

非水溶性抗生素原料的微生物限度检查方法及验证

俞虹¹,寿文虹¹,蒋玉芳¹,吴志刚¹,马安宇¹,施月娟²(1.浙江省金华市药品检验所,浙江 金华 321000;2.浙江省迪耳药业有限公司,浙江 金华 321000)

摘要:目的 建立非水溶性抗生素原料的微生物限度检查方法并对其进行验证。方法 抗生素原料,用经干热灭菌的 5%吐温-80作湿润剂, pH7.0氯化钠蛋白胨缓冲液稀释,上清液 500 r·min⁻¹离心,离心后的上清液用薄膜过滤器进行薄膜过滤并用 0.1%蛋白胨冲洗液冲洗,薄膜置营养琼脂培养平板上培养。结果 此方法有效地解决了这类非水溶性原料在水中漂浮以致前处理困难的问题,并较为完全地消除了具有这类强抗菌活性原料对微生物限度检查的内在干扰。结论 该方法适合于非水溶性抗生素原料的微生物限度检查。

关键词:非水溶性抗生素原料;微生物限度检查;验证

中图分类号:R927.32 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2006)05-0394-03

Develop the microbial limit tests on insoluble antibiotic material

YU Hong¹, SHOU Wen-hong¹, JIANG Yu-fang¹, WU Zhi-gang¹, MA An-yu¹, SHI Yue-juan² (1. Jinhua Institute for Drug Control of Zhejiang Province, Jinhua 321000, China; 2. Zhejiang Dier Pharmacy Co., Ltd., Jinhua 321000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To provide a method of microbial limit test on insoluble antibiotic material. **METHODS** 5% Tween 80 sterilized by dry heat air and pH 7.0 sodium chloride peptone solution were added to antibiotic material. The upper solution was transferred into centrifugal tube and centrifugated at $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, and then the supernatant was filtered with the membrane, and wash the filter with 0.1% peptone washing liquid, cultivate the thin-layer on nutrition agar slab. **RESULTS** This method effectively solved the problem of floating and completely eliminated the disturbance to microbial limit test of it. **CONCLUSION** The method is suitable to the microbial limit test for the insoluble antibiotic material.

KEY WORDS: insoluble antibiotic material; microbial limit test; validation

1 材料

2000AHTY智能集菌仪(杭州泰林医疗器械厂),偏聚氟乙稀滤膜(孔径 $0.45 \mu\text{m}$ 上海亚东核级树脂有限公司),LRH-250A生化培养箱(广东医疗器械厂)。

培养基:营养肉汤培养基、玫瑰红钠琼脂培养基、改良马丁培养基,上述培养基均为北京三药科技开发公司产品;0.9%氯化钠溶液、pH7.0氯化钠蛋白胨缓冲液、0.1%蛋白胨冲洗液(金华市药品检验所配制);磷酸二氢钾(AR上海试剂总厂);磷酸二氢钠(AR宜兴第二化学试剂厂);蛋白胨(上海东海制药厂);聚山梨酯80(吐温-80,浙江温州东南化工试剂厂)。克拉霉素(浙江耐司康药业有限公司050807),氟罗沙星(浙江九旭药业有限公司050800010),阿洛西林(浙江康恩贝生物制药股份有限公司050706-21)。大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC(B)44102]金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B)26003]枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B)63501]白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F)98001]黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F)98003]以上菌种均由中国药品生物制品检定所提供。

2 方法和结果

2.1 菌液的制备

取金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌3种菌种的新鲜培养物,分别接种于10mL营养肉汤培养基中,置37℃培养24h,用0.9%无菌氯化钠溶液稀释至 $10^{-5} \sim 10^{-7}$,使每毫升菌液中含50~100CFU备用。白色念珠菌接种于10mL改良马丁培养基中,置25℃培养24h,用0.9%无菌氯化钠溶液稀释至 10^{-5} ,使每毫升菌液中含50~100CFU备用。黑曲霉的新鲜培养物接种于改良马丁琼脂斜面培养基中,25℃培养120h,加3mL0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱,洗液用0.9%无菌氯化钠溶液制成每毫升菌液中含孢子数50~100CFU孢子悬液备用。

2.2 供试液的制备

称取样品各10g,加经干热灭菌的5%吐温-80 0.2mL,加pH7.0氯化钠蛋白胨缓冲液至100mL,边加边摇使成混悬液,静置5min使分层,倾取上清液置离心机中 $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5min,取上清液作供试液。

2.3 验证方法^[2]

①试验组:取供试液各10mL(a)及上述五种备用菌液1mL(b),先取a加入到100mL的0.1%蛋白胨冲洗液中,摇匀后用薄膜过滤器进行薄膜过滤(滤前滤膜先用冲洗液浸润),并取1300mL0.1%蛋白胨冲洗液进行逐次冲洗(每次100mL),蠕动泵转速 $80 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,在最后一次冲洗时加入1mL薄膜分别置琼脂培养平板及改良马丁培养平板上培养。按薄膜菌落计数。②活菌组:即以加b的方式同法操作,测定所加的试验菌落数。③供试品对照组:即以规定量供试液a的方式同法操作,测定供试液本底菌落数。④稀释剂组:为考察供试液制备过程中微生物受影响的程度,用pH7.0氯化钠蛋白胨缓冲液替代样品从供试液的制备起同法制备成空白液(c),并以c+b方式用薄膜过滤器进行薄膜过滤(滤前滤膜先用冲洗液浸润),并取1000mL0.1%蛋白胨冲洗液进行逐次冲洗(每次100mL),蠕动泵转速 $80 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,在最后一次冲洗时加入1mL薄膜分别置琼脂培养平板及改良马丁培养平板上培养,测定其菌落数。均同法进行3次独立的平行试验。

