

布洛芬法莫替丁片微生物限度检查方法验证

冯伟

(金陵药业南京金陵制药厂 江苏南京 210038)

摘要:目的: 建立一种布洛芬法莫替丁片微生物检查的方法。方法: 参照中国药典 2015 年版四部通则 1105, 1106, 通过系统的方法学验证来确认方法是否可行。结果: 需氧菌总数计数以及霉菌和酵母菌总数计数均可采用薄膜过滤法检查, 冲洗量 100ml; 控制菌大肠埃希菌检查法可采用薄膜过滤法, 冲洗量为 100ml, 将滤膜接种至 100ml 的胰酪大豆胨液体培养基培养。

关键词: 布洛芬法莫替丁片, 微生物检查, 控制菌检查, 大肠埃希菌, 薄膜过滤法。

复方布洛芬/法莫替丁 (Duexis) 用于治疗骨关节炎、类风湿性关节炎的症状和体征, 同时降低进行性上胃肠道溃疡的风险。布洛芬已被证实兼具抗炎和止痛双重特性, 而法莫替丁可减少能导致胃和十二指肠溃疡的胃酸分泌。将布洛芬与法莫替丁制成复方制剂, 可在不改变布洛芬止痛和抗炎性能的情况下提高其消化道安全性。

现按参照中国药典 2015 年版四部通则 1105 非无菌产品微生物限度检查, 以及通则 1106 非无菌产品微生物限度检查: 控制菌检查法的有关规定, 对该药进行微生物限度检查方法的验证。

1 实验材料

2 仪器与试剂

2.1 仪器

常熟双杰 JJ1000 型电子天平, 梅特勒托利多 Delta320 型 pH 计, 山东新华 XG1.DTS-0.24B 型脉动真空压力灭菌器, 上海博讯 GZX9246MBE 型数显鼓风干燥箱, 南京恒裕 SP-300B 型生化培养箱, 上海博讯 YXQ-LS-70A 型全自动立式压力蒸汽灭菌器, 杭州泰林 HTY-30B 型微生物限度检测仪, 苏州净化 BHC-1300 II A/B3 生物安全柜, 苏州净化 SW-CJ-2FB 型水平垂直两用工作净化台

2.2 试剂与药品

营养肉汤培养基; 营养琼脂培养基; 玫瑰红钠培养基; 胆盐乳糖培养基; 改良马丁培养基; pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液; 0.1% 蛋白胨水溶液。

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(F)44102]、白色念珠菌 [CMCC(F)98001]、黑曲霉 [CMCC(F)98003]、铜绿假单胞菌 [CMCC (B) 10104]

布洛芬法莫替丁片, 企业自制 (规格: 布洛芬/法莫替丁 800 mg/26.6 mg; 批号: 20161001, 20161002, 20161003)

3 方法与结果

3.1 验证方法

参照中国药典《2015 年版》四部 通则 1105 非无菌产品微生物限度检查 微生物计数法[1]; 通则 1106 非无菌产品微生物限度检查: 控制菌检查法[2]。

3.1.1 菌液制备

取经 30~35℃ 培养 18~24 小时的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌新鲜培养物, 20~25℃ 培养 2~3 天的白色念珠菌新鲜培养物, 用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 10 倍稀释至约为 50~100cfu/ml 备用。

取经 20~25℃ 培养 5~7 天的黑曲霉新鲜培养物加入 3~5ml 含 0.05% (ml/ml) 聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液, 洗脱孢子, 吸出孢子悬液至另一无菌空管内。用含 0.05% (ml/ml) 聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 10 倍稀释至约为 50~100cfu/ml 备用。

3.1.2 供试液制备

无菌称取样品 10g, 置研钵磨成粉末置 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100ml, 振摇, 使溶解, 作为 1:10 的供试液, 备用。

3.2 计数方法适用性试验

3.2.1 菌液组

3.2.1.1 需氧菌总数计数方法适用性试验

取 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 9.9ml 和试验菌悬液 (铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉) 0.1ml 混匀, 吸取 1ml 薄膜过滤, 以 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜, 冲洗量 100ml, 每种菌平行制备 2 张滤膜, 取出滤膜菌面朝上贴于胰酪大豆琼脂培养基平皿上, 30~35℃ 倒置培养 3~5 天点计菌落数。

