

ВИБІР АНТИМІКРОБНИХ РЕЧОВИН У СКЛАДІ СИРОПУ З ЕКСТРАКТОМ БУЗИНИ ЧОРНОЇ

Наталя Хохленкова, Ольга Калюжная,
Наталія Двінських

Національний фармацевтичний університет
України

Вступ. У сучасній фармації спостерігається зростання інтересу до лікарських засобів рослинного походження, що обумовлено їхньою високою біологічною активністю та у більшості випадків м'якою дією на організм, низькою токсичністю і мінімальним ризиком розвитку побічних ефектів.

Особливо актуальним є застосування сиропів на основі рослинних екстрактів, оскільки вони поєднують високу терапевтичну ефективність із зручністю застосування та гарними органолептичними характеристиками, що сприяє кращій прихильності пацієнтів до лікування. Ключовою перевагою сиропів є їхній високий рівень біологічної доступності, що забезпечує швидке та ефективне надходження активних компонентів до організму [1-3].

При розробці складу оральної лікарської форми, а саме сиропу, одним з головних завдань є зведення до мінімуму властивих лікарській формі недоліків – нестійкості при зберіганні і використанні після відкриття упаковки. Допоміжні речовини сиропів є сприятливим середовищем для розмноження мікроорганізмів, що призводить до підвищення мікробної контамінації в процесі його використання. Тому при розробці сиропів, як і інших лікарських форм для орального застосування, необхідно враховувати комплексний підхід до вибору допоміжних речовин, зокрема антимікробних консервантів [1-4].

Серед перспективних лікарських рослин особливу увагу привертає бузина чорна (*Sambucus nigra* L.), яка має виражені адаптогенні, протизапальні та імуностимулювальні властивості. Однак, при розробці сиропів на основі рослинної сировини виникає низка викликів, пов'язаних із забезпеченням їх мікробіологічної стабільності. Завдяки високому вмісту води та органічних компонентів, сиропи є сприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів, що може значно знижувати якість та термін придатності лікарського засобу [5-7].

На кафедрі біотехнології НФаУ, м. Харків розробляється сироп з густим екстрактом бузини чорної. Антоціани та фенольні кислоти, які є основними біологічно активними речовинами густого екстракту, мають протизапальний, імунomodуючий та антиоксидантний потенціал, що робить перспективним створення такого сиропу для профілактики та лікування захворювань, які супроводжуються запальним та оксидативним процесами [5].

З метою попередження виникнення неприємного смаку, запаху, утворення плісняви та

токсинів мікробного походження, доцільним було провести дослідження з вибору консерванту для сиропу, що розробляється. Основною проблемою є визначення оптимальної його концентрації – недостатня кількість не забезпечить необхідний термін зберігання, а надлишок може погіршувати якість продукту, а також бути недоцільним з економічної точки зору [2-4, 8].

Метою нашої роботи було проведення мікробіологічних досліджень на етапі фармацевтичної розробки сиропу з екстрактом бузини чорної з адаптогенною, протизапальною та імуностимулювальною дією.

Матеріали та методи. Як об'єкти дослідження використовували зразки сиропу на основі густого екстракту бузини, приготувані з додаванням допоміжних речовин – стабілізаторів та коригентів смаку, таких як гліцерин, екстракт стевії та кислота аскорбінова. Для підтримки мікробіологічної стабільності до складу зразків додавали антимікробні консерванти: метилпарагідроксибензоат, пропілпарагідроксибензоат, калію сорбат, натрію бензоат та їх комбінації. Для контролю використовували зразки сиропу без додавання консервантів.

Випробування ефективності антимікробних консервантів проводили за методикою відповідно до ДФУ 2.7, Т. 1 (5.1.3) [9]. Дослідження виконували в асептичних умовах ламінарного боксу (кабінет біологічної безпеки AC2-4E1 «Esco», Індонезія).

