

Анализ антимикробной активности препаратов прополиса при проведении экспертизы качества лекарственных средств

О.В. Гунар, Н.Г.Сахно, В.Э. Григорьева, Г.М. Булгакова

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Россия

Резюме: Представлен анализ результатов фармацевтической экспертизы качества препаратов прополиса, проведенной в лаборатории микробиологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в период 2006–2014 гг. по показателю «Антимикробная активность». За указанный период проанализировано 43 серии лекарственных средств, значительную часть из которых составили препараты отечественного производства (93%). Экспериментально определено влияние отдельных факторов, таких как вид микроорганизма, его концентрация и выбор питательной среды, на результат анализа по данному показателю.

Ключевые слова: экспертиза качества лекарственных сред; препараты прополиса; антимикробная активность.

Библиографическое описание: Гунар ОВ, Сахно НГ, Григорьева ВЭ, Булгакова ГМ. Антимикробная активность препаратов прополиса при проведении экспертизы качества лекарственных средств. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2015; (2): 17–19.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PROPOLIS PREPARATIONS WHEN PERFORMING MEDICINES QUALITY EVALUATION

O.V. Gunar, N.G. Sakhno, V.E. Grigorieva, G.M. Bulgakova

Federal State Budgetary Institution «Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

Abstract: The present article describes the analysis of the results of pharmaceutical expert evaluation of propolis preparations, performed in the laboratory of microbiology of the FSBI «SCEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation for the period of 2006–2014 in terms of «Antimicrobial activity». During the mention period 43 batches of medicinal products were analyzed, a significant part of which were solid domestic drugs (93%). Experimentally determined the effect of individual factors, such as the type of microorganism, the concentration and choice of nutrient medium, on the result of the analysis for this terms.

Key words: drug quality expert evaluation; antimicrobial activity; microbiological purity.

Bibliographic description: Gunar OV, Sakhno NG, Grigorieva VE, Bulgakova GM. Antimicrobial activity of propolis preparations when performing medicines quality evaluation. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin 2015; (2): 17–19.

Для российского фармацевтического рынка, как и для мирового рынка в целом, характерна тенденция потребления лекарственных препаратов природного происхождения, используемых в целях профилактики и лечения заболеваний различной этиологии [1]. Такие природные «комплексные смеси» как прополис обладают значительной биологической активностью (начиная от восполнения дефицита веществ, необходимых для нормальной жизнедеятельности организма, до внутренней самосанации – уничтожение патогенной и гнилостной микрофлоры, восстановление обменных нарушений, замедления новообразований). Прополис – это продукт переработки пчелами смолистых веществ собранных с растений, который не токсичен даже после длительного применения, не угнетает нормальную микрофлору желудочно-кишечного тракта, не приводит к дисбактериозу и снижению природного иммунитета, усиливает защитные силы организма. Таким образом, прополис является неповторимым природным продуктом, содержащим полезные вещества в подходящем для человека соотношении [2].

Согласно многочисленным исследованиям химического состава прополиса он представляет собой сложное многокомпонентное вещество, содержащее в своем составе как органические, так и минеральные соединения, которые по общности ряда свойств объединены в четыре группы: смолы, бальзамы, эфирные масла, воск, дубильные вещества [3]. Процентное содержание указанных химических веществ приведено в таблице 1.

Биологическую активность прополиса до сих пор не удается связать с каким-либо отдельным соединением или группой родственных веществ. Вероятнее всего, она обусловлена действием всего комплекса компонентов, входящих в состав продукта. Поскольку основным источником получения прополиса служат вещества растительного происхождения, которые представляют собой неоднородное сырье и различаются по своим свойствам, в зависимости от климатических особенностей прополис, собранный с разных растений, может отличаться. Исходя из этого, нельзя ожидать одинаковой антимикробной активности данного соединения, собранного в разных географических зонах [4].

