 – Изучение антимикробной активности экспериментальной мази

Штаммы микроорганизмов	Срок хранения мази				
	Исходная	3 мес.	6 мес.	9 мес.	12 мес.
	Количество колоний / диаметр зон задержки роста				
Staphylococcus aureus	28 / 20±0,3	28 / 20±0,2	25 / 14±0,2	31 / 14,0±0,1	31 / 14,0±0,1
Proteus vulgaris 261-III	20 / 18±0,2	20 / 18±0,2	23 / 13±0,7	27 / 12,8±0,2	27 / 12,8±0,6
Bacterium coli 0_{111}	27 / 17±0,2	27 / 17±0,3	24 / 17±0,3	39 / 17±0,3	39 / 17±0,4
Enterococcus hemoliticus	23 / 19±0,2	23 / 19±0,2	-	28 / 18±0,1	28 / 17,3±0,1

Анализ результатов таблицы 8 свидетельствует о сохранении антибактериальной активности мази в течение 1 года хранения. Задержка роста штаммов Enterococcus hemoliticus и Bacterium coli 0_{111} осталась в силе исходной мази. К остальным штаммам после 3-х месяцев хранения активность мази снизилась на 30 %.

Таблица 9 – Динамика показателей бактериологических исследований

Срок хранения, мес.	Суммарная обсемененность очага, КОЕ/см^2							
	Экспериментальная мазь				Мазь «Левомиколь»			
	Дни наблюдения							
	1	3	5	10	1	3	5	10
Исходная	114,8	24,1	0	0	116,5	-	71,4	14,0
3 мес.	115,7	34,7	0	0				
6 мес.	115,6	89,5	15,8	0				
9 мес.	115,6	90,0	16,0	0				
12 мес.	115,6	90,0	16,0	0				

Результаты табл. 9 также подтверждают преобладающее действие экспериментальной мази после года ее хранения над антибактериальной свежеприготовленной мазью «Левомиколь», что явно видно при сравнении их активности на 5 и 10-й день наблюдения. На 5-й день данные обсемененности очага при лечении экспериментальной мазью через год хранения такие же, как и при лечении мазью «Левомиколь» на 10-й день наблюдения.

Сравнение динамики репаративных процессов свидетельствует о значительных преимуществах экспериментальной мази при использовании ее до 3-х месяцев хранения, после 6-ти месяцев хранения мазь на 15-20% снижает свою активность, в дальнейшем свойства ее стабилизируются (испытания до 12 месяцев) и остаются на уровне свойств свежей мази «Левомиколь» с некоторым преобладанием терапевтического действия.

Таблица 10 – Ранозаживляющее действие сравниваемых мазей

Критерии эффективности	Срок наблюдения, сутки					
	Экспериментальная мазь					Мазь «Левомиколь»
	Срок хранения мази					Исходная
	Исходная	3 мес.	6 мес.	9 мес.	12 мес.	
Ликвидация репаративных процессов	3-4	5	5	5	5	6
Ликвидация инфильтрации тканей вокруг раны		4-5	5-6	5-6	5-6	
Ликвидация гнойного отделяемого из раны	4-5	4-5	7-8	7-8	7-8	7
Появление грануляции	5	5-6	7	7-8	7-8	8

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, экспериментальная мазь чабреца, имеющая в своем составе в качестве биологически активных веществ только эфирное масло чабреца, приготовленная без стабилизаторов и эмульгаторов, сохраняет однородность и водородный показатель в течение года хранения. Содержание основных действующих веществ – простых фенолов сохраняется на 100% в течение 9 месяцев хранения и на 16 % снижается за последующие 3 месяца хранения.

Антимикробная активность, определяемая в эксперименте на крысах и in vitro, в 2 раза активнее эталона сравнения антибактериальной мази «Левомиколь» на протяжении всего периода испытаний.

Ранозаживляющая активность, определяемая в динамике репаративных процессов в эксперименте на крысах, свидетельствует о значительном превосходстве новой мази (в 1,5 раза быстрее появляется грануляция) при хранении мази до 3 месяцев и сохраняет свою активность на уровне свежей мази сравнения – «Левомиколь» до конца испытаний – 1 год хранения.

Полученные данные позволяют рекомендовать экспериментальную мазь в качестве эффективного средства для лечения различных ран, отягощенных гнойно-некротическими процессами. Сохранение терапевтических свойств на протяжении 1 года хранения дает перспективу на приготовление мази не только экстемпорально в аптечной сети, но и в галеновом производстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Исследование эфирного масла чабреца и создание на его основе экспериментальных лекарственных форм: Отчет о НИР /промежуточный, ЗГУ, рук. А.Я.Толок; № ГР А01001042Р.-1994.-32 с.
2. Исследование биологической активности экспериментальных комплексов растений рода Тимьян: Отчет о НИР /заключительный, ЗГУ, №ГР 0197У012789.-1998.- 24 с.
3. Толок А.Я., Артемченко С.С. Фотометрическое определение фенолов в эфирных маслах//Химия природных соединений.-1988.-№4.-С.509-511.
4. Государственная фармакопея СССР X изд.- М.: Медицина, 1968.-111080 с.
5. Государственная фармакопея СССР.-Вып. 1. Общие методы анализа.- МЗ СССР.- 11 изд.,доп..- М.: Медицина, 1987.- 336 с.
6. Клемпарская Н.Н. Аутофлора как индикатор радиационного поражения.- М., 1966.
7. Левкина Е.Г., Малышев Ф.С., Нестеренко Л.Я. и др. Особенности стафилококковой флоры кожи человека и ее антагонистические свойства при различных состояниях организма//Вестник дерматологии и венерологии.- 1972, № 8.- С. 21-24.