

Валидација на метод за определување микробиолошка чистота на Кафетин® таблети

Драги Тодоровиќ, Ана Соколовска, Христина Бабуновска*

Фармацевтска, хемиска и козметичка индустрија "Алкалоид" а.д. - Скопје
"Александар Македонски" 12, 1000 Скопје, Македонија

Received March 2003; accepted September 2003

Апстракт

Извршена е валидација на методот за определување микробиолошка чистота на Кафетин® таблети. За таа цел користени се тест-микроорганизми: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и *Aspergillus niger*, од колекцијата ATCC. Употребен е неспецифичен хранлив медиум за аеробни микроорганизми и специфични хранливи медиуми за соодветни тест микроорганизми: ENDO, Cetrimid, Baird-Parker и Sabouraud хранлив агарен медиум. Користени се два начина на изведување на методот: директна инокулација во хранлив медиум и мембранска филтрација. Притоа е користен тестот на предизвик (Challenge test) и тестот на броење на пораснати колонии (CFU/ml). Вршена е пресметка на факторот што претставува однос помеѓу пораснати микроорганизми на инокулиран хранлив медиум, без и со додавање на испитуваниот препарат, како критериум за прифатливост на добиените аналитички резултати. Добиените вредности за факторот како критериум за прифатливост покажаа задоволителни вредности. Тоа укажува дека методот со кој се работи може да се употребува за определување на микробиолошка чистота кај Кафетин® таблети.

Клучни зборови: микробиолошка чистота, валидација на метод, Кафетин® таблети

Вовед

Микробиолошката чистота како параметар кај цврстите фармацевтски форми покажува присуство на дозволен број од некои непатогени микроорганизми што не го загрозуваат здравјето на корисниците, а исто така немаат негативно влијание на квалитетот на фармацевтскиот препарат и отсуство на патогени микроорганизми (1, 6).

Поголем број непатогени микроорганизми од дозволените може да доведе до појава на несакани ефекти кај пациентите, додека присуството на патогени микроорганизми може да биде вистинска опасност по здравјето на корисниците. Микробиолошката чистота е значаен параметар не само во моментот на производство, туку и до рокот на употреба на препаратот. Ако почетните вредности за микробиолошка чистота не соодветствуваат

може да се очекува дека до декларираниот рок на траење нивниот број ќе се зголеми. Микроорганизмите преку своите ензими и метаболити, можат да стимулираат и да предизвикаат различни процеси како оксидација, хидролиза, редукција и сл. Тоа може да доведе до појава на несакани физички и хемиски промени кај препаратите како промена на боја, појава на несакан мирис, опаѓање на тврдината, опаѓање на содржината на активната компонента, појава на разградни продукти.

Несоодветна контактна амбалажа може да доведе во услови на несоодветно чување на фармацевтските препарати до иницирање раст на микроорганизми и како последица на тоа можат да се случат процеси на интензивна деградација, иако препаратите во моментот на производство ги задоволуваат критериумите за микробиолошка чистота.

Затоа е многу важно при испитување микробиолошка чистота методолошката постапка да е валидирана, да се користат хранливи медиуми на кои пред-

*Hristina Babunovska
Tel: 389 2 104 065 Fax: 389 2 104 014
e-mail: hristina@unet.com.mk

ходно им е испитан фертилитетот и да бидат задоволени условите на ДПП/ДЛП во микробиолошката лабораторија во која што се изведува тестот (5).

Определување микробиолошка чистота на Кафетин® таблети се изведува според монографиите во современите фармакопеи. Притоа, како прифатливи се земаат критериумите:

– вкупен број аеробни бактерии - дозволен лимит 10^3 - максимално прифатлив лимит 5×10^3

– вкупен број фунги - дозволен лимит 10^2 - максимално прифатлив лимит 5×10^2

Escherichia coli - да не биде присутна (2).

За таа цел користени се лиофилизати од тест-микроорганизми со деклариран број колониформни единици (околу 100 CFU/ml). Употребени се директна инокулација на цврст хранлив медиум и паралелна употреба на мембранска филтрација како потврда на валидација на методот. Притоа е користен тестот на предизвик (Challenge test) и тестот на броење на плоча (3). Факторот како критериум на прифатливост е пропишан во фармакопеите и тој не смее да биде поголем од фактор пет (2). Кога некој препарат се работи прв пат за чии ексципиенти и активни компоненти нема потполни литературни податоци за нивното антимикробно дејство, како претходно испитување се прави тест на антимикробно дејство на препаратот (4).

