**Расторопши экстракт сухой + ФС**

**бифидобактерии бифидум +**

**лактобактерии ферментум,**

**капсулы Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препарат расторопши экстракт сухой + бифидобактерии бифидум + лактобактерии ферментум, капсулы. Препарат представляет собой комплекс из смеси живых лиофилизированных бактерий *Bifidobacterium bifidum 1* и *Lactobacillus fermentum 90Т-С4,* сорбированных на кремния диоксиде коллоидном, находящийся в капсуле (№ 3),которая помещена в капсулу (№ 0), содержащую расторопши экстракт сухой.

Действующими веществами препарата являются: пробиотические живые бактерии *B. bifidum 1*, *L. fermentum 90Т-С4* и расторопши экстракт сухой. Пробиотические бактерии, проявляющие антагонистическую активность в отношении возбудителей кишечных инфекций, представителей родов: *Shigella, Proteus, Staphilococcus, Escherichia* и обладающие высокой ферментативной и детоксикационной активностью, снижают токсическую нагрузку на печень. Расторопши экстракт сухой является гепатопротектором. Активные компоненты препарата обладают взаимопотенциирующим действием. Одна доза препарата содержит: *B. bifidum 1*не менее 5·107 КОЕ, *L. fermentum 90Т-С4* - не менее 5·107 КОЕ, расторопши экстракта сухого -0,1 г.

Препарат предназначен для лечения острых и хронических гепатитов инфекционной и неинфекционной природы.

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата расторопши экстракт сухой + бифидобактерии бифидум + лактобактерии ферментум, капсулы основано на культивировании производственных штаммов бактерий *B. bifidum 1*, *L. fermentum 90Т-С4* на оптимальных питательных средах с последующей лиофилизацией биомассы и капсулированием в капсулы № 3, которые затем помещают в капсулы № 0 с расторопши экстрактом сухим.

Основными этапами производства данного препарата являются:

* Получение посевного материала;
* Получение бактериальной массы путем культивирования культур *B. bifidum 1* и *L. fermentum 90Т-С4* в ферментерах;
* Сорбирование микробной массы каждого вида бактерий на кремния диоксиде коллоидном;
* Лиофильное высушивание сорбированной бактериальной массы;
* Приготовление капсулируемой массы из лиофилизированных бифидо- и лактобактерий сорбированных на кремния диоксиде коллоидном и вспомогательных веществ;
* Капсулирование и обеспыливание капсул № 3;
* Приготовление капсулируемой массы из расторопши экстракта сухого и вспомогательных веществ;
* Капсулирование и обеспыливание капсул № 0;
* Фасовка, упаковка, маркировка.

Готовый препарат передают на контроль.

Штаммы, используемые в процессе производства должны соответствовать требованиям, изложенным в ОФС «Бифидосодержащие пробиотики» и ОФС «Лактосодержащие пробиотики». Испытания проводят согласно ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Препарат должен производиться в соответствии с требованиями правил организации производства и контроля качества биотехнологических лекарственных препаратов. Стадии производственного процесса должны быть охарактеризованы в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Пробиотики».

ИСПЫТАНИЯ

Капсула № 3

**Описание.** Твердая желатиновая, цилиндрической формы с полусферическими концами. Корпус белый непрозрачный, крышечка желтая непрозрачная. Содержит порошок от беловато-серого до светло-бежевого цвета со слабым кисломолочным запахом. Определение проводят органолептически.

**Подлинность.** В мазках окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные полиморфные палочки, длиной от 2,0 до 5,0 мкм, располагающиеся одиночно, попарно, коротким цепочками или скоплениями, должны присутствовать палочки с утолщением на одном или двух концах или бифуркацией.

На поверхности агаризованной среды, в анаэробных условиях должны образоваться плоские округлые с неровным краем колонии, размером от 2 до 3 мм, полупрозрачные сероватые, плотной консистенции, легко снимаемые с агара, характерные для вида *B. bifidum*.

На поверхности агаризованной среды в анаэробных условиях должны образоваться слабовыпуклые, круглые с ровным краем колонии, размером 1,5- 2,5 мм, полупрозрачные беловатые, мягкие, врастающие в агар, характерные для вида *L. fermentum*.

Испытание проводят микроскопически в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков». Подлинность подтверждается специфической активностью в соответствии с методами, указанными в разделе «Специфическая активность».

