



Дисциплина

«Методы фармакопейного анализа»

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Лекция 13

(лектор: доцент, к.фарм.н. Тимофеева Ю.А.)

ВВЕДЕНИЕ

Микробиологический контроль — ключевой тип лабораторного контроля процессов производства фармацевтической продукции, позволяющий получать важные данные о качестве медицинских препаратов, а также о чистоте сырья и упаковочных материалов, используемых на предприятии. Этот вид контроля также применяется при исследовании качества промежуточных продуктов, объектов на производстве. Контроль микробиологической чистоты позволяет предотвратить выпуск нестерильной или загрязненной продукции, уменьшает риск микробиологического загрязнения в будущем, выявляет неблагоприятные тенденции, влияющие на сохранность и потребительские свойства лекарств.

Микробиологический контроль — обязательная часть GMP при производстве медицинских препаратов и лекарственных средств.

ВВЕДЕНИЕ

Фармацевтическая промышленность является одним из самых влиятельных бизнес-секторов в мире, объединяя государственные и частные организации, занимающиеся исключительно исследованиями, производством, сбытом и распределением фармацевтических химикатов для здоровья человека и животных. Анализ и контроль лекарственных средств в этом секторе крайне важны как для разработки новых лекарственных средств, так и для контроля существующих препаратов в целях обеспечения их качества, эффективности и безопасности.

Национальные фармакопеи являются основным правовым инструментом для обеспечения качества фармацевтической продукции.

Они включают стандарты качества и общие стандарты для производства лекарственных средств.

ВВЕДЕНИЕ

Эти стандарты охватывают, в частности, микробиологический контроль фармацевтических продуктов, сырья, воды, воздуха, оборудования или упаковочных материалов, с целью минимизации типа и количества присутствующих микроорганизмов (контаминации).

Микробная контаминация — наличие микроорганизмов (неприемлемых видов или недопустимого количества) в окружающей среде, исходном сырье, биологически активных (фармацевтических) субстанциях, промежуточных продуктах или готовых лекарственных препаратах. Микроорганизмы представляет собой серьезную опасность для фармацевтической промышленности, поскольку могут негативно влиять на целостность и безопасность продукта, снижать эффективность препаратов.

ВВЕДЕНИЕ

Основными источниками загрязнения являются воздух, сырье, оборудование, поверхности или даже сотрудники, выполняющие ту или иную деятельность. Фармакопеи разных стран предписывают производить контроль сырья и материалов, контроль качества готовой продукции и мониторинг производственной среды.

КРИТЕРИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ

При проведении **микробиологического контроля** фармацевтических препаратов, особое внимание уделяется двум ключевым аспектам.

- **Стерильность** — это полное отсутствие микроорганизмов.

Например, лекарственные средства для инъекций и инфузий, глазные капли, мази, пленки и другие препараты и вещества, которые должны быть стерильными согласно документации, должны быть лишены любых микроорганизмов;

- **Микробиологическая чистота** — это наличие ограниченного количества микроорганизмов, при условии отсутствия определенных видов, представляющих опасность для здоровья человека.



Рост микроорганизмов на различных питательных средах

КРИТЕРИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ

Нестерильные лекарственные средства (субстанции, различные формы препаратов — таблетки, капсулы, гранулы, растворы, суспензии, сиропы, мази, суппозитории и другие), а также вспомогательные вещества могут быть загрязнены микроорганизмами.

Основная цель проверки стерильности заключается в обнаружении наличия микроорганизмов в продуктах, которые должны быть стерильными, стерилизованными или асептически обработанными в соответствии с фармакопеями. Если результат теста на стерильность является удовлетворительным, это означает, что в исследуемом образце отсутствуют микроорганизмы.

Для этого используются различные методы.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

Мембранная фильтрация используется для проверки водных растворов, растворимых ингредиентов, масел и их растворов, мазей, кремов и других полутвердых веществ с высоким антибактериальным действием. Исключениями являются нерастворимые в воде или изопропилмиристате ингредиенты. Методика подразумевает несколько стадий исследования образца: смачивание мембран; подготовка проб и фильтрация их через мембранные фильтры; отмывка мембранных фильтров; добавление отфильтрованных осадков в питательную среду с последующим культивированием. Анализ проводится в установках открытого или закрытого типа, которые устроены так, что дают возможность переносить исследуемые вещества через мембранные фильтрующие системы в асептических условиях. Диаметр пор фильтра обычно составляет 0,45 мкм, что позволяет им улавливать микроорганизмы.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

Как правило, для водных, слабых спиртовых и масляных растворов используются фильтры из нитрата целлюлозы; для кислотных и концентрированных спиртовых растворов — фильтры из ацетата целлюлозы.

