

บันทึก

การตั้งตำรับยาต้านแบคทีเรียผสมสำหรับฉีดเพื่อรักษาสุกรที่ติดเชื้อแบคทีเรีย

สเตรปโตคอคคัส ซูอิส

นางสาวอัจฉรา ฤทธิ์กำลัง



ห้องสมุดคณะเภสัชศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5376961333

FORMULATION OF COMBINED ANTIBACTERIAL INJECTABLE SUSPENSION FOR  
THE TREATMENT OF *STREPTOCOCCUS SUIS* INFECTED PIGS

Miss Atchara Ritkumlung


A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmaceutics  
Department of Pharmaceutics and Industrial Pharmacy  
Faculty of Pharmaceutical Sciences  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2013  
Copyright of Chulalongkorn University

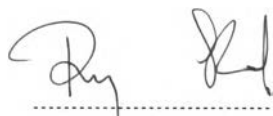


Thesis Title FORMULATION OF COMBINED ANTIBACTERIAL  
INJECTABLE SUSPENSION FOR THE TREATMENT  
OF *STREPTOCOCCUS SUIS* INFECTED PIGS  
By Miss Atchara Ritkumlung  
Field of Study Pharmaceutics  
Thesis Advisor Assistant Professor Pornpen Werawatganone,  
Ph.D.  
Thesis Co-Advisor Assistant Professor Walaisiri Muangsiri, Ph.D.  
Assistant Professor Dachrit Nilubol, Ph.D.

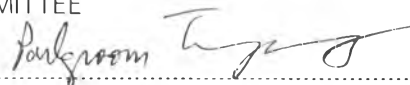
---

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn  
University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

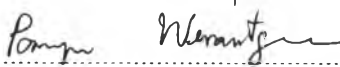


..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences  
(Assistant Professor Rungpetch Sakulbumrungsil, Ph.D.)

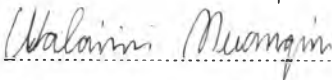
THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

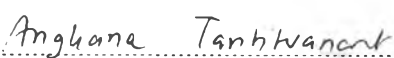
(Assistant Professor Pornpen Werawatganone, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor

(Assistant Professor Walaisiri Muangsiri, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor

(Assistant Professor Dachrit Nilubol, Ph.D.)

.....Examiner

(Assistant Professor Angkana Tantituvanont, Ph.D.)

.....External Examiner

(Napasinee Aksornkoe, Ph.D.)

อัจฉรา ฤทธิ์กำลัง : การตั้งตำรับยาต้านแบคทีเรียผสมสำหรับฉีดเพื่อรักษาสุกรที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *สเตรปโตคอคคัส ซูอิส*. (FORMULATION OF COMBINED ANTIBACTERIAL INJECTABLE SUSPENSION FOR THE TREATMENT OF *STREPTOCOCCUS SUI*S INFECTED PIGS) อ.ที่  
 ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.พรเพ็ญ วีระวัฒน์กานนท์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ร.ต.ท.  
 หญิง ดร.วัลย์ศิริ ม่วงศิริ, ผศ. ดร.เดชฤทธิ์ นิลอุบล, 109 หน้า.

