**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Смесь биомассы живых бактерий ФС**

**Lactobacillus gasseri + Bifidobacterium infantis**

**+ Enterococcus faecium Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на смесь биомассы живых бактерий.

Субстанция должна соответствовать ОФС «Биотехнологические лекартсвенные препараты», ОФС «Пробиотики» ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков» и нижеприведенным требованиям.

Содержит не менее 4,5ˑ107 КОЕ лактобактерий *Lactobacillus acidophilus*

Содержитне менее 3,0ˑ107 КОЕ бифидобактерий *Bifidobacterium infantis.*

Содержит не менее 4,5ˑ107 КОЕ энтерококков *Enterococcus faecium.*

Общее количество бактерий не менее 1,2ˑ108 КОЕ.

**Описание.** От белого до светло-жёлтого цвета порошок.

**Подлинность.** В мазках окрашенных по Граму, должны присутствовать

*Lactobacillus acidophilus (sp. L.gasseri)* Под микроскопом видны палочковидные бактерии, окрашиваемые в темно-фиолетовый цвет (грамположительные палочковидные бактерии длиной от 0,7 до 1,0 мкм).

*Bifidobacterium infantis* Под микроскопом видны палочковидные бактерии, окрашиваемые в темно-фиолетовый цвет (грамположительные плеоморфные бактерии длиной от 4,0 до 5,0 мкм).

*Enterococcus faecium* Под микроскопом, видны кокки, окрашиваемые в темно-фиолетовый цвет (грамположительные кокки длиной от 1,0 до 2,0 мкм).

Определение проводят 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».

**Мышьяк.** Не более 0,0002 % (ОФС «Мышьяк», метод 1). Для определения используют 0,25 г субстанции.

**Тяжелые металлы.** Не более 0,002 % (ОФС «Тяжёлые металлы», метод 2).

*Испытуемый раствор.* В кварцевый тигель помещают 1,0 г (для нормы 0,002 %), прибавляют 4 мл магния сульфата раствора 25 % в серной кислоте разведённой 9,8 %, перемешивают тонкой стеклянной палочкой, нагревают до температуры 800 °C, пока остаток в тигле не приобретёт белый или серый цвет. Полученный остаток охлаждают, смачивают несколькими каплями серной кислотой разведённой 9,8 %, выпаривают, повторно прокаливают и охлаждают. Полученный остаток количественно переносят двумя порциями по 5 мл хлористоводородной кислоты разведённой 7,3 % в мерную колбу вместимостью 20 мл, прибавляют 0,1 мл фенолфталеина раствора 0,1 %, затем осторожно прибавляют аммиака раствор концентрированный 25 % до перехода окраски в розовую. К полученному раствору прибавляют уксусную кислоту ледяную до обесцвечивания раствора и дополнительно 0,5 мл уксусной кислоты ледяной. Доводят объём раствора водой до метки. При необходимости фильтруют.

*Стандартный раствор.* Готовят, как описано для испытуемого раствора, используя вместо испытуемой субстанции 2,0 мл стандартного раствора 10 мкг/мл свинец-иона (ОФС «Тяжёлые металлы»). К 10,0 мл полученного раствора прибавляют 2,0 мл испытуемого раствора.

*Раствор сравнения.* Готовят, как описано для испытуемого раствора, прибавляя к испытуемой субстанции 2,0 мл стандартного раствора 10 мкг/мл свинец-иона. К 10,0 мл полученного раствора прибавляют 2,0 мл испытуемого раствора.

*Контрольный раствор.* К 10,0 мл воды прибавляют 2,0 мл испытуемого раствора.

К 12,0 мл каждого раствора прибавляют 2,0 мл буферного раствора рН 3,5. Перемешивают и прибавляют 1,2 мл тиоацетамидного реактива. Немедленно перемешивают. Через две минуты сравнивают окраски полученных растворов.

*Пригодность системы:*

- стандартный раствор по сравнению с контрольным раствором должен быть окрашен в светло-коричневый цвет;

- окраска раствора сравнения должна быть не менее интенсивна, чем окраска стандартного раствора.

*Допустимое содержание тяжёлых металлов.* Окраска испытуемого раствора не должна превышать по интенсивности окраску стандартного раствора.

При затруднении в оценке растворы фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Фильтрование проводят медленно и единообразно при умеренном и постоянном нажатии на поршень. Сравнивают пятна на фильтрах, полученные от фильтрования различных растворов. Коричневая окраска пятна на фильтре, полученного после фильтрования испытуемого раствора, не должна превосходить по интенсивности окраску пятна на

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

**Специфическая активность.** В 1 г субстанции должно содержаться лактобактерий не менее 4,5$∙$107 КОЕ, бифидобактерий - не менее 3,0$∙$107 КОЕ, энтерококков не менее 4,5107 КОЕ. Общее количество бактерий L. gasseri, В. infantis,E. faecium - не менее 1,2$∙$108 КОЕ (ОФС «Определение специфической активности пробиотиков»).

*Модифицированная среда Бриггса*

Состав среды: Панкреатический гидролизат казеина 15,0 г; Глюкоза 20,0 г; Дрожжевой экстракт 6,0 г; Полисорбат 80 1,0 г; Натрия хлорид 5,0 г; Крахмал 0,5 г; Раствор томатного экстракта 400 мл; L-цистеина гидрохлорид 0,5 г; Раствор печеночного экстракта 75 мл; Кальция карбонат 2,0 г; Агар 15,0 г; Вода 600 мл.

Растворяют вышеперечисленные ингредиенты в 500,0 мл воды. К раствору прибавляют 75,0 мл раствора печеночного экстракта и перемешивают. Доводят значение pH до 6,5 ±0,05 раствора с помощью 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты а затем доводят объем раствора водой до 600 мл и перемешивают. Стерилизуют культуральную среду в автоклаве при температуре 121°С в течение 15 мин. К стерилизованной среде прибавляют в асептических условиях раствор томатного экстракта.

*Модифицированная среда Бриггса с цефалексином.* В модифицированную среду Бриггса добавляют цефалексин (цефалексин предварительно растворяют в стерильной воде) из расчета 100 мкг на 1 мл среды и перемешивают.

*Раствор томатного экстракта.* К 32,0 г томатной пасты, не содержащей консервантов, прибавляют 400,0 мл воды. Смесь нагревают и кипятят в течение 1 ч.

*Раствор печеночного экстракта.* К 10,0 г порошка бычьей печени прибавляют 170,0 мл воды очищенной и экстрагируют при температуре 60°С в течение 3 ч. Затем для более полной экстракции нагревают и кипятят в течение приблизительно 10 мин. Охлаждают и доводят значение pH до 6,5±0,02 с помощью 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты.

*Раствор для разведения.* 1 % раствор пептона с добавлением раствора натрия хлорида 0,5 %.

*Испытуемый раствор.* Около 1,0 г (точная навеска) субстанции помещают в стерильный пакет для гомогенизации, прибавляют 99,0 мл раствора для разведения, гомогенизируют в течение 2 мин до получения гомогенной суспензии и инкубируют при температуре 40°С в течение 20 мин.

**Специфическая безвредность**. Должна быть безвредна. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*».

**Хранение.** В соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств».