

<https://doi.org/10.29296/25419218-2019-07-01>

© Коллектив авторов, 2019
УДК 615.2/3.011.17:579].07

Влияние микроорганизмов-контаминантов на подлинность и содержание действующих веществ в лекарственных препаратах

О.В. Гунар, М.В. Рощина, И.А. Буйлова, Н.Г. Сахно, Г.М. Булгакова

Научный центр экспертизы средств медицинского применения Министерства здравоохранения РФ;
Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Гунар Ольга Викторовна – начальник лаборатории микробиологии Научного центра экспертизы средств медицинского применения (НЦЭСМП) МЗ РФ, доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (916) 342-89-01. E-mail:gunar@expmed.ru

Рощина Марина Владимировна – эксперт 1 категории лаборатории микробиологии НЦЭСМП, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (915) 484-00-23. E-mail:m.roshchina@mail.ru

Буйлова Ирина Александровна – ведущий эксперт лаборатории микробиологии НЦЭСМП, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (905) 567-19-66. E-mail:schulya090481@mail.ru

Сахно Надежда Геннадьевна – главный эксперт лаборатории микробиологии НЦЭСМП, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (916) 561-52-94. E-mail:nadine87@inbox.ru

Булгакова Галина Михайловна – ведущий эксперт лаборатории микробиологии НЦЭСМП. Тел.: +7 (915) 123-48-20. E-mail:bulgakova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Введение. Оценка качества и безопасности лекарственных препаратов (ЛП), поступающих на потребительский рынок Российской Федерации – одна из основных задач фармацевтической отрасли. Содержащиеся в ЛП микроорганизмы-контаминанты и продукты их жизнедеятельности способны инфицировать организм пациента и стать причиной тяжелых пирогенных реакций. Кроме того, они способны оказывать влияние на ингредиенты лекарства, вызывая их разложение.

Цель работы – изучение влияния микроорганизмов-контаминантов, содержащихся в ЛП, на подлинность и содержание действующих веществ.

Материал и методы. Объекты исследования – 4 препарата, загрязненные различными бактериями и грибами: натрия пикосульфат, дарунавир, йогексол, лидокаин. Выделенные микроорганизмы-контаминанты идентифицировали с использованием соответствующих селективных и дифференциально-диагностических питательных сред, а также бактериологического анализатора Vitek 2 Compact. Содержание действующих веществ в препаратах определяли методами ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии.

Результаты. Анализируемые препараты были контаминированы плесневыми грибами, *Bacillus circulans* и *Burkholderia cepacia*. Через 24 мес хранения в препаратах «Натрия пикосульфат» и «Лидокаин» содержание микроорганизмов не изменилось, количество плесневых грибов, содержащихся в таблетках «Дарунавир», уменьшилось в 4 раза, а в растворе для инъекций «Йогексол» число бактерий *Burkholderia cepacia* увеличилось в 900 раз. Присутствовавшие в препаратах микроорганизмы не оказывали влияния на подлинность и содержание действующих веществ.

Заключение. Изучено сохранение жизнеспособности выявленных микроорганизмов в исследуемых препаратах в течение 24 мес хранения. Влияние микроорганизмов на показатели качества указанных препаратов не установлено.

Ключевые слова: лекарственные препараты, микроорганизмы-контаминанты, подлинность, содержание действующего вещества.

Для цитирования: Гунар О.В., Рощина И.В., Буйлова И.А., Сахно Н.Г., Булгакова Г.М. Влияние микроорганизмов-контаминантов на подлинность и содержание действующих веществ в лекарственных препаратах. Фармация, 2019; 68 (7): 5–10. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-07-01>

THE EFFECT OF MICROBIAL CONTAMINANTS ON THE IDENTITY AND CONTENT OF ACTIVE INGREDIENTS IN DRUGS

O.V. Gunar, M.V. Roshchina, I.A. Builova, N.G. Sakhno, G.M. Bulgakova

Research Center for Examination of Medical Products, Ministry of Health of the Russian Federation; 8, Petrovsky Boulevard, Build. 2, Moscow 127051, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Gunar Olga – Head of Laboratory of Microbiology, FSBI SCEEMP, Doctor of Pharmaceutical Sciences. Tel.: –7 (916) 342-89-01. E-mail:gunar@expmed.ru