Метод прямого посева применяется для анализа шовных нитей, маслянистых жидкостей и других труднорастворимых компонентов. Питательные среды подготавливаются в лабораториях или используются готовые сухие промышленного производства. Для тестирования образца на наличие грибов применимы среда Сабуро или жидкая соево-казеиновая среда; для тестов на анаэробные и аэробные бактерии нужна жидкая тиогликолевая среда.



Средоварка до 122⁰С

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ

Выбор метода для оценки микробиологической чистоты зависит от типа препарата, от его физических, химических характеристик, от требований и нормативов.

Выделяют несколько основных методов:

- **чашечный агаровый метод** (глубинного, поверхностного, глубинно модифицированного, двухслойного типа); для культивирования бактерий подходит соево-казеиновый агар или сухая среда №1; культивирования плесневых или дрожжевых грибов применяются **агар Сабуро** с глюкозой или сухая среда №2;
- **метод мембранной фильтрации**, описанный выше;
- **метод определения наиболее вероятных чисел (НВЧ)**: применим для исследования образцов с пониженным уровнем загрязнения или в ситуациях, когда использование иных методов невозможно.

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ

Метод считается не очень точным, если сравнивать с остальными (чашечный агаровый метод, мембранная фильтрация). Он допустим к использованию только для целей подсчета общего количества микроорганизмов.

Когда стоит задача идентификации конкретных видов микроорганизмов, используются диагностические и селективные питательные среды, биохимические тесты, экспресс-тесты, микробиологические анализаторы.



Автоклав горизонтальный автоматический до 134⁰C

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ВОДЫ И ВОЗДУХА В ФАРМАЦЕВТИКЕ

Вода занимает ключевую роль в фармацевтической промышленности как наиболее часто используемое вещество. Она является не только составной частью продукта на различных этапах производства, но и основным средством обеспечения жизненного цикла процесса производства. Вода применяется в широком спектре операций, включая различные стадии синтеза, смешивания, реакции и очистки. Ее чистота и качество играют решающую роль в обеспечении эффективности и надежности процессов, а также в конечном качестве и стабильности фармацевтических продуктов. Поэтому вода тщательно отбирается, очищается и контролируется согласно строгим стандартам, чтобы гарантировать безопасность и эффективность производства фармацевтических препаратов.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ВОДЫ И ВОЗДУХА В ФАРМАЦЕВТИКЕ

Микробиологический анализ воды осуществляется методом мембранной фильтрации в асептической среде. Метод позволяет подсчитать общее количество аэробных микроорганизмов (бактерий, грибов), а также выявить наличие *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Для данного вида анализа применяются мембранные фильтры из нитрата целлюлозы с диаметром пор, не превышающим 0,45 мкм.

Для исследования чистоты воздуха в помещениях на фармацевтических производствах применяются различные методы, такие как седиментационный, аспирационный и метод мембранной фильтрации. Эти методы позволяют определить уровень загрязнения воздуха и обнаружить наличие микроорганизмов, частиц пыли или других потенциальных контаминантов.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ВОДЫ И ВОЗДУХА В ФАРМАЦЕВТИКЕ

Седиментационный метод основан на том, что микроорганизмы под действием силы тяжести или движения воздушных потоков оседают на поверхности питательной среды в открытых чашках Петри, которые выставляются на определенное время в воздушной среде.

Аспирационный метод опирается на использование импакторов (воздухозаборников), принцип работы которых подразумевает отделение из пробы воздуха или газовой смеси взвешенных частиц (пыли, аэрозоли, микроорганизмов) при помощи инерционного удара. Частицы осаждаются на собирающей емкости или поверхности, расположенной внутри импактора. Такими собирающими объектами могут быть пластиковые стрипы, кассеты или чашки Петри с питательными средами.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ВОДЫ И ВОЗДУХА В ФАРМАЦЕВТИКЕ

В качестве питательной среды для подсчета общего числа микроорганизмов (на кубометр воздуха (ОМЧ) используется мясо-пептонный агар (МПА). Если необходимо выявить санитарно-показательные микроорганизмы, нужны селективные и диагностические питательные среды. Подсчет числа колоний осуществляется вручную или посредством счетчиков колоний.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

