

Разработка турбидиметрической методики количественного определения антибиотиков группы аминогликозидов в лекарственных препаратах для медицинского применения

*Е. Н. СЕМЕНОВА, С. И. КУЛЕШОВА, Е. И. САКАНЯН

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ, Москва

The Development of a Turbidimetric Method for the Quantitative Determination of Antibiotics of the Aminoglycoside Group in Medications

*E. N. SEMENOVA, S. I. KULESHOVA, E. I. SAKANYAN

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

Разработана и валидирована методика количественного определения стрептомицина сульфата в лекарственных средствах турбидиметрическим методом. По результатам экспериментов было установлено, что метрологические характеристики таких валидационных параметров методики, как линейность, прецизионность, правильность, не превышают валидационные критерии. Линейность отмечена в диапазоне концентраций стрептомицина от 3,75 до 8,43 мкг/мл. Результаты валидационных испытаний методики количественного определения стрептомицина свидетельствуют о перспективности и целесообразности внедрения турбидиметрического метода в отечественную систему стандартизации и оценки качества аминогликозидных антибиотиков.

Ключевые слова: аминогликозидный антибиотик, количественное определение, турбидиметрический метод, стандартизация, оценка качества.

A method for the quantitative determination of streptomycin sulfate in medicines by the turbidimetric method has been developed and validated. Based on the results of the experiments, it was found that the metrological characteristics of such validation parameters of the method as linearity, precision, and correctness do not exceed the validation criteria. Linearity was noted in the range of streptomycin concentrations from 3.75 to 8.43 µg/ml. The results of validation tests of the method for the quantitative determination of streptomycin indicate the prospects and feasibility of introducing the turbidimetric method into the domestic system for standardization and quality assessment of aminoglycoside antibiotics.

Keywords: aminoglycoside antibiotic, quantitative determination, turbidimetric method, standardization, quality assessment.

Введение

Стратегия развития фармацевтической отрасли Российской Федерации на период до 2020 г., а также Стратегия медицинского обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 г. обозначают в качестве одного из главных приоритетов государственной политики разработку конкурентоспособных импортозамещающих отечественных ЛС, в том числе, антибиотиков. Реализация этой задачи требует в свою очередь также совершенствования методов их стандартизации и последующей оценки качества [1, 2].

Одним из основных показателей качества антибиотиков является количественное определение. Методы, используемые для этих целей, их специфичность, чувствительность, воспроизво-

димось и т. д. постоянно совершенствуются и модифицируются, так как правильный их выбор определяет в дальнейшем и качество ЛС.

Известны различные методы количественного определения антибиотиков: биологические, например, метод последовательных разведений, диффузионный и турбидиметрические методы; спектроскопические, хроматографические, и другие. Каждый метод имеет область своего применения и характеризуется как определёнными преимуществами, так и недостатками.

В последние годы широкое распространение для количественного определения антибиотиков, в частности для антибиотиков полусинтетического происхождения, получили методы физико-химического анализа. Наиболее широко используются в фармакопейной практике методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и УФ-спектроскопии. Они обладают высокой воспроизводимостью и точностью, однако требуют ис-

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Петровский б-р, д. 8, стр. 2, г. Москва, 127051

пользования дорогостоящего оборудования и высокотоксичных органических растворителей, а также, в ряде случаев, отличаются длительностью анализа из-за необходимости предварительной пробоподготовки. Несмотря на распространение методов физико-химического анализа, микробиологические методы по-прежнему актуальны, а для некоторых антибиотиков остаются незаменимыми. Примером таких антибиотиков являются ЛС группы аминогликозидов. Это связано с особенностями химического строения антибиотиков группы аминогликозидов, в связи с чем, применение и развитие физико-химических методов для них затруднено [3].

На сегодняшний день ведущими зарубежными фармакопеями (USP, Ph. Eur., BP, JP) для количественного определения антибиотиков группы аминогликозидов рекомендованы два биологических метода: метод диффузии в агар и турбидиметрический метод. Однако следует отметить, что в отечественной фармакопейной практике (Фармакопеях СССР и ГФ РФ) применяется только диффузионный метод [3].