Roshchina Marina – 1-st category Expert of Laboratory of Microbiology, FSBI SCEEMP, PhD. Tel.: +7 (915) 484-00-23. E-mail: m.roshchina@mail.ru

Buylova Irina – Leading Expert of Laboratory of Microbiology, FSBI SCEEMP, PhD. Tel.: +7 (905) 567-19-66. E-mail: schulya090481@mail.ru

Sakhno Nadezhda – Chief expert of Laboratory of Microbiology, FSBI SCEEMP, PhD. Tel.: +7 (916) 561-52-94. E-mail: nadine87@inbox.ru

Bulgakova Galina – Leading Expert of Laboratory of Microbiology, FSBI SCEEMP. Tel.: +7 (915) 123-48-20. E-mail: bulgakova@expmed.ru

SUMMARY

Introduction. To assess the quality and safety of drugs entering the consumer market of the Russian Federation is one of the main tasks of the pharmaceutical industry. Microbial contaminants contained in the drugs and their metabolic products can infect the patient's body and cause severe pyrogenic reactions. In addition, they are able to influence the ingredients of the drug, causing their decomposition.

Objective: to study the effects of microbial contaminants contained in drugs on the identity and content of active ingredients.

Material and methods. The investigation objects were four drugs contaminated with various bacteria and fungi; these included sodium picosulfate, darunavir, iohexol, and lidocaine. Isolated microbial contaminants were identified using appropriate selective and differential diagnostic culture media, as well as a Vitek 2 Compact bacterial analyzer. The content of active ingredients in the drugs was determined by high performance liquid chromatography and UV spectrophotometry.

Results. The analyzed drugs were contaminated with mold fungi, *Bacillus circulans*, and *Burkholderia cepacia*. After 24-month storage in sodium picosulfate and lidocaine, the content of the microorganisms did not change; the quantity of molds contained in darunavir tablets decreased by 4 times and that of *Burkholderia cepacia* in injectable Yogexol solution increased by 900 times. The microorganisms present in the drugs did not affect the identity and content of active ingredients.

Conclusion. Preservation of the viability of the microorganisms identified in the test drugs for 24 months of storage was studied. The effects of microorganisms on the quality indicators of these drugs were not established.

Key words: drugs, microbial contaminants, identity, content of active ingredients.

For citation: Gunar O.V., Roshchina M.V., Builova I.A., Sakhno N.G., Bulgakova G.M. The effect of microbial contaminants on the identity and content of active ingredients in drugs. Farmatsiya (Pharmacy), 2019; 68 (7): 5–10. <https://doi.org/10/29296/25419218-2019-07-01>

Введение

В середине XX века было установлено, что многие лекарственные препараты (ЛП) могут служить благоприятной средой для развития микроорганизмов. Тогда же было доказано, что контаминированные микроорганизмами ЛП представляют опасность для больных и служат источником внутрибольничных инфекций [1]. Организм больного человека может быть ослаблен, а также значительно снижена его иммунная защита. Опасность инфицирования возрастает при инъекциях и инфузиях при введении растворов в кровяное русло, стерильные полости, т.е. в тех случаях, когда применение ЛП сопровождается нарушением кожных покровов и слизистых оболочек, а также при лечении ран, травм, обморожений и ожогов. В таких случаях контаминированные ЛП способны привести к инфицированию организма больного, тяжелым его последствиям или летальному исходу [2]. Микроорганизмы, продукты их жизнедеятельности, а также нежизнеспособные микробные клетки, содержащиеся в инфузионных растворах, при внутрисосудистых введениях могут привести к тяжелым пирогенным реакциям. Микроорганизмы-контаминанты могут воздействовать на ингредиенты лекарства, вызывать разложение действующих и вспомогательных веществ, что способно привести к потере терапевтического эффекта, изменению внешнего вида,

появлению неприятного запаха и вкуса, а в некоторых случаях – к образованию токсичных продуктов [3].

