

# ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

В. Л. Шевина<sup>1</sup>, Н. В. Хохленкова<sup>2</sup>, В. П. Рейда<sup>1</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ ТАБЛЕТОК «УРОНЕФРОН»

<sup>1</sup>ПАО «Фармак», г. Киев, Украина

<sup>2</sup>Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

*Статья посвящена разработке и проверке пригодности методики определения микробиологической чистоты таблеток «Уронефрон» на основе растительного сырья. Методика разработана в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи к нестерильным готовым лекарственным средствам в форме таблеток. Проанализированы факторы, влияющие на микробиологическую чистоту нестерильных лекарственных средств. Проведен комплекс микробиологических исследований с целью разработки методики испытания на микробиологическую чистоту таблеток «Уронефрон». Проведена проверка пригодности методики испытаний по отдельным видам микроорганизмов.*

*Проведенными исследованиями установлено, что таблетки «Уронефрон» по показателю качества «Микробиологическая чистота» соответствуют требованиям Европейской фармакопеи к лекарственным средствам категории 2. Установлено и внесено в проект аналитической нормативной документации на таблетки «Уронефрон» нормирование микробиологической чистоты.*

*Ключевые слова: микробиологическая чистота, растительные лекарственные средства, мочекаменная болезнь.*

### ВВЕДЕНИЕ

Мочекаменная болезнь – самая частая урологическая патология, которая распространена во всех географических зонах. Известно, что положительное влияние на динамику состояния пациента при мочекаменной болезни оказывают средства растительного происхождения, обладающие противовоспалительными, спазмолитическими и диуретическими свойствами. Такие лекарственные средства улучшают мочевыделительную функцию почек и мочевыводящих путей, снимая спазм гладкой мускулатуры, а также, имея диуретическое действие, усиливают "вымывание" продуктов бактериального распада и эндотоксинов с мочой [1].

Растения, обладающие мочегонной и спазмолитической активностью, действуют несколько слабее и медленнее, чем большинство современных синтетических лекарственных средств, однако их преимуществом является калийсберегающий характер диуретического действия [2].

Применение лекарственных растений и фитосборов связано с определенными

сложностями. Так, возникает необходимость в приготовлении свежих растворов, хранении уже приготовленных. В связи с этим большое значение приобретает применение растительных лекарственных средств в готовых лекарственных формах. С целью внедрения новых высокоэффективных технологий лечения мочекаменной болезни на ПАО «Фармак» (г. Киев, Украина) разработано лекарственное средство – таблетки «Уронефрон». В качестве действующего вещества в состав таблеток входит сухой экстракт из 9 растений: шелухи лука репчатого, корня пырея, листьев березы, семян пажитника, корня петрушки, травы золотарника, травы хвоща полевого, травы птичьего горца, корня любистка [3].

При производстве растительных лекарственных средств существует риск обсеменения лекарственного растительного сырья. Контроль исходного сырья, хранение и обработка имеют особое значение при производстве лекарственных средств растительного происхождения в связи с их непростым составом и переменным характером. Согласно Приложению 7 Руководства СТ-Н МОЗУ 42-4.0: 2011 «Ле-

карственные средства. Надлежащая производственная практика» растительное сырье должно быть надлежащего качества, а данные, подтверждающие это, должны быть предоставлены производителю растительного лекарственного средства [4]. Растительные субстанции (растительное сырье) следует хранить в отдельных зонах. Зона хранения должна быть оборудована таким образом, чтобы обеспечить защиту от проникновения насекомых или животных, особенно грызунов. Необходимо принять эффективные меры по предотвращению распространения любых таких животных и микроорганизмов, попавших вместе с растительным сырьем, по предотвращению ферментации и роста плесени, а также перекрестной контаминации. Следует использовать различные закрытые зоны для карантина растительного сырья.

Зона хранения должна быть хорошо вентилируемой; контейнеры следует размещать таким образом, чтобы обеспечить свободную циркуляцию воздуха. Особое внимание следует уделять чистоте и надлежащему обслуживанию зон хранения, особенно там, где образуется пыль. Для хранения растительных субстанций (растительного сырья) и растительных лекарственных средств могут потребоваться особые условия с определенными требованиями к влажности, температуре и защите от света; такие условия необходимо обеспечивать и контролировать.