Як живильні середовища використовували соєво-казеїновий та Сабуро-декстрозний агар, як розчинник – буферний розчин з натрію хлоридом та пептоном рН 7,0, що містить 50 г/л полісорбату 80, 5 г/л лецитину та 1 г/л гістидину гідрохлориду.

Як тест-культури мікроорганізмів використовували *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, приготування інкуляту здійснювали згідно з ДФУ 2.7, Т. 1 (5.1.3) [9].

Згідно з вимогами ДФУ проводили перевірку ростових властивостей живильних середовищ (соєво-казеїнового живильного середовища – для вирощування бактерій та Сабуро-декстрозного середовища без додавання антибіотика – для вирощування грибів) та перевірку придатності методики визначення загального числа життєздатних клітин. Контролем під час визначення ростових властивостей середовища служить стандартне середовище з гарантованими ростовими властивостями, на якому правильно виявляється кількісне та якісне зростання мікроорганізмів (морфологія колоній). Результати перевірки ростових властивостей живильних середовищ наведено у табл. 1.

Для проведення випробування ефективності обраних антимікробних консервантів зразки інкулювали свіжовиготовленою суспензією з одним з тест-мікроорганізмів з мікробним навантаженням від 10^5 КУО до 10^6 КУО у 1 мл зразку, ретельно перемішували для їх рівномірного розподілу у об'ємі

зразку та зберігали за температури від 20 °C до 25 °C у захищеному від світла місті. Безпосередньо після інокуляції та через 14 та 28 діб із кожного зразка відбирали 1 мл проби і визначали кількість життєздатних мікроорганізмів методом прямого висівання на чашки.

Критерієм оцінки ефективності консерванту є зниження кількості життєздатних клітин тест-мікроорганізмів у препараті за певний період часу після його контамінації. За вимогами ДФУ для оральних лікарських засобів логарифм зниження кількості життєздатних клітин бактерій через 14 діб має становити не менше трьох, через 28 діб - не

повинен збільшуватися; логарифм зниження кількості життєздатних клітин грибів через 14 діб має становити не менше одного, через 28 діб - не повинен збільшуватися [9].

Результати. Перед початком досліджень проводили перевірку ростових властивостей живильних середовищ. Дані табл. 1 демонструють, що живильні середовища відповідали за ростовими властивостями вимогам ДФУ 2.6 (2.6.12) [9А], а тест-мікроорганізми відповідали таксономічній характеристиці – морфологія колоній на середовищах та морфологія клітин під час мікроскопування були типовими для відповідного штаму.

Таблиця 1. Рости властивості живильних середовищ

Тест-мікроорганізми	Живильні середовища	Умови культивування		Висновки
		температура, °C	тривалість, год	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Соево-казеїновий агар	30-35	18-24	Морфологія колоній та клітин типова
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Соево-казеїновий агар	30-35	18-24	Морфологія колоній та клітин типова
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Сабуросо-декстрозний агар	20-25	48-72	Морфологія колоній та клітин типова
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Сабуросо-декстрозний агар	20-25	120-168	Морфологія колоній та клітин типова
-	Негативний контрольний дослід	35	24-72	Зростання мікроорганізмів відсутнє

Перевірка придатності методики визначення загального числа життєздатних клітин полягала у порівнянні результатів підрахунку числа тест-мікроорганізмів у випробуваному препараті і на контрольних висівах.

Для цього в пробірки з розведенням препарату, підготовленими для кожного тест-мікроорганізму окремо, вносили суспензію тест-штаму одного з видів мікроорганізмів, яка містить близько 100 колонієутворювальних одиниць (КУО).

Таблиця 2. Результати перевірки придатності методики

Зразок	Середнє число КУО в 1 мл зразка			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Суспензія мікроорганізмів + сироп	91	79	70	70
Контрольний висів	88	81	68	67

Результати, наведені у табл. 2, одержані під час підрахунку кожного з тест-мікроорганізмів у присутності та за відсутності випробуваного зразка, відрізняються не більше ніж 2 рази, що відповідає критерію прийнятності. Тобто метод поверхневого висівання на чашки з використанням стандартного розчинника придатний для визначення кількості мікроорганізмів у препараті і може використовуватися для проведення випробування ефективності антимікробних консервантів.

