

Развитие микробиологических методов анализа лекарственных средств

О. В. Гунар, Н. Г. Сахно, Е. С. Новик, Г. М. Булгакова,
Л. В. Колосова, И. А. Буйлова, М. В. Рощина

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Россия

Статья поступила 15.01.2016 г. Принята к печати 10.02.2016 г.

Резюме: Приведен обзор отечественной нормативной документации, посвященной испытанию лекарственных средств по микробиологическим показателям, таким как «Стерильность», «Микробиологическая чистота» и др. Обсуждается история возникновения показателей и создания соответствующих общих фармакопейных статей, а также перспективы развития методов в связи с изданием Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания. Имеется выраженная тенденция к гармонизации с ведущими мировыми фармакопеями, но Государственная фармакопея сохраняет индивидуальные особенности испытания качества лекарственных средств по микробиологическим показателям, в том числе, за счет внедрения новых технологий, автоматизации процесса и учета особенностей отдельных групп лекарственных средств.

Ключевые слова: микробиологические показатели; стерильность; микробиологическая чистота; содержание витаминов; концентрация микробных клеток; эффективность консервантов.

Библиографическое описание: Гунар ОВ, Сахно НГ, Новик ЕС, Булгакова ГМ, Колосова ЛВ, Буйлова ИА, Рощина МВ. Развитие микробиологических методов анализа лекарственных средств. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2016; (1): 15–18.

Выход в свет Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ) XIII издания ознаменовал начало нового этапа развития фармацевтического анализа. Принимая во внимание тесную связь микробиологических показателей с безопасностью применения лекарственных средств (ЛС), совершенствование методов их анализа имеет большое значение. Основные подходы, требования и способы оценки качества ЛС описаны в общих фармакопейных статьях (ОФС), касающихся микробиологических испытаний: «Стерильность», «Микробиологическая чистота», «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар», «Определение содержания витаминов в многокомпонентных препаратах микробиологическим методом», «Определение эффективности антимикробных консервантов», «Определение концентрации микробных клеток».

1. Стерильность. В мировой практике методика определения стерильности ЛС впервые была представлена в издании Британской фармакопеи, вышедшем в 1932 г., и фармакопее США 1936 г. С тех пор методика претерпела многочисленные изменения, в том числе касающиеся питательных сред, температуры и времени инкубации. Целью этих изменений было создание условий, обеспечивающих рост максимально возможного количества видов микроорганизмов-контаминантов [1].

Впервые в нашей стране ОФС «Стерильность» была включена в ГФ СССР X изд. в 1968 г. В статье были описаны методики испытания стерильности вакцин, анатоксинов и антитоксических сывороток, эндокринных ЛС, кровезаменителей, антибиотиков. В последующие годы основными руководящими документами по анализу стерильности были временная фармакопейная статья (ВФС) 42-1844–88 «Испытание на стерильность» (1988 г.), ГФ СССР XI изд. (1990 г.) [2], ОФС 42-0066–07 «Стерильность» ГФ РФ XII изд., ч. 1 (2007 г.) [3]. Переработанная ОФС 1.2.4.0003.15 «Стерильность», дополненная особен-

ностями анализа стерильности иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), включена в ГФ РФ XIII изд. (2015 г.).

Разработчиками был переработан раздел «Определение антимикробного действия» ЛС, расширен перечень рекомендованных инактиваторов.

Изменения коснулись анализа качества питательных сред: их ростовых свойств, стерильности и нейтрализующей способности. В ОФС сохранена возможность использования жидкой среды Сабуро наряду с соево-казеиновым бульоном для выявления дрожжевых и плесневых грибов. В отличие от предыдущего издания ГФ и ведущих мировых фармакопей для анализа ростовых свойств тиогликолевой среды, используемой в качестве универсальной для испытания ИБЛС, применяют тест-штаммы *Alcaligenes faecalis* 415 и *Clostridium novyi* 198.

