

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2005

О. В. Гунар, К. А. Каграманова

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Институт контроля лекарственных средств
ФГУ "НЦ ЭСМП" МЗ РФ, Лаборатория микробиологии

В статье рассматриваются методы определения антимикробного действия нестерильных лекарственных средств. Проводится сравнение модифицированного метода ГФХI изд. и альтернативного метода репликаций, рекомендованного для водонерастворимых и окрашенных препаратов. В статье обозначены преимущества альтернативного метода репликаций, а именно: возможность использования только 2-х агаризованных сред - экономичность; получение результатов, как правило, через 24 – 72 ч; широкий набор тест-микрорганов. Целесообразность применения альтернативного метода определения антимикробного действия обоснована, прежде всего, природой лекарственного средства.

Лекарственные средства (ЛС), обладающие антимикробным действием, могут подавлять рост отдельных видов бактерий и грибов. Если исследуемый препарат оказывает ингибирующее действие на микроорганизмы, которые выявляют в нестерильных лекарственных средствах (НЛС), необходимо адекватно инактивировать антимикробное действие во избежание неправильной оценки результатов испытания на микробиологическую чистоту.

В Государственной фармакопее XI изд. представлен метод определения антимикробного действия НЛС [1]. Однако в некоторых случаях этот метод не является оптимальным по следующим причинам:

1. концентрация водонерастворимых НЛС, выпадающих в осадок в буферном растворе и питательных средах, не соответствует расчетной;
2. при посеве некоторых НЛС жидкие среды (N3, N8) мутнеют, меняют свою первоначальную окраску, что исключает возможность визуально определить рост тест-микрорганов;
3. использование восьми питательных сред и 5 г лекарственного средства значительно повышает стоимость анализа;
4. в случаях значительной контаминации лекарственного средства рост сопутствующей микрофлоры не позволяет учесть результаты определения их антимикробного действия.

Учитывая вышесказанное, изучалась возможность совершенствования метода определения антимикробного действия НЛС. Целью работы было сравнение аналогичных методов, имеющих в зарубежных фармакопеях и нормативных документах (НД), и выбор наиболее оптимального варианта. В случае отсутствия последнего планировалась разработка метода, позволяющего в более сжатые сроки и с использованием меньшего количества питательных сред установить наличие антимикробного действия испытуемого препарата. На первом этапе было проведено сравнительное изучение методов определения

антимикробного действия НЛС, представленных в фармакопеях и НД на лекарственные средства.

1. *Чашечный агаровый метод определения антимикробного действия НЛС приведен в Фармакопее ЧССР [2].*

Методика испытания. В стерильную чашку Петри вносят 1 мл исследуемого разведения препарата и 0,1 мл суточной бульонной культуры тест-микрорганов, разведенной стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до 1:1000 или 1:10000. Добавляют 5 – 7 мл соответствующей питательной агаризованной среды, расплавленной и охлажденной до $(45 \pm 5)^\circ\text{C}$, тщательно перемешивают. После застывания агара чашки помещают в термостат при температуре $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ и инкубируют посевы бактерий 3-х суток, а затем еще 3 суток при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$. Посевы грибов инкубируют при температуре $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ в течение 6 суток. Контролем служат чашки Петри с культурой и средой, не содержащие исследуемое разведение препарата. После окончания сроков инкубации, т.е. по появлению типичного роста тест-микрорганов в контрольных чашках без препарата, отмечали наличие или отсутствие роста тест-штаммов бактерий и грибов на средах, в которые вносили различные разведения препарата.

2. *Метод определения антимикробного действия НЛС с помощью лунок (НД на лекарственные лосьоны, Венгрия).*

Методика испытания. В стерильную чашку Петри вносят 0,1 мл суточной бульонной культуры тест-микрорганов, разведенной стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до 1:1000, добавляют 15 – 20 мл соответствующей питательной среды, расплавленной и охлажденной до $(45 \pm 2)^\circ\text{C}$, тщательно перемешивают. После застывания агара делают стандартные лунки диаметром 8 мм, в которые вносят по 0,1 мл исследуемого разведения препарата.