Експериментален дел

Материјали

Стандардна апаратура и прибор во микробиолошка лабораторија ;

Пуферен раствор на пептон со натриум хлорид ;

Хранливи медиуми:

- Trypcase soy agar (TSA),
- Cetrimide агарен медиум,
- Baird Parker агарен медиум,
- ENDO агарен медиум,
- Sabouraud агарен медиум.

Тест-микроорганизми со деклариран број на CFU/ml:

- Escherichia coli* ATCC 8739,
- Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027,
- Staphylococcus aureus* ATCC 6538,
- Candida albicans* ATCC 10231,
- Aspergillus niger* ATCC 16404 и
- Bacillus subtilis* ATCC 6633

Суспензиите на тест-микроорганизми од лиофилизати приготвени се според упатството на производителот на тест-културите.

Определување антимикробно дејство на Кафетин® таблети

За оваа цел се подготвени во дупликат петриевни садови во кои е аплициран подготвениот препарат што се испитува. Извршена е инокулација со *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* и *Aspergillus niger* и прелиени се со соодветни хранливи медиуми. Инкубирани се 48-72 часа и отчитани се резултатите за вкупен број бактерии и фунги.

За определување на антимикробното дејство со специфични тест микроорганизми подготвена е суспензија од пуферен раствор на пептон со испитуваниот препарат и тест микроорганизми: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Од вака подготвените суспензии инокулиран е дел во претходно подготвени хранливи медиуми во петриевни садови во дупликат. Инкубирани се 48 часа и отчитани се резултатите за специфичните тест микроорганизми.

Фактор на прифатливост при определување микробиолошка чистота кај Кафетин® таблети

Користени се пет видови тест-микроорганизми: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* 10231 и *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Во 90,0 ml пуферен раствор од пептонска вода со рН 7,2 суспендирани се 10,0 g Кафетин® таблети.

Во пет стерилни епрувети (со капак за завртување), со стерилна пипета, префрлен е дел од суспензијата на Кафетин® таблети.

Во секоја епрувета со суспензија од Кафетин® таблети, со стерилна пипета, инокулиран е дел од суспензија на тест микроорганизам (во секоја епрувета по еден од тест микроорганизмите).

Содржината од секоја епрувета (добро затворена) е хомогенизирана со мешалка.

За потврда на добиените резултати користени се два начина за изведба на тестот.

Директна инокулација во хранлив медиум

Методот е изведен во согласност со наведените податоци:

Мембранска филтрација

Од епруветата со суспензија од Кафетин® таблети и соодветен микроорганизам по добра хомогенизација, со стерилна пипета, аплицирана е одре-

Препарат со микроорганизам	Хранлив медиум	Температура за инкубација (°C)	Период на инкубација
Кафетин® таблети/ <i>Escherichia coli</i>	TSA и ENDO	44- 2	Пет дена
Кафетин® таблети/ <i>Pseudomonas aerug.</i>	TSA и Cetrimide	32-35	Пет дена
Кафетин® таблети/ <i>Staphylococcus aureus</i>	TSA и Baird Parker	32-35	Пет дена
Кафетин® таблети/ <i>Candida albicans</i>	Sabouraud	22-25	Седум дена
Кафетин® таблети/ <i>Aspergillus niger</i>	Sabouraud	22-25	Седум дена

дена количина во еден држач за филтер од системот за филтрација, во кој веќе е поставен мембрански филтер со мрежа и големина на пори од 0,45µm. По извршена филтрација, филтерот е промиен со три порции од по 100ml пуферен раствор од пептон. Со стерилна пинцета филтерот е пренесен во петриев сад со хранлив медиум.

Хранливите медиуми, температурата и времетраењето на инкубацијата се исти како и при директна инокулација.

Резултати и дискусија

Според прикажните резултати во Табела 1, активните компоненти и ексципиентите во Кафетин® таблети не покажаа инхибирачко дејство врз испитуваните тест микроорганизми поради што нема потреба од инактивација.

Резултатите прикажани на Табелата 2 покажаа дека факторот на прифатливост се движи од 1,71 до 2,12 при директна инокулација врз хранлив медиум или 1,50 до 1,75 со мембранска филтрација, што е во рамките на критериумот на прифатливост.

Резултатите прикажани на Табелата 3 покажаа дека факторот на прифатливост се движи од 1,30 до 2,26 при директна инокулација врз хранлив медиум или 1,53 до 3,22 со мембранска филтрација, што е во рамките на критериумот на прифатливост.