Вместе с тем, турбидиметрический анализ обладает рядом преимуществ: метод экономичен, более чувствителен к низким концентрациям активного компонента и может быть адаптирован для получения точных результатов в короткие периоды времени, что позволяет использовать его как экспресс-метод для определения активности антибиотических препаратов [4].

В связи с этим, представляется своевременным актуализация действующих и разработка новых фармакопейных стандартов качества на ЛС на основе антибиотиков, в том числе, на методы определения их качества, которые должны быть, с одной стороны, гармонизированы с таковыми ведущих фармакопей мира, а, с другой стороны, отражать специфику развития отечественной фармацевтической отрасли.

Цель работы заключается в разработке турбидиметрической методики количественного определения стрептомицина сульфата в лекарственных препаратах для медицинского применения, находящихся в обращении на территории Российской Федерации.

Материал и методы

Препараты антибиотиков, реактивы и материалы. В работе были использованы: препарат «Стрептомицин, порошок для приготовления раствора для внутримышечного введения, 1 г», Россия; стандартный образец (СО) стрептомицин сульфат — USP RS (активность — 754 мкг/мг, действительный на момент исследования). Для приготовления основных и рабочих растворов стандартного и испытуемого образцов использовали буфер №4 (ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар). Для разработки методики были использованы химические реактивы отечественного и импортного производства с квалификацией не ниже «х. ч.».

Микроорганизмы, питательные среды. В работе использовали следующие штаммы микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (для турбидиметрического анализа); *Bacillus cereus*, var. *mycoides* 537 (для метода диффузии в агар), полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. При проведении турбидиметрического анализа применяли питательную среду № 3, рекомендованную USP и разработанную питательную среду для турбидиметрии, содержащую компоненты отечественного производства: панкреатический гидролизат казеина (ПГК) (ТУ 9229-240-78095326-2016); гидролизат мяса ферментативный (ГМФ) (ФСП 42-0487-4245-03); экстракт кормовых дрожжей (ТУ 9385-090-14237183-08) и D-глюкоза (ГОСТ 6038-79), pH используемой среды составил $7,2 \pm 0,2$. Определение биологической активности методом диффузии в агар проводили по ОФС.1.2.4.0010.15 «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар».

Условия эксперимента. Штаммы тест-микроорганизмов инкубировали в разработанной жидкой питательной среде для турбидиметрии при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. В день испытания бульонную культуру разбавляли для достижения мутности суспензии $25 \pm 2\%$ (коэффициент пропускания) с использованием спектрофотометра Agilent 8453 (США) и длины волны 580 нм. Полученную суспензию использовали в качестве посевного материала. Для турбидиметрического анализа была выбрана трёхдозная модель параллельных линий (3×3 дизайн; 3 дозы стандарта и 3 дозы образца). На каждые 1000 мл жидкой питательной среды прибавляли 10 мл посевного материала. Затем 9 мл инокулированной среды вносили в пробирку объёмом 20 мл и добавляли 1 мл рабочего раствора стандартного образца с соответствующей концентрацией стрептомицина ($C_1=3,75$, $C_2=5,63$ и $C_3=8,43$ мкг/мл) или 1 мл рабочего раствора испытуемого образца с соответствующей приближительной концентрацией ($T_1=3,75$, $T_2=5,63$ и $T_3=8,43$ мкг/мл). После этого анализируемые смеси инкубировали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 4,5 ч. Одновременно инкубировали отрицательный контроль (9 мл стерильной жидкой питательной среды для турбидиметрии и 1 мл буфера № 4) и положительный контроль (9 мл инокулированной жидкой питательной среды и 1 мл буфера № 4). Все пробирки, содержащие стандартный и испытуемый образец в разных концентрациях были подготовлены в шести экземплярах.

