

УДК 6.615.615.11

ОБЩИЕ ФАРМАКОПЕЙНЫЕ СТАТЬИ НА ПРЕПАРАТЫ ПРОБИОТИКИ ДЛЯ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ФАРМАКОПЕИ РФ XIII ИЗДАНИЯ – ПЕРВЫЙ ОПЫТ В МИРОВОЙ ФАРМАКОПЕЙНОЙ ПРАКТИКЕ

Осипова И.Г., Евлашкина В.Ф., Давыдов Д.С., Саканян Е.И.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, e-mail: Osipova@expmed.ru

Увеличение номенклатуры пробиотиков и их широкое применение в клинической практике послужило основанием к разработке ОФС на пробиотики для медицинского применения и методы их испытаний, предназначенные для включения в ГФ РФ (XIII изд.). Для создания единой системы оценки качества пробиотиков (отечественных и зарубежных) были проанализированы требования нормативной документации к качеству препаратов пробиотиков, находящихся в обращении на территории Российской Федерации и включенных в Государственный реестр ЛС РФ. В настоящее время в России зарегистрировано более 50 препаратов пробиотиков в различных лекарственных формах. В процессе проведенного исследования была осуществлена стандартизация используемых терминов, создана система разделения препаратов пробиотиков на группы, разработаны унифицированные требования к основным показателям качества, методам испытаний, отбору производственных штаммов, валидации методов испытаний и т.д. Материалы выполненных исследований использованы при составлении десяти ОФС («Пробиотики», «Бифидосодержащие пробиотики», «Лактосодержащие пробиотики», «Колисодержащие пробиотики», «Споры пробиотиков», «Иммунобиологические лекарственные средства», «Безопасность пробиотиков для медицинского применения», «Микробиологическая чистота», «Специфическая активность пробиотиков для медицинского применения» и «Производственные штаммы и штаммы для контроля»), вошедших в ГФ РФ XIII издания.

Ключевые слова: *общая фармакопейная статья, пробиотик для медицинского применения, производственный штамм, методы испытания, показатели качества*

GENERAL MONOGRAPHS ON PROBIOTICS PREPARATIONS FOR STATE PHARMACOPOEIA OF THE RUSSIAN FEDERATION XIII EDITION – FIRST EXPERIENCE IN THE WORLD PHARMACOPOEIA PRACTICE

Osipova I.G., Evlashkina V.F., Davydov D.S., Sakanjan E.I.

*Federal State Budgetary Institution «Scientific Center for Expert evaluation of Medical Products»
of the Ministry of the Russian Federation, Moscow, e-mail: Osipova@expmed.ru*

The increase of the nomenclature of probiotics and their widespread use in clinical practice was the basis for development of General monographs on probiotics for medical application and test methods for inclusion to State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII edition. To create a unified system of quality assessment of probiotics (national and foreign) have been analyzed the requirements of normative documents on the quality of probiotics preparations in circulation in the territory of the Russian Federation and included in the State Register of medical products of the Russian Federation. Now in Russia there are more than 50 probiotics preparations in different dosage forms. In the process of the research was carried out standardization of the terms, creation of a system of separation of probiotics preparations into groups, developed unified requirements for basic indicators of quality, testing methods, selection of production strains, the validation of test methods, etc. Materials of the research used in the preparation of the ten General monographs («Probiotics», «Bifidobacteria probiotics», «Lactobacteria probiotics», Colibacteria probiotics», «Spore probiotics», «Immunobiologic medical products», «Probiotics safety for medical use», «Microbiologic purity», «The specific activity of probiotics for medical use», «Production strains and strains to control») are included in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII edition.

