

# ВОЗМОЖНОСТЬ УМЕНЬШЕНИЯ ОБЪЕМА ОБРАЗЦА ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ГОМЕОПАТИЧЕСКИХ МАТРИЧНЫХ НАСТОЕК

О.В. Гунар, докт. фарм. наук, И.А. Буйлова

Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России;  
123182, Москва, ул. Щукинская, д.6, к. 1

Е-mail: gunar@expmed.ru

Разработана и апробирована схема испытания микробиологической чистоты гомеопатических матричных настоек, позволяющая получить воспроизводимый, статистически достоверный результат при использовании 3 мл образца и триптиказо-соевого бульона в качестве разбавителя и среды накопления возможных микроорганизмов-контаминантов.

**Ключевые слова:** гомеопатические матричные настойки, контроль качества, микробиологическая чистота.

Микробиологические показатели качества любого лекарственного средства (ЛС), в том числе и гомеопатического, служат важным критерием его безопасности. Однако лишь некоторые из мировых гомеопатических фармакопей, содержащие требования к качеству гомеопатических препаратов, включают такие микробиологические показатели, как «Стерильность» или «Микробиологическая чистота» [1]. Хотя сырье для гомеопатических препаратов растительного или животного происхождения может быть основным фактором риска получения контаминированной микроорганизмами фармацевтической продукции [2].

В Европейских странах, следуя директиве 2001/83/ЕС [6], к гомеопатическим относятся препараты, приготовленные из гомеопатического сырья или матричных настоек, которые, как и аллопатические лекарственные средства (ЛС), требуют надлежащего качества и безопасности по всем показателям [7].

Матричные настойки, являющиеся субстанциями для производства гомеопатических лекарственных препаратов, получают из природного сырья и этилового спирта различной концентрации (86, 62, 43% и др.) [3–5]. Большинство матричных гомеопатических настоек производится из сока свежего растительного сырья. Согласно предписаниям гомеопатических фармакопей, сырье должно быть переработано сразу же, или, если это невозможно, растительный матери-

ал подвергают хранению в глубоко замороженном состоянии или консервируют спиртом этиловым [4].

В настоящее время для определения микробиологической чистоты матричных гомеопатических настоек в нашей стране пользуются методами, включенными в Государственную фармакопею XII издания (ГФ РФ XII) [8], относя их к категории 3.2 (субстанции животного и растительного происхождения). Нормативные требования (табл. 1) предполагают использование для анализа данной группы ЛС 30 г (мл) образца. Однако матричные настойки представляют собой концентрат большого количества переработанного растительного или животного сырья, и часто выпускаемый объем такой субстанции за год не превышает 100 мл. Очевидно, что одновременное использование для анализа 30 мл не представляется возможным.

Цель настоящего исследования – доказательство возможности уменьшения объема образца гомеопатических матричных настоек для оценки их микробиологической чистоты.

## Экспериментальная часть

Объектами исследования служили водные и спиртовые гомеопатические матричные настойки 25 наименований, приготовленные из свежего и высушенного сырья. В исследовании использовали тест-штаммы микроорганизмов: *Candida albicans* ATCC 10231; *Escherichia coli* ATCC 8739; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404; *Salmonella abony* IHE 103/39 и питательные среды: триптиказо-соевая (TSA); Сабура (SDCA); триптиказо-соевый бульон (TSB); агар Брейда–Паркера; цетримидный агар; агар Эндо–ГРМ для выявления энтеробактерий, висмут-сульфитный агар (среда №5), ксилоза-лизин-дезоксихолат агар (XLD agar).

При анализе в соответствии с разработанным алгоритмом использовали чашечный метод глубинного

посева, пробирочный метод наиболее вероятных чисел (НВЧ) и фармакопейные способы выделения специфических микроорганизмов. В качестве растворителя вместо указанного в фармакопее буферного раствора использовали триптиказо-соевый бульон с целью оптимизации затрат количества образца для анализа.

Была проанализирована нормативная документация (НД) на различные гомеопатические препараты, гомеопатические фармакопеи, руководства, регламентирующие качество этого вида продукции. Гомеопатические фармакопеи таких стран, как Индия, Германия, Великобритания и других, не регламентируют методы и требования, предъявляемые к гомеопати-

ческим ЛС по показателю «Микробиологическая чистота». В некоторых имеются ссылки на нормативные требования фармакопей, которые предполагают значительное количество образца для микробиологического анализа (30–45 г). Приводим допустимые пределы содержания микроорганизмов в лекарственном растительном сырье (ЛРС), которое может быть использовано для производства гомеопатических препаратов (см. табл. 1) [8–10].