Наиболее распространенные микроорганизмы, которые обнаруживаются в ЛП – грамположительные бактерии, чаще – кокки. Загрязнение фармацевтических производств некоторыми из микроорганизмов связано с тем, что они являются частью микрофлоры человека. Наиболее часто выделяются следующие бактерии: *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. [5].

В период с 1988–2011 гг., согласно данным Федерального управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (U.S. Food and Drug Administration – FDA), в 39% случаев отозванные стерильные и нестерильные ЛП были заражены микроорганизмом *Burkholderia cepacia* [6]. В 2009 г. в Индии было зафиксировано заражение *B. cepacia* 13 больных, получавших внутривенные инъекции противорвотного препарата «Гранисетрон» при проведении курса химиотерапии [7]. Согласно данным литературы, бактерии *B. cepacia* способны выживать в ЛП, содержащих биоциды, консерванты, а также другие вспомогательные вещества, оказывающие бактериостатическое действие [8–10]. Кроме того, есть сведения об устойчивости данных бактерий ко многим видам антибиотиков, так как в резуль-

тате ингибирования β-лактамазы внешняя оболочка клетки становится непроницаемой для данных веществ. Еще одним защитным механизмом *V. serasia*, делающим неэффективной антимикробную терапию, является образование биопленки [11]. По мнению некоторых авторов, наличие *V. serasia* в ЛП можно объяснить несоблюдением правил надлежащей производственной практики (GMP), а также использованием методов анализа качества, которые не обладают достаточной чувствительностью для обнаружения этих микроорганизмов в воде, сырье и готовой продукции [11–13].

Согласно данным FDA, за 2000–2010 гг. было отозвано более 100 серий фармацевтических продуктов, из них в 21% образцов была обнаружена контаминация плесневыми и дрожжевыми грибами [14, 15]. Плесневые грибы широко распространены в окружающей среде и представляют большую опасность контаминации фармацевтических производств. По данным исследователей, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Trichophyton* spp. существенно загрязняли микробами производственную среду и выпускаемую продукцию [15].

Таким образом, контаминация стерильных и нестерильных ЛП может представлять опасность инфицирования больных и порчи лекарств с появлением нежелательных или даже токсичных свойств. Поэтому необходимо уделять особое внимание качеству и безопасности ЛП, поступающих на потребительский рынок. Основными показателями качества ЛП являются подлинность и количественное содержание действующих веществ, а безопасности – стерильность или микробиологическая чистота в зависимости от способа их применения.

Цель настоящей работы – изучение влияния микроорганизмов-контаминантов на качество некоторых ЛП по показателям: подлинность и количественное содержание действующего вещества.

Материал и методы

Для оценки влияния микроорганизмов на качество контаминированных ЛП исследовали следующие препараты, загрязненные различными бактериями и грибами: натрия пикосульфат, таблетки 5 мг; дарунавир, таблетки 75 мг; йогексол, раствор для инъекций 300 мг йода/мл; лидокаин, раствор для инъекций 5 мг/мл.

В указанных ЛП были обнаружены микроорганизмы-контаминанты, идентификацию которых выполняли с использованием соответствующих селективных и дифференциально-

диагностических питательных сред, а также при помощи бактериологического анализатора Vitek 2 Compact.

Для количественного определения микроорганизмов в 1 г (мл) зараженных ЛП был применен модифицированный глубинный метод в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XIII издания пп. 5.1.4 ОФС 1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота».