Keywords: *general monograph, probiotic for medical use, production strain, test methods, quality indicators*

Создание качественных, эффективных и безопасных лекарственных средств (ЛС) является основной задачей современной фармацевтической науки и практики. Любая национальная фармакопея устанавливает стандарты качества ЛС данной страны, являясь наглядным индикатором уровня развития и состояния национальной фармацевтической науки и промышленности. Отечественная система стандартизации ЛС базируется на Государственной Фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ), включающей в себя общие фармакопейные статьи (ОФС) и фармакопейные статьи (ФС). Согласно Федеральному Закону № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» от 12 апреля 2010 года «каче-

ство лекарственного средства – это соответствие лекарственного средства требованиям фармакопейной статьи, либо в случае её отсутствия нормативной документации или нормативного документа» [1]. Требования ГФ обязательны для всех организаций, занимающихся на территории РФ производством, изготовлением, хранением и применением лекарственных средств. Статьи ГФ РФ используются предприятиями – производителями лекарственных средств, как основа для создания собственной нормативной документации, которая в последующем применяется в экспертизе и контроле качества лекарственных средств на всех этапах их жизненного цикла [2].

В настоящее время, в соответствии с Государственным Реестром лекарственных средств (ГРЛС РФ), в Российской Федерации зарегистрировано более 50 препаратов пробиотиков, представленных в различных лекарственных формах (ЛФ) [3]. Увеличение номенклатуры пробиотиков потребовало создания фармакопейных стандартов качества и унификации требований, предъявляемых к их структуре и содержанию.

Целью данного исследования явилось создание фармакопейных стандартов качества лекарственных препаратов пробиотиков, основанных на современных научных достижениях и требованиях отечественных регламентирующих документов. В зарубежных фармакопеях данная группа лекарственных препаратов не выделена в категорию ЛС и монографии на них отсутствуют. В связи с этим, проведение анализа аналогичных монографий ведущих зарубежных фармакопей не представлялось возможным.

Разработка ОФС на лекарственные пробиотики и методы их анализа требовала решения нескольких задач:

– унификация используемых терминов и создание системы классификации на группы препаратов (т.к. без унификации терминологической системы невозможно однозначное понимание регламентируемых стандартов и положений);

– анализ требований, предъявляемых к показателям качества, нормативным требованиям, методам и методикам, условиям проведения испытаний препаратов пробиотиков.

Несмотря на давность введения термина «пробиотики» [4] до настоящего времени продолжаются научные дискуссии, касающиеся правомерности его применения наряду с термином, также используемым в нашей стране – «эубиотики» (или «бактерийные препараты нормофлоры»). Под термином «пробиотик» понимают «препарат на основе живых и убитых микроорганизмов и веществ микробного происхождения, оказывающих позитивные эффекты на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма хозяина через стабилизацию и оптимизацию функции его нормальной микрофлоры» [5]. «Эубиотики – это бактериальные препараты, действующим началом которых являются живые культуры микроорганизмов – представителей нормальной микрофлоры» [6]. Таким образом, терминами «пробиотики» и «эубиотики» изначально обозначали лекарственные препараты, содержащие бактерии, входящие в состав нормальной микрофлоры человека. На протяжении последних лет данные термины использовались как синонимы. Это объясняется тем, что в состав подавляющего большинства пробиотиков изначально вхо-

дили бактерии нормальной микрофлоры человека. Вместе с тем, понятие «пробиотики» более широкое. В настоящее время в состав препаратов пробиотиков входят бациллы, энтерококки, грибы, в связи с чем использование по отношению к их наименованию понятия «пробиотик» правильнее. Эубиотики, по своей сути согласно современным представлениям, следует рассматривать как частную разновидность пробиотиков, поэтому в ОФС, включенной в ГФ РФ XIII издания, используется термин «пробиотики для медицинского применения» с указанием о том, что пробиотики содержат живые и инактивированные апатогенные микроорганизмы и/или продукты их метаболизма вместе с частично разрушенными микробными клетками, обладающими антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий и обеспечивающими восстановление нормальной микрофлоры человека [7].

Традиционно пробиотики классифицируют на группы по составу или по названию таксономических групп микроорганизмов.