*สเตรปโตคอคคัส ซูอิส* เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสำคัญในฟาร์มสุกร บางครั้งการใช้ยาต้านจุลชีพเพียงชนิดเดียวทำให้ไม่ประสบความสำเร็จในการรักษา จึงน่าสนใจที่จะใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกันสองชนิดเพื่อรักษาสุกรที่ติดเชื้อ*สเตรปโตคอคคัส ซูอิส* ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์คือพัฒนาสูตรตำรับยาฉีดแขวนตะกอนต้านจุลชีพผสมเพื่อรักษาสุกรที่ติดเชื้อ*สเตรปโตคอคคัส ซูอิส* การทดสอบความไวของเชื้อ*สเตรปโตคอคคัส ซูอิส* สายพันธุ์ท้องถิ่นจำนวน 16 ตัวอย่างเชื้อที่เก็บได้จากฟาร์มสุกรในประเทศไทยต่อยาต้านจุลชีพ 3 กลุ่ม (เบต้า-แลคแทม, อะมิโนไกลโคไซด์และฟลูออโรควิโนโลน) โดยเทคนิคอากาการโดลูชัน หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและคัดเลือกยาต้านจุลชีพสำหรับนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป การศึกษาการเสริมฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพ โดยใช้วิธีเชคเกอร์บอร์ด และการคำนวณหาค่าดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อ เลือกยาต้านจุลชีพที่ใช้ร่วมกันแล้วมีศักยภาพมากที่สุด และตั้งตำรับที่ใช้น้ำมันหลายชนิดและสารช่วยให้เปียกเพื่อเตรียมเป็นยาฉีดแขวนตะกอน ประเมินความคงตัวทางกายภาพและทางเคมี และการปลดปล่อยของยาออกจากตำรับยาฉีดแขวนตะกอน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ*สเตรปโตคอคคัส ซูอิส* มีความไวต่อยากลุ่มเบต้า-แลคแทม (อะม็อกซิซิลิน, เซฟาโซลิน, เซฟไตรอะโซนและเซฟแทซิม) และยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (ไซโปรฟลอกซาซินและเอนโรฟลอกซาซิน) มากกว่ายากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (นีโอมัยซินและเจนตามัยซิน) ผลการเสริมกันของเอนโรฟลอกซาซินและอะม็อกซิซิลินให้ฤทธิ์ต้านเชื้อ*สเตรปโตคอคคัส ซูอิส* สูงที่สุด เมื่อเทียบกับยาต้านจุลชีพตัวอื่นๆ ดังนั้นเอนโรฟลอกซาซินร่วมกับอะม็อกซิซิลินถูกเลือกเพื่อนำมาเตรียมเป็นยาต้านจุลชีพแบบแขวนตะกอนในน้ำมัน ยาแขวนตะกอนอะม็อกซิซิลิน ไตรไฮเดรทและเอนโรฟลอกซาซิน เบล ประกอบด้วยน้ำมันเมล็ดฝ้าย ใช้เป็นตัวกลางและทวิน 20 เป็นสารช่วยให้เปียก มีลักษณะทางกายภาพที่ดี ตะกอนกระจายตัวใหม่ได้ง่าย และมีความคงตัวทางกายภาพ หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส และ  $75 \pm 5$  % ความชื้นสัมพัทธ์ เป็นเวลา 3 เดือน เปอร์เซ็นต์คงเหลือของยาอะม็อกซิซิลิน ไตรไฮเดรท และเอนโรฟลอกซาซิน เบล  $101.57 \pm 0.71$  และ  $98.81 \pm 2.22$  ตามลำดับ การปลดปล่อยของเอนโรฟลอกซาซิน เบล แสดงการปลดปล่อยอย่างช้าๆ ใช้เวลานานมากกว่า 24 ชั่วโมง ในขณะที่การปลดปล่อยอะม็อกซิซิลิน ไตรไฮเดรทถึงระดับหนึ่งแล้วมีการเปลี่ยนแปลงน้อยภายในเวลา 10 ชั่วโมง ดังนั้นยาอะม็อกซิซิลิน ไตรไฮเดรทและเอนโรฟลอกซาซิน เบลในน้ำมันมีศักยภาพที่ดีในการนำไปพัฒนาสูตรตำรับยาต้านแบคทีเรียแบบผสมเพื่อใช้รักษาสุกรที่ติดเชื้อ*สเตรปโตคอคคัส ซูอิส*

ภาควิชา วิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม

สาขาวิชา เภสัชกรรม

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต อัจฉรา ฤทธิ์กำลัง

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

# # 5376961333 : MAJOR PHARMACEUTICS

KEYWORDS: STREPTOCOCCUS SUIIS / PIGS / SUSPENSION / INJECTION / ANTIBACTERIAL

ATCHARA RITKUMLUNG: FORMULATION OF COMBINED ANTIBACTERIAL INJECTABLE SUSPENSION FOR THE TREATMENT OF *STREPTOCOCCUS SUIIS* INFECTED PIGS. ADVISOR: ASST. PROF. PORNPEN WERAWATGANONE, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. WALAISIRI MUANGSIRI, Ph.D., ASST. PROF. DACHRIT NILUBOL, Ph.D., 109 pp.