При автоматической идентификации на Vitek 2 Compact пробирки с приготовленными суспензиями микроорганизма определенной оптической плотности по Мак Фарланду устанавливали в кассету. Напротив них в специальные прорези помещали карты так, чтобы относящаяся к карте пластиковая трубочка была погружена в пробирку. Для заполнения карты взвесью микроорганизма кассету помещали в вакуумную станцию анализатора, после чего перемещали держатель в загрузочный модуль, где происходила герметизация карт. После этого автоматически карты поступали в инкубатор, и в течение 5–8 ч прибор периодически учитывал результаты. По окончании исследования был получен протокол с результатом идентификации.

При проведении химической части исследования использовали стандартные образцы (СО) натрия пикосульфата ВРСRS; йогексола USPRS; лидокаина USPRS и рабочий стандартный образец (РСО) дарунавира.

Для анализа натрия пикосульфата, дарунавира и йогексола методом ВЭЖХ использовали жидкостный хроматограф Agilent 1260 с квадруполь масс-детектором 6130. Определение йогексола методом УФ-спектрофотометрии проводили на UV-Vis спектрофотометре Agilent 8453.

Приготовление стандартных растворов

1. Точную навеску 50 мг СО натрия пикосульфата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл воды, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. 5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора смесью метиловый спирт – вода (3:7) до метки и перемешивают.

2. Точную навеску 40 мг СО дарунавира помещают в мерную колбу темного стекла вместимостью 100 мл, растворяют в 60 мл растворителя, доводят растворителем до метки, перемешивают.

3. Точную навеску 7,5 мг СО йогексола помещают в пробирку, прибавляют 10 мл дистиллированной воды, перемешивают.

4. Точную навеску 70 мг СО лидокаина помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, растворяют в 40 мл воды, прибавляют 40 мл 95% этилового спирта, 20 мл 0,1М раствора хлористоводородной кислоты, доводят объем раствора до метки и перемешивают.

Приготовление испытуемых растворов

1. Одну таблетку натрия пикосульфата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 15 мл смеси метиловый спирт – вода (3:7). Обрабатывают ультразвуком до полного диспергирования таблетки, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

2. Точную навеску тщательно растертых таблеток, эквивалентную 40 мг дарунавира, помещают в мерную колбу темного стекла вместимостью 100 мл, растворяют в 60 мл растворителя, доводят им же до метки, перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр «Миллипор» с размером пор 0,45 мкм.

3. 1 мл препарата йогексол помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора дистиллированной водой до метки и перемешивают. 3 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем дистиллированной водой до метки и перемешивают.

4. В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 20 мл испытуемого препарата (количество, эквивалентное 100 мг лидокаина), прибавляют 50 мл воды, 50 мл 95% этилового спирта, 25 мл 0,1М раствора хлористоводородной кислоты, доводят объем раствора до метки и перемешивают.

Результаты и обсуждение

При исследовании контаминированных ЛП были обнаружены микроорганизмы, представленные в табл.1. В ЛП «Лидокаин» и «Йогексол» были выделены грамотрицательные бактерии *Burkholderia cepacia* – один из ведущих возбудителей оппортунистических, нозокомиальных и послеоперационных раневых инфекций у человека [6–11].

Препарат «Йогексол» в течение 12 мес исследовался на определение числа содержащихся микроорганизмов (см. рисунок). Количественное содержание *B. cepacia* увеличилось на 2 lg– с $2 \cdot 10^4$ КОЕ/мл до $2 \cdot 10^6$ КОЕ/мл за 12 мес хранения препарата «Йогексол». Через 24 мес хранения препарата число микроорганизмов в ЛП составило $1,8 \cdot 10^6$ КОЕ/мл.