По составу пробиотики подразделяют на монокомпонентные, поликомпонентные, сорбированные и комбинированные. Система классификации основана на содержании в составе в качестве активного компонента одного («моно») или нескольких («поли») штаммов/видов/родов микроорганизмов; вспомогательных веществ сорбентов – активированный уголь, кремния диоксид коллоидный и т.п.), (в этом случае пробиотик называется «сорбированным») или лизоцима, лекарственных средств растительного происхождения, витаминов/микроэлементы и др. (такой пробиотик называется комбинированным). Основные недостатки этой классификации состоят в том, что препараты, входящие в одну группу отличаются по основным показателям («Подлинность», «Специфическая активность», «Количество живых бактерий в одной дозе» и «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов»/«Микробиологическая чистота») и нормативным требованиям. Например, в группу «монокомпонентных пробиотиков» входят препараты Бифидумбактерин и Споробактерин, у которых разные показатели специфической активности, в первом случае «Активность кислотообразования», а во втором – «Антагонистическая активность». Кроме того показатели качества «Количество живых бактерий в одной дозе» и «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов/Микробиологическая чистота» также контролируют разными методами, т.к. данные препараты содержат анаэробные и аэробные бактерии, которые требуют различных условий культивирования.



Схема распределения общих фармакопейных статей на препараты пробиотиков и методы испытаний, включенные в ГФ РФ, изд. XIII [7]

Таблица 1

Показатели качества и методы их определения, включенные в общие фармакопейные статьи [7]

Название показателя	Ссылка на нормативный документ или метод испытания
Описание	Визуальный
Подлинность	ОФС.1.7.2.0009.15 «Определение специфической активности пробиотиков»
Время восстановления (для лиофилизатов, порошков)	ОФС.1.8.1.0002.15 «Иммунобиологические лекарственные средства»
Время распадаемости (для таблеток и капсул)	ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул»
Температура и время плавления или время полной деформации (для суппозиторий)	ОФС.1.2.1.0012.15 «Температура плавления» или ОФС.1.4.2.0010.15 «Определение времени полной деформации суппозиторий на липофильной основе»
pH	ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия»
Потеря в массе при высушивании	ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании»
Средняя масса и отклонения от средней массы (для таблеток, суппозиторий, содержимого капсул, пакетов)	ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм»
Извлекаемый объем (для суспензий)	ОФС.1.4.2.0002.15 «Извлекаемый объем»
Специфическая безвредность	ОФС.1.7.2.0001.15 «Безопасность пробиотиков в тестах in vivo»
Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов	ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота»
Специфическая активность	ОФС.1.7.2.0009.15 «Определение специфической активности пробиотиков»
Производственные штаммы и штаммы для контроля	ОФС.1.7.2.0012.15 «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков»
Упаковка и Маркировка	ОФС.1.8.1.0002.15 «Иммунобиологические лекарственные средства»
Хранение	ОФС.1.8.1.0002.15 «Иммунобиологические лекарственные средства»

Другая система классификации основана на делении по таксономическим группам микроорганизмов: «бифидосодержащие пробиотики», «лактосодержащие пробиотики», «колисодержащие пробиотики», «споровые пробиотики» и «пробиотики других таксономических групп (содержат живые апато-

генные бактерии, принадлежащие к родам *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, дрожжевых грибов – *Saccharomyces cerevisiae* и *S.boulevardii*). Этой системой классификации учитываются основные свойства активного компонента. Препараты, входящие в одну группу не от-

личаются по показателям качества, отличия в нормативных требованиях незначительны. В связи с этим система деления по таксономическим группам микроорганизмов была взята за основу. Для четырех групп пробиотиков были разработаны общие фармакопейные статьи [7].

