

布洛伪麻胶囊微生物限度检查方法验证试验研究

袁林娜 (贵州省药品检验所, 贵阳 550004)

摘要:目的 建立布洛伪麻胶囊微生物限度检查方法。方法 按中国药典 2005 版微生物限度检查方法进行验证试验。结果 试验组枯草芽孢杆菌采用低速离心、培养基稀释法菌回收率为 86% 以上; 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌采用低速离心、平皿法菌回收率为 83% 以上; 黑曲霉、白色念珠菌采用沉降法、培养基稀释法菌回收率为 85% 以上; 控制菌检查试验组采用常规法, 可检出大肠埃希菌。结论 本法为布洛伪麻胶囊微生物限度检查方法的建立提供依据。

关键词:验证试验; 低速离心; 沉降法; 培养基稀释法; 回收率

中图分类号: R927.32

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2007)03-0229-03

YUAN Lin-na (Guizhou Provincial Institute for Drug Control, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determination of microbial limits in Buluoweima capsule. **METHODS** Validation of microbial limit was tested according to Pharmacopoeia of China 2005 edition. **RESULTS** The recoveries of bacillus subtilis in test group were above 86% when low speed centrifugation and diluting method of culture medium were used. The recoveries of escherichia coil and staphylococcus aureus were above 83% when low speed centrifugation and plate method were used. The recoveries of aspergillus niger and candida albicans were above 85% when sedimentation method and diluting method of culture medium were used. Escherichia coil can be detected by conventional method. **CONCLUSION** The proposed method could provide a scientific evidence for establishing a method of microbial limit tests of Buluoleima.

KEY WORDS: validation; low speed centrifugation; sedimentation method; diluting method of culture medium; recovery

布洛伪麻胶囊是由布洛芬、盐酸伪麻黄碱组成的复方制剂,为常用的口服抗感冒药^[1]。在非规定灭菌制剂^[2]的微生物限度常规检验中,化学药品细菌、霉菌、酵母菌及控制菌的检出率都较低,因采用的检验方法未经方法学验证,所以不能确定是该类药品基本无污染,还是检验方法不具科学性。本试验用2005年版中国药典规定的3株细菌、2株真菌(大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉、白色念珠菌)对三批布洛伪麻胶囊进行了微生物限度检查法的验证试验,以确认所采用的方法是否适合于该药品的细菌、霉菌、酵母菌数的测定和控制菌检查及检查药品本身污染微生物的状况,结果报道如下。

1 实验材料

1.1 仪器

800型离心沉淀器(上海手术器械十厂);SE2020电子天平(梅特勒-托利多常州衡器有限公司)。

1.2 试剂

营养琼脂培养基(批号031124);营养肉汤培养基(批号050121);玫瑰红钠琼脂培养基(批号040202);BL培养基(批号050321);pH7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液(060223)北京三药科技开发公司。MUG培养基(批号030102)北京牛牛基因技术有限公司。氯化钠(批号041011)成都五环高欣化学试剂厂。

1.3 供试品

布洛伪麻胶囊(批号为20050802、20050907、20051111)。

1.4 菌种

大肠埃希菌[CMCC(B)44102];枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501];金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003];黑曲霉[CMCC(F)98003];白色念珠菌[CMCC(F)98001]均由中国药品生物制品检定所提供。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

将上述5株菌的新鲜培养物分别接种至规定培养基,细菌培养16h;酵母菌培养24h;霉菌培养5d,按中国药典2005年版二部附录方法制备菌(孢子)悬液,备用。

2.2 供试液制备

取供试品10g,按中国药典2005年版二部附录方法制

成1:10供试液,备用。

2.3 细菌、霉菌及酵母菌计数方法的验证

2.3.1 试验组 供试液1mL和50~100CFU试验菌,分别注入平皿中,每株菌平行制备2个平皿。

2.3.2 菌液组 测定所加的试验菌数。

2.3.3 供试品对照组 取试验组供试液注皿量,测定供试品本底菌数。

2.3.4 稀释剂对照组 pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中加入试验菌,使每mL菌数为50~100CFU,同试验组方法测定其菌数。

2.3.5 回收率计算 回收率%=[(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)÷菌液组平均菌落数]×100%。

2.3.6 结果判断 在3次平行试验中,试验组的菌回收率均应在70%以上;若低于70%,应采用适宜的方法(设立稀释剂对照组,试验菌的回收率应在70%以上,该方法成立)重新进行验证试验。

预试验:取供试液1、0.50、0.33、0.2mL分别注1皿为一组,每组加入1种试验菌菌液,共5组。除大肠埃希菌0.2mL·皿⁻¹的回收率为88%外,其余4株菌0.2mL·皿⁻¹的菌回收率均为0%。

供试液低速离心(500r·min⁻¹)4min,取上层液(以下简称离心液)混匀后注皿,白色念珠菌、黑曲霉、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌1mL·皿⁻¹的回收率为80%以上,枯草芽孢杆菌0.2mL·皿⁻¹的回收率为76%。

低速离心稀释剂对照组,3株细菌回收率均为70%以上,2株真菌回收率低于70%。

供试液采用沉降法^[3]沉降5min,取上层液(以下简称沉降液)混匀后注皿,白色念珠菌、黑曲霉0.2mL·皿⁻¹的菌回收率为70%以上。

沉降法稀释剂对照组,2株真菌回收率均为70%以上。

根据预试验结果,金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌分别取离心液1、1、0.2mL·皿⁻¹(1mL分注5皿);白色念珠菌、黑曲霉分别取沉降液0.2mL·皿⁻¹进行验证试验。结果见表1(表1试验组数据除枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉为10皿平均值外,其余2株菌及菌液组、稀释剂对照组均为2皿平均值)。