С целью изучения антимикробной активности прополиса, В.П. Кивалкиной еще в середине прошлого века были проведены фундаментальные исследования с использованием 74 штаммов микроорганизмов. Согласно данным

Таблица 1

ОСНОВНЫЕ ВЕЩЕСТВА, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ПРОПОЛИСА

Вещества	Содержание в %	
	Пределы	В среднем
Растительные смолы	38,0 – 60,0	55,0
Воск	7,8 – 36,0	22,0
Бальзамы	3,0 – 30,0	15,0
Дубильные вещества	0,5 – 15,0	8,0
Эфирные масла	2,0 – 15,0	8,0

этих исследований, установлено, что прополис из разных местностей отличался по антимикробной активности, однако подавляющее большинство образцов (водных, спиртовых, глицериновых и масляных растворов прополиса) имело очень близкий диапазон действия [4].

Антимикробную активность прополиса в большинстве случаев определяют методом серийных двукратных разведений в агаре, результаты которого зависят от ряда факторов: состава питательной среды, вида и концентрации тест-микроорганизмов.

Целью данной работы явилось изучение антимикробной активности препаратов прополиса в рамках фармацевтической экспертизы качества, а также установление влияния отдельных факторов на результаты анализа.

Были поставлены и решены следующие задачи:

- 1) сравнительный анализ результатов фармацевтической экспертизы качества препаратов прополиса отечественного и зарубежного производства по показателю «Антимикробная активность»;
- 2) экспериментальное определение влияния отдельных факторов (вид и концентрация микроорганизма, питательная среда для анализа) на результат оценки антимикробной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. В работе были использованы образцы лекарственного препарата «Настойка прополиса» различных производителей.

2. Тест-штаммы в виде типовых стандартных культур микроорганизмов:

- *Bacillus cereus* ATCC 10702;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027;
- *Escherichia coli* ATCC 8739;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

3. Питательные среды, применяемые для анализа:

- триптиказо-соевый агар (TSA), производства «Biomerieux», Франция;
- среда №1 ГРМ, производства ЗАО ПФК «Оболenskoe», Россия;
- мясо-пептонный агар (МПА), приготовленный в лаборатории микробиологии из компонентов.

Методика определения антимикробной активности препарата «Настойка прополиса» представлена на схеме 1.

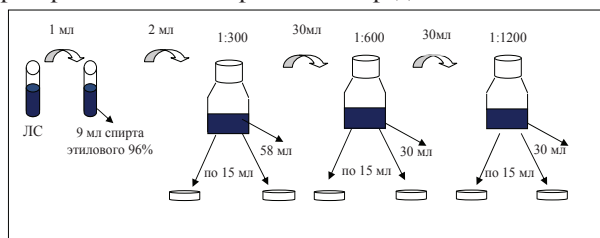


Рис. 1. Схема оценки антимикробной активности Настойки прополиса

Антимикробную активность препарата определяли методом последовательных разведений в агаризованной питательной среде: 1 мл препарата вносили в пробирку с 9 мл спирта этилового, получая разведение 1:10.

В стерильную коническую колбу вместимостью 100 мл помещали 58 мл расплавленной агаризованной среды при температуре 80–90°C, в две другие колбы – по 30 мл среды. В первую колбу вносили 2 мл препарата в соотношении 1:10 и быстро перемешивали, получая разведение 1:300. После чего готовили ряд серийных двукратных разведений до получения соотношения 1:1200. Содержимое каждой колбы разливали по 15 мл в две стерильные чашки Петри диаметром 90 мм. Одновременно в две стериль-

ные чашки вносили по 0,25 мл спирта этилового 96% и по 15 мл питательной среды (контрольный образец).

Тест-штамм микроорганизма (24-часовую культуру, выращенную на жидкой питательной среде) наносили на поверхность застывшего и подсушенного агара с помощью петли или штампа репликатора. После чего чашки инкубировали при температуре (37±1)°C в течение 18–24 часов. После инкубации отмечали последнее разведение с полной видимой задержкой роста микроорганизма при наличии роста в контрольном образце. Согласно нормативным требованиям, препарат должен подавлять рост тест-штамма в разведении не менее чем 1:300.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках настоящей работы был проведен анализ результатов фармацевтической экспертизы качества препаратов прополиса по показателю «Антимикробная активность». В период с 2006 по 2014 гг. было исследовано 43 серии лекарственных средств, большинство из них (32 серии) составлял препарат «Настойка прополиса», 8 серий – субстанция прополиса, 3 серии – спрей для местного применения «Пропосол-Н». Значительную часть ЛС, поступивших на фармацевтическую экспертизу в указанный период, составляли препараты российского производства (93%), при этом не соответствовали требованиям нормативной документации по показателю «Антимикробная активность» 7 серий образцов (16%).