**Распадаемость.** Не более 20 мин. Капсулу помещают в колбу вместимостью 100 мл и прибавляют 50 мл воды очищенной при температуре 37 ºС, содержимое колбы интенсивно перемешивают до распада капсулы с образованием рыхлой массы беловато-серого или светло-бежевого цвета на дне сосуда. Определение повторяют 3 раза.

**Средняя масса и отклонение от средней масы.** Содержимое капсулы должно составлять 0,20 г, отклонение от средней массы - не более 10 %. Допускается отклонение не более 25 % для двух капсул из 20.

20 капсул № 0 вскрывают, извлекают капсулу № 3, очищают сухой безворсовой салфеткой. Далее испытание проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 3,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» (по методике определения потери в массе при высушивании в биологических лекарственных препаратах). Перед испытанием две капсулы № 0 пинцетом извлекают из емкости с капсулами и помещают в чашку Петри, глазными ножницами капсулы № 0 разрушают и пинцетом извлекают капсулы № 3, очищают сухой безворсовой салфеткой и вскрывают чистыми глазными ножницами.

**Специфическая активность.** Не менее 5·107 КОЕ *B. bifidum 1*,не менее 5·107 КОЕ *L. fermentum 90Т-С4* в капсуле.

Для определения количественного состава микроорганизмов испытывают три капсулы из 20 отобранных из каждой серии препарата.

В асептических условиях капсулы № 0 вскрывают стерильными глазными ножницами, извлекают капсулы № 3, очищают безворсовой стерильной салфеткой и помещают в колбу с 30 мл подогретого до 37 ºС стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Колбу помещают в термостат или на водяную баню при температуре 39 ºС. Через 10-30 мин содержимое колбы перемешивают до гомогенного состояния, полученное разведение микробной взвеси соответствует 10-1.

Далее испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» (разделом 1.1) на средах рекомендованных для выделения бифидо- и лактобактерий.

Допустимо определение количества живых бактерий каждого вида на одной среде, при условии, что бактерии, входящие в состав препарата, образуют визуально различимые по форме и другим признакам колонии. Методика и среды для испытания должны быть валидированы и указаны в нормативной документации.

Капсула № 0

**Описание.** Капсула № 0 - твердая желатиновая, цилиндрической формы с полусферическими концами. Корпус белый непрозрачный, крышечка желтая непрозрачная. Содержит капсулу № 3 и аморфный порошок от серовато-желтого до светло-коричневого цвета. Определение проводится визуально.

**Подлинность.** Подтверждается двумя методами:

* качественной цианидиновой реакцией - должно появиться малиновое окрашивание;
* методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) - на хроматограмме должно обнаруживаться не менее трех зон фиолетового цвета на уровне зон раствора рабочего стандартного образца (РСО) расторопши экстракта сухого.

Качественная цианидиновая реакция. Капсулу № 0 вскрывают глазными ножницами, высыпают содержимое в чашку Петри и 0,05 г расторопши экстракта сухого переносят в пробирку, прибавляют 10 мл спирта 96 %, 0,25 г пыли цинковой и 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и пермешивают. Должно появиться малиновое окрашивание.

Тонкослойная хроматография. Для испытания из расторопши экстракта сухого, извлеченного из капсулы № 0, готовят раствор испытуемого образца: 0,01 г порошка растворяют в 10 мл ацетона и фильтруют через бумажный фильтр. Испытание проводят методом ТСХ в соответствии с ОФС «Тонкослойная хроматография».

На хроматографическую пластинку наносят в виде точки по 0,025 мл раствора испытуемого образца и РСО расторопши экстракта сухого. Хроматографируют восходящим способом в камере, предварительно насыщенной в течение 1 ч смесью хлороформа, ацетона и муравьиной кислоты в соотношении 9:2:1. После того, как фронт подвижной фазы пройдет расстояние около 10 см, пластинку извлекают из камеры, сушат на воздухе в течение 10 мин. Детекцию зон адсорбции проводят в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм.

Примечание

Приготовление раствора РСО расторопши экстракта сухого. Навеску 5мг расторопши экстракта сухого растворяют в 5 мл ацетона.

**Распадаемость.** Не более 20 мин. Капсулу помещают в колбу вместимостью 100 мл и прибавляют 50 мл воды очищенной при температуре 37 ºС. Содержимое колбы интенсивно перемешивают до распада капсулы с образованием рыхлой массы серовато-желтого или светло-коричневого цвета на дне сосуда. Определение повторяют 3 раза.