Чашки помещают в термостат и инкубируют посевы бактерий при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч.

После окончания срока инкубации измеряют диаметры зон задержки роста каждого тест-микробного организма.

При сравнительной оценке представленных выше методов определения антимикробного действия НЛС были отмечены следующие недостатки:

Метод, рекомендованный [2], по длительности превышает сроки испытания по ГФ XI изд [1] и USP 21 [3].

Метод лунок, рекомендованный на некоторые венгерские препараты, можно использовать только для водорастворимых препаратов. Кроме того, не указан стандарт, с которым сравнивают антимикробное действие НЛС. Сроки проведения испытания — 24 ч — не позволяют использовать тест-культуру дрожжевых и плесневых грибов.

В связи с невозможностью применить вышеуказанные методы для определения антимикробного действия различных НЛС, независимо от природы и лекарственной формы, были разработаны варианты определения антимикробного действия — модификация метода ГФ XI изд. с использованием как плотных, так и жидких питательных сред, и метод репликаций, включающий только две агаризованные питательные среды. Оба метода основаны на использовании тест-микроорганизмов как бактерий, так и грибов.

Материалы и методы. Для выполнения сравнительных экспериментов определения антимикробного действия нами были использованы:

1. Лекарственные препараты: Деготь березовый (жидкость темно-коричневого цвета), Димедрол таблетки (при растворении — стойкая суспензия белого цвета), Дротаверина гидрохлорид таблетки 0,08 г (при растворении — стойкая суспензия желтого цвета), Йодинол (жидкость темно-синего цвета), Олифен таблетки (черного цвета), Тамоксифена цитрат таблетки 0,01 г (при растворении —

суспензия белого цвета), Ундецин мазь (сине-голубого цвета), Фукорцин (жидкость ярко-малинового цвета), Хлорофиллипт 1 % спиртовой раствор (жидкость зелено-го цвета с опалесценцией после растворения), Эмульсия пихтовой смолы (коричневого цвета). Все исследуемые лекарственные средства представляли собой либо нерастворимые в воде, либо окрашенные вещества.

2. Тест-микроорганизмы: *Bacillus cereus* ATCC¹ 10702, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella abony* ИНЕ 103/39, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Aspergillus niger* ATCC 9642 (ATCC¹ — Американская коллекция типовых культур).

Тест-штаммы *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. Aeruginosa*, *S. aureus* получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ГИСК им. Л. А. Тарасевича (Москва). Штамм *C. albicans* получали из Всероссийского микологического Центра (Санкт-Петербург), штамм *A. niger* — из Всероссийской коллекции микроорганизмов РАН (Москва).

Используемые тест-штаммы были типичным по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам.

Тест-штаммы бактерий хранили при температуре (5 ± 1) °С в лиофилизированном состоянии или под слоем стерильного вазелинового масла на полужидком агаре следующего состава: панкреатического гидролизата казеина — 8,0 г, натрия хлорида — 5,0 г, агара — 5,0 г, воды дистиллированной — 1000 мл, pH среды после стерилизации 7,1 ± 0,2.

Тест-культуру *C. albicans* хранили на среде N2 (агар Сабуру), в которой количество агара уменьшено до 1 %. Тест-культуру *A. niger* хранили на среде N2 (агар Сабуру) (Госфармакопей XI изд., вып. 2, с. 200), делая пересевы через каждые 3 мес.

