

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, «HIMEDIA», Индия.

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

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

Среда № 4 - для выделения энтеробактерий, сухая, «HIMEDIA», Индия.

Среда № 8 - для выращивания бактерий, «HIMEDIA», Индия.

Среда № 10 - для выделения золотистого стафилококка, сухая, «HIMEDIA», Индия.

Среда № 11 - для предварительного обогащения энтеробактерий, сухая, «HIMEDIA», Индия.

Среда № 12 - для выделения сальмонелл, сухая, «HIMEDIA», Индия.

Среда № 13 - для идентификации сальмонелл, сухая, «HIMEDIA», Индия.

Среда № 14 - для идентификации *E. coli*, сухая, «HIMEDIA», Индия.

Изучение микробиологической чистоты сухого экстракта *Radus Graynae Maxim* проводилось в соответствии с требованиями к микробиологической чистоте лекарственных препаратов и субстанций, описанных в ОФС 42-0067-07 Государственной Фармакопеи РФ XII изд. [5, 163].

Так нестерильные формы лекарственных средств (субстанции, различные лекарственные формы препаратов для приема внутрь - таблетки, капсулы, гранулы, растворы, суспензии, сиропы и др., а также вспомогательные вещества) могут быть контаминированы различными микроорганизмами. При этом допускается наличие лимитированного количества микроорганизмов, при отсутствии определенных видов бактерий, представляющих 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].

Соответственно данной классификации, сухой экстракт из надземных частей *Padus Graynae 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

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 подготовку различных образцов перед испытанием, отбор проб образцов для анализа, методы 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 двухслойным 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 35°C . 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 двухслойным агаровым методом, описанным выше, используя среду № 2. Посевы инкубировали в течение 5 суток при температуре 22°C . 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 грамтрицательных палочек отдельные колонии отсеивали на скошенную в пробирках среду № 1 и инкубировали в течение 18-24 ч.

Для подтверждения результатов использовали биохимические тесты. Из пробирок с чистой культурой делали пересевы на агар Симмонса и соево-казеиновый бульон (среда № 15), а также проводили тест на наличие фермента цитохромоксидазы. Через 18-24 часов инкубации отмечали бактериальный рост или его отсутствие на агаре Симмонса (среда № 14). Утилизацию цитрата определяли по смещению рН-среды в щелочную сторону (изменению цвета среды из зеленого в синий). Наличие индола определяли по появлению красного кольца на поверхности соево-казеинового бульона при добавлении реактива Ковача.

Если в образце обнаруживали грамтрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидаза, не утилизирующие цитрат натрия и образующие индол, считали, что лекарственное средство контаминировано *E. coli*.

Количественное определение *E. coli*. Количественное определение *E. coli* проводили таким же образом, как количественное определение других энтеробактерий, делая пересев из гомогената А в пробирки со средой № 3. В случае равномерного помутнения среды в пробирках для подтверждения наличия *E. coli* из каждой пробирки делали пересев петлей на плотную среду № 4. Посевы инкубировали в течение 18-24 часов. Появление на средах характерных для *E. coli* колоний грамтрицательных палочек являлось положительным тестом, 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 переносили в 100 мл среды № 8, перемешивали и инкубировали в течение 18-24 ч. При наличии 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 черные 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 грамтрицательных палочек, 2-3 характерные колонии (каждую отдельно) пересевали на трехсахарный агар с солями железа (среда № 13), нанося большое количество культуры петлей сначала на скошенную часть агара, а потом уколом в столбик, не касаясь 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 ставили тест на наличие фермента «цитохромоксидаза», используя чистую культуру со скошенного агара среды № 1. Если требовалось дополнительное подтверждение, использовали подходящие биохимические и серологические тесты.

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

Выявление *Staphylococcus aureus*. 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 24-48 часов. При наличии роста пересевали петлей на среду № 10 и инкубировали в течение 24-48 часов. Золотисто-желтые колонии, окруженные желтыми зонами, на среде № 10 свидетельствовали о наличии *S. aureus*.

Для идентификации использовали реакцию плазмокоагуляции с чистой культурой стафилококка, отсеянной на среде № 1.

Если 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 Graynae Maxim* // Наука, техника и образование (Москва), 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.