По завершении процесса инкубации размножение микроорганизмов останавливали добавлением 0,5 мл 12% раствора формальдегида к каждой из пробирок, в том числе положительных и отрицательных контролей и определяли оптическую плотность взвеси тест-микроорганизмов в пробирках с испытуемым и стандартным образцами, а также контрольных пробирок.

После установления оптимальных условий для получения кривой «доза—реакция», была проведена валидация методики путём определения следующих параметров: линейность, правильность, прецизионность, устойчивость и специфичность [5, 6]. Расчёт биологической активности антибиотиков, математическую и статистическую обработку результатов осуществляли в соответствии с существующими рекомендациями [5] с помощью программных обеспечений Microsoft Office Excel и CombiStats, version 5.0.

Результаты и обсуждение

В настоящее время на фармацевтическом рынке России присутствует более 1000 препаратов на основе антибиотиков. Среди аминогликозидных антибиотиков к числу наиболее важных в практическом отношении относится стрептомицин. Лекарственные препараты на основе стреп-

Таблица 1. Биологический контроль качества жидкой питательной среды для турбидиметрии

Тест-штамм	Наименование биологического показателя	Значение показателя
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P	Чувствительность	10^{-7}
	Стабильность основных свойств	Равномерное помутнение среды. Грамположительные кокки в виде гроздей. Оксидазоотрицательны, каталазоположительны
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Чувствительность	10^{-7}
	Стабильность основных свойств	Равномерное помутнение среды. Грамположительные кокки в виде гроздей. Оксидазоотрицательны, каталазоположительны
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Чувствительность	10^{-7}
	Стабильность основных свойств	Равномерное помутнение среды. Грамотрицательные неподвижные палочки. Оксидазоотрицательны, каталазоположительны

томицина используют в комплексной терапии туберкулёза. Стрептомицин обладает эффективным действием в отношении особо опасных инфекций (чума, туляремия, бруцеллёз) и не может быть с полным успехом заменён сегодня даже современными полусинтетическими антибиотиками [7].

Государственная Фармакопея Российской Федерации для количественного определения стрептомицина в лекарственных средствах рекомендует использование метода диффузии в агар. Этот метод основан на способности молекул антибиотика стрептомицина диффундировать в агаровых средах и образовывать зоны угнетения, в которых не развивается тест-микроорганизм, чувствительный к испытываемому антибиотику [5, 8].

Принцип турбидиметрического тестирования заключается в измерении и сравнении степени угнетения роста бактериальной популяции в жидкой питательной среде в результате воздействия испытываемого образца и стандартного образца в определённых концентрациях.

В связи с этим, на первом этапе необходимо было разработать состав жидкой питательной среды, которая, с одной стороны, соответствовала бы питательным потребностям тест-микроорганизмов, обеспечивая их хороший рост, а с другой стороны, отвечала требованиям, предъявляемым к питательным средам для турбидиметрии, т. е. была прозрачной и неинтенсивно окрашенной. Состав питательной среды и оценка её качества описаны в работе [9].

Необходимо отметить, что в качестве основного источника белка в жидкой питательной среде для турбидиметрии используется ПГК, получаемый в процессе ферментативного гидролиза из казеина и отличающийся от других источников белка (например, мясной ткани) постоянством состава и содержанием всех основных аминокислот и витаминов. В качестве источника углеводов в жидкую питательную среду для турбидиметрии были добавлены глюкоза и дрожжевой экстракт. Дрожжевой экстракт является дополнительным источником витаминов, макро- и микроэлементов.

