

# Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© О. В. Гунар, 2003

О. В. Гунар

## ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ И ГРИБОВ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ ИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ. АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ АГАРОВЫЙ МЕТОД

Институт Государственного контроля лекарственных средств, Москва

Согласно правилам GMP методы, используемые для контроля качества лекарственных средств, должны быть валидированы. Цель валидации метода — показать посредством оценки специфических характеристик, что данный метод соответствует предназначенным целям [1].

При определении качества лекарственных средств по показателю “Микробиологическая чистота” по методике, представленной в Государственной фармакопее XI, анализ количественного содержания аэробных бактерий и грибов проводят двухслойным агаровым методом [2]. Использование любого другого агарового метода посева требует валидации и фактического обоснования.

В данной работе рассматриваются фактические данные по валидации альтернативного агарового метода количественного определения аэробных бактерий и грибов в нестерильных лекарственных средствах, названного нами малым глубинным (МГ).

При выполнении подобного рода исследований используемые питательные среды должны быть отвалидированы, средства измерения поверены, качество тест-микроорганизмов подтверждено сертификатами коллекций.

Валидация выполняется в следующей последовательности:

1. Написание протокола
2. Выполнение задач, перечисленных в протоколе
3. Внесение в документацию результатов испытаний
4. Оценка результатов испытаний для того, чтобы подтвердить, что они соответствуют требованиям протокола
5. Написание отчета по валидации

Далее представлен протокол валидации, по результатам выполнения которого нами составлен отчет, а малый глубинный метод посева рекомендован в качестве альтернативного при контроле качества лекарственных средств.

*Протокол валидации метода количественного определения аэробных бактерий и грибов, выделяемых из нестерильных лекарственных средств*

**I. Описание метода.** В качестве альтернативного метода посева для количественного определения аэробных бактерий и грибов, выделяемых из лекарст-

венных средств, предлагается модификация чашечного агарового метода МГ.

В стерильную чашку Петри вносили 1 мл исследуемого раствора (взвеси тест-микроорганизмов, суспензии, эмульсии) образца лекарственного средства, добавляли 5–7 мл расплавленной и охлажденной до температуры 45°C питательной среды N1 (для аэробных бактерий), N2 (для дрожжевых и плесневых грибов) и тщательно перемешивали. После застывания среды чашки Петри переворачивали и инкубировали при температуре 32,5–25°C для количественного определения бактерий и 22,5–25°C для количественного определения грибов в течение 3–5 суток.

**II. Критические параметры, подлежащие оценке.**

**1. Точность** — это отклонение найденного значения величины от ее истинного значения. Точность показывает способность количественного метода определять те микроорганизмы, которые были внесены искусственно или естественно контаминировали лекарственные средства. Необходимо протестировать минимум три контрольные взвеси разных тест-микроорганизмов: аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов. Средний результат должен находиться в пределах от 95 до 105 %.

**2. Сходимость.** Состоит из двух главных компонентов: повторяемости и воспроизводимости.

Повторяемость — один и тот же образец при одних и тех же условиях анализирует один и тот же микробиолог, используя минимум 6 чашек Петри. Повторяемость оценивается величиной относительного стандартного отклонения, которое должно быть не более 5 %.

Воспроизводимость — один и тот же образец в разных условиях (на разных питательных средах, из разных взвесей тест-микроорганизмов) анализируют разные микробиологи.

**3. Устойчивость.** Рассматривают данные многократных анализов естественно контаминированных образцов лекарственных средств.

### III. Программа проведения валидации.

1. Определение количественного содержания аэробных бактерий и грибов в модельных опытах с использованием следующих тест-микроорганизмов, полученных из коллекций с соответствующими сертификатами:

1. аэробные бактерии *Bacillus cereus* ATCC 10702, *B. subtilis* ATCC 6633
2. плесневые грибы *Aspergillus niger* ATCC 9642, *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* ВКМ F-265,
3. дрожжевые грибы *Saccharomyces cerevisiae* ВКМУ-56
4. дрожжеподобные патогенные грибы *Candida albicans* ATCC 1 – 0/11, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Candida albicans* ССМ 55/79.

Выбор тест-культур определяли как рекомендациями [3], так и спектром микроорганизмов, наиболее часто выделяемых из нестерильных лекарственных средств.