Резултатите прикажани на Табелата 4 покажаа дека факторот на прифатливост се движи од 2,25 до 2,50 при директна инокулација врз хранлив медиум или 1,5 до 2,00 со мембранска филтрација, што е во рамките на критериумот на прифатливост.

Резултатите прикажани на Табелата 5 покажаа дека факторот на прифатливост се движи од 1,25 до 1,48 при директна инокулација врз хранлив медиум или 1,24 до 1,37 со мембранска филтрација, што е во рамките на критериумот на прифатливост.

Резултатите прикажани на Табелата 6 покажаа дека факторот на прифатливост се движи од 0,92 до 1,02 при директна инокулација врз хранлив медиум или 0,65 до 0,74 со мембранска филтрација, што е во рамките на критериумот на прифатливост.

Резултатите во Табела 7 покажуваат дека факторите на прифатливост за петте тест микроорганизми, при валидација на методот за микробиолошка чистота кај Кафетин® таблети со директна инокулација се движат од 0,92 до 2,26, а со мембранска филтрација од 0,65 до 3,22 и се во рамките на критериумот на прифатливост.

Табела 1. Определување антимикробно дејство на Кафетин® таблети

микроорганизам во суспензија од препарат	хранлив медиум	I петриев сад	II петриев сад	Контролен петриев сад (без препарат)
<i>Escherichia coli</i>	ENDO	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	TSA	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chapman	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cetrimid	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	Sabouraud	+	+	+

- нема пораст на колонии;

! слаб пораст на колонии;

+ добар пораст на колонии;

Табела 2. Фактор на прифатливост при определување микробиолошка чистота на Кафетин® таблети со суспензија од *Escherichia coli* ATCC 8739

тест - материјал	директно нанесување на хранлив медиум						F
	вид на медиум	24h cfu	48h cfu	72h cfu	96h cfu	пет дена cfu	
пептонска вода + суспензија од <i>Escherichia coli</i>	I 1,0ml на TSA	17	17	19	20	24	
	II 1,0ml на TSA	9	11	17	17	17	
	I 1,0ml на ENDO	7	9	11	11	12	
	II 1,0ml на ENDO	8	11	12	14	14	
суспензија од Кафетин® таблети + суспензија од <i>Escherichia coli</i>	I 1,0ml на TSA	13	13	14	14	14	1,71
	II 1,0ml на TSA	5	7	8	8	8	2,12
	I 1,0ml на ENDO	3	5	5	6	6	2,00
	II 1,0ml на ENDO	0	4	8	8	8	1,75
тест - материјал	мембранска филтрација						F
	вид на медиум	24h cfu	48h cfu	72h cfu	96h cfu	пет дена cfu	
пептонска вода + суспензија од <i>Escherichia coli</i>	I 1,0ml на TSA	3	7	13	13	14	
	II 1,0ml на TSA	0	3	6	7	11	
	I 1,0ml на ENDO	0	0	6	7	7	
	II 1,0ml на ENDO	0	2	5	6	6	
суспензија од Кафетин® таблети + суспензија од <i>Escherichia coli</i>	I 1,0ml на TSA	0	3	5	8	8	1,75
	II 1,0ml на TSA	0	3	3	5	7	1,57
	I 1,0ml на ENDO	0	1	4	4	4	1,75
	II 1,0ml на ENDO	0	0	3	4	4	1,50

F - фактор на прифатливост I - прв петриев сад II - втор петриев сад

Табела 3. Фактор на прифатливост при определување микробиолошка чистота на Кафетин® таблети со суспензија од *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

тест - материјал	директно нанесување на хранлив медиум						F
	вид на медиум	24h cfu	48h cfu	72h cfu	96h cfu	пет дена cfu	
пептонска вода + суспензија од <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I 1,0ml на TSA	161	169	170	170	173	
	II 1,0ml на TSA	170	171	175	175	175	
	I 1,0ml на Cetrimid	19	120	122	125	125	
	II 1,0ml на Cetrimid	43	153	160	162	165	
суспензија од Кафетин® таблети + суспензија од <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I 1,0ml на TSA	117	127	128	133	133	1,30
	II 1,0ml на TSA	113	128	130	132	132	1,32
	I 1,0ml на Cetrimid	0	78	80	88	88	1,42
	II 1,0ml на Cetrimid	0	64	73	73	73	2,26
тест - материјал	мембранска филтрација						F
	вид на медиум	24h cfu	48h cfu	72h cfu	96h cfu	пет дена cfu	
пептонска вода + суспензија од <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I 1,0ml на TSA	160	162	166	166	споени	
	II 1,0ml на TSA	154	154	155	155	споени	
	I 1,0ml на Cetrimid	0	63	63	63	63	
	II 1,0ml на Cetrimid	0	44	45	46	46	
суспензија од Кафетин® таблети + суспензија од <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I 1,0ml на TSA	70	70	72	72	72	2,30
	II 1,0ml на TSA	34	47	48	48	48	3,22
	I 1,0ml на Cetrimid	0	33	33	33	33	1,90
	II 1,0ml на Cetrimid	0	29	30	30	30	1,53