表 1 细菌、霉菌及酵母菌计数方法验证

Tab 1 The methods validation of counting bacteria, molds and socchamyces

	20050802			20050907			20051111			稀释剂对照组		
	菌液组	试验组	回收率	菌液组	试验组	回收率	菌液组	试验组	回收率	菌液组	试验组	回收率
	CFU		100%	CFU		100%	CFU		100%	CFU		100%
大肠埃希菌	98	91	93	90	85.5	95	78	72.5	93	75.5	75.5	100
金黄色葡萄球菌	96	84	88	84	75	89	100	83	83	67.5	59	87
枯草芽孢杆菌	56	54	96	73	63	86	66	58	88	111	97	87
白色念珠菌	87	78	90	95	93	98	88.5	81	92	75	72.5	97
黑曲霉	64.5	59.6	92	91	77	85	73	71	97	98	94.5	96

2.4 控制菌检查方法的验证

2.4.1 试验组 供试液 10 mL及 10~100CFU大肠埃希菌加入 BL培养基中,按中国药典 2005年版二部附录大肠埃希菌检查法检查。

表 2 控制菌检查方法验证

Tab 2 The method validation of inspecting controled bacteria

项目	加菌量 (CFU)	BL培养基 (100 mL)	MUG培养基		EMB琼脂	结果
			MUG— I			
供试品组		20050802	4/	4/	4/	未检出
		20050907	4/	4/	4/	未检出
		20051111	4/	4/	4/	未检出
试验组	大肠埃希菌 64	20050802	+	+	+	检出
		20050907	+	+	+	检出
		20051111	+	+	+	检出
阴性菌对照组	金黄色葡萄球菌 72	20050802	4/	4/	4/	未检出
		20050907	4/	4/	4/	未检出
		20051111	4/	4/	4/	未检出
阴性对照			4/	4/	4/	未检出

2.4.4 采用经验证的方法检查三批布洛伪麻胶囊、霉菌、酵母菌数小于 10 CFU·g⁻¹、细菌数 20050802、20050907、20051111 分别为 30、50、10 CFU·g⁻¹,未检出大肠埃希菌。

3 讨论

3.1 进行药品微生物限度检查时,当供试品具有抑菌活性,应采用适宜的方法消除供试液的抑菌活性,再依法进行检查。在日常的检验工作中,对具有抑菌活性的中药不溶性沉淀或化学药品难溶、微溶性成分,通常采用离心沉淀集菌法中的低速离心 (500 r·min⁻¹) 5 min除去,取上层液进行微生物限度检查。理论上在此转速下的菌细胞大部分存在于上层液中,少部分菌细胞和大部分药物颗粒沉于管底,对菌细胞的检出不会造成太大影响。在多次进行的稀释剂对照组试验中,大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌低速离心 5 min,回收率可达 70%以上,金黄色葡萄球菌则偶有低于 70%的现象,所以将离心时间设置为 4 min。2株真菌低速离心 (500 r·min⁻¹) 5 min,菌细胞 (孢子)绝大部分沉于管底,将离心时间缩短至 3 min回收率仍达不到 70%,选择沉降法 5 min,回收率可达 70%以上。从以上数据看,沉降法较为适宜作为真菌检查时去除供试液中不溶性抑菌活性成分的方法选择。

3.2 为了考察沉降法的可行性,本试验增加了稀释剂对照组经振荡器振摇 5、15、30 min(按每时段取出一瓶)后再沉降

2.4.2 阴性菌对照组 方法同试验组,以金黄色葡萄球菌作为阴性对照菌。

2.4.3 结果判断 阴性菌对照组不得检出阴性对照菌;试验组应检出试验菌,该试验方法成立。试验结果见表 2。

的试验,白色念珠菌、黑曲霉的菌回收率均在 70%以上。

3.3 微生物限度检查方法学验证采用预试验方法,以 1皿试验初步考察供试液对验证用菌株抑菌活性的强弱,既可为正式试验的方法提供依据,又可以减少工作量及试剂、试剂剂的浪费,提高工作效率。

3.4 经验证:生产企业在原、辅料、生产和检验等条件不变的情况下,布洛伪麻胶囊的微生物限度检查可按以下方法进行检验。供试液低速离心 (500 r·min⁻¹) 4 min,上层液 1 mL分注 5皿,每皿 0.2 mL,测定细菌数;供试液沉降法 5 min,上层液 1 mL分注 5皿,每皿 0.2 mL计霉菌及酵母菌数。供试液 10 mL加入 100 mL BL培养基中,按 2005年版中国药典微生物限度检查法大肠埃希菌检查法检验控制菌。

参考文献

[1] State Medical Stantand Become a regular it concerning the New Drugs. (2003) Vol X X VIII(国家药品标准新药转正标准.第 28 册)[S]. 2003:102-103.

[2] ChP(2005) Vol II (中国药典 2005年版,二部)[S]. 2005:93.

[3] MA X R, SU D M. Maunal for Microbe Control of Drugs(药品微生物学检验手册)[M]. Beijing: Science Press, 2000: 62.

收稿日期: 2006-10-16