Таблица 1

Определение антимикробного действия лекарственных средств различными методами

Наименование препарата	Метод*	Разведение ЛС для снятия антимикробного действия в отношении тест-микроорганизмов								
		<i>B. cereus</i>	<i>B. subt.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. abony</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albic.</i>	<i>A. niger</i>	
1. Деготь березовый	1	1:20	1:20	1:10	1:10	1:10 пересев	1:20 пересев	1:10	1:10	
	2	1:20	1:20	1:10	1:10	1:10	1:20	1:10	1:10	
2. Димедрол таблетки	1	1:50	1:50	1:50	1:50	1:10	1:50	1:20	1:10	
	2	1:50	1:50	1:50	1:50	1:10	1:50	1:10	1:10	
3. Дротаверина гидрохлорид таблетки 0,08 г	1	1:200	1:200	1:10	1:10	1:10	1:200	1:20	1:10	
	2	1:200	1:200	1:10	1:10	1:10	1:200	1:10	1:10	
4. Йодинол	1	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:50	
	2	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	
5. Олифен таблетки	1	1:50	1:50	1:10 пересев	1:10 пересев	1:10 пересев	1:10 пересев	1:10	1:10	
	2	1:50	1:50	1:10	1:10	1:100	1:100	1:10	1:10	
6. Тамоксифена цитрат таблетки 0,01 г	1	1:200	1:200	1:10	1:10	1:10	1:500	1:10	1:10	
	2	1:200	1:200	1:10	1:10	1:10	1:500	1:10	1:10	
7. Ундецин мазь	1	1:50	1:50	1:10 пересев	1:10 пересев	1:10 пересев	1:50 пересев	1:100	1:100	
	2	1:50	1:50	1:10	1:10	1:10	1:50	1:100	1:100	
8. Фукорцин	1	1:50	1:50	1:10 пересев	1:10 пересев	1:10 пересев	1:10 пересев	1:20	1:20	
	2	1:50	1:50	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	
9. Хлорофиллипт 1 % спиртовой раствор	1	1:200	1:200	1:10	1:10	1:10	1:50	1:10	1:10	
	2	1:200	1:200	1:10	1:10	1:10	1:50	1:10	1:10	
10. Эмульсия пихтовой смолы	1	1:10	1:10	1:10 пересев	1:10 пересев	1:10	1:10 пересев	1:10	1:10	
	2	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	

Обозначение: *1 — результаты получены методом 1, 2 — результаты получены методом репликаций.

Лиофилизированную культуру тест-штамма из ампулы или со среды хранения переносили в пробирки с питательным бульоном: среда N8 для бактерий, жидкая среда Сабуро — для *C. albicans*. Посевы на среде N8 инкубировали при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ в течение 18–24 ч, посевы на жидкой среде Сабуро — при температуре $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. Посевы *A. niger* на среде N2 инкубировали при температуре $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ до появления черных или темно-коричневых экзогенных спор (конидий) в течение 5–7 суток.

Перед определением антимикробного действия НЛС культуры тест-штаммов бактерий пересевали на среду N8 (питательный бульон) и инкубировали при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ в течение 18–24 ч. Культуры грибов выращивали заранее: *C. albicans* — на жидкой среде Сабуро 48 ч, а *A. niger* — на среде N2 за 5–7 суток до начала испытания.

3. Питательные среды и растворители:

Согласно [1] для определения антимикробного действия ЛС использовали следующие питательные среды: среды N1, N8 — для выращивания бактерий, среда N2, жидкая среда Сабуро — для выращивания грибов, среды №3, №4 — для обогащения и идентификации бактерий сем. *Enterobacteriaceae*, среда N9 — для идентификации *Pseudomonas aeruginosa*, среда N10 — для идентификации *Staphylococcus aureus*, фосфатный буферный раствор с натрия хлоридом и пептоном, pH 7,0, раствор натрия хлорида 0,9 % изотонический.

Проведение испытания. Готовили разведения препарата 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, используя фосфатный буферный раствор (ГФ XI изд.). Для приготовления эмульсий в раствор добавляли 2,5 % твина-80.

Суточные бульонные культуры бактерий и *C. albicans* разводили методом десятикратных серийных разведений стерильным раствором натрия хлорида 0,9 % изотониче-

ским не менее, чем 1:10000. Культуру *A. niger* смывали со скошенного агара фосфатным буферным раствором с 0,1 % твина-80. Определяли количество конидий в 1 мл смыва, используя камеру Горяева или чашечный агаровый метод, и разводили до концентрации $10^3 - 10^4$ КОЕ/мл.

Испытание проводили 2 описанными методами.