2.4 回收率计算

试验组细菌回收率% = (试验组平均菌落数 - 供试品对照组平均菌落数) ÷ 活菌组平均菌落数 × 100%

稀释剂组细菌回收率% = 稀释剂组平均菌落数 ÷ 活菌组平均菌落数 × 100%

2.4.1 冲洗液用量的验证 取各供试液10mL及稀释液10mL分别用0.1%蛋白胨冲洗液600,800,1000,1200,1400mL同法置薄膜过滤器进行薄膜过滤并逐次冲洗后(每次100mL),蠕动泵转速 $80 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,在最后一次冲洗时加入各菌液1mL,结果见表1。

2.4.2 稀释剂的验证 取经干热灭菌的5%吐温-80 0.2mL,加pH7.0氯化钠蛋白胨缓冲液至100mL,用薄膜过滤器进行薄膜过滤(滤前滤膜先用冲洗液浸润),并取1000mL0.1%蛋白胨冲洗液进行逐次冲洗(每次100mL),蠕动泵转速 $80 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,在最后一次冲洗时分别加入1mL薄膜分别置琼脂培养平板及改良马丁培养平板上培养。结果见表2。

2.4.3 样品的验证结果 见表3。

表 1 不同冲洗量各种菌回收率 (%)

Tab 1 The recoveries of various bacteria after washing with different volume of solution (%)

冲洗量 (mL)	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		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
600	58.3	71.6	60.9	70.6	66.0	79.2	72.8	67.3	66.3	89.3	90.3	93.2	90.3	93.1	90.6
800	70.6	76.3	86.1	79.1	80.1	79.3	76.3	76.8	73.3	86.9	91.6	96.4	98.3	95.3	95.9
1 000	86.8	80.9	90.3	89.0	86.3	84.3	79.6	82.3	86.0	96.3	90.2	95.1	95.7	98.3	96.9
1 200	94.6	93.1	91.3	91.4	91.2	85.9	83.9	86.2	90.9	90.8	90.4	94.3	93.6	89.7	94.3
1 400	94.8	93.6	91.3	91.6	93.6	90.2	86.9	90.5	90.6	99.6	95.3	96.4	98.3	90.6	90.9

注: A: 氟罗沙星; B: 克拉霉素; C: 阿洛西林

Note: A: fluvoxacin; B: clarithromycin; C: azlocillin

表 2 稀释剂的验证结果(对照组)

Tab 2 Diluent confirmation result (comparison group)

菌种	稀释剂	加入菌数(活菌数)	回收菌数	回收率 (%)
大肠埃希菌		102	86	84.3
金黄色葡萄球菌		78	75	96.2
枯草芽孢杆菌		52	47	90.4
白色念珠菌		61	62	101.2
黑曲霉		53	52	98.1

表 3 供试品组细菌回收率 (%)

Tab 3 The recovery of bacterium of the sample (%)

药品名称	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉
氟罗沙星	91.1	91.6	91.2	95.6	99.3
克拉霉素	96.3	86.4	92.5	99.3	90.1
阿洛西林	95.3	90.8	92.6	90.3	92.9

注:空白的菌落数均为 0 个/mL

Note: the quantity of blank colony is 0 /mL

3 讨论

3.1 非水溶性抗生素原料应用于口服制剂有着相当多的品种,建立其微生物限度检查方法并对其进行验证有着极其重要的意义。从表 1 可看出,冲洗量达 800mL 的细菌回收率均已在 70%以上,1 000~1 400mL 可达到较为满意的效果,表 2 显示稀释剂(对照组)菌回收率也均在 70%以上,按中国药典 2005 年版规定菌回收率均须达到 70%以上才符合验证要

求,本方法符合验证要求。

3.2 为避免操作上的个体差异,笔者建议选用 1 000mL 的冲洗量较为合适,如表 3 所示,本法能达到满意的验证效果。

3.3 具强抗菌活性的非水溶性抗生素原料通过本法采用少量 5%吐温-80 首先解决了在稀释剂中不溶而致漂浮的现象,选用吐温-80 解决非水溶性原料在水中的分散性较调节稀释剂的 pH 值效果好,稀释剂的 pH 值下降会致抑菌作用的增强。这类性质的抗生素虽然溶解度极底,但还是有一定的溶解性,笔者多次用培养基稀释法或离心法试验均无法消除抗菌活性,采用湿润后离心再薄膜过滤法方可消除内在干扰,对冲洗剂的用量从表 3 看出,过滤前滤膜先用冲洗液湿润可减少滤膜对抗生素的吸附。

3.4 另外先将吐温-80 稀释后再干热灭菌作为湿润剂较无菌操作时直接用灭菌过的吐温-80 更为方便,此处采用 5%吐温-80 0.2mL 只是作为湿润剂而非增溶剂,吐温-80 的量越大冲洗的难度随之增加。采用本法的用量,不失为是一种简便而行之有效的好方法。

参考文献

- [1] 宋勤,袁林娜,刘应旭.口服头孢拉定制剂微生物限度检查研究试验[J].药物分析杂志,2005,25(6):689.
- [2] 中国药典 2005 年版二部[S].2005:附录 94.

收稿日期:2006-01-17