2. В качестве естественно контаминированных использование следующих лекарственных средств: Аллохол таблетки, покрытые оболочкой, Альмагель, Гипозоль, Желчь медицинская консервированная, Карсил 50 капсул, Карсил 100 капсул, Ортосифона тычиночного листа, Парацетамол таблетки, Пиперазина адипинат раствор, Финлепсин таблетки, Хай-Трим суспензия, Холензим таблетки.

3. Исследование количественного содержания бактерий и грибов на питательных средах, прошедших валидацию согласно [4].

4. Сравнение результатов от посева малым глубинным методом с данными, полученными другими чашечными методами, а именно: 2-х слойного, поверхностного, глубинного.

5. Данные, представленные в таблицах, соответствовали требованиям согласно всем критическим параметрам.

#### 5.1. Точность.

Средний результат отражал количество аэробных бактерий и грибов с точностью в пределах от 95 % до 105 %.

#### 5.2. Сходимость.

5.2.1. Повторяемость. Выражается величиной относительного стандартного отклонения (не более 5 %). Микробиолог анализировал каждый образец, делая посев минимум на 6 чашках Петри.

5.2.2. Воспроизводимость. Разные микробиологи (3 человека) выполняли анализы образцов и получили воспроизводимые результаты.

#### 5.3. Устойчивость

Данные многократных анализов естественно контаминированных лекарственных средств не противоречили данным, полученным при посеве тест-микроорганизмов.

### Отчет о валидации. 1. Назначение

При контроле качества НЛС по показателю “Микробиологическая чистота” особое значение имеет правильный выбор метода количественного определения микроорганизмов. Жесткая регламентация допустимого в 1 г лекарственного средства количества микроорганизмов-контаминантов требует использования методов, позволяющих получать достоверные, хорошо воспроизводимые количественные характеристики микрофлоры, содержащейся в исследуемых образцах. При этом следует учитывать как видовые морфологические особенности выделенных штаммов, так и лекарственную форму, природу и способы применения лекарственного средства.

Наиболее стандартными методами количественного определения аэробных бактерий и грибов в НЛС, рекомендованными фармакопеями, являются:

– Глубинный чашечный метод [5],

– Двухслойный агаровый [2].

Однако в ряде случаев их использование не всегда оправдано. Например, грибы из родов *Mucor*, *Rhizopus* и др., рост которых не замечен через 24 ч инкубации, через 48 ч покрывают всю поверхность агаризованной среды в чашке Петри, делая невозможным подсчет отдельных колониеобразующих единиц (КОЕ) [6]. Среди аэробных бактерий также отмечены представители рода *Bacillus*, склонные к сливному, ползучему росту колоний.

Медленно растущие организмы, напротив, образуют колонии лишь через 5 – 7 сут инкубации, удлинняя таким образом сроки микробиологического анализа.

Трудности подобного рода количественного определения аэробных бактерий и грибов побудили изыскать метод, позволяющий получать достоверные результаты контроля качества НЛС в том случае, когда рутинные методы недостаточно эффективны, и валидировать его.

Было проведено сравнительное изучение 4-х вариантов чашечного агарового методов посева: 2-х слойного, поверхностного, глубинного в двух модификациях, а именно с использованием 15 – 20 мл (БГ — большой глубинный) и 5 – 7 мл (МГ) агаровой среды.

### 2. Краткое описание отвалидированного метода.

В стерильную чашку Петри вносили 1 мл исследуемого раствора (взвеси тест-микроорганизмов, суспензии, эмульсии) образца лекарственного средства, добавляли 5 – 7 мл расплавленной и охлажденной до температуры 45°C питательной среды и тщательно перемешивали. После застывания среды чашки Петри переворачивали и инкубировали при температуре (32,5 2,5)°C для количественного определения бактерий и (22,5 2,5)°C для количественного определения грибов в течение 3 – 5 суток.

3. Используемые тест-микроорганизмы и питательные среды. Культивирование тест-штаммов

Таблица 1  
Количество КОЕ тест-микроорганизмов при различных методах посева

Тест-штамм	Методы посева							
	поверхностный		2-х слойный		глубинный		малый глубинный	
1. <i>B. cereus</i>	71	1	84	2	68	2	108	4
2. <i>B. subtilis</i>	112	6	125	6	147	6	160	6
3. <i>A. niger</i>	131	3	153	4	89	3	190	5
4. <i>P. verrucosum</i>	41	1	59	3	57	3	70	3
5. <i>S. cerevisiae</i>	60	1	60	2	58	1	64	3
6. <i>C. albicans</i>	44	1	31	6	36	2	39	1