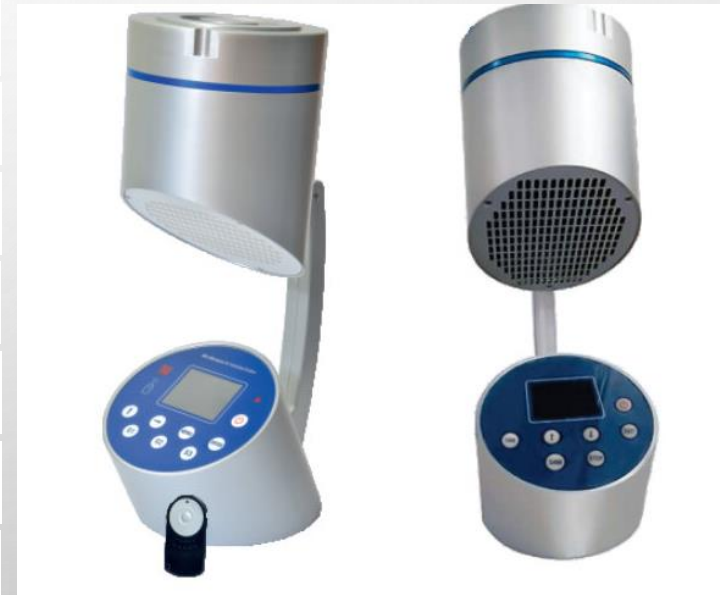
Современные питательные среды охватывают потребности в микробиологическом контроле как стерильных, так и нестерильных продуктов, а также воды и воздуха. Питательные среды разрабатываются в соответствии с высокими требованиями нормативных документов и подтверждаются сертификатами производства.

Для проведения микробиологического анализа воды и других жидкостей **методом мембранной фильтрации** применяются специальные фильтрующие устройства в виде коллекторов/гребенок с закрепленными на них воронками, с совместимыми или предусмотренными фильтрами из нитрата/ацетата целлюлозы диаметром 0,45 мкм. Модели коллекторов различаются количеством секций (1, 3 или 6), материалом изготовления (нержавеющая сталь или пластик (отдельные части, например воронки, могут быть также из стекла, а пробки из резины), объемом воронок (15-1000 мл).

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

Также используются закрытые фильтрационные системы, полностью исключаящие контакт с окружающей средой, где фильтрат собирается в ресивере, а фильтр-влагоотделитель препятствует попаданию капель влаги в камеру вакуумного насоса. Системы полностью укомплектовываются.

Для проведения микробиологического анализа воздуха применяются воздухозаборники (импакторы) со скоростью всасывания до 200 л/мин. и объемом отбираемого воздуха от 1 до 2000 л. Применяются пробоотборники со встроенными программами калибровки и осуществляющими мониторинг воздуха методом мембранной фильтрации с применением желатиновых мембранных фильтров.



Воздухозаборник/импактор

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

Ускорение подсчета колоний на питательных средах осуществляется за счет автоматических и полуавтоматических счетчиков колоний.

Полуавтоматические модели подразумевают ручное нанесение маркером меток на дно чашки в местах расположения колоний; фиксируется факт прикосновения маркера ко дну, каждому соприкосновению соответствует звуковой сигнал. Автоматические устройства для подсчета колоний определяют и считают колонии на любых носителях (пластиковые тест-пластины, мембраны, чашки Петри) посредством встроенного объектива. Для работы с большим числом проб применяются полностью автоматизированные станции, которые инкубируют, определяют и подсчитывают колонии в режиме реального времени (их вместимость может быть до 300 чашек Петри).

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

Для точного определения микроорганизмов, помимо специфических сред и биохимических тестов, применяются микробиологические анализаторы. Эти автоматические или полуавтоматические системы обеспечивают быстрое и надежное определение наличия или отсутствия патогенов, их видовой или родовой принадлежности и антибиотикочувствительности.

Использование такого оборудования значительно уменьшает время, необходимое для получения результатов. Вместо того, чтобы ждать несколько суток при использовании классических методов, с помощью этих систем результаты можно получить всего за сутки или даже меньше — несколько часов.



Счетчик колоний автоматический

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

Это особенно важно в срочных случаях, когда экспресс-определение микроорганизмов является критически важным. Приборы работают за счет использования различных методов анализа, которые позволяют достичь максимальной эффективности и точности. Например, таких как, не прямой анализ изменения импеданса, иммуноферментный анализ, измерение оптической плотности образца, молекулярно-генетические, флуориметрические и колориметрические методы, а также матричную масс-спектрометрию.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ

Биологические методы оценки применяют для определения активности лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов, содержащих сердечные гликозиды.