Во всех случаях в качестве тест-штамма были использованы бактерии *B. cereus*. С целью определения антимикробной активности препарата был проведен сравнительный эксперимент с использованием фармакопейных тест-штаммов микроорганизмов. Результаты представлены в таблице 2.

Как видно из приведенных данных, препарат в разведении 1:300 не оказывал антимикробного действия на тест-штаммы *E. coli* и *P. aeruginosa*, в то время как рост *B. cereus* и *S. aureus* отсутствовал.

Таблица 2

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА ПРОПОЛИСА В ОТНОШЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕСТ-ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Разведение препарата	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
1:300	-	+	+	-
1:600	+	+	+	+
1:1200	+	+	+	+

Условные обозначения: «-» – нет роста, «+» – рост

На основании этого были выбраны тест-микроорганизмы для оценки влияния их концентрации на антимикробное действие препарата. Для анализа использовали взвеси бактерий *B. cereus* и *S. aureus*, содержащие различное количество клеток: 1×10^4 и 1×10^7 колониеобразующих единиц в 1 мл (КОЕ/мл) – для *B. cereus*; 1×10^6 и 1×10^9 КОЕ/мл – для *S. aureus*. Результаты представлены в таблице 3.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что при более низкой концентрации *Staphylococcus aureus* препарат обладает наибольшей активностью в разведении 1:300, в то время как для различных концентраций *Bacillus cereus* такой зависимости выявлено не было.

Важным фактором, оказывающим влияние на результаты микробиологических исследований, является питательная среда. Для определения антимикробной актив-

Таблица 3

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КЛЕТОК ТЕСТ-ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА НА АНТИМИКРОБНУЮ АКТИВНОСТЬ ОБРАЗЦА

Разведение препарата	<i>B.cereus</i> 1 · 10 ⁴ КОЕ/мл	<i>B.cereus</i> 1 · 10 ⁷ КОЕ/мл	<i>S.aureus</i> 1 · 10 ⁴ КОЕ/мл	<i>S.aureus</i> 1 · 10 ⁷ КОЕ/мл
1:300	-	-	±	+
1:600	+	+	+	+
1:1200	+	+	+	+

Условные обозначения: «-» – нет роста, «+» – рост, «±» – задержка роста.

Таблица 4

ВЛИЯНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ПРОПОЛИСА

Разведение препарата	МПА	TSA	Среда №1 ГРМ
1:300	+	+	+
1:600	+	+	+
1:1200	+	+	+

Условные обозначения: «+» – рост тест-штаммов микроорганизмов

ности препаратов прополиса применяют агаризованные среды общего назначения, свободные от ингибиторов и индикаторов, предназначенные для широкого спектра микробиологических задач. Питательные среды общего назначения используют для количественного определения микроорганизмов в лекарственных препаратах и фармацевтических субстанциях, а также для инокуляции и дальнейшей инкубации разнообразных видов тест-штаммов и микроорганизмов-контаминантов [5].

С целью определения зависимости антимикробной активности препарата от питательной среды были использованы: триптиказо-соевый агар (TSA), среда № 1 ГРМ, мясо-пептонный агар (МПА). В качестве тест-

ЛИТЕРАТУРА

1. Миронов АН, Сакаева ИВ, Саканян ЕИ, Корсун ЛВ, Мочикина ОА. Современные подходы к вопросу стандартизации лекарственного растительного сырья. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2013; (2): 52–56.
2. Применение прополиса в медицине. Реферат. Available from: http://knowledge.allbest.ru/medicine/3c0b65635b3bc69a4d43a89521206c27_0.html.
3. Бай А. Химический состав и свойства прополиса. Реферат. Available from: <http://medznate.ru/docs/index-23783.html>.
4. Кивалкина ВП. Прополис, его антимикробные и лечебные свойства: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Казань; 1964.
5. Гунар ОВ, Каграманова КА, Булгакова ГМ. Гармонизация отечественных и международных подходов при оценке фармакопейных микробиологических питательных сред. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2012; (2): 14–18.