При изучении вопроса об уменьшении объема образца для испытания были рассмотрены действующие издания фармакопей. Европейская, Британская, Международная и другие фармакопеи предусматри-

вают уменьшение количества пробы для микробиологического анализа, если объем серии ограничен. В ГФ РФ XII (ч. 1) нет описания подобных случаев [10–12]. Это подтверждает актуальность исследования, а также его экономическую целесообразность.

Была изучена возможность уменьшения объема анализируемого образца на примере 25 гомеопатических матричных настоек, 12 из которых анализировали в количестве 30, 3, и 1 мл. Остальные наименования из-за ограниченности проб исследовали на образцах объемом 3 мл. На подготовительном этапе для всех настоек определяли антимикробное действие [13] и исходную микробиологическую чистоту образцов (ГФ XII) [8]. Анализ показал, что из 25 исследованных образцов 23 не содержали микроорганизмов при стандартном первоначальном разведении пробы 1:10, лишь 2 образца – настойка травы звездчатки и татарника – были контаминированы аэробными микроорганизмами в количестве 265 и 100 КОЕ/г соответственно. Среди выделенных бактерий были обнаружены *Bacillus cereus* и *Rizobium radiobacter*.

Далее настойки искусственно инокулировали тест-микроорганизмами в количестве 50 КОЕ/мл каждого. В основу разработанной методики анализа уменьшенного количества образца гомеопатических матричных настоек было положе-

Таблица 1

**ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К ГОМЕОПАТИЧЕСКИМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ ПО ПОКАЗАТЕЛЮ «МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧИСТОТА»**

| Показатели  | Содержание микроорганизмов в ЛРС |   |                                 |
|---|----------------------------------|---|---------------------------------|
|   | ГФ РФ XII                        | Руководство по гомеопатическим лекарственным средствам Канады | Европейская фармакопея, 8 изд.  |
| Общее число аэробных бактерий, КОЕ/г(мл)            | <1 · 10 <sup>4</sup>             | < 1 · 10 <sup>5</sup>   | <5 · 10 <sup>5</sup> в 1 г (мл) |
| Общее число дрожжевых и плесневых грибов, КОЕ/г(мл) | <1 · 10 <sup>2</sup>             | < 1 · 10 <sup>4</sup>   | <5 · 10 <sup>4</sup> в 1 г (мл) |
| Наличие бактерий сем. <i>Enterobacteriaceae</i>     | <1 · 10 <sup>2</sup>             | –   | <10 <sup>4</sup> в 1 г (мл)     |
| Наличие <i>Escherichia coli</i>                     | Отсутствие в 1 г                 | Отсутствие  | Отсутствие в 1 г (мл)           |
| Наличие <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>     |                                  |   | –                               |
| Наличие <i>Salmonella</i> spp.                      | Отсутствие в 10 г                | Отсутствие  | Отсутствие в 25 г (мл)          |

Таблица 2

**КОЭФФИЦИЕНТ ФИШЕРА, РАССЧИТАННЫЙ ДЛЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПО ВОССТАНОВЛЕНИЮ ТЕСТ-ШТАММОВ ИЗ ИНОКУЛИРОВАННЫХ СУБСТАНЦИЙ**

| Субстанция                 | Коэффициент Фишера (F) при F <sub>таб</sub> = 19 (f=2; p=0.95)      |             |              |
|----------------------------|---|-------------|--------------|
|                            | среда TSA   | среда SDCA  |              |
|                            | тест-штаммы   |             |              |
|                            | <i>S.a.</i> , <i>B.s.</i> , <i>E.c.</i> , <i>S.a.</i> , <i>P.a.</i> | <i>A.b.</i> | <i>C. a.</i> |
| Артикаина гидрохлорид      | 3,6   | 18,1        | 3,6          |
| Бетаксолон                 | 1,6   | 1,4         | 4,6          |
| Гидроксиэтилкрахмал        | 5,4   | 11,8        | 1,0          |
| Надропин                   | 8,3   | 5,4         | 1,0          |
| Оксиметазолина гидрохлорид | 3,3   | 2,5         | 3,5          |
| Таурин                     | 1,5   | 3,0         | 3,0          |
| Хондроитина сульфат        | 15,6  | 1,6         | 1,4          |

*Примечание.* *S.a.* – *Candida albicans*; *B.s.* – *Bacillus subtilis*; *E.c.* – *Escherichia coli*; *S.n.* – *Salmonella abony*; *P.a.* – *Pseudomonas aeruginosa*; *A.b.* – *Aspergillus brasiliensis*.