## Количественное определение аэробных бактерий в контаминированных препаратах (КОЕ/г)

Наименование препарата	Методы посева			
	поверхностный	2-х слойный	глубинный	малый глубинный
1. Альмагель	(2,4 0,1)10 <sup>6</sup>	(2,6 0,2)10 <sup>6</sup>	(3,0 0,1)10 <sup>6</sup>	(3,0 0,1)10 <sup>6</sup>
2. Феназепам таблетки (образец 1)	(1,93 0,03)10 <sup>4</sup>	(1,24 0,03)10 <sup>4</sup>	(1,43 0,04)10 <sup>4</sup>	(1,47 0,02)10 <sup>4</sup>
3. Феназепам таблетки (образец 2)	(4,5 0,1)10 <sup>3</sup>	(4,8 0,2)10 <sup>3</sup>	(4,4 0,2)10 <sup>3</sup>	(6,6 0,3)10 <sup>3</sup>
4. Феназепам таблетки (образец 3)	(1,51 0,02)10 <sup>4</sup>	(1,27 0,02)10 <sup>4</sup>	(1,06 0,02)10 <sup>4</sup>	(1,59 0,03)10 <sup>4</sup>
5. Ортосифона тычиночного листья	(2,1 0,3)10 <sup>8</sup>	(2,1 0,2)10 <sup>8</sup>	(2,1 0,1)10 <sup>8</sup>	(2,1 0,1)10 <sup>8</sup>

## Количественное определение дрожжевых грибов в контаминированных препаратах (КОЕ/г)

Наименование препарата	Методы посева			
	поверхностный	2-х слойный	глубинный	малый глубинный
1. Желчь медицинская консервированная	(3,0 0,1)10 <sup>3</sup>	(6,0 0,2)10 <sup>3</sup>	(5,0 0,2)10 <sup>3</sup>	(6,0 0,2)10 <sup>3</sup>
2. Карсил 100 капсул	(1,3 0,2)10 <sup>4</sup>	(1,3 0,2)10 <sup>4</sup>	(1,0 0,2)10 <sup>4</sup>	(1,4 0,4)10 <sup>4</sup>
3. Карсил 50 капсул	(2,8 0,1)10 <sup>4</sup>	(1,7 0,2)10 <sup>4</sup>	(1,3 0,2)10 <sup>4</sup>	(2,2 0,1)10 <sup>4</sup>
4. Пиперазина адипинат раствор (образец 1)	(3,2 0,1)10 <sup>4</sup>	(2,5 0,3)10 <sup>4</sup>	(3,0 0,1)10 <sup>4</sup>	(3,4 0,1)10 <sup>4</sup>
5. Пиперазина адипинат раствор (образец 2)	(3,2 0,1)10 <sup>4</sup>	(2,3 0,2)10 <sup>4</sup>	(2,0 0,3)10 <sup>4</sup>	(2,7 0,1)10 <sup>4</sup>
6. Пиперазина адипинат раствор (образец 3)	(1,9 0,1)10 <sup>4</sup>	(0,9 0,2)10 <sup>4</sup>	(2,4 0,2)10 <sup>4</sup>	(2,7 0,2)10 <sup>4</sup>
7. Пиперазина адипинат раствор (образец 4)	(1,1 0,1)10 <sup>4</sup>	(1,1 0,2)10 <sup>4</sup>	(1,0 0,1)10 <sup>4</sup>	(1,2 0,2)10 <sup>4</sup>
8. Хай-Трим суспензия	(4,4 0,2)10 <sup>3</sup>	(4,0 0,1)10 <sup>3</sup>	(4,0 0,2)10 <sup>3</sup>	(4,2 0,1)10 <sup>3</sup>

## Количественное определение плесневых грибов в контаминированных препаратах (КОЕ/г)

Наименование препарата	Методы посева			
	поверхностный	2-х слойный	глубинный	малый глубинный
1. Аллохол таблетки	194 4	222 6	204 5	236 2
2. Гипозоль(образец 1)	250 4	210 1	190 3	260 1
3. Гипозоль(образец 2)	200 8	190 1	100 2	230 4
4. Желчь медицинская консервированная	100 1	85 6	72 4	105 1
5. Парацетамол таблетки	(6,3 0,1)10 <sup>3</sup>	(6,2 0,1)10 <sup>3</sup>	(6,0 0,2)10 <sup>3</sup>	(7,1 0,3)10 <sup>3</sup>
6. Финлепсин таблетки	(1,8 0,5)10 <sup>4</sup>	(6,3 0,2)10 <sup>4</sup>	(6,6 0,1)10 <sup>4</sup>	(6,9 0,1)10 <sup>4</sup>
7. Холензим таблетки	250 8	300 6	300 2	350 8

аэробных бактерий и контаминированных бактериями образцов препаратов проводили на среде № 1 (ГФ XI изд. или приготовленной из сухой, производства ГНЦПМ Оболенск, Московская обл.). Культивирование грибов проводили на агаризованной среде № 2 (Сабура).

