

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ТВЕРДОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ ЖИДКОГО РАСТИТЕЛЬНОГО ЭКСТРАКТА

Т.В. Фатеева

зав. лабораторией микробиологических исследований,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: fateeva2151@mail.ru

П.Г. Мизина

д.фарм.н., профессор,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

А.С. Гуленков

аспирант, Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

Представлены результаты изучения антимикробной активности лекарственной формы «таблетки для рассасывания» на основе зарегистрированного в Российской Федерации жидкого комбинированного растительного экстракта из цветков ромашки, календулы и травы тысячелистника. Установлено, что таблетки предлагаемого состава обладают антимикробной активностью сопоставимо в отношении *S. aureus* с лекарственными препаратами «Эвкалипт-М», «Шалфей», «Эхинацея», «Аджисепт» и «Стрепсилс». Показано, что перевод жидкого экстракта в необходимое для разработки твердых лекарственных форм порошкообразное состояние путём адсорбции на носителях различной природы не изменяет его антимикробные свойства, при этом снижение минимальной подавляющей концентрации коррелирует со степенью высвобождения флавоноидов с поверхности носителей.

Ключевые слова: таблетки для рассасывания, жидкий растительный экстракт, антимикробная активность.

Для цитирования: Фатеева Т.В., Мизина П.Г., Гуленков А.С. Антимикробная активность твердой лекарственной формы на основе жидкого растительного экстракта. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019; 22(2): 24–28. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-02-04>

Воспалительные процессы ротовой полости смещают pH ротовой жидкости в кислую сторону [1, 2], что снижает эффективность медикаментозного воздействия и способствует развитию полирезистентных бактерий, борьбу с которыми ВОЗ считает важнейшей проблемой XXI века [3, 4]. Применение лекарственных растительных препаратов, которые, в отличие от синтетических субстанций, не вызывают резистентность бактерий, может способствовать решению данной проблемы. Особый интерес представляют лекарственные растительные препараты, содержащие флавоноиды [5].

В Российской Федерации зарегистрированы таблетки для рассасывания на основе лекарственного растительного сырья, применяемые в комплексной терапии воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей, глотки, полости рта: «Эвкалипт-М» (Нидерланды), «Шалфей» (Нидерланды), «Аджисепт» (Индия) и др. Актуальным является разработка современных отечественных препаратов для лечения респираторных заболеваний в лекарственной форме «таблетки для рассасывания» на основе зарегистрированных в РФ препаратов растительного происхождения

Жидкий комбинированный экстракт цветков ромашки, календулы и травы тысячелистника (ЖКРЭ), содержащий флавоноиды, входит в состав зарегистрированного в РФ препарата «Ротокан», обладающего противовоспалительной и антимикробной активностью [6–8].

Цель исследования – изучить противомикробную активность экспериментального состава таблеток для рассасывания на основе жидкого комбинированного растительного экстракта (ЖКРЭ) цветков ромашки, календулы и травы тысячелистника, стандартизованного по сумме флавоноидов, в отношении различных штаммов патогенных микроорганизмов для решения вопроса рациональности дальнейших исследований препарата данного состава.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследуемые образцы:

жидкий комбинированный растительный экстракт (ЖКРЭ) цветков ромашки, календулы и травы тысячелистника (препарат «Ротокан», Россия); вспомогательные вещества: микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) Pharmacel 112, кремния

диоксид коллоидный (КДК-300), Aeroperl 300 Pharm, кремния диоксид коллоидный (КДК-380), Aerosil-380.

Препараты сравнения:

Эхинацея, таблетки для рассасывания, регистрационный номер П N0 12081/01 от 11.03.2009, «Natur Produkt Europe B.V.» (Нидерланды), показания к применению: профилактика ОРВИ и ОРЗ, при начальных признаках гриппа и «простуды» (в комплексной терапии), в качестве вспомогательного средства при рецидивирующих инфекциях дыхательных путей;

Шалфей, таблетки для рассасывания, регистрационный номер П N011411/01 от 02.03.2009, «Natur Produkt Europe B.V.» (Нидерланды), показания к применению: в комплексной терапии воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей (ангина, ларингит, фарингит) и полости рта (стоматит, гингивит);

Эвкалипт-М, таблетки для рассасывания, регистрационный номер П N012101/01 от 02.03.2009, «Natur Produkt Europe B.V.» (Нидерланды), показания к применению: воспалительные заболевания верхних дыхательных путей и глотки (фарингит, ларингит, трахеит);

Аджисент, таблетки для рассасывания, регистрационный номер П N013229/01 от 31.08.2007, «Agiо Pharmaceuticals» (Индия), показания к применению: инфекционно-воспалительные заболевания полости рта и глотки;

Стрепсилс, таблетки для рассасывания, регистрационный номер П N015151/01 от 01.07.2008, «Reckitt Benckiser Healthcare International Ltd.» (Великобритания), показания к применению: инфекционно-воспалительные заболевания полости рта и глотки.