Для предупреждения подобных последствий Европейская фармакопея предусматривает обязательное определение микробиологической чистоты лекарственного сырья (содержания жизнеспособных бактерий и грибов в 1 г) перед использованием его в производстве. Высокий уровень микробной контаминации существенно влияет на качество готовых лекарственных средств и представляет большую опасность как для стабильности лекарственного средства, так и для человека. Помимо разрушения лекарственных веществ, микроорганизмы способны продуцировать различные токсины, органические кислоты, амины, которые могут стать причиной резкого ухудшения состояния больного. Способность микроорганизмов некоторых видов к образованию спор позволяет им длительное время выживать в лекарственных средствах при отсутствии питательных веществ.

Обеспечение качества ЛС по показателю «Микробиологическая чистота» определяется входным контролем сырья и вспомогательных веществ, контролем санитарно-гигиенического состояния производственных помещений, воздуха, оборудования, технологической одежды персонала, а также проверкой микробной контаминации полуфабрикатов на всех стадиях технологического процесса до готовой продукции и упаковки [5].

Целью данного исследования являлись разработка и проверка пригодности методики определения микробиологической чистоты (МБЧ) таблеток «Уронефрон».

Для достижения цели была поставлена задача: провести определение микробиологической чистоты согласно критериям приемлемости для таблеток «Уронефрон».

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для разработки методики контроля микробиологической чистоты были использованы таблетки «Уронефрон», тест-микроорганизмы: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella abony* NCTC 6017, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Перед проведением исследований проверяли пригодность каждой партии готовой к использованию питательной среды (ЕФ, раздел 2.6.12).

10 г порошка растертых таблеток помещали во флакон, доводили объем до 100 мл буферным раствором с натрия хлоридом и пептоном рН 7,0, содержащим 50 г/л полисорбата 80, 1 г/л гистидина, 5 г/л лецитина, и перемешивали до образования однородной суспензии (образец № 1).

10 мл подготовленного образца № 1 помещали во флакон, доводили объем тем же растворителем до 100 мл и встряхивали (образец № 2).

Для определения общего числа аэробных микроорганизмов (Total aerobic microbial count, ТАМС) по 1 мл испытуемого образца № 2 с разведением 1: 100 вносили в две чашки Петри и добавляли по 30 мл расплавленного и охлажденного до температуры 45°C соево-казеинового агара.

Для определения общего числа дрожжевых и плесневых грибов (Total yeast and mould count, ТУМС) по 1 мл испытуемого

образца № 1 вносили в две чашки Петри и добавляли по 30 мл расплавленного и охлажденного до температуры 45°C сабуро-декстрозного агара.

Посевы на соево-казеиновом агаре инкубировали в течение 3–5 суток при температуре 30–35°C, на сабуро-декстрозном агаре – в течение 5–7 суток при температуре 20–25°C.

Для выявления *Staphylococcus aureus* 10 мл испытуемого образца № 1 помещали в 100 мл соево-казеинового бульона. Инкубировали от 18 ч до 24 ч при температуре 30–35°C. После окончания инкубации пересевали на чашку Петри с маннитно-солевым агаром и инкубировали от 18 ч до 72 ч при температуре 30–35°C.

Для выявления *Escherichia coli* 10 мл испытуемого образца № 1 помещали в 100 мл соево-казеинового бульона. Инкубировали в течение 18–24 ч при температуре 30–35°C. После окончания инкубации встряхивали флакон и 1 мл его содержимого вносили в 100 мл бульона Мак-Конки, инкубировали в течение 24–48 ч при температуре 42–44°C. После окончания инкубации пересевали на агар Мак-Конки. Посевы инкубировали в течение 18–72 ч при температуре 30–35°C.

Для выявления *Salmonella* 10 г порошка растертых таблеток помещали в 100 мл соево-казеинового бульона, встряхивали до образования однородной суспензии. Инкубировали от 18 ч до 24 ч при температуре 30–35°C. После окончания инкубации встряхивали флакон и 0,1 мл его содержания вносили в 10 мл среды Раппопорта-Василиадиса, инкубировали в течение 18–24 ч при температуре 30–35°C. После окончания инкубации пересевали на дезоксихолатный агар с ксилозой и лизином и инкубировали от 18 ч до 48 ч при температуре 30–35°C.

Для количественной оценки грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи, 1 г растертых таблеток помещали в пробирку, доводили объем до 10 мл соево-казеиновым бульоном. Инкубировали от 2 ч до 3 ч при температуре 20–25°C. Приготовленные разведения, содержащие 0,1 мл, 0,01 мл, 0,001 мл образца, вносили в соответствующие объемы накопительного бульона Мозеля. Инкубировали от 24 ч до 48 ч при температуре 30–35°C. После завершения инкубации с каждого контейнера пересевали на агар с желчью, глюкозой, кристаллическим фиолетовым и ней-

тральным красным. Инкубировали от 18 ч до 24 ч при температуре 30–35°C. Вероятное число бактерий определяли по таблице 2.6.13-2. (Европейская фармакопея).

