

同芬和培欣微生物限度检查法验证试验

郭艳春^{1*} 于德才²

(1. 内蒙古呼伦贝尔市人民医院, 内蒙古 呼伦贝尔 021008; 2. 包头中药
有限责任公司, 内蒙古 包头 014040)

【摘要】 目的: 确认药典常规法是否适合于同芬和培欣的微生物限度检查, 并取得适宜的检查方法。方法: 按 2005 年版《中国药典》微生物限度检查法及方法学验证要求, 对同芬和培欣进行了方法学验证。结果: 同芬和培欣对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌抑菌作用强, 培养基稀释法阳性对照菌回收率仍低于 70%。结论: 对同芬和培欣进行微生物限度检查, 应按照 2005 年版《中国药典》要求, 通过方法验证实验建立相应的合理的检验方法。

【关键词】 方法学验证; 微生物限度; 同芬; 培欣

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1005-9903(2010)14-0179-02

微生物检测技术是保证生产厂家产品质量安全的一项重要检查项目。为保证药品微生物检测结果的真实可靠, 必须对所有的检测方法进行验证。对于我公司新药同芬(富马酸酮替芬鼻喷雾剂)和培欣(硝酸异山梨酯喷雾剂)的微生物限度的具体检查方法, 中国药典并没有规定, 所以根据 2005 版药典的规定, 我们对同芬和培欣进行了微生物限度检查的方法验证。

1 材料

1.1 样品 同芬(富马酸酮替芬鼻喷雾剂)批号 070529、培欣(硝酸异山梨酯喷雾剂)批号 070417。包头中药有限责任公司生产。

1.2 培养基 营养琼脂培养基, 批号 20061202; 玫瑰红钠琼脂培养基, 批号 040929; 胆盐乳糖培养基, 批号 20070612; 营养肉汤培养基, 批号 20070728; 改良马丁培养基, 批号 070911; MUG 培养基, 批号 20070820。

1.3 试验菌株 金黄色葡萄球菌 [CMCC(B) 26003]; 枯草芽孢杆菌 [CMCC(B) 63501]; 大肠埃希菌 [CMCC(B) 44102]; 白色念珠菌 [CMCC(F) 98001]; 黑曲霉 [CMCC(F) 98003]。

上述培养基和菌株均由中国药品生物制品检定所提供。

2 方法

2.1 菌液制备

2.1.1 取经 30 ~ 35 °C 培养 18-24 h 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌肉汤培养物, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成每 1 mL 含菌数为 50 ~ 100 CFU 的菌悬液。

2.1.2 取经 23 ~ 28 °C 培养 24 ~ 28 h 的白色念珠菌改良马丁培养物, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成每 1 mL 含菌数为 50 ~ 100 cfu 的菌悬液。

2.1.3 取经 23 ~ 28 °C 培养 1 周的黑曲霉斜面培养物, 加 3 ~ 5 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液, 将孢子洗脱, 吸出孢子悬液至无菌试管内, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成每 1 mL 含菌数为 50 ~ 100 CFU 的菌悬液。

2.2 供试液制备 称取供试品 10 g, 加 pH 7.0 的无菌氯化钠-蛋白胍缓冲液至 100 mL 作为 1:10 的供试液。

3 方法学验证

3.1 细菌、霉菌及酵母菌的方法学验证

3.1.1 药典常规法 取 1 mL 供试液注皿, 分别加入 5 株试验菌, 测定回收率。

3.1.2 培养基稀释法 取 0.2 mL 供试液注皿, 分别加入 5 株试验菌, 测定回收率。

3.1.3 离心集菌薄膜过滤法 取 10 mL 供试液移至灭菌离心管中, 以 500 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液 1 mL 加入薄膜过滤器中, 冲洗, 在最后 1 次冲洗液中加入试验菌, 抽干后取出滤膜, 菌面朝上贴于培养基平板上培养, 测定回收率。