Культуры микроорганизмов:

Staphylococcus aureus 209-P, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus vulgaris* (ATCC 6896), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) (ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Россия);

Candida albicans (ATCC 10231) (ГосНИИгенетика, Россия); *Microsporum canis* (352) (Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии, Россия).

Питательные среды:

мясо-пептонный бульон, готовый к применению (МПБ);

жидкая среда Сабуро (ЖСС) (Филиал «МЕД-ГАМАЛ» НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Россия).

При изучении бактериостатической (питательная среда – МПБ) и фунгистатической (питательная среда – ЖСС) активности в опытах *in vitro* использовали метод двукратных серийных разведений. Опыты проводили в трех повторностях. Последняя пробирка с чистой средой (без добавления образца) служила контролем. Все пробирки (опытные и контрольные) засеивали культурами микроорганизмов. Бактериостатический и фунгистатический эффект определяли по минимальному, подавляющему рост бактерий и грибов разведению (концентрации), при котором визуально не наблюдали роста микроорганизмов.

Приготовление взвеси грамположительных и грамотрицательных бактерий. Взвеси грамположительных и грамотрицательных бактерий готовили в изотоническом растворе натрия хлорида по бактериальному стандарту мутности СОС 42-28-85-2018 (109 микробных тел/мл) (ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Россия) 10 ЕД. Из первой пробирки, содержащей 10^9 микробных тел/мл, путем десятикратных разведений в изотоническом растворе натрия хлорида готовили ряд убывающих концентраций микроорганизмов: 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 . Затем в каждую опытную пробирку, вносили по 0,2 мл взвеси, содержащей 10^4 микробных тел/мл (рабочая микробная нагрузка).

Посевы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Приготовление взвеси грибов. Взвесь грибов готовили в изотоническом растворе натрия хлорида по бактериальному стандарту мутности 10 ЕД. Полученную взвесь разводили изотоническим раствором натрия хлорида в 20 раз. В опытные и контрольные пробирки засеивали по 0,2 мл полученной взвеси. Посевы инкубировали при температуре 30–32 °С: дрожжеподобные грибы – в течение 48 ч, мицелиальные грибы – в течение 10–14 сут.

Изучение антимикробной активности жидких образцов. Готовили ряд опытных пробирок с 2 мл среды МПБ. В первую пробирку добавляли 2 мл изучаемого жидкого образца, получали исходное разведение 1:2. Затем последовательным разведением в питательной среде в 2 раза приготавливали ряд убывающих разведений.

Изучение антимикробной активности твердых образцов. При изучении твердых образцов (адсорбенты с ЖКРЭ/таблетки с ЖКРЭ), точную навеску (весы аналитические CAS CAUX 120 (CAS Corporation, Япония)) переносили в стериль-

ную пробирку и стерилизовали в течение 1 ч 96%-ным этиловым спиртом (смачивание поверхности). Затем в эту пробирку добавляли соответствующую питательную среду в количестве 4,0 мл, необходимом для создания исходной концентрации фармацевтических ингредиентов. В остальные пробирки добавляли по 2 мл питательной среды и далее путем двукратных разведений готовили ряды убывающих концентраций препарата (опытные пробирки). При установлении пределов антимикробной активности образцов выполняли уточняющую раститровку активности подбором навески (для адсорбентов с ЖКРЭ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование антимикробной активности проводили в соответствии с рекомендациями «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» под ред. проф. Р.У. Хабриева [9].

В ходе выполнения экспериментальных исследований сравнивали бактерио- и фунгистатиче-

скую активность исходного ЖКРЭ (плацебо – спирт 40%-ный), адсорбентов с ЖКРЭ (плацебо – адсорбенты без ЖКРЭ) и таблеток для рассасывания, содержащих ЖКРЭ (плацебо – таблетки без ЖКРЭ) с учетом содержания флавоноидов в микрограммах на миллилитр в исследуемых образцах (табл. 1–3).

Полученные результаты (табл. 1) свидетельствуют о большей чувствительности *S. aureus* 209-Р к флавоноидам ЖКРЭ, по сравнению со всеми исследованными микроорганизмами, что было использовано в дальнейших скрининговых исследованиях. При изучении плацебо установлено, что спирт этиловый 40%-ный обладает антимикробной активностью в отношении всех изученных штаммов патогенных микроорганизмов в разведениях 1:4/1:8, что значительно ниже активных разведений экстракта.

Таким образом, наличие спирта этилового в растительном экстракте не оказывало влияния на его антимикробную активность в разведении более 1:4/1:8.