Данные, приведённые в табл. 1, подтверждают, что состав разработанной жидкой питательной среды для турбидиметрии достаточен для

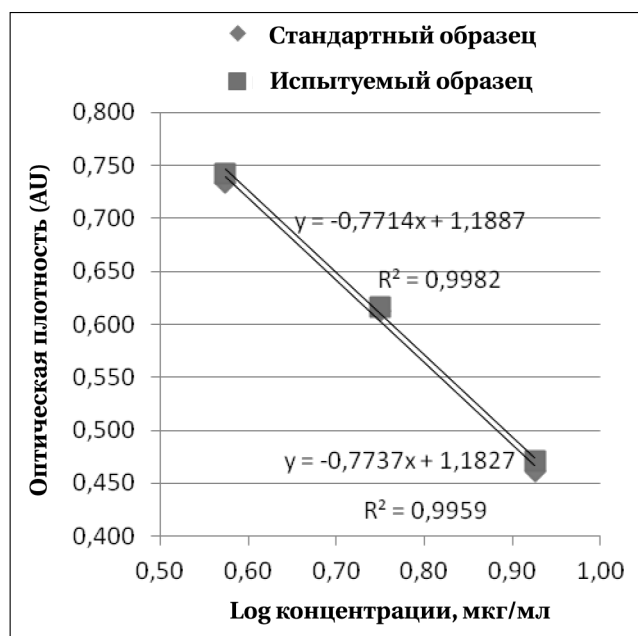
удовлетворения функции энергообеспечения и роста тест-микроорганизмов.

Как видно из табл. 1, тест-микроорганизм *S. aureus* ATCC 6538 P в разработанной жидкой питательной среде даёт равномерный рост без образования плёнки и осадка, что важно для проведения анализа турбидиметрическим методом, и в ходе проведённых экспериментальных исследований был выбран как высокочувствительный к стрептомицину тест-микроорганизм для дальнейшего использования при количественном определении его в лекарственных средствах.

Проверка правильности выбранных условий эксперимента и валидация методики. Определение биологической активности при использовании трёхдозной модели параллельных линий проводят путём сравнения линий дозозависимости стандартного и испытываемого образцов (т.е. сравнения степени угнетения роста бактериальной популяции в результате воздействия испытываемого образца и стандартного образца в определённых концентрациях). Об угнетении роста тест-микроорганизма судят по величине мутности среды (оптическая плотность взвеси тест-микроорганизма), которая измеряется фотометрически после инкубации. Выбранная модель предполагает, что взаимосвязь между логарифмом доз и оптической плотностью взвеси тест-микроорганизма должна быть представлена в виде прямой линии во всем диапазоне исследованных концентраций; прямая линия испытываемого образца должна быть параллельна соответствующей прямой линии стандартного образца [5, 10].

На рисунке представлена выявленная зависимость измеряемого параметра (оптической плотности взвеси тест-микроорганизма) от концентрации определяемого антибиотика. Прямолинейную зависимость наблюдали на протяжении всего исследуемого диапазона концентраций стрептомицина от 3,45 до 8,43 мкг/мл. О тесной линейной связи и корреляции между зависимой и объясняющей переменными можно судить по коэффициенту детерминации R^2 .

В соответствии с требованиями ОФС 1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологи-



Зависимость оптической плотности взвеси тест-микроорганизма *S. aureus* ATCC 6538 P от концентрации стрептомицина

Примечание. Уравнения линейной регрессии и значения коэффициентов детерминации: $y = -0,7737x + 1,1827$; $R^2 = 0,9959$ для стандартного образца; $y = -0,7714x + 1,1887$; $R^2 = 0,9982$ для испытуемого образца.

ческими методами» [5], был проведен дисперсионный анализ, который подтвердил правильность полученных данных и значительную регрессию ($p < 0,01$), характеризующую статистическую значимость дозозависимости, параллельность двух линий регрессии, свидетельствующую, что различия между наклоном прямых испытуемого и стандартного образцов статистически незначимы («Параллельность»), линейность дозозависимости («Линейность», «Квадратичность» и «Разность квадратичностей») (табл. 2).

Для анализа специфичности оценивали способность методики определять антимикробную активность стрептомицина в отношении подоб-

ранного тест-штамма. Специфичность была подтверждена использованием высокочувствительного к стрептомицину тест-микроорганизма *S. aureus* ATCC 6538 P, а также отсутствием угнетения роста тест-штамма в контрольной пробирке (положительный контроль, т.е. содержащий только инокулированную питательную среду и растворитель (буфер № 4)).