Каждый из исследуемых ЛП был проанализирован на подлинность, количественное содержание действующего вещества и микробиологическую чистоту (табл. 2). После 24 мес хранения ЛП «Пикосульфат натрия», контаминированного факультативно анаэробными бактериями *Bacillus circulans*, подлинность и количественное содержание действующего вещества в препарате не изменилось. Содержание микроорганизмов также осталось неизменным. В образце ЛП «Дарунавир», контаминированного плесневыми грибами, после 24 мес хранения число микроорганизмов уменьшилось в 4 раза, влияние грибов на подлинность и содержание действующего вещества не установлено. При исследовании образца ЛП «Йогексол» установлено, что количество загрязняющих его бактерий *Burkholderia cepacia* увеличилось за время хранения (24 мес) в 900 раз. Подлинность ЛП подтверждена, влияние на содержание действующего вещества отсутствует. Согласно анализу ЛП «Лидокаин», зараженно- го бактериями *Burkholderia cepacia*, подлинность и

Таблица 1

Микроорганизмы, выделенные в исследуемых лекарственных препаратах

Table 1

Microorganisms isolated in the test drugs

Лекарственный препарат	Обнаруженные микроорганизмы
Натрия пикосульфат	<i>Bacillus circulans</i>
Дарунавир	Плесневые грибы
Йогексол	<i>Burkholderia cepacia</i>
Лидокаин	<i>Burkholderia cepacia</i>

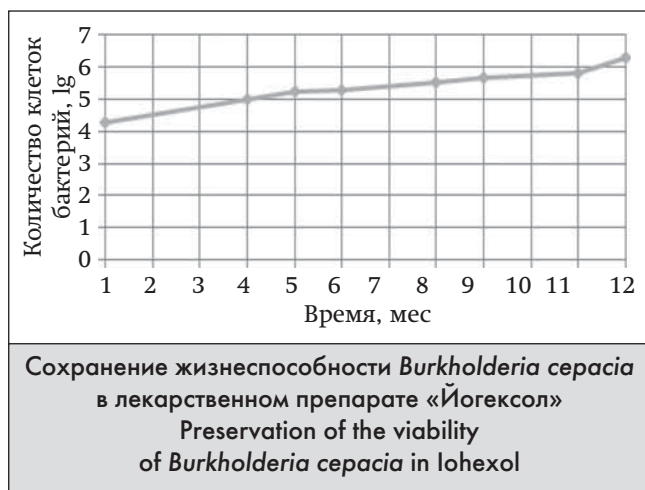


Таблица 2

Результаты исследования лекарственных препаратов

Table 2

Results of drug studies

Лекарственный препарат	Показатель качества	Нормативные требования	Результаты испытания	
			в начале исследования	через 24 мес хранения
Натрия пикосульфат	Микробиологическая чистота	1. Количество аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ/г; 2. Количество дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ/г; 3. Отсутствие <i>E. coli</i> в 1 г	$1,4 \cdot 10^3$ КОЕ/г бактерий <i>Bacillus circulans</i>	$1,4 \cdot 10^3$ КОЕ/г бактерий <i>Bacillus circulans</i>
	Содержание действующих веществ	4,50–5,50 мг	4,90 мг	4,94 мг
Дарунавир	Микробиологическая чистота	1. Количество аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ/г; 2. Количество дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ/г; 3. Отсутствие <i>E. coli</i> в 1 г	$6,0 \cdot 10^2$ КОЕ/г плесневых грибов	$1,5 \cdot 10^2$ КОЕ/г плесневых грибов
	Содержание действующих веществ	69,40–80,60 мг	72,20 мг	71,90 мг
Йогексол	Стерильность	Должен быть стерильным	Нестерильно, $2,0 \cdot 10^4$ КОЕ/г бактерий <i>Burkholderia cepacia</i>	Нестерильно, $1,8 \cdot 10^6$ КОЕ/г бактерий <i>Burkholderia cepacia</i>
	Содержание действующих веществ	288–316 мг йода/мл	289 мг йода/мл	289 мг йода/мл
Лидокаин	Стерильность	Должен быть стерильным	Нестерильно, $3,6 \cdot 10^4$ КОЕ/г бактерий <i>Burkholderia cepacia</i>	Нестерильно, $3,6 \cdot 10^4$ КОЕ/г бактерий <i>Burkholderia cepacia</i>
	Содержание действующих веществ	4,75–5,25 мг/мл	5,03 мг/мл	5,04 мг/мл

содержание лидокаина гидрохлорида в образце после 24 мес хранения осталось без изменений, неизменным осталось и количество микроорганизмов.