2. Микробиологическая чистота. Требования к качеству ЛС по показателю «Микробиологическая чистота» впервые были введены в ГФ XI изд. в 1990 году. Позже, в 1995, 2001, 2003 годах были опубликованы три изменения к статье ГФ XI изд., а с 2007 г. испытания проводят по ГФ XII изд. с ОФС 42-0067–07 «Микробиологическая чистота».

Однако, учитывая современный уровень развития фармацевтического производства и контроля, возникла необходимость кардинального пересмотра и создания новой редакции ОФС «Микробиологическая чистота», в которую включены особенности испытания препаратов-пробиотиков, а также методов определения качества воды для инъекций (ангро) и воды очищенной.

В ОФС «Стерильность» сохранены обозначения категорий ЛС, использованные в ГФ XII изд. при нормировании их качества, а также внесены дополнения, касающиеся анализа ИЛП.

В раздел «Интерпретация результатов количественного определения микроорганизмов» введены коэффициенты — «2» для всех категорий ЛС и «5» — для

лекарственных растительных средств (ЛРС). Введение коэффициента «5» было обосновано и введено еще в ОФС «Методы микробиологического контроля» [4] ввиду того, что ЛРС, представляющие собой лекарственные растения или их части (листья, цветы, трава, плоды, семена, кора, корни, корневища и др.), невозможно полностью стандартизовать в отношении количества аэробных бактерий и грибов. Использование указанных коэффициентов при учете и интерпретации результатов анализа способствует гармонизации ГФ XIII изд. с ведущими мировыми фармакопеями.

В ОФС «Стерильность» актуализированы видовые названия бактерий и грибов согласно современной классификации, а также уточнен набор микроорганизмов, используемых в ходе анализа, с указанием тест-штаммов в первую очередь отечественных коллекций.

Впервые в отечественной нормативной документации приведены нормативные требования и методика определения дрожжевых грибов *Candida albicans* в вагинальных ЛС.

По сравнению с ГФ XII изд. внесены изменения в разделы, посвященные выделению и идентификации энтеробактерий, *Escherichia coli*, бактерий рода *Salmonella*. Они касаются объема образца для анализа, набора питательных сред и условий инкубации посевов.

Перечень питательных сред оптимизирован и дополнен с учетом современных возможностей производства. Способ определения ростовых и селективных свойств жидких питательных сред упрощен. Соответствующий раздел ОФС содержит рекомендации по анализу дифференциально-диагностических питательных сред.

3. Определение содержания витаминов в многокомпонентных препаратах микробиологическим методом. Современные методы определения содержания витаминов делят на физико-химические и биологические. К физико-химическим относят высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), фотокolorиметрию, спектрофотометрию. Для количественного определения аскорбиновой и фолиевой кислот в последнее время развивается метод флуориметрии. Однако содержание некоторых витаминов в поливитаминных препаратах настолько мало, что чувствительность физико-химических методов не позволяет провести количественное определение с необходимой точностью. В таких случаях применяют микробиологические методы с использованием специальных витаминзависимых микроорганизмов в качестве аналитических индикаторов, что нередко является единственно возможным способом. Такое определение основано на прямом воздействии химического вещества на живую клетку высокоспецифичного тест-штамма. Микробиологические методы используют для определения содержания цианокобаламина, кальция пантотената, фолиевой кислоты, D-биотина, никотиновой кислоты (никотинамида). К нормативным документам, в соответствии с которыми до недавнего времени производили испытание, относились:

- ГФ СССР XI изд., вып.2, «Определение цианокобаламина (витамина B12)»;
- ОФС 42-0005–01 «Определение содержания D-биотина»;

- ОФС 42-0006–01 «Определение содержания кальция пантотената»;
- ОФС 42-0018–04 «Определение содержания фолиевой кислоты»;
- ОФС 42-0017–04 «Определение содержания кислоты никотиновой или никотинамида».