Требования к перечню показателей качества, включаемых в фармакопейную статью и/или нормативную документацию на лекарственные препараты, складывается из требований к лекарственной форме, в которой данный препарат выпускается, и биологических свойств активного компонента. Для создания единой системы оценки качества пробиотиков (отечественных и зарубежных) были проанализированы требования нормативной документации на препараты, внесенные в ГРЛС РФ [3]. Проведенный анализ показал, что пробиотики применяются с использованием различных путей введения: для приема внутрь, интравагинально, ректально. При этом они препараты пробиотиков могут быть в виде различных ЛФ (лиофилизаты, суспензии, порошки, таблетки, ректальные и вагинальные суппозитории и др.). Показатели качества, включенные в ОФС на пробиотики [7], с соответствующими ссылками на ОФС представлены в табл. 1.

Контроль обязательных показателей качества пробиотиков «Подлинность», «Специфическая активность», «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов» и «Специфическая безвредность» включает в себя биологические и микробиологические методы, которые характеризуются более высокой степенью вариабельности, чем физико-химические, что явилось необходимостью к разработке общих фармакопейных статей на используемые методы испытаний.

ОФС 1.7.2.0009.15 «Определение специфической активности пробиотиков» вводит впервые и включает валидированные методы определения показателей качества «Количество жизнеспособных бактерий в одной дозе лекарственного средства», «Активность кислотообразования» или «Антагонистическая активность». Определение количества живых особей в дозе проводят методом десятикратных разведений с высевом на плотные питательные среды (метод Коха) и глубинного чашечного метода или в жидкие и полужидкие среды (метод предельных разведений). При проведении контроля поликомпонентных или комбинированных пробиотиков необходимо учитывать количество и соотношение всех видов или штаммов входящих в препарат. Результаты количественного определения микроорганизмов выражаются в колониеобразующих единицах (КОЕ). Кислотообразующую

активность штаммов-продуцентов, входящих в лакто- и бифидосодержащие пробиотики определяют по титруемой кислотности при культивировании бактерий в адекватной питательной среде, методом кислотно-основного титрования. Для определения антагонистической активности используют метод отсроченного антагонизма на плотной среде по зонам задержки роста тест-штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Тест-штаммы микроорганизмов, получают из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦ ЭСМП» Министерства здравоохранения РФ (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации).

ОФС.1.7.2.0001.15 «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*» вводится впервые и содержит валидированные биологические методы, используемые в опытах *in vivo*, предназначенные для определения следующих показателей: «Безвредность», «Вирулентность», «Токсичность», «Токсигенность», позволяющих выявлять недопустимые реакции человеческого организма на применение лекарственного средства и отсутствие риска причинения вреда здоровью. Контроль пробиотика по показателю «Безвредность» позволяет выявить негативное воздействие испытуемого препарата при вероятном образовании токсических примесей (например, при нарушении производственного регламента, нарушениях условий хранения и т.п.). Испытание безвредности препарата пробиотика осуществляют при его пероральном введении беспородным белым мышам в количестве, не превышающем одной человеческой дозы. Показатели «Вирулентность», «Токсичность» и «Токсигенность» являются обязательными при контроле безопасности производственных штаммов бактерий рода *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, дрожжевых грибов – *Saccharomyces cerevisiae*, *S.boulardii* и др. микроорганизмов. Целью проведения данных тестов является выявление возможной патогенности испытуемых штаммов, превышающей установленный ранее допустимый уровень, что может контролироваться по летальности или интоксикации тестируемых животных.

В ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» впервые включен раздел «Определение микробиологической чистоты иммунобиологических лекарственных средств, содержащих живые микроорганизмы», в котором впервые указаны категории микробной чистоты различных ЛФ пробиотиков (табл. 2), методы определения отсутствия контаминации препаратов пробиотиков посторонними микроорганизмами и грибами.