3.2.1.2 霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验

取 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 9.9ml 和试验菌悬液 (白色念珠菌、黑曲霉) 0.1ml 混匀, 吸取 1ml 薄膜过滤, 以 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜, 冲洗量 100ml, 每种菌平行制备 2 张滤膜, 取出滤膜菌面朝上贴于沙氏葡萄糖琼脂培养基平皿上, 20~25℃ 倒置培养 5 天点计菌落数。

3.2.2 供试品组

3.2.2.1 需氧菌总数计数方法适用性试验

取供试液 9.9ml 和稀释液 0.1ml 混匀, 吸取 1ml 薄膜过滤, 以 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜, 冲洗量 100ml, 平行制备 2 张滤膜, 取出滤膜菌面朝上贴于胰酪大豆琼脂培养基平皿上, 30~35℃ 倒置培养 5 天点计菌落数。

3.2.2.2 霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验

取供试液 9.9ml 和稀释液 0.1ml 混匀, 吸取 1ml 薄膜过滤, 以 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜, 冲洗量 100ml, 平行制备 2 张滤膜, 取出滤膜菌面朝上贴于沙氏葡萄糖琼脂培养基平皿上, 20~25℃ 倒置培养 5 天点计菌落数。

3.2.3 试验组

3.2.3.1 需氧菌总数计数方法适用性试验

取上述制备好的 1:10 供试液 9.9ml, 加入试验菌液 (铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉) 0.1ml, 混匀, 吸取 1ml 薄膜过滤, 以 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜, 冲洗量 100ml, 每种菌平行制备 2 张滤膜, 取出滤膜菌面朝上贴于胰酪大豆琼脂培养基平皿上, 30~35℃ 倒置培养 3~5 天点计菌落数。

3.2.3.2 霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验

取上述制备好的 1:10 供试液 9.9ml, 加入试验菌液 (白色念珠菌、黑曲霉) 0.1ml 混匀, 吸取 1ml 薄膜过滤, 以 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜, 冲洗量 100ml, 每种菌平行制备 2 张滤膜, 取出滤膜菌面朝上贴于沙氏葡萄糖琼脂培养基平皿上, 20~25℃ 倒置培养 5 天点计菌落数。

3.2.4 试验结果的判定方法及标准

3.2.4.1 计算公式

$$\text{试验组菌数的回收率} = \frac{\text{试验组平均菌落数} - \text{供试品组平均菌落数}}{\text{菌液组平均菌落数}}$$

3.2.4.2 判定标准

试验组的菌数回收率应在 0.5~2 之间。

若各试验菌的回收率均符合规定, 照所用的供试液制备方法 & 计数方法进行该供试品的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数。

3.2.5 试验结果

本品供试品组需氧菌数，霉菌和酵母数均为 0，菌液组及试验组菌落计数见表 1-表 4，试验组回收率见表 5-表 6。

结果表明，试验组菌数回收率均符合规定，由此得出需氧菌总数计数可采用：1:10 供试液（含 0.1%聚山梨酯 80），薄膜过滤法检查，冲洗量 100ml；霉菌和酵母菌总数计数可采用：1:10 供试液（含 0.1%聚山梨酯 80），薄膜过滤法检查，冲洗量 100ml。

表 1 需氧菌总数菌液组菌落计数(cfu/ml)

试验次数	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉菌
------	---------	--------	--------	-------	------

表 3 需氧菌总数试验组菌落计数(cfu/ml)

批号	试验次数	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉菌
20161001	1	61	80	69	67	67
	2	58	76	75	61	55
	平均	60	78	72	64	61
20161002	1	56	69	72	64	78
	2	73	76	81	73	86
	平均	65	73	77	69	73
20161003	1	73	67	72	71	70
	2	59	63	65	63	68
	平均	66	65	69	67	69

表 4 霉菌和酵母菌总数试验组菌落计数(cfu/ml)

批号	试验次数	白色念珠菌	黑曲霉菌
20161001	1	79	73
	2	68	70
	平均	74	72
20161002	1	78	76
	2	72	83
	平均	75	80
20161003	1	59	65
	2	72	70
	平均	66	68

表 5 需氧菌试验组回收率

	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉菌
20161001	98.4%	111.4%	101.4%	103.2%	93.8%
20161002	106.6%	104.3%	108.5%	111.3%	112.3%
20161003	108.2%	92.9%	97.2%	108.1%	106.2%