1. Метод 1 (модификация метода ГФ XI изд.) [4]

Каждое разведение препарата вносили по 1 мл в чашки Петри диаметром 90 мм, в одни из которых добавляли по 0,2 мл взвеси культуры *B. cereus*, *B. subtilis*, а в оставшиеся — по 0,2 мл культур *C. albicans* и *A. niger*. Чашки с бактериями заливали 7–10 мл расплавленной и охлажденной до 45°C средой N1, чашки с культурами грибов — тем же количеством среды N2.

Далее вносили по 1 мл разведения в пробирки с 10 мл жидких сред N3 и N8, куда затем добавляли по 1 мл взвеси *E. coli*, *S. abony*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* соответственно средам, каждый микроорганизм отдельно. В контрольные чашки и пробирки вместо разведений препарата вносили такое же количество растворителя. Посевы на средах N1, 3, 8 инкубировали при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ в течение 2 сут (среды N3, 8) и 3–5 сут (среда N1). Посевы на среде N2 инкубировали при температуре $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ в течение 3–5 суток. После окончания сроков инкубации, т.е. по появлению типичного роста тест-микроорганизмов в контрольных чашках и пробирках без препарата, отмечали наличие или отсутствие роста тест-штаммов бактерий и грибов на средах, в которые вносили различные разведения препарата. В случае, если при внесении препарата в жидкие питательные среды (N3, 8) образовывалось помутнение или окраска среды изменялась, что препятствовало учету результатов, делали пересевы на агаризованные среды: со среды N3 на среду N4, со среды N8 на среды N9 и 10. В представленной табл. 1 это обозначено словом “пере-

Таблица 2

Антимикробное действие ЛРС, полученное различными методами

Наименование, разведение	Тест микроорганизмы по ГФ XI изд. и Изменению № 2 к ГФ XI изд.						
	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. abony</i> ГИСК 103/39	<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>C. albicans</i> ATCC 885 – 653	<i>A. niger</i> ATCC-9642
1. Эвкалипта прутовидного листья							
1:10	+	+	+	+	+	+	+
1:100	+	+	+	+	+	+	+
2. Листья толокнянки							
1:10	—	+	+	—	—	+	+
1:100	+	+	+	+	+	+	+
3. Шалфея листья							
1:10	+	+	+	+	+	+	+
1:100	+	+	+	+	+	+	+
4. Березовые почки							
1:10	+	+	+	+	+	+	+
1:100	+	+	+	+	+	+	+
5. Ноготков цветки							
1:10	±	+	+	+	+	+	+
1:100	+	+	+	+	+	+	+
6. Бадана корневище							
1:10	—	+	+	+	+	+	+
1:100	+	+	+	+	+	+	+
Контроль роста тест-штаммов	+	+	+	+	+	+	+

Обозначение: + — наличие роста тест-микроорганизмов; — — отсутствие роста тест-организмов; ± — замедленный или угнетенный рост тест-микроорганизмов

сев". При росте типичных колоний *E. coli* (среда N4), *P. aeruginosa* среда N9), *S. aureus* (среда N10) отмечали наличие роста тест-микроорганизма.

2. Метод репликаций (для водонерастворимых и окрашенных ЛС) — альтернативный

В случае, если лекарственное средство представляет собой водонерастворимое или окрашенное вещество, т.е. невозможно учесть результаты прямого посева в жидких питательных средах, без дополнительных пересевов на плотные среды, предпочтительнее выполнить определение антимикробного действия методом репликаций, т.е. воспользоваться альтернативным методом.

Для этого в стерильные чашки Петри вносили по 1 мл каждого разведения исследуемого препарата. В контрольные чашки вносили по 1 мл растворителя, используемого для получения разведений. В чашки Петри как в эксперименте, так и в контроле добавляли по 15 мл расплавленной и охлажденной до 45 °С среды N1, в другие — такое же количество среды N2 и быстро перемешивали. После застывания агара чашки подсушивали для удаления конденсата с поверхности среды, на которую затем бактериологической петлей или репликатором наносили инокулят каждого тест-штамма бактерий и грибов в виде бляшек на среды N1 и 2 соответственно. Чашки со средой N1 инкубировали при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 48 ч. Чашки со средой N2 инкубировали при температуре (22,5 ± 2,5) °С в течение 3 – 5 сут. Наличие такого же роста тест-микроорганизмов, как в контроле, обозначали знаком "+", отсутствие роста — знаком "—"; слабый, замедленный или ограниченный рост обозначали знаком ±. Сравнение результатов, полученных двумя методами определения антимикробного действия водонерастворимых и окрашенных ЛС, представлено в табл. 1.