В методике использовали критерий приемлемости: в 1 г лекарственного средства допускается не более  $10^4$  аэробных микроорганизмов (ТАМС) и не более  $10^2$  дрожжевых и плесневых грибов (ТУМС), не более  $10^2$  КОЕ грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи, в 1 г. Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г, отсутствие *Escherichia coli* в 1 г, отсутствие *Salmonella* в 10 г [6].

Для проверки пригодности методики испытаний по отдельным видам микроорганизмов готовили образцы в соответствии с разработанной методикой. Вносили образец в питательную среду и в момент перемешивания добавляли монокультуру одного из тест-микроорганизмов. Число тест-микроорганизмов в инокулированных образцах составляло не более 100 КОЕ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проверкой пригодности методики являлось количественное и качественное сравнение интенсивности роста определенных Европейской фармакопеей (р. 2.6.12, 2.6.13) тест-микроорганизмов в присутствии и в отсутствие испытуемого лекарственного средства, в условиях испытания, указанных в нормативной документации.

На основании полученных экспериментальных данных была разработана методика испытания таблеток «Уронефрон» на МБЧ, внесенная в проект аналитической нормативной документации на таблетки «Уронефрон».

Результаты испытаний пригодности методики представлены в таблицах 1, 2.

Как видно из таблиц, в условиях испытания, указанных в методике, при наличии испытуемых образцов наблюдается рост тест-микроорганизмов и получены положительные результаты их идентификации.

Наличие роста тест-микроорганизмов в присутствии и в отсутствие испытуемого образца свидетельствует о пригодности методики определения общего числа аэробных микроорганизмов (ТАМС) методом глубинного посева на чашки с разведением 1:100, дрожжевых и плесневых грибов (ТУМС) с разведением 1:10, выявления *E.coli*, *Staphylococcus aureus*,

*Salmonella* и количественной оценки грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи, с разведением 1:100.

Результаты исследований по определению микробиологической чистоты приведены в таблице 3.

Таблица 1 – Результаты проверки пригодности методики определения общего числа аэробных микроорганизмов (ТАМС)

Тест-микроорганизмы	Число КОЕ тест-микроорганизмов на двух чашках (сред.)	
	С образцом	Контрольный опыт
	Разведение	
	1:100	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	78/82 (80)	71/69 (70)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	57/53 (55)	61/60 (61)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	79/85 (82)	77/74 (76)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	64/70 (67)	73/77 (75)
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	53/49 (51)	52/54 (53)

Таблица 2 – Результаты проверки пригодности методики определения общего числа дрожжевых и плесневых грибов (ТУМС)

Тест-микроорганизмы	Число КОЕ тест-микроорганизмов на двух чашках (сред.)	
	С образцом	Контрольный опыт
	Разведение	
	1:10	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	78/71 (75)	74/78 (76)
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	49/56 (53)	57/54 (56)

Таблица 3 – Исследование микробиологической чистоты таблеток «Уронефрон»

Показатель	Критерий приемлемости	Полученный результат
ТАМС	$10^4$	162
ТУМС	$10^2$	34
Грамотрицательные бактерии, толерантные к желчи	$10^2$	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	Должны отсутствовать	Отсутствуют
<i>Escherichia coli</i>	Должны отсутствовать	Отсутствуют
<i>Salmonella</i>	Должны отсутствовать	Отсутствуют

## ВЫВОДЫ

1. На основании полученных экспериментальных данных была разработана методика испытания таблеток «Уронефрон» на МБЧ. Установлено и внесено в проект аналитической нормативной документации на таблетки «Уронефрон» следующее нормирование микробиологической чистоты: общее число аэробных микроорганизмов (ТАМС)  $10^4$  КОЕ / г; общее число дрожжевых и плесневых грибов (ТУМС)  $10^2$  КОЕ / г; отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г; отсутствие *Escherichia coli* в 1 г; отсутствие *Salmonella* в 10 г; не более  $10^2$  КОЕ грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи в 1 г.

2. Проведенными исследованиями установлено, что таблетки «Уронефрон» по показателю МБЧ соответствуют требованиям Европейской фармакопеи к лекарственным средствам категории 2.