но использование вместо стандартного разбавителя триптиказо-соевого бульона (TSB), который одновременно служил и разбавителем, и накопительной средой для микроорганизмов. Применение данной методики было апробировано в более ранних исследованиях при работе над уменьшением объема образца для фармацевтических субстанций. В табл. 2 представлены числовые значения коэффициента Фишера, рассчитанные на основании количественного выделения микроорганизмов из субстанций, растворенных в бульоне TSB и стандартном растворителе согласно Фармакопее. Результаты свидетельствуют об отсутствии статистических различий между двумя группами, следовательно, можно использовать накопительный бульон TSB в качестве растворителя.

Представленная ниже схема (см. рисунок) демонстрирует инокуляцию и выделение микроорганизмов из 3 мл пробы: 1 мл – для количественного определения аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов, для выявления *S. aureus* и *P. aeruginosa*, 1 мл – для определения содержания бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, 1 мл – для испытания бактерий рода *Salmonella*. Для сравнения использовали 30 мл каждой матричной настойки, качественное и количественное выделение микроорганизмов в данном случае производили в соответствии с требованиями ГФ РФ XII [8].

Качественное выделение микроорганизмов (табл. 3) показало,

что при использовании для анализа 1 мл специфические микроорганизмы были выделены лишь в 50% случаях. Процент восстановления бактерий и грибов в образцах матричных настоек уменьшенного объема (3 и 1 мл) по отношению к контрольной группе (30 мл) находился в диапазоне от 51 до 106%. Для образцов объемом 1 мл в 30% случаях это значение было менее 70%. Процент восстановления микроорганизмов из настоек, взятых в количестве 3 мл, превышал 70% (табл. 4). Это означает, что микроорга-