ОБ АВТОРАХ:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8.
 Гунар Ольга Викторовна. Начальник лаборатории микробиологии, д-р фарм. наук. Сахно Надежда Геннадьевна. Ведущий эксперт лаборатории микробиологии, канд. фарм. наук.
 Григорьева Виктория Эдуардовна. Эксперт 2-й категории лаборатории микробиологии.
 Булгакова Галина Михайловна. Ведущий эксперт лаборатории микробиологии.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ:

Гунар Ольга Викторовна; Gunar@cpmed.ru

Статья поступила 03.03.2015 г.

микроорганизма применяли *B. cereus*. Испытание препарата проводили согласно схеме 1. Результаты эксперимента представлены в таблице 4.

Как видно, данные, полученные с использованием различных питательных сред, были аналогичны: препарат не обладал антимикробной активностью в разведениях 1:300, 1:600, 1:1200. Исходя из этого, был сделан вывод о том, что выбор питательной среды не оказывает влияния на результат испытания.

ВЫВОДЫ

1. Согласно данным проведенного анализа результатов фармацевтической экспертизы качества препаратов прополиса, по показателю «Антимикробная активность» большинство образцов (84%) соответствовали требованиям нормативной документации.

2. Препараты прополиса не проявляли антимикробной активности в отношении *E. coli* и *P. aeruginosa*, в то время как рост *B. cereus* и *S. aureus* в указанном разведении (1:300) отсутствовал. Полученные аналогичные данные для грамположительных бактерий *B. cereus* и *S. aureus* подтверждают целесообразность использования именно этих видов микроорганизмов при проведении экспертизы качества препаратов прополиса по показателю «Антимикробная активность».

3. В ходе экспериментального изучения влияния концентраций тест-штаммов на результат определения антимикробной активности было выявлено, что при использовании взвесей *S. aureus*, содержащих разное количество клеток, результаты определения различались между собой, в то время как изменение концентрации суспензий *B. cereus* не влияло на получаемый результат.

4. Данные, полученные в ходе испытания препаратов прополиса по показателю «Антимикробная активность» с использованием различных питательных сред, не различались между собой. Это дает основание утверждать, что выбор питательной среды не оказывает влияния на результат испытаний, т.е. для проведения анализа может быть использована любая универсальная среда для выращивания бактерий.

REFERENCES

1. Mironov AN, Sakaeva IV, Sakanyan EI, Korsun LV, Mochikina OA. Current approaches to standardization of herbal substances. Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya 2013; (2): 52–56 (in Russian).
2. The use of propolis in medicine. Abstract. Available from: http://knowledge.allbest.ru/medicine/3c0b65635b3bc69a4d43a89521206c27_0.html (in Russian).
3. Bay A. The chemical composition and properties of propolis. Abstract. Available from: <http://medznate.ru/docs/index-23783.html> (in Russian).
4. Kivalkina VP. Propolis and its antimicrobial and healing properties. Dr.Biol.Sci [thesis]. Kazan; 1964 (in Russian).
5. Gunar OV, Kagramanova KA, Bulgakova GM. Harmonisation of local and international approaches to the assessment of pharmacopoeial microbiological culture media. Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya 2012; (2): 14–18 (in Russian).

AUTHORS:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8 Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.
 Gunar OV. Head of Laboratory of microbiology. Doctor of Pharmaceutical Sciences.
 Sakhno NG. Leading expert of Laboratory of microbiology. Candidate of Pharmaceutical Sciences.
 Grigorieva VE. 2nd category expert of Laboratory of microbiology.
 Bulgakova GM. Leading expert of Laboratory of microbiology.

Принята к печати 16.04.2015 г.