Таблица 1. Антимикробная активность ЖКРЭ в опытах *in vitro*

Условия опыта		Тест-культура					
Разведение	Содержание флавоноидов, мкг/мл	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. canis</i>
1:2	650	–	–	–	–	–	–
1:4	325	–	–	–	–	–	–
1:8	162,5	–	–	–	МПК	МПК	–
1:16	81,3	–	МПК	МПК	+	+	–
1:32	40,6	–	+	+	+	+	–
1:64	20,3	–	+	+	+	+	МПК
1:128	10,2	–	+	+	+	+	+
1:160	8,1	МПК	+	+	+	+	+

Примечание: здесь и далее «+» – рост есть, «МПК» – минимальная подавляющая концентрация, «–» – бактериостатические или фунгистатическое действие.

Таблица 2. Антимикробная активность порошкообразных экспериментальных смесей в отношении *S. aureus* в опытах *in vitro*

Содержание флавоноидов, мкг/мл	Объект		
	МКЦ–ЖКРЭ	КДК 300–ЖКРЭ	КДК 380–ЖКРЭ
325	–	–	–
162,5	–	–	–
81,3	–	–	–
40,6	–	–	–
20,3	–	МПК	МПК
10,2	МПК	+	+
8,1	+	+	+

Таблица 3. Антимикробная активность экспериментальных таблеток для рассасывания с ЖКРЭ в опытах *in vitro*

Условия опыта		Тест-культура					
Разведение	Содержание флавоноидов, мкг/мл	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. canis</i>
1:2	168	–	–	–	МПК	МПК	–
1:4	84	–	МПК	МПК	+	+	–
1:8	42	–	+	+	+	+	–
1:16	21	–	+	+	+	+	МПК
1:32	10,5	МПК	+	+	+	+	+
1:64	5,2	+	+	+	+	+	+

Таблица 4. Антимикробная активность препаратов в отношении *S. aureus* в опытах *in vitro*

Разведение	Образец					
	ЭЛФ	Эвкалипт-М	Шалфей	Эхинацея	Аджисепт	Стрепсилс
1:4	–	–	–	–	–	–
1:8	–	–	МПК	–	–	–
1:16	–	МПК	+	–	МПК	–
1:32	МПК	+	+	МПК	+	МПК
1:64	+	+	+	+	+	+
1:128	+	+	+	+	+	+

Минимальная подавляющая концентрация фармацевтических ингредиентов ЖКРЭ в отношении *S. aureus* составляет 8,1 мкг/мл. Однако при внесении в экспериментальные пробирки адсорбентов с подобной концентрацией действующих веществ не наблюдали антимикробной активности. При проведении дополнительных раститровок установили, что проявление специфической активности коррелирует со степенью десорбции фармацевтических ингредиентов с поверхности адсорбентов. Наибольшая степень высвобождения действующих веществ установлена для МКЦ, с добавлением которой и были получены экспериментальные таблетки для рассасывания. В лекарственную форму закладывали 148 мг смеси адсорбента с ЖКРЭ, содержащей 336 мкг флавоноидов.

Был проведен сравнительный анализ антимикробной активности в отношении *S. aureus* для экспериментальной лекарственной формы (ЭЛФ) и коммерческих препаратов таблеток для рассасывания, имеющихся на российском фармацевтическом рынке (табл. 4).

Таким образом, разработанная экспериментальная лекарственная форма таблеток для рассасывания с ЖКРЭ цветов ромашки, календулы и

травы тысячелистника обладает более высокой антимикробной активностью в отношении *S. aureus*, чем у коммерческих препаратов «Эвкалипт-М», «Шалфей» и «Аджисепт», и сопоставимой с активностью таких препаратов, как «Эхинацея» и «Стрепсилс».

ВЫВОДЫ

1. Таблетки предлагаемого состава на основе жидкого комбинированного экстракта из цветков ромашки, календулы и травы тысячелистника обладают антимикробной активностью. Полученные результаты свидетельствуют о большей чувствительности *S. aureus* 209-Р к флавоноидам ЖКРЭ по сравнению со всеми исследованными микроорганизмами.
2. Проявление специфической активности исследуемых образцов коррелирует со степенью десорбции фармацевтических ингредиентов с поверхности адсорбентов. Наибольшая степень высвобождения действующих веществ установлена для МКЦ.
3. Таблетки для рассасывания предлагаемого состава обладают антимикробной активностью, сопоставимой в отношении *S. aureus* с

зарегистрированными лекарственными препаратами «Эквалипт-М», «Шалфей», «Эхинацея», «Аджисепт» и «Стрепсилс» в аналогичной лекарственной форме.

