

ISSN 2414-5718

НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ СЕГОДНЯ

ЯНВАРЬ 2017 № 1 (12)



НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

САЙТ ИЗДАТЕЛЬСТВА: [HTTP://SCIENCEPROBLEMS.RU](http://scienceproblems.ru)

САЙТ ЖУРНАЛА: [HTTP://PUBLIKACIJA.RU](http://publikacija.ru)

EMAIL: [ADMBESTSITE@YANDEX.RU](mailto:admbestsite@yandex.ru)



9 772414 571001

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧИСТОТА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ КАЧЕСТВА СУХОГО ЭКСТРАКТА ИЗ НАДЗЕМНЫХ ЧАСТЕЙ RADUS GRAYNAE MAXIM

Исмаилов И. З.¹, Кравцов А. А.²

¹Исмаилов Исабек Зайлидинович / *Ismailov Isabek Zailidinovich* - кандидат фармацевтических наук,
доцент,

кафедра базисной и клинической фармакологии,

Кыргызская государственная медицинская академия им. И. К. Ахунбаева;

²Кравцов Алексей Анатольевич / *Kravcov Aleksej Anatol'evich* – кандидат медицинских наук,

Научно-профилактическое объединение «Профилактическая медицина»,
руководитель,

Республиканский научно-практический центр инфекционного контроля,
г. Бишкек, Кыргызская Республика

Аннотация: на всех этапах от производства лекарственных средств до потребителя необходимо оценивать вероятность риска производства некачественных лекарственных средств и совершенствовать систему контроля, добиваясь обеспечения их качества. Безопасность лекарственного средства напрямую зависит от микробиологических показателей. В статье представлены результаты изучения микробиологической чистоты сухого экстракта из надземных частей *Radus Graynae Maxim* в соответствии ОФС 42-0067-07 Государственной Фармакопеи РФ XII изд.

Ключевые слова: лекарственные средства, контроль качества, безопасность, микробиологическая чистота, фитопрепараты, *Radus Graynae Maxim*.

Основой для получения фитопрепаратов являются лекарственные растения, которые относятся к сырью, наиболее контаминированному различными микроорганизмами, и могут являться переносчиками различных бактерий, грибов и вирусов, а также загрязнений от животных и насекомых. При этом микробной контаминации может подвергаться не только лекарственное растительное сырье, но и почти все субстанции, и готовые лекарственные формы.

На современном этапе развития фармацевтического производства, обязательным является соблюдение правил надлежащей производственной практики (GMP), что приводит к ужесточению подходов контроля качества субстанций и лекарственных препаратов. В фармацевтической отрасли существует система обеспечения качества лекарственных средств и одним из наиболее важных параметров, характеризующих качество любой субстанции и лекарственных форм, является его микробиологическая чистота [1, 57-59].

Следовательно, при разработке лекарственных средств и в особенности растительного происхождения, необходимым условием является оценка микробиологических рисков. При этом, учитывая прямую зависимость между безопасностью лекарственного средства и микробиологическими показателями его контаминации, необходимо жестко контролировать качество микробиологических испытаний, которые должны быть максимально точными и надежными [2].

Цель исследования: оценка микробиологической чистоты сухого экстракта *Radus Graynae Maxim*.

Материалы и методы. Объектом изучения являлся сухой экстракт из надземных частей *Radus Graynae Maxim*, полученный методом лиофильной сушки [3, 100-102].

Используемые питательные среды для микробиологического исследования [4].

Среда № 1 - для выращивания аэробных бактерий, сухая, «НIMEDIA», Индия.

Среда № 2 (агар Сабуро с глюкозой и антибиотиками) - для выращивания дрожжевых и плесневых грибов, сухая, «НIMEDIA», Индия.

Среда № 3 для обогащения для энтеробактерий, сухая, «НIMEDIA», Индия.

Среда № 4 - д
Среда № 8 - д
Среда № 10 - д
Среда № 11 - д
Среда № 12 - д
Среда № 13 - д
Среда № 14 - д

Изучение ми
проводилось в со
препаратов и суб
XII изд. [5, с. 163].