Заключение

Таким образом, в ходе проведенного исследования через 24 мес хранения подтверждена жизнеспособность выявленных микроорганизмов во всех изученных ЛП. Через 24 мес хранения в препаратах «Натрия пикосульфат» и «Лидокаин» содержание микроорганизмов не изменилось, количество плесневых грибов в таблетках «Дарунавир» уменьшилось в 4 раза, а в растворе для инъекций «Йогексол» число бактерий *Burkholderia cepacia* увеличилось в 900 раз.

Микроорганизмы (бактерии, плесневые грибы) не оказывали влияния на подлинность и количественное содержание действующих веществ в исследованных препаратах.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература/References

1. Kailings L. Secretariat of the European Free Trade Association, 1973; 17–23.
2. Гаврилов А.С. Фармацевтическая технология. Изготовление лекарственных средств. М.: ГЭОТАР–Медиа, 2010;624. [Gavrilov A.S. Pharmaceutical technology. The manufacture of medicines. Moscow: GEOTAR–Media, 2010; 624 (in Russian)].
3. Гунар О.В., Сахно Н.Г., Рощина М.В., Григорьева В.Э., Меркулов В.А. Оценка микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств и видовая оценка микроорганизмов–контаминантов. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения, 2014;4: 7–11. [Gunar O.V., Sakhno N.G., Roshchina M.V. et al. Assessment of microbiological purity of non-sterile drugs and species spectrum of microbial contaminants. Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya, 2014; 4: 7–11 (in Russian)].
4. Федотов А.Е. Производство стерильных лекарственных средств. М.: Асинком, 2012; 400. [Fedotov A.E. Production of sterile drug. Moscow: Asincom, 2012; 400 (in Russian)].
5. Sandle T. A review of cleanroom microflora: types, trends, and patterns. PDA Journal of pharmaceutical science and technology, 2011; 65: 392–403.
6. Jimenez L., Kulko E., Barron E. et al. *Burkholderia cepacia*: A problem that does not go away! EC Microbiology, 2015; 2 (1): 205–10.
7. Singhal T., Shah S., Naik R. Outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteremia in a chemotherapy day care unit due to intrinsic contamination of an antiemetic drug. Indian journal of medical microbiology, 2015; 33 (1): 117–9.
8. Kim J.M., Ahn Y., LiPuma J.J. et al. Survival and susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex in chlorhexidine gluconate and benzalkonium chloride. Journal of industrial microbiology and biotechnology, 2015; 42 (6): 905–13.
9. Zani F., Minutello A., Maggi L. et al. Evaluation of preservative effectiveness in pharmaceutical products: the use of a wild strain of *Pseudomonas cepacia*. Journal of applied microbiology, 1997; 83 (3):322–6.
10. Rose H., Baldwin A., Dowson C.G. et al. Biocide susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2009; 63 (3):502–10.
11. Torbeck L., Raccasi D., Guilfoyle D.E. et al. *Burkholderia cepacia*, the decision is overdue. PDA journal of pharmaceutical sciences and technology, 2011; 65: 535–43.
12. Sutton S., Jimenez L. A Review of Reported Recalls Involving Microbiological Control 2004–2011 with Emphasis on FDA Considerations of «Objectionable Organisms». American pharmaceutical review, 2006; 9: 62–9.
13. Jimenez L. Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2007; 61 (5):383–99.
14. Vijayakumar R., Sandle T., Manoharan C. A review of fungal contamination in pharmaceutical products and phenotypic identification of contaminants by conventional methods. European journal of parenteral and pharmaceutical sciences, 2012; 17 (1): 4–19.
15. Lopolito P., Bartnett C., Polarine J. Control strategies for fungal contamination in clean rooms. Controlled environments, 2007; 372: 1–5.

Поступила 15 апреля 2019 г.

Received 15 April 2019

Принята к публикации 4 июля 2019 г.

Accepted 4 July 2019