*Streptococcus suis* (*S. suis*) is an important pathogen in the swine farm. Sometime the use of a single antimicrobial drug has been unsuccessful in the treatment. The use of antimicrobial combinations has been interesting for the treatment of *S. suis* infected pigs. Therefore, the objective of this study was to develop combined antimicrobial injectable suspension for the treatment of *S. suis* infected pigs. The susceptibility testing of 16 local *S. suis* strains collected from Thai swine farms against three antimicrobial groups ( $\beta$ -lactams, aminoglycosides and fluoroquinolones) was performed using agar dilution technique. The Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) were determined and the antimicrobials were selected for further studies. The synergistic effects of antimicrobial combinations were studied using checkerboard method and Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index calculation. The most potent antimicrobial combination was selected and formulated using various oils and dispersing agents to prepare parenteral suspensions. Physical and chemical stabilities and in vitro release of the suspensions were evaluated. The results demonstrated that *S. suis* isolates were more sensitive to  $\beta$ -lactam (amoxicillin, cefazolin, ceftriaxone and cefotaxime) and fluoroquinolone (ciprofloxacin and enrofloxacin) groups than aminoglycoside group (neomicin and gentamicin). The synergistic effects of enrofloxacin and amoxicillin provided the highest antimicrobial activities against *S. suis* among other antimicrobials. Then, enrofloxacin combined with amoxicillin was selected to formulate as antimicrobial suspensions in oil. Amoxicillin trihydrate and enrofloxacin base suspension containing cottonseed oil and tween 20 as a medium and a dispersing agent was good physical appearance, easily resuspended and physically stable. After 3 months at  $30 \pm 2$  °C and  $75 \pm 5$  %RH, percent remainings of amoxicillin trihydrate and enrofloxacin base in the suspension were  $101.57 \pm 0.71$  and  $98.81 \pm 2.22$ , respectively. The release profile of enrofloxacin base showed sustained release longer than 24 hours while that of amoxicillin trihydrate reached a plateau in 10 hours. Therefore, amoxicillin trihydrate and enrofloxacin base in oil is a potential candidate in developing formulation of combined antibacterials for the treatment of *S. suis* infected pigs.

Department: Pharmaceutics and Industrial  
Pharmacy

Field of Study: Pharmaceutics

Academic Year: 2013

Student's Signature Atchara Ritkumlung

Advisor's Signature P. Wera

Co-Advisor's Signature W. Muang

Co-Advisor's Signature Dachrit Nilubol

## ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis would never have been finish without the great support and encouragement from several people. First and foremost, I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation to my advisor, Assistant Professor Dr. Pornpen Werawatganone for her invaluable advice, grateful support, patience, supervision, understanding and stimulating throughout the study. Her kindness will always be memorable.

I am especially grateful to Assistant Professor Dr. Walaisiri Muangsiri, my co-advisor, for her invaluable advice, solving problems, support and excellent supervision.

I am very grateful to Assistant Professor Dr. Dachrit Nilubol, my co-advisor, for his invaluable advice, giving the amoxicillin sodium and CEFOMAX 100®, CEFRALO® L.A, CEF-3-MAX® and EXCENEL® RTU.

I also wish to express deep appreciation to Associate Professor Dr. Parkpoom Tengamnuay, Assistant Professor Dr. Angkana Tantituvanont, and Dr. Napasinee Aksornkoe for spending their valuable time to be my thesis committee and for their suggestions and comments.

I am very grateful to the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission for giving partial financial support to my thesis work (HR 11661), and also grateful to the Faculty of Pharmaceutical science and Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University for their support of equipment and laboratory.

The other special thanks are extended to Generic Vet Chem Co., Ltd. for donation of enrofloxacin base and amoxicillin trihydrate; Combine Lab Co., Ltd. for gift of enrofloxacin base; Croda Co., Ltd. for contribution of Span 20, Span 80, Tween TM 20 and Tween TM 80.

I am deeply appreciated to my friends; Pipat, Sirinda, Tullaya, Jitkasem, Nattawee, Laddawan, Panida, Sakalanunt, Keerati, Supakunya, Phojana and Sitapatch for their friendship, support and encouragement. I wish to extend my warmest thanks to all staff members especially, Waree Niyomtham and Thitima Tripipat, of the Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Science and Department of Pharmaceutics and Industrial Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical

Sciences for their help with my work and to all other people whose names have not been mentioned for their grateful support.

Finally, I would like to express to my infinite gratitude and great appreciation to my family for the love, understanding, encouragement and support throughout my study.



## CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT .....	iv
ENGLISH ABSTRACT .....	v
ACKNOWLEDGEMENTS .....	vi
CONTENTS .....	viii
LIST OF TABLES .....	x
LIST OF FIGURES .....	xii
LIST OF EQUATIONS .....	xiv
LIST OF ABBREVIATIONS .....	xv
CHAPTER I INTRODUCTION .....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW .....	4
1. <i>Streptococcus suis</i> ( <i>S. suis</i> ) .....	4
Guidelines for treatment and control of <i>S. suis</i> infection .....	6
2. Antibacterial agents .....	8
3. Susceptibility testing method .....	10
4. Methods used to assess the activity of antimicrobial combinations .....	15
5. Suspensions .....	21
5.1 Typical excipients used in parenteral suspensions .....	22
5.2 Evaluation and stability of parenteral suspension .....	25
6. <i>In vitro</i> release study .....	28
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS .....	30
Materials .....	30
Apparatus .....	33
Accessories .....	34
Methods .....	35
1. Evaluation of antimicrobials .....	35
2. Characterization .....	40
3. Preparation of suspensions in oil for intramuscular injection .....	44





	Page
4. Physical and chemical stability study of suspensions in oil.....	47
5. <i>In vitro</i> release study .....	48
6. Statistical analytical.....	49
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION.....	50
1. Evaluation of antimicrobials .....	50
1.1 Antimicrobial susceptibility test.....	50
1.2 Testing of the antimicrobial combinations.....	54
2. Characterization .....	58
2.1 DSC analysis.....	58
2.2 Quantitative analysis of amoxicillin and enrofloxacin by HPLC method. ....	60
2.3 Organic solvent for drug extraction .....	62
2.4 Solubility of amoxicillin trihydrate and enrofloxacin base .....	63
3. Preparation of antimicrobial suspensions in oil for IM injection.....	64
4. Physical and chemical stability study of suspensions in oil.....	70
5. <i>In vitro</i> release study .....	80
CHAPTER V CONCLUSIONS.....	82
REFERENCES .....	84
APPENDIX A.....	96
The particle size and percent remainings of antibacterial suspension formulations.....	96
APPENDIX B.....	99
Validation of HPLC method.....	99
VITA.....	109



## LIST OF TABLES

		Page
Table 1	The dilution process of antimicrobial drugs to be used in agar dilution susceptibility test.....	37
Table 2	HPLC linear gradient method.....	42
Table 3	MIC ranges of the reference strains.....	53
Table 4	MICs of 12 antimicrobial agents for 16 <i>S. suis</i> isolates.....	54
Table 5	FIC index of the combining drugs.....	57
Table 6	Results of susceptibility testing.....	58
Table 7	The percentages of extraction of amoxicillin and enrofloxacin using organic solvents.....	62
Table 8	The percentages of extraction of amoxicillin and enrofloxacin using ethyl ether and hexane.....	63
Table 9	Compositions suspensions.....	64
Table 10	Composition abbreviation.....	65
Table 11	Sedimentation volume and redispersibility of all antimicrobial suspension formulations after 24 hours and 1 week at room temperature.....	67
Table 12	Viscosity values of the suspensions using AND model SV-10.....	69
Table 13	Viscosity values of the suspensions using Brookfield: model-DV-II.....	69
Table 14	Sedimentation volume of antimicrobial suspensions in oil after heating cooling cycle.....	70
Table 15	Redispersibility of antimicrobial suspensions in oil after heating cooling cycle...71	71
Table 16	Sedimentation volume and time of redispersion after 3 months.....	75
Table 17	The viscosities of suspensions at day 0 and 3 months.....	78
Table A-1	Particle size of all formulations after heating cooling cycle.....	97
Table A-2	Particle size of antimicrobial suspension formulations after 3 months.....	97
Table A-3	The percent remainings of amoxicillin in suspensions after 3 months.....	97
Table A-4	The percent remainings of enrofloxacin in suspensions after 3 months.....	98



	Page
Table B-1 Data for calibration curve of amoxicillin trihydrate by HPLC method.....	104
Table B-2 Data for calibration curve of enrofloxacin base by HPLC method.....	104
Table B-3 The percentage of analytical recovery of amoxicillin trihydrate.....	106
Table B-4 The percentage of analytical recovery of enrofloxacin base.....	106
Table B-5 Data of intraday precision of amoxicillin trihydrate by HPLC method.....	107
Table B-6 Data of intraday precision of enrofloxacin base by HPLC method.....	107
Table B-7 Data of interday precision of amoxicillin trihydrate by HPLC method.....	107
Table B-8 Data of interday precision of enrofloxacin base by HPLC method.....	107



## LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1 Broth microdilution susceptibility panel containing 98 reagent wells and disposable tray inoculators.....	11
Figure 2 <i>S. suis</i> isolate tested by the agar dilution tests on sheep blood agar.....	12
Figure 3 <i>Staphylococcus aureus</i> isolate tested by the Etest gradient diffusion method...	13
Figure 4 Disk diffusion test.....	14
Figure 5 Automated instrument systems.....	15
Figure 6 Assessment of antimicrobial combinations with the disk diffusion technique.....	20
Figure 7 Assessment of antimicrobial combinations with the paper strip diffusion.....	21
Figure 8 A typical checkerboard plot and no bacterial growth observed in this gray area representing synergistic effect.....	39
Figure 9 Modified Franz diffusion cell.....	48
Figure 10 The characteristic colonies of <i>S. suis</i> on sheep blood agar.....	52
Figure 11 <i>S. suis</i> was cultured on the sheep blood Mueller Hinton agar.....	52
Figure 12 Typical checkerboard plots obtained from this study bacterial growth observed in the shaded area; A) synergy B) additivity C) indifference.....	56
Figure 13 DSC thermograms of drugs.....	59
Figure 14 UV spectrum of amoxicillin trihydrate.....	60
Figure 15 UV spectrum of enrofloxacin.....	60
Figure 16 Chromatograms of simultaneously analyzed two drugs at 229 nm.....	61
Figure 17 Chromatograms of simultaneously analyzed two drugs at 277 nm.....	61
Figure 18 Solubility determination of amoxicillin trihydrate and enrofloxacin base.....	64
Figure 19 Formulation code.....	65
Figure 20 The appearances of suspension formulations freshly prepared and floating particle shown in the circle.....	66
Figure 21 Particle size of all formulations after heating cooling 6 cycles.....	72
Figure 22 Particle size distribution of CT20 formulation after heating cooling 6 cycles.....	72
Figure 23 Particle size distribution of CT80 formulation after heating cooling 6 cycles.....	73



Figure 24 Particle size distribution of COT20 formulation after heating cooling 6 cycles.....	73
Figure 25 Particle size distribution of COT80 formulation after heating cooling 6 cycles.....	73
Figure 26 The appearances of COT201 and COT202 during stability test.....	74
Figure 27 The particle size of antimicrobial suspensions after 3 months.....	76
Figure 28 Particle size distribution of COT201 after 3 months at 30 °C.....	76
Figure 29 Particle size distribution of COT201 after 3 months at 40 °C.....	77
Figure 30 Particle size distribution of COT202 after 3 months at 30 °C.....	77
Figure 31 Particle size distribution of COT202 after 3 months at 40 °C.....	77
Figure 32 Chemical stability of COT201 and COT202 suspension formulations.....	79
Figure 33 The release profiles of antibacterial suspensions.....	81
Figure 34 HPLC chromatogram of mobile phase.....	102
Figure 35 HPLC chromatogram of amoxicillin and enrofloxacin at 229 nm.....	103
Figure 36 HPLC chromatogram of enrofloxacin at 277 nm.....	103
Figure 37 Calibration curve of amoxicillin trihydrate and enrofloxacin base by HPLC method.....	105



## LIST OF EQUATIONS

	Page
Equation 1 Sedimentation volume.....	27
Equation 2 Degree of flocculation.....	27
Equation 3 FIC index.....	40
Equation 4 Percentages synergism.....	40
Equation 5 Percentages extraction of drug.....	44
Equation 6 Sedimentation volume.....	45
Equation 7 Percentages release of drug.....	49



## LIST OF ABBREVIATIONS

%	=	percentage
µg	=	microgram
°C	=	degree Celsius
cm	=	centimeter
CV	=	coefficient of variation
DSC	=	differential scanning calorimetry
et al.	=	<i>et alii</i> , 'and others'
g	=	gram
BP	=	The British Pharmacopoeia
F	=	sedimentation volume
HPLC	=	high performance liquid chromatography
i.e.	=	id est, that is
kDa	=	kilodalton
mg	=	milligram
min	=	minute
mL	=	milliliter
mm	=	millimeter
MW	=	molecular weight
MWCO	=	molecular weight cut off
No.	=	number
PBS	=	phosphate buffer saline
pH	=	the negative logarithm of the hydrogen ion concentration
$r^2$	=	coefficient of determination
rpm	=	round per minute

SD	=	standard deviation
USP/NF	=	The United States Pharmacopoeia/National Formulary
UV	=	ultraviolet
w/w	=	weight by weight