F - фактор на прифатливост I - прв петриев сад II - втор петриев сад

Табела 4. Фактор на прифатливост при определување микробиолошка чистота на Кафетин® таблети со суспензија од *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

тест- материјал	директно нанесување на хранлив медиум							F
	вид на медиум	24h cfu	48h cfu	72h cfu	96h cfu	пет дена cfu		
пептонска вода + суспензија од <i>Staphylococcus aureus</i>	I	1,0ml на TSA	23	25	25	27	27	
	II	1,0ml на TSA	22	22	22	24	25	
	I	1,0ml на B-Parker	0	18	20	20	22	
	II	1,0ml на B-Parker	0	15	18	19	21	
суспензија од Кафетин® таблети + суспензија од <i>Staphylococcus aureus</i>	I	1,0ml на TSA	0	9	11	11	12	2,25
	II	1,0ml на TSA	0	7	9	10	10	2,50
	I	1,0ml на B-Parker	0	7	7	8	9	2,44
	II	1,0ml на B-Parker	0	5	7	7	9	2,33

тест- материјал	мембранска филтрација							F
	вид на медиум	24h cfu	48h cfu	72h cfu	96h cfu	пет дена cfu		
пептонска вода + суспензија од <i>Staphylococcus aureus</i>	I	1,0ml на TSA	11	13	13	16	17	
	II	1,0ml на TSA	13	13	14	14	14	
	I	1,0ml на B-Parker	0	11	11	12	12	
	II	1,0ml на B-Parker	4	8	8	9	9	
суспензија од Кафетин® таблети + суспензија од <i>Staphylococcus aureus</i>	I	1,0ml на TSA	10	11	11	11	11	1,54
	II	1,0ml на TSA	0	5	7	7	7	2,00
	I	1,0ml на B-Parker	5	7	7	7	7	1,71
	II	1,0ml на B-Parker	3	4	5	5	5	1,80

F - фактор на прифатливост I - прв петриев сад II - се работи прв пат некој препарат втор петриев сад

Табела 5. Фактор на прифатливост при определување микробиолошка чистота на Кафетин® таблети со суспензија од *Candida albicans* ATCC 10231

тест – материјал	директно нанесување на хранлив медиум							F
	вид на медиум	24h cfu	48h cfu	72h cfu	96h cfu	пет дена cfu	седум дена cfu	
пептонска вода + суспензија од <i>Candida albicans</i>	I	1,0 ml на Sabouraud	0	48	120	160	споени	споени
	II	1,0 ml на Sabouraud	0	70	86	190	190	споени
суспензија од Кафетин® таблети + суспензија од <i>Candida albicans</i>	I	1,0 ml на Sabouraud	0	27	128	128	128	1,25
	II	1,0 ml на Sabouraud	0	26	44	128	128	1,48

тест - материјал	мембранска филтрација							F	
	вид на медиум	24h cfu	48h cfu	72h cfu	96h cfu	пет дена cfu	седум дена cfu		
пептонска вода + суспензија од <i>Candida albicans</i>	I	1,0 ml на Sabouraud	0	15	37	37	37	37	
	II	1,0 ml на Sabouraud	0	20	31	31	31	споени	
суспензија од Кафетин® таблети + суспензија од <i>Candida albicans</i>	I	1,0 ml на Sabouraud	0	11	23	27	27	27	1,37
	II	1,0 ml на Sabouraud	0	11	24	25	25	25	1,24

F - фактор на прифатливост I - прв петриев сад II - втор петриев сад

Табела 6. Фактор на прифатливост при определување микробиолошка чистота на Кафетин® таблети со суспензија од *Aspergillus niger* ATCC 16404