## SUMMARY

V. L. Shevina,

N. V. Khokhlenkova, V. P. Reyda

### STUDY OF MICROBIOLOGICAL PURITY OF TABLETS «URONEFRON»

The article covers a development and validation test of microbiological purity determination method for tablets «Uronefron» produced on the basis of herbal raw materials. The method is developed in accordance with

the European Pharmacopoeia requirements to non-sterile finished medicinal products in forms of tablets. The factors influenced on the microbiological purity of non-sterile medicinal product are analyzed. The set of microbiological studies is performed in order to develop the test procedure of microbiological purity for tablets «Uronefron».

Validation test of test method related to the certain type of microorganisms is carried out.

It is established with performed studies that tablets of «Uronefron» related to the parameter of «Microbiological purity» meet with the European Pharmacopoeia requirements to medicines of category 2.

Standardization of microbiological purity is determined and included to the draft of analytical procedure for tablets «Uronefron».

Keywords: microbiological purity, herbal preparations, urolithiasis.

ная болезнь: эволюция представлений / А. Н. Россоловский, О. Л. Березинец, Б. И. Блюмберг // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. – 2014. – Том 4, № 1.

3. Европейская фармакопея 8.0. – раздел 2.6.12.

4. Шемерянкина, Т. Б. Требования к стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов на его основе / Т. Б. Шемерянкина, Т. А. Сокольская, Т. Д. Даргаева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – № 3. – С. 9–12.

5. Гунар, О. В. Требования к микробиологическому качеству лекарственных средств и процедур испытания в различных фармакопеях / О. В. Гунар // Фармация. – 2010. – № 6. – С. 9–13.

6. Note for Guidance on Pharmaceutical Development. – EMEA/CHMP/167068/2004 – ICH (ICH Topic Q8). – May 2006. – 9 p.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аляев, Ю. Г. Мочекаменная болезнь: современные методы диагностики и лечения, руководство / Ю. Г. Аляев. – ГЭОТАР – Медиа, – 2010. – 216 с.

2. Россоловский, А. Н. Мочекамен-

Адрес для корреспонденции:

Украина,  
г. Киев, ул. Фрунзе, 63,  
ОАО «Фармак»,  
тел. +38 067 464 94 96,  
Шевина В. Л.

Поступила 15.06.2015 г.

В. О. Гельмбольдт<sup>1</sup>, В. Ю. Анисимов<sup>1</sup>, И. О. Шишкин<sup>1</sup>, Р. Е. Хома<sup>2</sup>,  
К. П. Шабельник<sup>3</sup>, С. И. Коваленко<sup>3</sup>

#### ГЕКСАФТОРОСИЛИКАТЫ 3,5-ДИЗАМЕЩЕННЫХ КАТИОНОВ 1,2,4-ТРИАЗОЛИЯ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ КАРИЕСПРОТЕКТОРНЫЕ АГЕНТЫ

<sup>1</sup>Одесский национальный медицинский университет, г. Одесса, Украина

<sup>2</sup>Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, г. Одесса, Украина

<sup>3</sup>Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

В работе представлены результаты синтеза и изучения физико-химических характеристик ряда гексафторосиликатов 3,5-дизамещенных катионов 1,2,4-триазолия состава  $(LH)_2SiF_6 \cdot nH_2O$  ( $L_1$  = 3-пиридин-3-ил-5-(2'-аминофенил)-1H-1,2,4-триазол,  $n = 1$ ;  $L_2$  = 3-бензофуран-2-ил-5-(2'-амино-3'-метил-фенил)-1H-1,2,4-триазол,  $n = 1$ ;  $L_3$  = 5-(2'-амино-5'-хлоро-фенил)-3-фуран-3-ил-1H-1,2,4-триазол,  $n = 1$ ;  $L_4$  = 3-адамантан-1-ил-5-(2'-амино-фенил)-1H-1,2,4-триазол,  $n = 2$ ;  $L_5$  = 5-(2'-амино-3'-метил-фенил)-3-фуран-3-ил-1H-1,2,4-триазол,  $n = 1$ ;  $L_6$  = 3-тиофен-3-ил-5-(2'-амино-3'-фторо-фенил)-1H-1,2,4-триазол,  $n = 2$ ;  $L_7$  = 3-тиофен-2-ил-5-(2'-амино-3'-фторо-фенил)-1H-1,2,4-триазол,  $n = 3$ ), представляющих интерес в качестве потенциальных кариеспротекторных агентов. Синтез гексафторосиликатов осуществляли путем взаимодействия метанольных растворов гетероциклических оснований L с 45%-ной кремнефторородной кислотой (молярные соотношения  $L : H_2SiF_6 = 1 : 3$ ). Полученные соедине-