Критерієм оцінки ефективності консерванту у лікарській формі служило зниження кількості життєздатних клітин тест-мікроорганізмів у

Готували контроль тест-мікроорганізмів. Інокульовані зразки ретельно перемішували. По 1 мл із розведень препарату та контролів окремо для кожного тест-штаму, що містить не більше 100 КУО, висівали поверхневим методом на тверді живильні середовища: соєво-казеїновий агар – для виявлення бактерій та Сабуросо-декстрозний агар – для виявлення грибів. Результати перевірки придатності методики визначення загального числа життєздатних клітин наведені у табл. 2.

препараті за певний період часу після його контамінації.

Враховуючи антимікробну активність екстракту бузини необхідно було підтвердити доцільність додавання консервантів, тому на першому етапі нами було проведено дослідження зразків сиропу без додавання консервантів (табл. 3). Результати, представлені в табл. 3, показують, що зразок сиропу без додавання консервантів демонструє позитивний результат мікробіологічного тесту лише щодо бактерій *S. aureus* та *E. coli*. Це підтверджує літературні дані про антимікробні властивості активних компонентів сиропу [6, 7].

Таблиця 3. Результати вивчення ефективності антимікробної консервувальної дії зразків сиропу без додавання консервантів

Тест- мікроорганізми	Концентрація консерванта, %	lg кількості життєздатних мікроорганізмів безпосередньо після інокуляції, lg КУО/мл	lg зменшення кількості життєздатних мікроорганізмів, lg КУО/мл (вимоги ДФУ 2.7, Т.1/ отримані результати)	
			14 діб	28 діб
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	–	5,40	3/3,18	НЗ/НЗ
<i>E. coli</i> ATCC 8739	–	5,7	3/3,25	НЗ/НЗ
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 9027	–	5,60	3/2,78	НЗ/НЗ
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	–	5,7	1/1,64	НЗ/1,23
<i>As. brasiliensis</i> ATCC 16404	–	5,7	1/1,53	НЗ/1,34

Примітка: НЗ – не спостерігається збільшення числа мікроорганізмів порівняно з кількістю життєздатних мікроорганізмів у попередній контрольній точці; НВ – не виявлено життєздатних клітин мікроорганізмів у випробуванні.

Водночас, цей зразок не відповідає вимогам ДФУ, оскільки для бактерій *P. aeruginosa* логарифм зменшення життєздатних клітин через 14 діб є меншим за 3. Крім того, для грибів *C. albicans* і *A. brasiliensis* через 28 діб не повинно спостерігатися збільшення числа мікроорганізмів проти кількості життєздатних мікроорганізмів у попередній контрольній точці.

Таким чином, отримані дані підкреслюють важливість введення антимікробних консервантів до складу сиропу для забезпечення відповідності встановленим стандартам мікробіологічної стабільності. Результати дослідження антимікробної ефективності досліджуваних консервантів наведено в табл. 4.

Таблиця 4. Результати ефективності антимікробних консервантів у досліджуваних зразках