Прецизионность исследовали на двух уровнях: повторяемость (сходимость) и внутрилабораторная прецизионность.

Повторяемость разработанной методики оценивали по независимым результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории в пределах короткого промежутка времени, т. е. по результатам параллельных определений ($RSD = 0,62$).

Внутрилабораторную прецизионность валидируемой методики определяли в условиях работы одной лаборатории, но в разные дни ($RSD = 2,79$).

Данные, приведённые в табл. 3, свидетельствуют о пригодности разработанной методики по валидационному параметру надёжность, так как использование разных питательных сред для турбидиметрии (№3, рекомендованной USP и разработанной нами жидкой питательной среды), и небольшие изменения времени инкубации и длины волны не влияли на определение антимикробной активности стрептомицина в лекарственных средствах.

Согласно Руководству по валидации методик анализа лекарственных средств [6], правильность методики характеризуется степенью близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений к принятому опорному (истинному) значению. Оценка правильности может быть выполнена несколькими способами, одним из которых является сравнение результатов, полученных с использованием валидируемой методики и фармакопейного метода (табл. 4).

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа

Источник дисперсии (показатель)	Число степеней свободы	Сумма квадратов	Средний квадрат	$F_{\text{набл.}}$	$F_{\text{критич.}}$	
Регрессия	1	0,369648	0,369648	833,849	>8,1	$p = 99\%$
Параллельность	1	0,00045000	0,00045000	0,001	<4,35	$p = 95\%$
Линейность	1	0,00104723	0,00104723	1,181	<4,35	$p = 95\%$
Квадратичность	1	0,00100042	0,00100042	2,257	<4,35	$p = 95\%$
Разность квадратичностей	1	0,00004681	0,00004681	0,106	<4,35	$p = 95\%$

Таблица 3. Результаты проверки устойчивости количественного определения стрептомицина турбидиметрическим методом

Параметр	Модифицированные условия	Нормальные условия	Устойчивость методики
Время инкубации (мин)	265	270	Устойчива
	275		
Длина волны (нм)	525	530	Устойчива
	535		
Питательная среда	№ 3 Разработанная питательная среда	Разработанная питательная среда	Устойчива

Таблица 4. Сравнительная оценка биологических методов количественного определения стрептомицина

Метод анализа	Время выполнения анализа (инкубации), ч	Среднее содержание стрептомицина, %	RSD, %
Турбидиметрическая методика	4,5	100,1	2,3
Диффузия в агар	18–20	98,6	0,80

На основании данных анализа можно сделать вывод о том, что с вероятностью 95% не существует статистически значимых различий между результатами, полученными с использованием обеих методик ($t_{\text{расч.}}=1,21 < t_{\text{крит.}}=2,45$).

По совокупному установлению соответствий критериям приемлемости прецизионности, линейности и специфичности, можно сделать заключение о правильности валидируемой методики.