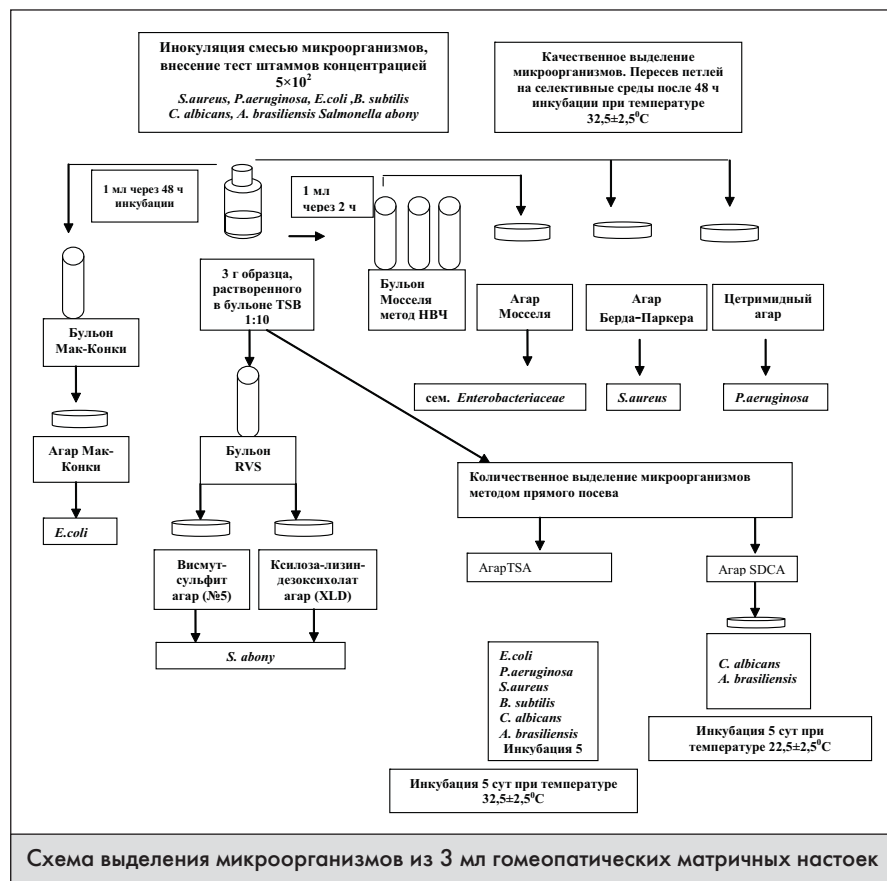


Схема выделения микроорганизмов из 3 мл гомеопатических матричных настоек

Таблица 3

**КАЧЕСТВЕННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ МАТРИЧНЫХ НАСТОЕК, ВЗЯТЫХ В КОЛИЧЕСТВЕ 1 мл**

| Растения, использованные для получения матричной настойки | Питательная среда/выделяемые тест-штаммы |   |                                   |  |   |
|---|--|---|-----------------------------------|--|---|
|   | Берда–Паркера агар/<br><i>S. aureus</i>  | Цетримидный агар/<br><i>P. aeruginosa</i> | Мак-Конки агар/<br><i>E. coli</i> | Висмут-сульфитный агар/<br><i>S. abony</i> | Ксилоза, лизиндезоксидат агар/<br><i>S. abony</i> |
| Топинамбур  | –  | +   | +                                 | +  | +   |
| Свежие листья смородины черной                            | +  | +   | –                                 | +  | +   |
| Смородина черная  | +  | +   | +                                 | –  | –   |
| Польнь лекарственная                                      | –  | +   | +                                 | –  | –   |
| Барбарис обыкновенный                                     | –  | –   | –                                 | –  | –   |
| Барбарис амурский   | –  | +   | –                                 | +  | –   |
| Туя западная  | +  | –   | –                                 | +  | –   |

Примечание. + – наличие роста; – – отсутствие роста микроорганизмов.

мы, контаминирующие образец, восстанавливаются из 3 мл аналогично контрольному (30 мл). Поэтому в дальнейшей работе предпочтение было отдано образцу 3 мл.

Следует отметить, что матричные настойки травы звездчатки и татарника, которые были контаминированы естественной микрофлорой, инокулировали искусственно лишь тест-штаммами специфических микроорганизмов. Эти штаммы были выделены из

уменьшенного объема образца (3 мл) даже при наличии естественной микрофлоры, которая не ингибировала рост отдельных тест-штаммов, в частности *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella abony*. Коэффициент Фишера, рассчитанный на основе полученных результатов, приведен в табл. 5. Сравнение данных с табличными значениями коэффициента Фишера свидетельствует о том, что рассматриваемая методика воспроизводи-

ма и статистически значимых различий между результатами, полученными для 3 групп, нет.

Далее по разработанной схеме для образца 3 мл были исследованы остальные 13 наименований гомеопатических матричных настоек: фиалки трехцветной, барбариса обыкновенного, сереной ползучей, ромашки аптечной, табака, посконника пронзеннолистного, дурмана обыкновенного, подофиллума щитовидного, плауна булавовидного, пчелиного яда, рыжих муравьев, анамиты коккулюсовидной, чилибухи (рвотного ореха). Коэффициент восстановления микроорганизмов из изученных гомеопатических матричных настоек находился в диапазоне от 70 до 104% – для аэробных бактерий и от 71 до 150% – для дрожжевых и плесневых грибов.

Таким образом, считаем возможным выполнять анализ микробиологической чистоты настоек матричных гомеопатических с использованием 3 мл: 1 мл – для определения количественного содержания аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов, отсутствия *S. aureus* и *P. aeruginosa*; 1 мл – для количественного содержания бактерий семейства *Enterobacteriaceae*; 1 мл – для подтверждения отсутствия бактерий рода *Salmonella*.

100% исследованных гомеопатических матричных настоек удовлетворяли требованиям НД и лишь в 8% случаев были обнаружены микроорганизмы в допустимых количествах.