Тест-мікроорганізми	Концентрація консерванту, %	lg кількості життєздатних мікроорганізмів безпосередньо після інокуляції, lg КУО/мл	lg зменшення кількості життєздатних мікроорганізмів, lg КУО/мл (вимоги ДФУ 2.3 / отримані результати)	
			14 діб	28 діб
Натрію бензоат				
Staphylococcus aureus ATCC 6538	0,1	5,32	3/3,25	НЗ/НВ
	0,2	5,38	3/НВ	НЗ/НВ
Escherichia coli ATCC 8739	0,1	5,62	3/НВ	НЗ/НВ
	0,2	5,59	3/НВ	НЗ/НВ
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	0,1	5,56	3/2,68	НЗ/НВ
	0,2	5,61	3/2,84	НЗ/НВ
Candida albicans ATCC 10231	0,1	5,60	1/0,70	НЗ/НВ
	0,2	5,68	1/0,95	НЗ/НВ
Aspergillus brasiliensis ATCC 16404	0,1	5,58	1/0,80	НЗ/0,75
	0,2	5,64	1/0,95	НЗ/НВ
Калію сорбат				
Staphylococcus aureus ATCC 6538	0,1	5,35	3/3,12	НЗ/НВ
	0,2	5,25	3/3,52	НЗ/НВ
Escherichia coli ATCC 8739	0,1	5,65	3/3,15	НЗ/НВ
	0,2	5,61	3/3,24	НЗ/НВ
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	0,1	5,65	3/3,14	НЗ/НВ
	0,2	5,57	3/НВ	НЗ/НВ
	0,1	5,60	1/0,57	НЗ/НВ

Тест-мікроорганізми	Концентрація консерванту, %	lg кількості життєздатних мікроорганізмів безпосередньо після інокуляції, lg КУО/мл	lg зменшення кількості життєздатних мікроорганізмів, lg КУО/мл (вимоги ДФУ 2.3 / отримані результати)	
			14 діб	28 діб
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,2	5,62	1/0,89	НЗ/НВ
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0,1	5,63	1/0,75	НЗ/НВ
	0,2	5,65	1/0,87	НЗ/НВ
Метилпарагідроксibenзоат+пропілпарагідроксibenзоат (5:1)				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0,2	5,59	3/3,30	НЗ/НВ
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0,2	5,51	3/3,34	НЗ/НВ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0,2	5,46	3/3,21	НЗ/НВ
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,2	5,58	1/НВ	НЗ/НВ
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0,2	5,65	1/НВ	НЗ/НВ
Калію сорбат+натрію бензоат (1:1)				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0,2	5,68	3/НВ	НЗ/НВ
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0,2	5,57	3/НВ	НЗ/НВ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0,2	5,58	3/НВ	НЗ/НВ
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,2	5,54	1/НВ	НЗ/НВ
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0,2	5,59	1/1,84	НЗ/НВ

Примітка: НЗ – не спостерігається збільшення числа мікроорганізмів порівняно з кількістю життєздатних мікроорганізмів у попередній контрольній точці; НВ – не виявлено життєздатних клітин мікроорганізмів у випробуванні.

Через 14 діб зберігання зразків сиропу з додаванням натрію бензоату антимікробна дія виявилася не ефективною. Логарифм зниження кількості життєздатних клітин бактерій перевищував 3 лише для *S. aureus* та *E. coli*: для концентрації 0,1% значення для *S. aureus* становило 3,25, для *E. coli* життєздатних клітин не виявлено. Для *P. aeruginosa* та грибів *C. albicans* та *A. brasiliensis* на 14 добу логарифм зменшення становив менше 3 для бактерій та менше 1 для грибів, що не відповідає вимогам ДФУ для оральних препаратів.

Для сиропів з додаванням калію сорбату у концентраціях 0,1% та 0,2% через 14 діб логарифм зниження кількості життєздатних клітин бактерій перевищував 3,0, а для грибів був менше 1, що не відповідає вимогам. На 28 добу у зразках із калію

сорбатом обох концентрацій клітини тест-мікроорганізмів не зафіксовано.

Зразки сиропу з комбінацією метилпарагідроксibenзоату та пропілпарагідроксibenзоату (5:1) в концентрації 0,2% продемонстрували ефективну антимікробну дію.

У зразках з комбінацією 0,1% калію сорбату та 0,1% натрію бензоату спостерігалася повна відповідність фармакопейним вимогам. Через 14 і 28 діб логарифм зниження кількості життєздатних клітин для всіх тест-мікроорганізмів відповідав критеріям ДФУ. Така комбінація консервантів забезпечила ефективну мікробіологічну стабільність сиропу, що дозволяє рекомендувати її для захисту препарату.