тест- материјал	директно нанесување на хранлив медиум							
	вид на медиум	24h cfu	48h cfu	72h cfu	96h cfu	пет дена cfu	седум дена cfu	F
пептонска вода + суспензија од <i>Aspergillus niger</i>	I 1,0 ml na Sabouraud	0	35	35	35	споени	споени	
	II 1,0 ml na Sabouraud	0	35	35	36	споени	споени	
Суспензија од Кафетин® таблети + суспензија од <i>Aspergillus niger</i>	I 1,0 ml na Sabouraud	0	38	38	38	споени	споени	0,92
	II 1,0 ml na Sabouraud	0	34	35	35	споени	споени	1,02

тест – материјал	мембранска филтрација							
	вид на медиум	24h cfu	48h cfu	72h cfu	96h cfu	пет дена cfu	седум дена cfu	F
пептонска вода + суспензија од <i>Aspergillus niger</i>	I 1,0 ml na Sabouraud	0	21	25	25	споени	споени	
	II 1,0 ml na Sabouraud	0	23	23	23	споени	споени	
Суспензија од Кафетин® таблети + суспензија од <i>Aspergillus niger</i>	I 1,0 ml na Sabouraud	0	38	38	38	споени	споени	0,65
	II 1,0 ml na Sabouraud	0	31	31	31	споени	споени	0,74

F - фактор на прифатливост I - прв петриев сад II - втор петриев сад

Табела 7. Споредба на факторите на прифатливост за тест микроорганизмите за Кафетин® таблети на TSA и *Sabouraud* хранлив медиум со директна инокулација и со мембранска филтрација

тест-микроорганизам		директна инокулација	мембранска филтрација
		F	F
<i>Escherichia coli</i>	I	1,71	1,50
	II	2,10	1,75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I	1,30	1,47
	II	2,26	1,53
<i>Staphylococcus aureus</i>	I	1,54	3,22
	II	2,00	2,50
<i>Candida albicans</i>	I	1,25	1,37
	II	1,48	1,24
<i>Aspergillus niger</i>	I	0,92	0,65
	II	1,02	0,74

F- фактор на прифатливост I - прв петриев сад II - втор петриев сад

Заклучок

Кафетин® таблетите не поседуваат антимикурно дејство и при определување на микробиолошката чистота нема потреба од инактивација.

Методот што е применет за определување на микробиолошката чистота на Кафетин® табле-

тите е соодветен и одговара на бараните перформанси за микробиолошка чистота на цврсти фармацевтски препарати.

Тест микроорганизмите и хранливите медиуми што се користени при валидирање на методот покажуваат соодветност со барањата на современите фармакопеи.

Сите резултати во трудот покажаа дека факторот на прифатливост се движи во рамките на компатибилноста, да не е поголем од фактор 5, што значи дека методите што се користат за определување на микробиолошката чистота, се валидирани според важечките критериуми за фармацевтско производство.

Литература

1. Denyer, S. and Baird, R. (1990), Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals pp. 236-240.
2. European Pharmacopoeia, 3rd Edition (1997), Council of Strasbourg, pp. 45-55.
3. The United States Pharmacopoeia 24 / The National Formulary 19 (1995), United States Pharmacopoeial Convention Inc., 1752-1753; 1809-1823.
4. Государственна Фармакопеја СССР XI. (1987), Медицина, Москва
5. Guidelines for Validation (1990), MPMD, Merck & Co. Inc.
6. Collins and Lynes (1989), Microbiological Methods, Butterworth & Co. (Publishers) Ltd.

Summary

Validation of the method for determination of microbiological purity of the Caffetin® tablets

Todorovic Dragi, Sokolovska Ana, Babunovska Hristina

*Pharmaceutical, chemical and cosmetic industry "Alkaloid" Skopje
"Aleksandar Makedonski" 12, 1000 Skopje, Macedonia*

Key words: microbiological purity, validation of the method, Caffetin® tablets.

A validation of the method for determination of the microbiological purity of Caffetin® tablets has been done. For this purpose the test microorganisms: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* from the collection ATCC have been used. A non-specific nutritious medium for aerobic microorganisms and specific nutritious media for adequate test microorganisms: ENDO, Cetrimid, Baird-Parker and Sabouraud nutritious agar medium have been used. The method was performed in two modes: a direct inoculation into a nutritious medium and a membrane filtration. At the same time, a Challenge test was as well used the test of counting the growing colonies (CFU/ml). A calculation of the factor has been done, which represents relationship between growing microorganisms of the inoculated nutritious medium with and without adding to the examined preparation, as a criterion for acceptance of the achieved analytical results. The achieved values for the factor as a criterion for acceptance have shown satisfying values. It can be concluded that this method can be used for determination of the microbiological purity of Caffetin® tablets.