В ГФ XIII изд. приведена ОФС 1.2.4.0012.15 «Определение содержания витаминов в многокомпонентных препаратах микробиологическим методом», в которую включены усовершенствованные и переработанные вышеперечисленные документы. В ОФС описаны особенности определения витаминов чашечным и пробирочным методами, что делает указанный документ компактным и более удобным для использования специалистами.

4. Определение эффективности антимикробных консервантов. На протяжении многих десятилетий фармацевтические производители применяют антимикробные консерванты для обеспечения микробиологической защиты ЛС, а также для увеличения срока их хранения.

В ГФ X изд. в качестве консервантов-антисептиков для инъекционных лекарственных форм и ИЛП были рекомендованы: хлорбутанолгидрат 0,05–0,5%, фенол 0,25–0,5%, хлороформ 0,5%, мертиолят 0,01%, нипагин 0,1%.

В ГФ XI изд. приведены консерванты, предназначенные для неинъекционных лекарственных форм.

Требования к проведению испытания эффективности антимикробных консервантов, входящих в состав ЛС, были включены в ВФС 42-3456–99 (1999 г.) и ГФ XII изд. ОФС 42-0069–07.

Метод определения эффективности антимикробных консервантов в готовых препаратах используется при решении вопроса о пригодности того или иного консерванта для данного ЛС, а также для расширения антимикробного спектра действия консерванта за счет использования синергического эффекта двух и более консервирующих соединений.

В связи с необходимостью совершенствования существующего метода анализа и устранения выявленных недостатков ОФС 42-0069–07 была пересмотрена.

Впервые в мировой практике в ОФС 1.2.4.0011.15 «Определение эффективности антимикробных консервантов» ГФ XIII изд. в методику испытания включен модифицированный глубинный чашечный агаровый метод. Кроме того, антиacidные лекарственные препараты, приготовленные на водной основе, исключены как отдельная категория и внесены в категорию 3 «Лекарственные препараты для приема внутрь». Представлена переработанная таблица «Критерии оценки эффективности антимикробных консервантов лекарственных препаратов» для упрощения понимания внесенных в нее данных.

Перечень используемых микроорганизмов исправлен в соответствии с современной классификацией, уточнен требуемый объем инокулятов тест-штаммов бактерий и грибов, требуемый при испытании.

5. Определение концентрации микробных клеток. ОФС 1.7.2.0008.15 «Определение концентрации микробных клеток» представлена в ГФ XIII изд. впервые и включает в себя:

— методы прямого подсчета (в счетной камере, на мембранных фильтрах);
 — методы непрямого подсчета (турбидиметрия, нефелометрия, кондуктометрия, визуальные методы с помощью оптических стандартных образцов мутности);

— методы определения жизнеспособных клеток микроорганизмов (мембранной фильтрации, посев на питательные среды, окраска селективными красителями).

Актуальность введения данной ОФС в ГФ XIII изд. продиктована необходимостью стандартизации методов определения концентрации микробных клеток. Описанные методы используются при микробиологических испытаниях качества ЛС, включая ИЛП и ветеринарные препараты, а также при других экспериментальных исследованиях в области микробиологии, включая валидационные испытания.

В данной ОФС методы биолюминесценции и проточной цитометрии, подробно описанные в ведущих мировых фармакопеях, представлены в качестве информации с указанием необходимости выполнения процедуры валидации перед их использованием. Особое внимание в ОФС уделено оптическому стандарту мутности как наиболее простому и широко распространенному в настоящее время непрямому методу определения количества микробных клеток. Среди

инструментальных методов в ОФС включен не описанный ни в одной мировой фармакопее метод электрочувствительных зон (Култера).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, несмотря на общую ярко выраженную тенденцию к гармонизации с ведущими мировыми фармакопеями, ГФ сохраняет индивидуальные особенности испытания качества ЛС по микробиологическим показателям. Развитие методов анализа происходит за счет внедрения новых технологий, автоматизации процесса и учета особенностей отдельных групп ЛС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bugno A, de Jesus Andreoli Pinto T. The influence of incubation conditions in sterility test. *PDA Journal of pharmaceutical science and technology* 2003; 57(6): 399–403.
2. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. Вып. 2. М.: Медицина; 1990.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. 12-е изд. Часть 1. М.: НЦЭСМП; 2007.
4. ОФС 42-0016-04. Методы микробиологического контроля лекарственных растительных средств, состоящих из одного вида сырья или нескольких (сборы) – фасованная продукция, а также растительного сырья «ангро». Москва; 2004.