Следует отметить еще один аспект проблемы определения антимикробного действия. В некоторых случаях само лекарственное средство с неизвестным антимикробным действием бывает контаминировано различными микроорганизмами. В таком случае сопутствующая микрофлора безусловно изменит настоящую картину при внесении тест-штаммов бактерий и грибов в жидкие и агаризованные среды при проведении испытания методом 1. Использование метода репликаций в таком случае обосновано. Нами было проведено сравнение двух методов определения антимикробного действия таких образцов, как лекарственное растительное сырье. В подобных образцах обнаружена значительная микробная загрязненность из-за специфики получения лекарственного растительного сырья. При этом допустимые пределы количе-

ственного содержания аэробных бактерий и грибов имеют достаточно высокие значения, а именно: в 1 г лекарственного растительного сырья допускается наличие не более 10⁷ аэробных бактерий, 10⁵ дрожжевых и плесневых грибов, 10² *E. coli* [4].

Результаты определения антимикробного действия лекарственного растительного сырья двумя методами представлены в табл. 2. В случаях определения антимикробного действия лекарственных средств, высоко контаминированных микроорганизмами, предпочтительнее проводить испытание методом репликаций, так как при посеве микроорганизмов на питательные среды согласно модифицированному методу невозможно учесть результаты из-за сопутствующего роста микрофлоры, содержащейся в образцах. При использовании метода репликаций на поверхности агаризованной среды № 1 со сплошным ростом сопутствующей микрофлоры, отмечается рост тест-штамма *B. cereus* в виде бляшек. Таким образом, можно определить наличие или отсутствие антимикробного влияния образца, а присутствующие микроорганизмы-контаминанты не являются помехой при учете результатов.

Экспериментальные данные, полученные в результате определения антимикробного действия водонерастворимых и окрашенных лекарственных средств, показали аналогичные результаты между двумя используемыми методами в представленных случаях. В качестве выводов следует указать на преимущества альтернативного метода:

- Для определения антимикробного действия ЛС требуются только 2 агаризованные среды.
- Количество тест-штаммов микроорганизмов, помимо рекомендованных, может быть увеличено, даже при использовании всего 2-х чашек Петри. При широком наборе тест-микроорганизмов целесообразно нанесение инокулята на поверхность агаризованной среды с помощью репликатора.
- Результаты, как правило, можно получить через 24 – 72 ч.
- Не требуется дополнительный пересев из накопительных сред на дифференциально-диагностические.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР XI изд., вып. 2, Москва (1990), т. 2, с. 193 – 200.
2. Фармакопея ЧССР 4 изд., Прага (1987).
3. USP 21, Rockwill (1985).
4. Изменение № 2 к Государственной Фармакопее XI изд. "Методы микробиологического контроля лекарственных средств", Москва (2001).

Поступила 15.04.03

METHODS FOR ESTIMATING THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NONSTERILE PHARMACEUTICAL PREPARATIONS

O. V. Gunar and K. A. Kagramanova

Institute for State Control of Drugs, State Scientific Center for Drug Expertise and Control, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Two methods for evaluation of the antimicrobial activity of nonsterile pharmaceutical preparations are compared: (i) a modified method according to the State Pharmacopoeia (XIth Ed.) and (ii) an alternative spot (replica) technique applicable to water-insoluble products and also to fatty and colored preparations. The spot method has an advantage of being economic (use of only two culture media), fast (24 – 72 hours), and universal (admitting the use a broad set of microbes). The final choice of the method is determined primarily by the nature of each particular preparation.