В качестве тест-микроорганизмов использовали следующие штаммы:

1. Аэробных бактерий *Bacillus cereus* ATCC 10702
2. Плесневых грибов *Aspergillus niger* ATCC 9642, *Penicillium verrucosum* var. *Cyclopium* ВКМ F-265
3. Дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* ВКМ Y-56
4. Дрожжеподобных патогенных грибов *Candida albicans* ATCC 1-0/11, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Candida albicans* ССМ 55/79.

Выбор тест-культур определяли как рекомендациями [2, 3], так и спектром микроорганизмов, наиболее часто выделяемых из ЛС.

Культуры выращивали на скошенных средах № 1 и № 2 для аэробных бактерий и грибов соответственно. Время инкубации бактерий 24 ч при температуре (32,5 2,5) °С, грибов — от 48 ч дрожжевых и дрожжеподобных до 5–7 сут плесневых при температуре (22,5 2,5) °С.

Полученные культуры смывали стерильным раствором натрия хлорида 0,9 % изотоническим, для смыва плесневых грибов в раствор добавляли 0,1 % твина-80. Взвеси тест-микроорганизмов стандартизовали по Международному стандарту мутности 10 ЕД до концентрации 10<sup>7</sup> КОЕ/мл. Для определения количества

конидий плесневых грибов в полученном смыве использовали камеру Горяева.

Для сравнения различных методов посева использовали суспензию клеток (конидий) с концентрацией  $10^3$  КОЕ/мл для поверхностного метода и  $10^2$  КОЕ/мл для остальных вариантов. По окончании инкубации подсчитывали число колоний на чашках Петри, вычисляли среднее значение из 6 и более результатов определения, которые представлены в табл. 1 – 4.

Результаты количественного определения аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов, полученные различными методами, имели достоверные различия. Цифровые значения имели один тот же порядок величины.

При посеве поверхностным методом аэробных бактерий, дрожжевых и дрожжеподобных грибов наблюдали развитие наиболее выраженных, не диссоциированных колоний, характерных по морфологии и легко сосчитываемых. Однако при использовании этого метода количество образца, вносимого на поверхность агара (0,1 мл), менее представительно по сравнению с другими методами (1,0 мл). Кроме того, при определении числа бактерий и грибов в 1 г (мл) контролируемого лекарственного средства возрастает процент ошибки в связи с умножением на коэффициент разведения не менее 100.

Колонии микроорганизмов, полученные на чашках Петри после других методов посева, несколько разли-

чались по размерам, однако это не оказывало влияния на их количественный учет.

Результаты сравнения разных методов посева свидетельствуют о достаточной эффективности предложенной нами модификации глубинного метода посева микроорганизмов, названной малым глубинным методом.

Проведенная валидация обосновывает применение малого глубинного метода посева микроорганизмов в качестве альтернативного при количественном определении бактерий и грибов, контаминирующих лекарственные средства на основании следующих показателей — ускоренному образованию колоний, четкому, компактному формированию колоний, облегченному количественному учету результатов, экономичности (используется в 4 – 5 раз меньше питательной среды).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Thirty-second Report of WHO Expert Committee on specifications for Pharmaceutical Preparations*, WHO Technical Report Series No 823, Geneva, (1992), pp. 117 – 121.
2. *Государственная фармакопея СССР XI изд.*, вып. 2, т. 2, Москва (1990), сс. 193 – 200.
3. Изменение № 2 к ГФ XI изд. “Методы микробиологического контроля лекарственных средств” от 14.08.2001 г.
4. ВФС 42-3455-99 “Определение ростовых свойств питательных сред, используемых для испытания на стерильность и микробиологическую чистоту лекарственных средств”.
5. USP 24.
6. О. В. Гунар, К. А. Каграманова, *Хим.-фарм. журн.*, **25**(11), 74 – 75 (1991).

Поступила 11.06.02