**Средняя масса и отклонение от средней масы.** Должна составлять 0,1 г, отклонение от средней массы - не более 10 % в одной серии. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Взвешивают 20 капсул № 0 по отдельности. Затем капсулы вскрывают, извлекают капсулы № 3, тщательно очищают от порошка сухой безворсовой салфеткой и взвешивают. Среднюю массу (С) в г расторопши экстракта сухого, вычисляют по формуле:

$С=\left(А -М -\left.В\right)\right.÷20$*,*

где:

*А* - масса 20 капсул № 0 с содержимым, г;

*М* - масса 20 капсул № 0 без содержимого, г;

*В* - масса 20 капсул № 3 с содержимым, г

Взвешивание проводят в двух повторностях.

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 3,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» (по методике определения потери в массе при высушивании в биологических лекарственных препаратах).

**Количественное определение суммы флаволигнанов.** Содержание в одной капсуле в пересчете на сибилин должно находиться в интервале от 60 до 80 мг. Определение проводят спектрофотометрическим методом.

Около 50 мг (точная навеска) порошка из открытой капсулы № 0 помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл спирта 96 % и взбалтывают в течение 30 мин. Объем раствора доводят до метки тем же растворителем и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр. Из первых 10 мл фильтрата отбирают 1 мл, вносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают. Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 288 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %. Испытуемые раствора готовят в двух повторностях.

Содержание суммы флаволигнанов *(X)* в г, в пересчете на силибин в одной капсуле вычисляют по формуле:

$X=\frac{50∙50∙D∙m\_{1} }{460∙100∙m}=\frac{0,054∙D∙m\_{1}}{m}$,

где:

*D* - оптическая плотность раствора;

*m* - масса навески порошка из капсулы, в г;

*m1* - средняя масса содержимого одной капсулы, в г;

*460* - удельный показатель поглощения силибина в спирте 96 % при длине волны 288 нм

**Микробиологическая чистота.** Должен соответствовать категории 5.3. Б (табл.1). Определение проводится в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

**Специфическая безвредность**. Препарат должен быть безвреден для белых мышей при пероральном введении одной дозы. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*».

**Производственные штаммы и штаммы для контроля.** Производственный штамм бактерий *B. bifidum* 1 должен быть депонирован в официальной коллекции. Биологические и биохимические свойства штамма должны соответствовать требованиям ОФС «Бифидосодержащие пробиотики», ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков», ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*», ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» и ОФС «Микробиологическая чистота».

Штаммы бактерий, используемые для контроля производственного штамма бактерий *B. bifidum* 1: *S. sonnei* 5063 (депозит № 900741 или 233043)*; S. flexneri* 337 (депозит № 900732 или 232152), 170 (депозит № 900731 или 232151)*; E. coli* 157 (депозит № 900751 или 240329)*; P. mirabilis* H-237 (депозит № 900771 или 160120), *P. vulgaris* 177 (депозит № 900761 или 160153), *S. aureus* 209-Р FDA=6538-Р ATCC (депозит № 900781 или 201108) должны быть депонированы в официальной коллекции микроорганизмов. Тест-штаммы должны соответствовать требованиям ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Производственный штамм бактерий *L. fermentum 90Т-С4* должен быть депонирован в официальной коллекции. Биологические и биохимические свойства штамма должны соответствовать требованиям ОФС «Лактосодержащие пробиотики», ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков», ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*», ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» и ОФС «Микробиологическая чистота».

Используемые для контроля штаммы бактерий депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ): *S. sonnei* 5063 (депозит № 900741 или 233043)*; S. flexneri* 337 (депозит № 900732 или 232152), 170 (депозит № 900731 или 232151)*; Escherichia coli* 157 (депозит № 900751 или 240329)*; Proteus mirabilis* H-237 (депозит № 900771 или 160120), *P. vulgaris* 177 (депозит № 900761 или 160153), *S. aureus* 209-Р FDA=6538-Р ATCC (депозит № 900781 или 201108). Тест-штаммы должны соответствовать требованиям ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже 1 раза в год.

**Упаковка и маркировка**. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Лекарственные формы».

**Транспортирование** и **хранение.** В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и «Хранение лекарственных средств» при температуре от 2 до 10 °С. Допускается транспортирование препарата при температуре не выше 25оС не более 10 сут.