表 6 霉菌和酵母菌总数试验组回收率

	白色念珠菌	黑曲霉菌
20161001	104.2%	98.6%
20161002	105.6%	109.6%
20161003	93.0%	93.2%

3.3 控制菌检查方法适用性试验（大肠埃希菌）

3.3.1 试验组

采用薄膜过滤法，取 1:10 供试液 10ml，过滤，冲洗量 100ml，在冲洗液中加入小于 100cfu 的大肠埃希菌，过滤后，取出滤膜接入 100ml 的胰酪大豆胨液体培养基于 30-35℃培养 18-24 小时。

3.3.2 阳性对照组

采用薄膜过滤法，取稀释液 10ml，过滤，冲洗量 100ml，在冲洗液中加入小于 100cfu 的大肠埃希菌，过滤后，取出滤膜接入 100ml 的胰酪大豆胨液体培养基于 30-35℃培养 18-24 小时。

3.3.3 阴性对照组

采用薄膜过滤法，取稀释液 10ml，过滤，冲洗量 100ml，过滤

	菌				
1	64	68	78	67	68
2	57	72	63	56	62
平均	61	70	71	62	65

表 2 霉菌和酵母菌总数菌液组菌落计数(cfu/ml)

试验次数	白色念珠菌	黑曲霉菌
1	69	75
2	72	70
平均	71	73

后，取出滤膜接入 100ml 的胰酪大豆胨液体培养基于 30-35℃培养 18-24 小时。

3.3.4 选择和分离纯化

取上述培养物 1ml，接种至含 100ml 麦康凯液体培养基内培养，42-44℃培养 24-48 小时。取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂平板上 30-35℃培养 18-72 小时。阳性对照组和阴性对照组同法操作。

3.3.5 试验结果的判定方法及标准

试验组、阳性对照组有大肠埃希菌生长（且浊度一致），阴性对照组未检出菌落。（有菌生长：+；无菌生长：-）

3.3.6 试验结果

试验结果见表 7，试验组、阳性对照组有大肠埃希菌生长（且浊度一致），阴性对照组未检出菌落。（有菌生长：+；无菌生长：-），说明本方法可行，本品大肠埃希菌检查法可采用薄膜过滤法，取 1:10 供试液 10ml 过滤，冲洗量为 100ml，将滤膜接种至 100ml 的胰酪大豆胨液体培养基培养。

表 7 大肠埃希菌检查方法适用性检查结果

步骤	试验组			阳性对照组	阴性对照组
	20161001	20161002	20161003		
胰酪大豆胨液体培养基	+	+	+	+	-
麦康凯液体培养基	+	+	+	+	-
麦康凯液体培养物划线 接种于麦康凯琼脂平板	第三批均为微红色, 菌落中心呈深桃红色, 圆形, 扁平, 边缘整齐, 表面光滑, 湿润			微红色, 菌落中心呈深桃红色, 圆形, 扁平, 边缘整齐, 表面光滑, 湿润	-
分离纯化、染色镜检、生化 试验等	经鉴定第三批均为大肠埃希菌			经鉴定为大肠埃希菌	-
接种于麦康凯琼脂平板	第三批均为微红色, 菌落中心呈深桃红色, 圆形, 扁平, 边缘整齐, 表面光滑, 湿润			微红色, 菌落中心呈深桃红色, 圆形, 扁平, 边缘整齐, 表面光滑, 湿润	-
分离纯化、染色镜检、生化 试验等	经鉴定第三批均为大肠埃希菌			经鉴定为大肠埃希菌	-

4 讨论

本文作者对布洛芬法莫替丁片的微生物限度检查法按照中国药典 2015 年版四部 通则 1105 非无菌产品微生物限度检查, 进行了系统的方法学验证, 结果表明, 采用不同批次的三批样品进行试

验, 其回收率均符合要求, 本方法可行。

对布洛芬法莫替丁片的控制菌检查按照中国药典 2015 年版四部 通则 1106 非无菌产品微生物限度检查: 控制菌检查法, 进行了系统的方法验证, 最后表明本方法中试验组、阳性对照组有大肠埃希菌生长 (且浊度一致), 阴性对照组未检出菌落, 方法简单可行, 可以作为布洛芬法莫替丁片微生物检查的控制方法。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 2015 年版. 四部. 通则 1105 140-144
- [2] 中国药典 [S]. 2015 年版. 四部. 通则 1106 144-149