Так нестериль
формы препарат
сиропа и др.,
различными ми
количества ми
представляющих

Согласно Госу
происхождения в
них установлены
микроорганизмов,
также наличие Esc

Соответствен
Graynae Maxim о
производства нест

Таблица 1. Требо

Субстанция, вс

Категория 3.2.
Субстанции при
(растительного, и
минерального) д
нестерильных ле

Эксперимента
подготовку различ
методы количеств
идентификацию от
в нестерильных ле
Испытание пр
контаминацию исс
Количественн
двухслойным мето
буферном растворе
Определение в
по 1 мл в каждую

- № 4 - для выделения энтеробактерий, сухая, «HIMEDIA», Индия.
- № 8 - для выращивания бактерий, «HIMEDIA», Индия.
- № 10 - для выделения золотистого стафилококка, сухая, «HIMEDIA», Индия.
- № 11 - для предварительного обогащения энтеробактерий, сухая, «HIMEDIA», Индия.
- № 12 - для выделения сальмонелл, сухая, «HIMEDIA», Индия.
- № 13 - для идентификации сальмонелл, сухая, «HIMEDIA», Индия.
- № 14 - для идентификации E. coli, сухая, «HIMEDIA», Индия.

Содержание микробиологической чистоты сухого экстракта *Padus Graupae Maxim* должно соответствовать требованиям к микробиологической чистоте лекарственных веществ и субстанций, описанных в ОФС 42-0067-07 Государственной Фармакопеи РФ [5, с. 163].

Нестерильные формы лекарственных средств (субстанции, различные лекарственные препараты для приема внутрь - таблетки, капсулы, гранулы, растворы, суспензии, и др., а также вспомогательные вещества) могут быть контаминированы различными микроорганизмами. При этом допускается наличие лимитированного количества микроорганизмов, при отсутствии определенных видов бактерий, вызывающих эпидемиологическую опасность для здоровья человека.

Согласно Государственной Фармакопеи XII изд., лекарственные средства растительного происхождения в зависимости от способа применения разделяются на категории 3 и 4. Для них установлены пределы допустимых микробиологических норм определенных групп микроорганизмов, такие как: общее число бактерий (ОЧБ) и общее число грибов (ОЧГ), а также наличие *Escherichia coli*, *Salmonella* и энтеробактерии [5, с. 163].

Согласно данной классификации, сухой экстракт из надземных частей *Padus Graupae Maxim* относится к категории 3.2 - Субстанции природного происхождения для производства нестерильных лекарственных препаратов (табл. 1).

Таблица 1. Требования к микробиологической чистоте субстанций и вспомогательных веществ для производства лекарственных препаратов

Категория, субстанции, вспомогательные вещества	Рекомендуемые требования
Категория 3.2. Субстанции природного происхождения растительного, животного или минерального) для производства нестерильных лекарственных препаратов	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов - не более 10^4 КОЕ в 1 г или в 1 мл. • Общее число грибов - не более 10^2 КОЕ в 1 г или в 1 мл. • Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г или в 1 мл. • Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г или в 10 мл. • Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г или в 1 мл. • Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г или в 1 мл. • Энтеробактерий - не более 10^2 КОЕ в 1 г или в 1 мл.

Экспериментальная часть. Испытание на микробиологическую чистоту включало взятие различных образцов перед испытанием, отбор проб образцов для анализа, количественного определения жизнеспособных бактерий и грибов, выявление и идентификацию отдельных видов бактерий, наличие которых недопустимо или ограничено в нестерильных лекарственных средствах.

Испытание проводилось в асептических условиях, с целью предотвращения контаминацию исследуемых образцов.

Количественное определение микроорганизмов. Испытание проводилось петрическим методом в чашках Петри. Образец в количестве 10 г растворяли в фосфатном буферном растворе pH 7.0 так, чтобы конечный объем раствора составлял 100 мл.

Определение количества аэробных бактерий. Из приготовленного раствора вносили по 1 мл в каждую из двух пробирок с 4 мл среды № 1 охлажденной до температуры 45°C .



Быстро перемешивали содержимое пробирки и переносили в чашку Петри, содержащую 20 мл застывшей питательной среды № 1. Вращательными движениями чашки равномерно распределяли верхний слой среды. После застывания среды чашки переворачивали и инкубировали в течение 5 суток при температуре 35⁰С. Через 48 ч и окончательно через 5 суток подсчитывали число колоний на двух чашках, находя среднее значение, умножали его на показатель разведения, и вычисляли число бактерий в 1 г образца.