Микробиологическая чистота пробиотиков

ПРОБИОТИКИ	
Категория 5.3	
ЛФ	Рекомендуемые требования
А. Для приема внутрь, интравагинально (лиофилизаты, суспензии, порошки)	– Отсутствие бактерий-контаминантов в единице препарата/г(мл) – Отсутствие дрожжевых и плесневых грибов в единице препарата/г(мл) – Для колисодержащих препаратов – отсутствие в единице препарата/г(мл) БОЕ-бактериофага (для препаратов с содержанием <i>E.coli</i> не менее 10^{10} КОЕ допускается не более 10 БОЕ бактериофага)
Б. Для приема внутрь, интравагинально, ректально (таблетки, капсулы, суппозитории)	– Общее число аэробных бактерий – не более 10^2 КОЕ в единице препарата (г) – Общее число дрожжевых и плесневых грибов – менее 10 КОЕ в единице препарата (г) – Отсутствие энтеробактерий в единице препарата (г) – Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в единице препарата (г) – Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в единице препарата (г) – Для колисодержащих препаратов – отсутствие в единице препарата (г) БОЕ бактериофага (для препаратов с содержанием <i>E.coli</i> не менее 10^{10} КОЕ допускается не более 10 БОЕ бактериофага)

Раздел этой ОФС «Определение микробиологической чистоты иммунобиологических лекарственных средств, содержащих живые микроорганизмы» построен следующим образом: «Питательные среды, используемые в испытаниях», «Отбор и подготовка испытуемых образцов», таблицы с указанием условий проведения испытаний, «Методика», «Учет результатов».

ОФС.1.7.2.0012.15 «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков» вводится впервые и распространяется на штаммы микроорганизмов, используемые в производстве пробиотиков для медицинского применения [157]. В ОФС указано, что для производства ЛП должны использоваться пробиотические производственные штаммы микроорганизмов с терапевтическим действием, подтвержденным клинически, депонированные в Национальной или Международной коллекции. Кроме того, в ОФС изложены требования к отбору, проверке и хранению рекомендуемых штаммов микроорганизмов, а также к биологическим свойствам тест-штаммов микроорганизмов, рекомендуемых для контроля антагонистической активности производственных штаммов и лекарственных препаратов пробиотиков.

ОФС.1.8.1.0002.15 «Имунобиологические лекарственные средства» вводится впервые и содержит требования, предъявляемые к производству, исходному сырью, штаммам, показателям качества, упаковке, маркировке, условиям транспортирования и хранения иммунобиологических препаратов, включая препараты пробиотиков [7].

Заключение

Разработка фармакопейных требований к оценке качества препаратов пробиотиков

обеспечивает комплексный подход к вопросам их стандартизации, основанных на национальных требованиях, сформированных с учетом системы обеспечения качества лекарственных средств в РФ. Материалы выполненных исследований включены в десять ОФС («Пробиотики», «Бифидосодержащие пробиотики», «Лактосодержащие пробиотики», «Колисодержащие пробиотики», «Споровые пробиотики», «Имунобиологические лекарственные средства», «Безопасность пробиотиков для медицинского применения», «Микробиологическая чистота», «Специфическая активность пробиотиков для медицинского применения» и «Производственные штаммы и штаммы для контроля»), вошедших в ГФ РФ XIII издания.

Список литературы

1. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
2. Стратегия лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года. Available from: <http://www.realschool.ru/data/library/statia.pdf>; <http://fas.gov.ru/upload/aboutfas/archive/dcd6e0324412e43ebe3e2f165ca4717b.pdf>.
3. Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации. [Электронный ресурс] // URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/>
4. Lilly D.M., Stillwell R.H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms // Science. – 1965. – 147. – P. 747–748.
5. FAO/WAO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Argentina, 2001. Available from: <http://www.fao.org/es/esn/Probio/report.pdf>.
6. Чупринина Р.П., Скорикова (Осипова) И.Г., Евлашкина В.Ф. Препараты для профилактики и лечения дисбактериозов различной этиологии // В монографии: «Актуальные проблемы создания и применения иммунологических препаратов для диагностики и профилактики инфекционных болезней». – Пермь, 1993. – Т. 1. – С. 264–279
7. Государственная фармакопея РФ, изд. XIII / Т. 1, 2 <http://www.femb.ru/feml>