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.
 Гунар Ольга Викторовна. Начальник лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества ЛС, д-р фарм. наук.
 Сахно Надежда Геннадьевна. Ведущий эксперт лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества ЛС, канд. фарм. наук.
 Новик Елена Самарьевна. Ведущий эксперт лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества ЛС, канд. биол. наук.
 Булгакова Галина Михайловна. Ведущий эксперт лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества ЛС.
 Колосова Людмила Васильевна. Эксперт 1-й категории лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества ЛС.
 Буйлова Ирина Александровна. Эксперт 1-й категории лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества ЛС.
 Рощина Марина Владимировна. Микробиолог лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества ЛС.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Гунар Ольга Викторовна; Gunar@exrmed.ru

THE DEVELOPMENT OF MICROBIOLOGICAL METHODS FOR DRUG ANALYSIS

O. V. Gunar, N. G. Sakhno, E. S. Novik, G. M. Bulgakova, L. V. Kolosova,
 I. A. Buylova, M. V. Roshchina

Federal State Budgetary Institution
 «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
 of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

Abstract: The article presents the review of the national regulatory documents on drug testing for microbiological characteristics, such as «Sterility», «Microbiological Purity» etc. It discusses the history of the establishment of characteristics and the elaboration of the related general pharmacopoeia monographs, as well as prospects for the development of methods in connection with the publication of the Russian State Pharmacopoeia XIII edition. There is a clear trend towards harmonization with the leading world pharmacopoeias, but the Russian State Pharmacopoeia maintains the individual characteristics of drug quality analysis in terms of microbiological characteristics, including the introduction of new technologies, process automation and taking into account the special features of individual drug groups.

Key words: microbiological characteristics; sterility; microbiological purity; vitamin content; concentration of microbial cells; preservative effectiveness.

For citation: Gunar OV, Sakhno NG, Novik ES, Bulgakova GM, Kolosova LV, Buylova IA, Roshchina MV. The development of microbiological methods for drug analysis. *Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin* 2016; (1): 15–18.

REFERENCES

1. Bugno A, de Jesus Andreoli Pinto T. The influence of incubation conditions in sterility test. *PDA Journal of pharmaceutical science and technology* 2003; **57**(6): 399–403.
2. State Pharmacopoeia of the USSR. 11th ed. Issue 2. Moscow: Meditsina; 1990 (in Russian).
3. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 12th ed. Part 1. Moscow: NCESMP; 2007 (in Russian).
4. General Monograph 42-0016–04. Methods of microbiological control of medicinal plant resources, consisting of one or more kinds of raw materials (charges) – packaged products as well as vegetable raw materials in bulk. Moscow; 2004 (in Russian).

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard, 8–2, Moscow, 127051, Russian Federation.

Gunar OV. Head of Laboratory of microbiology of Test Center of Quality Expertise of Medicines. Doctor of Pharmaceutical Sciences.

Sakhno NG. Leading expert of Laboratory of microbiology of Test Center of Quality Expertise of Medicines. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Novik ES. Leading expert of Laboratory of microbiology of Test Center of Quality Expertise of Medicines. Candidate of Biological Sciences.

Bulgakova GM. Leading expert of Laboratory of microbiology of Test Center of Quality Expertise of Medicines.

Kolosova LV. 1st category expert of Laboratory of microbiology of Test Center of Quality Expertise of Medicines.

Buylova IA. 1st category expert of Laboratory of microbiology of Test Center of Quality Expertise of Medicines.

Roshchina MV. Microbiologist of Laboratory of microbiology of Test Center of Quality Expertise of Medicines.