3.1.4 回收率测定

试验组: 常规法和培养基稀释法取规定量供试液和 50 ~ 100 CFU mL⁻¹ 试验菌注皿, 平行制备 2 个

[收稿日期] 2010-04-19

[通讯作者] * 郭艳春, Tel: 13847002371

平皿,按平皿法测定其菌数;离心集菌薄膜过滤法,取规定量供试液过滤,冲洗,在最后 1 次冲洗液中加入 50~100 CFU mL⁻¹ 试验菌,过滤,按薄膜过滤法测定其菌数。

菌液组:取与试验组相同的 50~100 CFU mL⁻¹ 试验菌注皿,平行制备 2 个平皿,按平皿法测定其菌数。

供试品对照组:常规法和培养基稀释法取规定量供试液注皿,平行制备 2 个平皿,按平皿法测定其供试品本底菌数;离心集菌薄膜过滤法,取规定量供试液过滤,冲洗,按薄膜过滤法测定其供试品本底菌数。

3.1.5 回收率计算:回收率应不低于 70%。结果见表 1~3。

表 1 常规法测定 5 株试验菌的回收率 %

药品	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉
同芬	59	55	61	84	90
培欣	51	59	51	93	92

表 2 稀释法(0.2 mL/皿)测定 5 株试验菌的回收率 %

药品	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌
同芬	83	78	60
培欣	86	82	63

表 3 离心集菌薄膜过滤法测定 3 株试验菌的回收率 %

药品	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌
同芬	117	94	97
培欣	96	88	93

注:每膜冲洗 300 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,分 3 次冲洗。

3.1.6 结果判断 从表 1 可以看出,同芬和培欣均对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌有抑菌活性,回收率低于 70%;对白色念珠菌、黑曲霉菌无抑菌活性,回收率不低于 70%;改用培养基稀释法对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌重新验证。从表 2 可以看出,枯草芽孢杆菌回收率仍低于 70%,说明培养基稀释法(0.2 mL/皿)尚不能消除二者的抑菌活性。改用离心集菌薄膜过滤法对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌再次验证,从表 3 可以看出,采用离心集菌薄膜过滤法可消除其抑菌活性,3 种菌回收率均不低于 70%。说

明采用离心集菌薄膜过滤法(每膜冲洗 300 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,分 3 次冲洗)可测定同芬和培欣的细菌数,采用药典常规法可测定其霉菌和酵母菌数。

3.2 控制菌检查方法验证及结果

3.2.1 大肠埃希菌的验证

3.2.2 菌液制备 同前菌液的制备,制备大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌菌液。

3.2.3 验证方法 试验组取 1:10 供试液 10 mL 及 10~100 CFU 大肠埃希菌加入 100 mL 胆盐乳糖增菌培养基中,依大肠埃希菌检查法进行检查,阴性菌对照组取 1:10 供试液 10 mL 及 10~100 CFU 金黄色葡萄球菌加入 100 mL 胆盐乳糖增菌培养基中,依大肠埃希菌检查法进行检查。

3.2.4 试验结果 大肠埃希菌检查方法验证结果见表 4。

表 4 常规法控制菌试验

药品	大肠埃希菌	
	试验组	阴性菌对照组
同芬	+	-
培欣	+	-

3.2.5 结果判断 从上表可以看出,试验组检出检查菌,阴性菌对照组未检出阴性对照菌,说明用常规法即可检出大肠埃希菌。

4 结论

通过对同芬和培欣 2 种药品的细菌、霉菌及酵母菌计数方法和控制菌检查方法的验证,确定上述 2 品种宜采用离心集菌薄膜过滤法(每膜冲洗 300 mL pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,分 3 次冲洗)测定其细菌数,采用药典常规法测定霉菌和酵母菌数;采用药典常规法检查其控制菌。

[参考文献]

[1] 中国药典[S].一部.北京,2005:70.
 [2] 汪穗福.微生物检测验证技术[S].北京:中国医药科技出版社,2005.

[责任编辑 何伟]