Определение общего числа грибов. Испытание проводили двуслойным агаровым методом, описанным выше, используя среду № 2. Посевы инкубировали в течение 5 суток при температуре 22⁰С. Через 72 часа и окончательно через 5 суток подсчитывали общее число колоний дрожжевых и плесневых грибов на двух чашках, находят среднее значение, умножали его на показатель разведения, т.е. на 10, и вычисляли число грибов в 1 г образца.

Выделение и идентификация семейства Enterobacteriaceae. Образец в количестве 10 г вносили в 100 мл среды № 11, перемешивали и инкубировали в течение 2 ч. После инкубации содержимое флакона (гомогенат А) перемешивали и переносили 10 мл в 100 мл среды № 3. Посев инкубировали в течение 18-48 ч. При появлении роста делали пересев на плотную среду № 4, инкубировали в течение 18-24 ч. Появление на среде колоний грамотрицательных палочек являлось свидетельством того, что исследуемый образец был контаминирован бактериями.

Количественное определение: Использовали 3 пробирки с 9 мл среды № 3. Гомогенат А в количестве 1 мл (соответствовал 0,1 г образца) вносили в первую пробирку, тщательно перемешивали и переносили 1 мл (соответствует 0,01 г образца) во вторую пробирку, снова перемешивали и переносили 1 мл (соответствует 0,001 г образца) в третью пробирку, меняя пипетку после каждого шага. Посевы инкубировали в течение 24-48 ч. В случае роста, для подтверждения наличия энтеробактерий делали пересев петлей на плотную среду № 4 и инкубировали чашки Петри в течение 18-24 часов. Появление на плотной среде колоний грамотрицательных палочек говорило о положительном тесте, отсутствие роста колоний об отрицательном тесте. Наиболее вероятное количество энтеробактерий и других грамотрицательных микроорганизмов в 1 г образца определяли по таблице 2.

Таблица 2. Определение количества энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий в образце

Соответствующее количество испытуемого образца			Наиболее вероятное количество бактерий в 1 г образца
0,1 г	0,01 г	0,001 г	
1 мл гомогената 1	1 мл гомогената 1 в разведении 1:10	1 мл гомогената 1 в разведении 1:100	
+	+	+	Более 10 ³
+	+	-	От 10 ² до 10 ³
+	-	-	От 10 ¹ до 10 ²
-	-	-	Менее 10 ¹

Обозначения: (+) - положительный тест; (-) - отрицательный тест.

Выявление Escherichia coli. Исследуемый образец, разведенный стерильным буферным раствором 1:10, переносили в количестве 10 мл (соответствует 1 г) в 100 мл жидкой питательной среды № 8, перемешивали и инкубировали в течение 18-48 часов. Затем 1 мл содержимого флакона переносили в 10 мл среды № 3. Посевы инкубировали в течение 18-24 часов. При наличии роста, в случае равномерного помутнения среды в пробирках, делали пересев на среду № 4. Посевы инкубировали в течение 18-24 ч. На среде № 4 E. coli образовывали - малиновые колонии с металлическим блеском, окруженные малиновыми зонами, неслизистые. Подозрительные на принадлежность к E. coli колонии на плотных средах микроскопировали. При обнаружении в мазках

рицательных палочек отдельные колонии отсеивали на скошенную в пробирках № 1 и инкубировали в течение 18-24 ч.

Для подтверждения результатов использовали биохимические тесты. Из пробирок с культурой делали пересевы на агар Симмонса и соево-казеиновый бульон (среда № 14). Также проводили тест на наличие фермента цитохромоксидазы. Через 18-24 часов отмечали бактериальный рост или его отсутствие на агаре Симмонса (среда № 14). Наличие цитрата определяли по смещению pH-среды в щелочную сторону (изменению цвета из зеленого в синий). Наличие индола определяли по появлению красного кольца в соево-казеиновом бульоне при добавлении реактива Ковача.

В образце обнаруживали грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидаза, не утилизирующие цитрат натрия и не обладающие индол, считали, что лекарственное средство контаминировано *E.coli*.

Количественное определение *E.coli*. Количественное определение *E.coli* проводили так же, как количественное определение других энтеробактерий, делая пересев питательной среды А в пробирки со средой № 3. В случае равномерного помутнения среды в пробирке для подтверждения наличия *E.coli* из каждой пробирки делали пересев петлей на среду № 4. Посевы инкубировали в течение 18-24 часов. Появление на средах № 4 для *E.coli* колоний грамотрицательных палочек являлось положительным результатом, а отсутствие роста этих колоний - отрицательным тестом. Наиболее вероятное количество клеток *E.coli* в 1 г образца определяли по таблице 1.