Незважаючи на те, що парабени показали ефективну консервувальну дію, вони мають певні недоліки, пов'язані з низкою розчинністю у воді, необхідністю комбінування двох або кількох для підвищення антимікробної активності, ймовірністю виникнення побічної дії – сенсibilізації до алергенів, впливу на гормональну систему, їхня потенційна токсичність у високих дозах, а також неприємний смак, що важливо для досліджуваної лікарської форми. [11-14]

Тому при виборі консервантів нами було враховано переваги комбінації калію сорбату та натрію бензоату [15, 16]:

- широкий спектр антимікробної дії;
- ефективність в діапазоні рН від 2 до 6,5;
- висока гігієнічна безпека (калію сорбат);
- низький рівень виникнення алергічних реакцій;
- економічність.

Висновки та перспективи подальших досліджень.

1. Проведені випробування показали необхідність додавання до складу сиропу з екстрактом бузини антимікробних консервантів.
2. Високу антимікробну ефективність продемонстрували зразки із вмістом комбінації натрію бензоат (0,1%) та калію сорбат (0,1%), а також комбінації метилпарагідроксибензоату та пропілпарагідроксибензоату у співвідношенні (5:1) в концентрації 0,2%.
3. Враховуючи вимоги безпечності та економічності при використанні консервантів у даній розробці, перспективним консервантом при створенні сиропу з екстрактом бузини обрано комбінацію натрію бензоату (0,1%) та калію сорбату (0,1%). Зразки сиропу з обраними консервантами були закладені на зберігання та подальших досліджень. Конфлікт інтересів: відсутній.

Selection of antimicrobial agents in the composition of elderberry extract syrup

Natalia Khokhlenkova, Olha Kaliuzhnaia, Nataliia Dvinskykh

Introduction. In modern pharmacy, there is growing interest in herbal medicines, which usually have low toxicity and mild effects. Syrups with plant extracts are particularly relevant because of their high therapeutic effectiveness and ease of use. It is important to consider the microbiological stability of syrups, as they provide a favorable environment for microorganisms. The Biotechnology Department at NUPh is developing a syrup from black elderberry, which possesses antioxidant and anti-inflammatory properties. To avoid deterioration of product quality, it is crucial to investigate the optimal concentration of preservatives.

The aim of the work. To conduct microbiological studies during the pharmaceutical development stage of the syrup containing black elderberry extract with adaptogenic, anti-inflammatory, and immunostimulatory effects. **Materials and Methods.** The objects of study were syrup samples without preservatives and those with added methylparaben, propylparaben, potassium sorbate, sodium benzoate, and their combinations. The effectiveness of antimicrobial

preservatives was tested according to the methodology specified in SPbU 2.7, V. 1 (5.1.3). The studies were conducted in aseptic conditions within a laminar flow cabinet (Biosafety cabinet AS2-4E1 «Esco», Indonesia).

Results. The growth properties of nutrient media and the suitability of the methodology for determining the total number of viable cells were verified. The study demonstrated the importance of including antimicrobial preservatives in the syrup to ensure compliance with established standards for microbiological stability. The effectiveness testing of the antimicrobial preservatives yielded the following results: after 14 days of storage, the antimicrobial action of the syrup with sodium benzoate was ineffective, and the results for *P. aeruginosa* and fungi *C. albicans* and *A. brasiliensis* did not meet SPbU requirements. Syrups with potassium sorbate at concentrations of 0.1% and 0.2% also failed to meet the criteria. The combination of methylparaben and propylparaben, as well as the combination of potassium sorbate and sodium benzoate, proved effective and met the requirements for ensuring microbiological stability. **Conclusions.** The tests demonstrated the necessity of adding antimicrobial preservatives to the syrup containing elderberry extract. High antimicrobial efficacy was shown by samples containing combinations of sodium benzoate and potassium sorbate, as well as methyl- and propylparabens. Considering certain factors, the first combination of preservatives was selected. Samples of syrup with the chosen preservatives were prepared for storage for further research.