Заключение

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о возможности при-

менения разработанной методики для определения количественного содержания стрептомицина в лекарственных препаратах, находящихся в обращении на территории Российской Федерации.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учёта НИР АААА-А18-118021590049-0).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Юргель Н.В. Система надзора и контроля в сфере обращения лекарственных средств в Российской Федерации. Вестник Росздравнадзора. — 2008. — № 6. — С. 4–11. / *Jyurgel' N.V. Sistema nadzora i kontrolya v sfere obrashcheniya lekarstvennykh sredstv v Rossijskoj Federatsii. Vestnik Roszdravnadzora* 2008; 6: 4–11. [in Russian]
2. Саканян Е.И. Надлежащая фармакопейная практика: современные аспекты развития. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. — 2013. — № 1. — С. 60–62. / *Sakanyan E.I. Nadlezhashchaya farmakopeynaya praktika: sovremennyye aspekty razvitiya. Vestnik Nauchnogo Tsentra Ekspertizy Sredstv Meditsinskogo Primeneniya* 2013; 1: 60–62. [in Russian]
3. Семенова Е.Н., Саканян Е.И., Кулешова С.И. Сравнительная характеристика методов количественного определения, используемых при стандартизации и последующей оценке качества антибиотиков. Вестн. военно-мед. Академии. — 2017. — Т. 63. — № 7–8. — С. 53–57. / *Semenova E.N., Sakanyan E.I., Kuleshova S.I. Sravnitel'naya kharakteristika metodov kolichestvennogo opredeleniya, ispol'zuemykh pri standartizatsii i posleduyushchej otsenke kachestva antibiotikov. Vestnik Voenno-Med. Akademii* 2017; 63: 7–8: 53–57. [in Russian]
4. Олещук Ю.В., Семенова Е.Н., Кулешова С.И., Саканян Е.И. Применение турбидиметрического метода анализа для стандартизации и оценки качества антибиотиков группы аминогликозидов и лекарственных препаратов на их основе. Антибиотики и химиотер. — 2018. — Т. 36. — № 7–8. — С. 62–66. / *Oleshchuk Yu.V., Semenova E.N., Kuleshova S.I., Sakanyan E.I. Primenenie turbidimetricheskogo metoda analiza dlya standartizatsii i otsenki kachestva antibiotikov gruppy aminoglikozidov i lekarstvennykh preparatov na ikh osnove. Antibiotiki i khimioter* 2018; 36: 7–8: 62–66. [in Russian]
5. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Государственная фармакопея РФ. XIV изд. М.: ФЭМБ, 2018. / *Ministerstvo zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii. Gosudarstvennaya Farmakopeya RF. XIV izd. M.: FEMB, 2018. [in Russian]*
6. Юргель Н.В., Младенцев А.Л., Бурдейн А.В., Гетьман М.А., Малин А.А., Косенко В.В. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. М. Министерство здравоохранения и социального развития РФ; 2007. / *Jyurgel' N.V., Mladentsev A.L., Burdeyn A.V., Get'man M.A., Malin A.A., Kosenko V.V. Rukovodstvo po validatsii metodik analiza lekarstvennykh sredstv. M. Ministerstvo zdravookhraneniya i sotsial'nogo razvitiya RF; 2007. [in Russian]*
7. Навашина С.М., Фомина И.П., Сазыкин Ю.О. Антибиотики группы аминогликозидов. М.: Медицина; 1977. / *Navashina S.M., Fomina I.P., Sazykin Yu.O. Antibiotiki gruppy aminoglikozidov. M.: Meditsina; 1977. [in Russian]*
8. Кулешова С.И. Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. — 2015. — № 3. — С. 13–17. / *Kuleshova S.I. Opredelenie aktivnosti antibiotikov metodom diffuzii v agar. Vestnik Nauchnogo Tsentra Ekspertizy Sredstv Meditsinskogo Primeneniya* 2015; 3: 13–17. [in Russian]
9. Саканян Е.И., Семенова Е.Н., Кулешова С.И. и др. Разработка и оценка качества новой питательной среды для количественного определения антибиотиков турбидиметрическим методом. Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. — 2018. — № 20. — С. 21–26. / *Sakanyan E.I., Semenova E.N., Kuleshova S.I. i dr. Razrabotka i otsenka kachestva novoy pitatel'noj sredy dlya kolichestvennogo opredeleniya antibiotikov turbidimetricheskim metodom. Voprosy Obespecheniya Kachestva Lekarstvennykh Sredstv* 2018; 20: 21–26. [in Russian]
10. Hewitt W. Microbiological assay for pharmaceutical analysis. Interharm/CRC; 2003.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Семенова Екатерина Николаевна — Эксперт I категории лаборатории антибиотиков Испытательного Центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Кулешова Светлана Ивановна — к. б. н., Начальник лаборатории антибиотиков Испытательного Центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кандидат биологических наук, Москва

Саканян Елена Ивановна — д. фарм. н., профессор