Использование триптиказосоевого бульона в качестве растворителя-накопителя для

Таблица 4

**ПРОЦЕНТ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В МАТРИЧНЫХ НАСТОЙКАХ**

| Растения, использованные для получения матричной настойки | Процент восстановления бактерий и грибов |          |                         |          |
|---|--|----------|-------------------------|----------|
|   | из образца объемом 3 мл                  |          | из образца объемом 1 мл |          |
|   | грибы                                    | бактерии | грибы                   | бактерии |
| Топинамбур  | 70                                       | 82       | 56                      | 78       |
| Свежие листья смородины черной                            | 87                                       | 87       | 72                      | 98       |
| Смородина черная  | 87                                       | 70       | 74                      | 84       |
| Белена черная   | 70                                       | 79       | 51                      | 68       |
| Каланхое  | 73                                       | 99       | 64                      | 92       |
| Полынь лекарственная                                      | 71                                       | 77       | 78                      | 76       |
| Лук репчатый  | 85                                       | 82       | 82                      | 77       |
| Барбарис обыкновенный                                     | 97                                       | 106      | 98                      | 95       |
| Барбарис амурский   | 84                                       | 103      | 96                      | 98       |
| Туя западная  | 83                                       | 100      | 91                      | 87       |

Таблица 5

**КОЭФФИЦИЕНТ ФИШЕРА, РАССЧИТАННЫЙ ДЛЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ТЕСТ-ШТАММОВ В ИНОКУЛИРОВАННЫХ МАТРИЧНЫХ НАСТОЙКАХ ОБЪЕМОМ 30 мл и 3 мл**

| Растение, использованное для получения матричной настойки | Коэффициент Фишера (F) при $F_{таб} = 161,4$ ( $f=1$ ; $p=0,95$ )  |                 |                |
|---|--|-----------------|----------------|
|   | среда TSA  | среда SDCA      |                |
|   | тест-штаммы  |                 |                |
|   | <i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. abony</i> | <i>A. bras.</i> | <i>C. alb.</i> |
| Барбарис обыкновенный                                     | 4,4  | 5,5             | 1,0            |
| Барбарис амурский   | 2,2  | 1,0             | 1,0            |
| Белена черная   | 25,0   | 1,2             | 2,2            |
| Каланхое  | 0,0  | 6,7             | 40,0           |
| Лук репчатый  | 10,3   | 9,0             | 3,1            |
| Полынь лекарственная                                      | 2,2  | 1,0             | 3,8            |
| Листья смородины черной, свежие                           | 2,2  | 2,8             | 1,1            |
| Смородина черная  | 4,6  | 1,9             | 3,3            |
| Топинамбур  | 5,0  | 4,0             | 1,0            |
| Туя западная  | 4,8  | 3,7             | 1,0            |

выявления бактерий семейства *Enterobacteriaceae* за счет исключения этапа накопления в лактозном бульоне, а также использование 1 мл для обнаружения бактерий рода *Salmonella* позволит снизить затраты на образец для анализа.

### Выводы

1. Анализ нормативной документации, регламентирующей требования к качеству и количеству гомеопатических матричных настоек для определения микробиологической чистоты, показал, что в большинстве гомеопатических фармакопей недостаточно внимания уделяется микробиологическим нормам и методам. Требуемое количество образца составляет 30–45 г.

2. При помощи искусственной инокуляции разного количества образца гомеопатических настоек была смоделирована контаминация, а затем выполнено качественное и количественное выделение микроорганизмов, показывающее оптимальное количество образца для микробиологического анализа.

3. Доказана возможность выделения микроорганизмов из уменьшенного до 3 мл количества образца гомеопатических матричных настоек и разработана методика по уменьшению количества образца для испытания микробиологической чистоты, апробированная на 25 образцах матричных настоек, дающая воспроизводимые результаты.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Киселева Т.А., Карпеев А.А. Гомеопатическая фармация: введение и руководство. М.:ФНКЭЦ ТМДА Росздрава, 2005; 438.
2. Сокольская Т.А., Даргаева Т.Д., Копытко Я.Ф., Лякина М.Н. Гомеопатическая фармация: проблемы и пути ее решения. Фармация, 2002; 1: 40–42.
3. Лякина М.Н. Субстанции растительного происхождения в гомеопатической фармации: методология построения стандарта качества. Хим.-фарм. журн., 2004; 38 (1): 28–30.
4. Терешина Н.С., Цуканов Ю.В., Самынина И.А. Животное сырье для гомеопатии: источники и проблемы получения. Фармация, 2015; 5: 54–56.
5. Ганеман С. Органон врачебного искусства. (перевод А. Высочанского) М.: Симилия, 1998; 137.
6. Council E.U. Directive 2001/83/EC of the European parliament and of the council of 6 November 2001 on the community code relating to medicinal products for human use. Official Journal L., 2001; 311 (28): 11.
7. Csutor D., Boros K., Hohmann J. Low potency homeopathic remedies and allopathic herbal medicines: is there an overlap. PLoS one., 2013; 8 (9).
8. Государственная фармакопея РФ, XII изд. Ч. 1. 2008; 160–194
9. Evidence for Homeopathic Medicines Guidance Document (Электронный ресурс)//Health Canada URL: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodnatur/legislation/docs/> (дата обращения 09.04.2015)
10. European Pharmacopoeia 8th edition (Электронный ресурс)//European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM). URL:<http://online.edqm.eu/entry.htm> (дата обращения 18.04.2015)
11. The United State Pharmacopoeia. National Formulary (USP 36 – NF 31) – The United State Pharmacopoeial Convention, 2013.
12. The International Pharmacopoeia 4-th Edition. URL: <http://apps.who.int/phint/en/d/Jb/7.3.3.1.html> (дата обращения 29.03.2015)
13. Гунар О.В., Сахно Н.Г., Каграманова К.А., Булгакова Г.М. Испытание микробиологического качества лекарственных средств по Российской и Европейской фармакопеям: сравнение методик. Фармация, 2011; 2: 47–49.