Авторы выражают благодарность ЗАО «ФПК ФармВИЛАР» – эксклюзивному дистрибьютеру продукции DFE Pharma и Evonik за предоставленные образцы вспомогательных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические рекомендации по диагностике и лечению гриппа [электронный ресурс]: Министерство здравоохранения Российской Федерации, Москва 2016. Режим доступа: https://petsru.ru/files/user/fdbd9903df09bb6f04f397450a13732b/Recom_Flu.pdf (дата обращения: 09.10.2018).
2. Politis C. et al. Wound healing problems in the mouth // *Frontiers in physiology*. 2016. Т. 7. С. 507.
3. The WHO policy package to combat antimicrobial resistance // *Bulletin of the World Health Organization*. 2011. № 89. P. 390–392.
4. World Health Organization et al. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. 2014.
5. Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. Flavonoids: an overview // *Journal of nutritional science*. 2016. Т. 5.
6. ФСП 42-0171-1463-01. Ротокан экстракт жидкий.
7. Государственный реестр лекарственных средств России [Электронный ресурс]. 2018. Режим доступа: <https://www.rlsnet.ru/> (дата обращения: 09.10.2018);
8. Патент № 1561262. Состав, обладающий противовоспалительной, антимикробной активностью «Ротокан» / С.Я. Соколов, А.И. Багинская, Г.С. Сакович, Л.Ф. Белова, Т.Е. Лескова, В.К. Колхир, Т.И. Городнюк, К.С. Рыбалко, О.А. Коновалова, Р.Г. Мартынова. 1994.
9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. проф. Р.У. Хабриева. М.: Медицина. 2005.

Поступила 29 декабря 2018 г.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOLID EXPERIMENTAL DRUG FORM BASED ON A LIQUID PLANT EXTRACT

© Authors, 2019

T.V. Fateeva

Chief of the Laboratory of Microbiological Research,
All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)
E-mail: fateeva2151@mail.ru

P.G. Mizina

Dr.Sc. (Pharm.), Professor, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

A.S. Gulenkov

Post-graduate Student, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

The data on the study of the antimicrobial activity of an experimental dosage form with a liquid combined plant extract from chamomile flowers, calendula and yarrow herb for resorption in the mouth are presented. It was shown that the natural liquid extract has a higher antibacterial activity against gram-positive bacteria (*S. aureus* 209-P) than against gram-negative microorganisms and moderate fungistatic activity against mycelial fungi (*M. canis*). It has been proven that the transfer of a liquid extract into a powdery state, which is necessary for the development of solid dosage forms, by adsorption on carriers of different nature, does not change its antimicrobial properties. At the same time, a decrease in the minimum inhibitory concentration correlates with the degree of release of flavonoids from the carrier surface. The developed experimental dosage form of lozenges has a higher antimicrobial activity against *S. aureus* in comparison with the commercial preparations of lozenges «Equivalent-M» and «Sage», and comparable results in comparison with the tablets «Echinacea», «Ajisept» and «Strepsils».

Key words: solid dosage form, tablet for resorption in the mouth, antimicrobial activity, bacteriostatic activity, fungistatic activity, liquid plant extract.

For citation: Fateeva T.V., Mizina P.G., Gulenkov A.S. Antimicrobial activity of solid experimental drug form based on a liquid plant extract. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2019;22(2):24–28. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-02-04>

REFERENCES

1. Metodicheskie rekomendacii po diagnostike i lecheniyu grippa [ehlektronnyj resurs]: Ministerstvo zdavoohraneniya rossijskoj federacii, Moskva 2016. Rezhim dostupa: https://petsru.ru/files/user/fdbd9903df09bb6f04f397450a13732b/Recom_Flu.pdf (дата обращения: 09.10.2018)
2. Politis C. et al. Wound healing problems in the mouth // *Frontiers in physiology*. 2016. Т. 7. С. 507.
3. The WHO policy package to combat antimicrobial resistance // *Bulletin of the World Health Organization*. 2011. № 89. P. 390–392.
4. World Health Organization et al. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. 2014.
5. Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. Flavonoids: an overview // *Journal of nutritional science*. 2016. Т. 5.
6. ФСП 42-0171-1463-01. Ротокан экстракт жидкий.
7. Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv Rossii [EHlektronnyj resurs]. 2018. Rezhim dostupa: <https://www.rlsnet.ru/> (data obrashcheniya: 09.10.2018);
8. Patent № 1561262. Sostav, obladayushchij protivovospalitel'noj, antimikrobnnoj aktivnost'yu «Rotokan» / S.Ya. Sokolov, A.I. Baginskaya, G.S. Sakovich, L.F. Belova, T.E. Leskova, V.K. Kolhir, T.I. Gorodnyuk, K.S. Rybalko, O.A. Konvalova, R.G. Martynova. 1994.
9. Rukovodstvo po ehksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novyh farmakologicheskikh veshchestv / Pod red. prof. R.U. Habrieva. M.: Medicina. 2005.