Keywords: antimicrobial preservatives, test microorganisms, elderberry extract, microbiological stability

References

1. Nikitina O, Choudhry S. Current state and prospects for the development of pharmaceutical production of herbal medicinal products. Pharmaceutical review. 2023;(4):86-9. DOI: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2023.4.14177>
2. Slyusar O. A., Gladukh E. V. Prospects for creating a combined syrup based on plant raw materials. Ukrainian Medical Almanac. 2014. T. 17(1):107-108. URL: <https://surl.li/ckastc>.
3. Patil J, Mali D, More K, Jain Sh. Formulation and evaluation of herbal syrup. World Journal of Pharmaceutical Research. 2019. Vol. 8(6):1061-1067. DOI: 10.20959/wjpr20196-14867.
4. Shostak T, Kalyniuk T, Gudz N. Features of pharmaceutical development of herbal medicinal products (Literature review). Phytotherapy. 2014. (4):77-82. URL: <https://surl.li/bxllhy>
5. Baba J, Khokhlenkova N. Prospects for creating syrup with elderberry extract. Youth Pharmacy Science: materials of the V All-Ukrainian Scientific and Practical Conference with International Participation (2024):150-151. URL: https://nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2021/04/yps_materialy-konferentsii_2024.pdf
6. Mocanu ML, Amariei S. Elderberries-A Source of Bioactive Compounds with Antiviral Action. Plants (Basel). 2022 Mar 10;11(6):740. DOI: 10.3390/plants11060740.

7. Nurzyńska-Wierdak R, Najda A, Sałata A., Krajewska A. Bioactive compounds and antioxidant properties of black elderberry (*Sambucus nigra* L.). *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*. 2022;21(2):143–156. DOI: 10.24326/asphc.2022.2.13.
8. Baula O, Derkach T. Quality assurance of herbal medicinal products: status and prospects. *Pharmaceutical review*. 2017;(2):79-86. DOI: 10.11603/2312-0967.2017.2.7816.
9. State Pharmacopoeia of Ukraine. 2nd ed. Supplement 7. Kharkiv: State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines»; 2024. Vol. 1. 296 p.
10. State Pharmacopoeia of Ukraine. 2nd ed. Supplement 6. Kharkiv: State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines»; 2023. 424 p.
11. Al-Rubaye IM. A review of the literature on antimicrobial preservatives: definition, properties, classification, safety, side effects and antimicrobial effectiveness testing. *Atena J Public Health*. 2022;4:7. URL: <https://atenajournals.com/index.php/ajph/article/view/67>
12. Petric Z, Ružić J, Žuntar I. The controversies of parabens – an overview nowadays. *Acta Pharm*. 2021;71(1):17-32. DOI: <https://doi.org/10.2478/acph-2021-0001>.
13. Tade R, More M, Chatap V et al. Safety and Toxicity Assessment of Parabens in Pharmaceutical and Food Products. *Inventi Rapid: Pharmacy Practice*, 2018;(3):1-9. DOI: 10.13140/RG.2.2.23621.40161
14. European Medicines Agency. Reflection paper on the use of methyl- and propylparaben as excipients in human medicinal products for oral use. Eur. Union. 2015;44(EMA/CHMP/SWP/272921/2012):13. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-use-methyl-and-propylparaben-excipients-human-medicinal-products-oral-use_en.pdf
15. Kumar R, Rajput R. Role of Natural Preservatives and their Effect on Food's Shelf Life. *Curr. J. Appl. Sci. Technol*. 2023 Dec. 13;42(47):7-19. DOI: 10.9734/cjast/2023/v42i474312.
16. Silva MM, Lidon F. Food preservatives – an overview on applications and side effects. *Emir J Food Agric*. 2016 Jan. 7;28(6):366-73. URL: <https://ejfa.me/index.php/journal/article/view/1049>.