К лекарственному растительному сырью и лекарственным растительным препаратам, для которых проводится биологическая оценка активности сердечных гликозидов, относятся:

1. Листья наперстянки пурпуровой, крупноцветковой и их лекарственные препараты.

2. Лекарственные препараты наперстянки шерстистой.



Наперстянка пурпуровая



Наперстянка шерстистая

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ

3. Трава, лекарственные препараты горицвета.

4. Трава, листья, цветки ландыша, лекарственные препараты ландыша, сложные лекарственные формы, содержащие настойку ландыша.

5. Семена и лекарственные препараты строфанта.

6. Трава и семя желтушника раскидистого (серого), сложные лекарственные формы, содержащие желтушник серый и др.



Горицвет весенний



Ландыш майский



Строфант Комбе Желтушник раскидистый



ПРИНЦИП МЕТОДА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ

Биологическая оценка указанных выше лекарственных средств основана на способности сердечных гликозидов в токсических дозах вызывать систолическую остановку сердца животных.

Активность лекарственных средств, содержащих сердечные гликозиды, оценивают по сравнению с активностью стандартных образцов и выражают в единицах действия (ЕД).

Испытания проводят на лягушках разных видов. Устанавливают наименьшие дозы стандартного образца и испытуемого лекарственного средства, вызывающие систолическую остановку сердца подопытных животных. Затем рассчитывают содержание единиц действия в 1 г испытуемого лекарственного средства (ИЛС), если испытывается лекарственное растительное сырье или сухие концентраты; в одной таблетке - при испытании таблеток или в 1 мл, если испытываются жидкие лекарственные формы.

СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПОНЯТИЕ ЕДИНИЦЫ ДЕЙСТВИЯ

Стандартным образцом (СО) при испытании лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов ландыша, комплексных лекарственных препаратов, содержащих настойку ландыша, служат специально изготовленные спиртовые экстракты ландыша, содержащие очищенную от сопутствующих веществ сумму сердечных гликозидов ландыша.

СО при испытании лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов наперстянки пурпуровой и крупноцветковой служат специально полученные спиртовые экстракты наперстянки указанных видов, содержащие очищенную от сопутствующих веществ сумму сердечных гликозидов.

СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПОНЯТИЕ ЕДИНИЦЫ ДЕЙСТВИЯ

Стандартными образцами при испытании другого лекарственного растительного сырья и полученных из него лекарственных препаратов служат индивидуальные кристаллические гликозиды: при испытании лекарственных препаратов наперстянки шерстистой - целанид-стандарт; при испытании лекарственного растительного сырья и препаратов горицвета - цимарин-стандарт; при испытании лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов строфанта - строфантин G-стандарт; лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов желтушника серого эризимин-стандарт.

Биологическую активность стандартных образцов устанавливают на лягушках-самцах (*Rana temporaria*) массой 28-33 г при подкожном введении в октябре-ноябре (таких лягушек условно называют "стандартными" или "нормальными").

СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПОНЯТИЕ ЕДИНИЦЫ ДЕЙСТВИЯ

При испытании на лягушках разведения стандартных образцов подбирают с таким расчетом, чтобы одна лягушачья единица действия (1 ЛЕД) соответствовала дозе стандартного образца, вызывающей в определенных условиях опыта систолическую остановку сердца у большинства стандартных подопытных лягушек.

Под 1 ЛЕД ландыша или наперстянки подразумевают специфическую биологическую активность 0,3 мл стандартного спиртового образца, разведенного в 4 раза водой. Неразведенные стандартные образцы наперстянки и ландыша содержат в 1 мл 13,33 ЛЕД.

Под 1 ЛЕД цимарина, целанида подразумевают специфическую биологическую активность 0,3 мл стандартного спиртоводного раствора кристаллического гликозида в следующей концентрации:

СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПОНЯТИЕ ЕДИНИЦЫ ДЕЙСТВИЯ

- цимарина 1 : 13333
- целанида 1 : 5000

Под 1 ЛЕД строфантина G, эризимины подразумевают специфическую биологическую активность 0,4 мл стандартного спиртоводного раствора кристаллического гликозида в следующей концентрации:

строфантина G 1 : 20000
эризимины 1 : 25000



**ВОЗНИКШИЕ ВОПРОСЫ ПО МАТЕРИАЛАМ
ЛЕКЦИИ**

ПРОСЬБА НАПРАВЛЯТЬ НА ПОЧТУ

timofeeva@volgmed.ru

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!