Поступила 17 сентября 2015 г.

## A POSSIBILITY TO REDUCE A SAMPLE FOR MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF HOMEOPATHIC MATRIX TINCTURES

O.V. Gunar, PhD; I.A. Builova

Research Center for Examination of Medical Products, Ministry of Health of Russia; 6, Shchukinskaya St., Build. 1, Moscow 123182

### SUMMARY

Whether the number of samples of homeopathic matrix tinctures for microbiological analysis might be reduced during their examination and quality control and a testing scheme was developed and tried out using 25 samples of homeopathic matrix tinctures as an example. Investigations were conducted using the test microorganisms recommended by the State Pharmacopoeia of Russia. To optimize the number of samples for the analysis during qualitative and quantitative isolation of microorganisms, trypticase-soy broth was used as a solvent (a diluent) and for microbial accumulation. It was shown that the microbiological purity of homeopathic matrix tinctures might be analyzed with 3 ml of a sample.

**Key words:** homeopathic matrix tinctures, quality control, microbiological purity.

### REFERENCES

1. Kiseleva T.T., Karpeev A.A. Homeopathic Pharmacy: an introduction and tutorial. Moscow: FNKETS TMDL; 2005: 438 (in Russian).
2. Sokolskaya T.A., Dargaeva T.D., Kopytko Yu.F., Lyakina M.N. Homeopathic Pharmacy: problems and ways of its solution, Farmatsiya, 2002; 1: 40–42 (in Russian).
3. Lyakina M.N. Substances of vegetable origin in the homeopathic pharmacy: methodology of construction quality standard/ Pharmaceutical Chemistry Journal, 2004; 1: 28–30 (in Russian).
4. Tereshina N.S., Tsukanov Yu.V., Samynina I.A. Animal raw materials for homeopathy: sources and the problems of its preparation. Farmatsiya, 2015; 5: 54–56 (in Russian).
5. Hahnemann S. Organon of the Medical Art. Moscow: Similia, 1998; 137 (in Russian).
6. Council E.U. Directive 2001/83/EC of the European parliament and of the council of 6 November 2001 on the community code relating to medicinal products for human use. Official Journal L., 2001; 31 (28): 11.
7. Csutor D., Boros K., Hohmann J. Low potency homeopathic remedies and allopathic herbal medicines: is there an overlap. PLoS one, 2013; 9: 1–5.
8. The State Russian Federation pharmacopoeia, 12th ed. Part 1. Moscow: Medicine, 2007; 704 (in Russian).
9. Evidence for Homeopathic Medicines Guidance Document. Health Canada URL: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodnatur/legislation/docs/>
10. European Pharmacopoeia 8th edition. European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM). URL:<http://online.edqm.eu/entry.htm>
11. The United State Pharmacopoeia. National Formulary (USP 36 – NF 31) – The United State Pharmacopoeial Convention, 2013.
12. The International Pharmacopoeia 4-th Edition. URL: <http://apps.who.int/phint/en/d/Jb/7.3.3.1.html>
13. Gunar O.V., Sakhno N.G., Kagramanova K.A., Bulgakova G.M. Testing the microbiological quality of medicines on the Russian and European Pharmacopoeia: a comparison of methods, Farmatsiya, 2002; 2: 47–49 (in Russian).