Выявление бактерий рода *Salmonella*. В начале 10,0 г исследуемого образца помещали в 100 мл среды № 8, перемешивали и инкубировали в течение 18-24 ч. При появлении роста 1 мл после перемешивания переносили в 10 мл среды № 12 и инкубировали в течение 16-24 часов. Затем делали пересев петлей на Висмут-сульфит агар и инкубировали в течение 24-48 ч. На Висмут-сульфит агаре бактерии из рода *Salmonella* образовывали колонии с характерным металлическим блеском, при этом участок среды под колонией прокрашивался в черный цвет.

Колонии, подозрительные на принадлежность к роду *Salmonella*, микроскопировали. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек, 2-3 характерные колонии (каждую) пересевали на трехсахарный агар с солями железа (среда № 13), нанося большое количество культуры петлей сначала на скошенную часть агара, а потом уколом в столбик, доходя до дна пробирки. Через 24 часа инкубации, в столбике питательной среды отмечали изменение цвета из красного в желтый. Почернение среды свидетельствовало об образовании сероводорода - типичном признаке видов рода *Salmonella*. Параллельно проводили тест на наличие фермента «цитохромоксидаза», используя чистую культуру со среды № 13. Если требовалось дополнительное подтверждение, использовали подходящие биохимические и серологические тесты.

В образце обнаруживали грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом «цитохромоксидазой», не ферментирующие сахарозу и лактозу и не обладающие сероводород, считали, что лекарственное средство было контаминировано бактериями рода *Salmonella*.

Выявление *Staphylococcus aureus*. Исследуемый образец, разведенный стерильным раствором 1:10, переносили в количестве 10 мл (соответствует 1 г) в 100 мл питательной среды № 8, перемешивали и инкубировывали в течение 24-48 часов. При появлении роста пересевали петлей на среду № 10 и инкубировали в течение 24-48 часов. При появлении желтых колоний, окруженных желтыми зонами, на среде № 10 свидетельствовали о наличии *S.aureus*.

Для идентификации использовали реакцию плазмокоагуляции с чистой культурой *S.aureus* № 10, отсеянной на среду № 10.

В образце обнаруживали грамположительные кокки, ферментирующие маннит (среда № 10), обладающие ферментом коагулаза, ли, что лекарственное средство контаминировано *S.aureus*.



Результаты изучения микробиологической чистоты сухого экстракта *Padus Graynae Maxim* представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты исследования микробиологической чистоты сухого экстракта *Padus Graynae Maxim*

Требования НД	Результаты испытаний
Общее число аэробных бактерий не более 10^4 КОЕ/г (колонии образующие единицы в 1 грамме)	Менее 1×10^1 КОЕ/г
Общее число грибов не более 10^2 КОЕ/г	Менее 1×10^1 КОЕ/г
Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г.	Не обнаружено
Энтеробактерий, устойчивых к желчи, не более 10^2 КОЕ в 1 г	Не обнаружено
Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г	Не обнаружено
Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г	Не обнаружено
<i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г	Не обнаружено

Таким образом, показатели микробиологической чистоты сухого экстракта *Padus Graynae Maxim* соответствуют требованиям ОФС 42-0067-07 Государственной Фармакопеи РФ XII изд. и могут быть использованы для обеспечения качества субстанции – сухого экстракта *Padus Graynae Maxim* для изготовления нестерильных форм лекарственных средств для приема внутрь.

Литература

1. Арзамасцев А. П., Титова А. В. Особенности системы стандартизации субстанций в условиях рыночной экономики // Ремедиум. Москва, 2006. № 9. С. 57-59.
2. Гунар О. В. Методологические основы совершенствования системы микробиологического контроля качества лекарственных средств: Автореф. дисс. ... докт. фарм. наук. Пермь, 2009. 48 с.
3. Разработка технологии получения сухого экстракта *Padus Grayanae Maxim* // Наука, техника и образование, 2016. № 10 (28). С. 100-102.
4. Каталог «HIMEDIA». Сухие питательные среды и добавки, 2003. Mumbai, Индия. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.himedialabs.ru/2-uncategorised/> (дата обращения: 30.12.2016).
5. Государственная Фармакопея XII изд., Т. 2. М.: НЦЭСМП, 2008. С. 163.