

殖能力均显著降低,T抑制细胞亚群百分比值显著升高,表明雷公藤多苷具有一定的细胞免疫抑制作用,为临床合理用药提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 黄真,毛庆秋.雷公藤多苷的临床应用、不良反应及预防[J].药品评价,2005,2(2):125-127.

- [2] 吴敏毓,刘公植.医学免疫学[M].第4版.合肥:中国科学技术大学出版社,2002.

- [3] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay [J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1): 55-63.

(收稿日期 2009-04-22)

克拉霉素片微生物限度检查方法学验证研究

姜凌,傅鹏,张建军

(天津药物研究院 新药评价中心,天津 300193)

摘要:目的 确定克拉霉素片微生物检查方法。方法 采用离心与薄膜过滤联合法对克拉霉素片试验菌回收率的有效性进行评价。结果 离心与薄膜过滤联合法的细菌、真菌回收率均高于70%。结论 采用离心与薄膜过滤联合法测定细菌、真菌数,可有效除去克拉霉素片中的抑菌成分,使检验结果更准确、可靠。

关键词:克拉霉素片;抗菌;微生物限度检查;回收率

中图分类号:R927.1

文献标识码:A

文章编号:1674-5515(2009)05-0291-03

Validation of microbial limit test of Clarithromycin Tablets

JIANG Ling, FU Peng, ZHANG Jian-Jun

(Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for the microbial limit test of Clarithromycin Tablets. **Methods** The methods of centrifugation and membrane filtration were combined to evaluate the recovery rate of test bacteria in Clarithromycin Tablets. The antimicrobial effect of Clarithromycin Tablets was determined by recovery rate of the test bacteria. **Results** The recovery rates of bacteria and fungi in Clarithromycin Tablets were both over 70%. **Conclusion** The combination of centrifugation and membrane filtration can be used effectively in the microbial limit test of Clarithromycin Tablets. It is accurate and reliable.

Key words: Clarithromycin Tablets; anti-microbial; microbial limit test; recovery rate

克拉霉素片属大环内酯类抗生素,主要成分为克拉霉素。该制剂对革兰阳性菌、部分革兰阴性菌及支原体有抑制作用,临床上主要用于抗感染治疗。由于克拉霉素片中含有抑菌成分,使其中污染的微生物处于受损或半死亡等状态,故干扰污染微生物的正常检出,使检验结果不能真实反映药品中微生物污染的状况^[1-2]。《中国药典》(2005年版)规定,在建立一种药品微生物限度检查方法时,应对方法进行验证以保证方法的可靠性。为此,笔者按《中国药典》(2005年版二部)规定的方法^[3],人工加入阳

性对照菌,测其回收率,建立了克拉霉素片微生物限度检查方法。

1 材料与仪器

1.1 供试品

克拉霉素片,由天津药物研究院制剂中心提供,批号071101。

1.2 菌种

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、大肠杆菌[CMCC(B)44102]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉菌

[CMCC(F)98003],均由中国药品生物制品检定所提供。

1.3 试液

氯化钠-蛋白胨缓冲液(pH 7.0)组成:磷酸二氢钾 3.56 g、磷酸氢二钠 7.23 g、氯化钠 4.3 g、蛋白胨 1.0 g,加水 1 000 mL,微温溶解,滤清,pH 试纸测 pH 值约 7.0,每瓶分装 200 mL,121 °C 高压灭菌 20 min,于 4 °C 冰箱储存。

1.4 培养基

营养琼脂培养基(批号:20070702)、玫瑰红钠琼脂培养基(批号:061226)、胆盐乳糖培养基(批号:060613)、营养肉汤培养基(批号:060919)、马丁培养基(批号:20070802)、MUG 培养基(批号:20070309),均为北京三药科技开发公司生产。

1.5 仪器

YAMATO SM-Z 型自动高压灭菌锅,日本樱花公司;PL203 型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;WH2 型涡旋混合仪,上海沪西医疗仪器厂;HYT-2000A 型智能集菌仪及配套反复使用过滤器,杭州高得医疗器械有限公司;LD5-2A 型离心机,北京医疗设备厂。

2 方法

2.1 菌液制备

将接种了大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物置于营养肉汤培养基中,于 30~35 °C 培养 18~24 h,用 0.9% 无菌氯化钠溶液稀释成每 1 mL 含 50~100 cfu 的菌悬液,备用;将接种白色念珠菌的新鲜培养物置于改良马丁培养基中,于 23~28 °C 培养 18~24 h,用 0.9% 无菌氯化钠溶液稀释成每 1 mL 含 50~100 cfu 的菌悬液,备用;将接种黑曲霉的新鲜培养物置于改良马丁琼脂斜面培养基中,培养 5~7 d,待大量孢子产生后,加入 3~5 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱,吸出孢子悬液至灭菌试管内,将菌液稀释至每 1 mL 含 50~100 cfu 的菌悬液,备用。

2.2 供试品溶液配制

称取供试品 10 g,溶于 100 mL pH 为 7.0 的氯化钠-蛋白胨液中,配制成质量浓度为 0.1 g/mL 的供试品溶液。

2.3 方法验证

2.3.1 离心沉淀集菌法

1)供试品溶液的处理:取供试品溶液 10 mL,先以 500 r/min 离心 5 min,取全部上清液,再以 3 000

r/min 离心 20 min,弃去上清液,留底部集菌液约 2 mL,加稀释液(即氯化钠-蛋白胨缓冲液,下同)补至原体积。2)试验组微生物计数验证:取供试品溶液 1 mL 和 50~100 cfu 试验菌 1 mL,分别注入平皿中,立即倾注相应培养基,每种试验菌平行制备 2 个平板,按《中国药典》(2005 年版二部)“微生物限度菌落计数方法”测定菌落数。3)菌液组微生物计数验证:取试验菌液各 1 mL,注入平皿中,按上述方法计数加入的试验菌数。每种菌株分别制备 2 个平皿,与试验组同法测定菌落数。4)稀释剂对照组微生物计数验证:取无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 1 mL,注入平皿,每种菌株分别制备 2 个平皿,每个平皿加入 50~100 cfu 试验菌,与试验组同法测定菌落数。5)菌落回收率计算:试验组的菌落回收率=(试验组平均菌落数-对照组平均菌落数)/菌液组的平均菌落数×100%。

2.3.2 离心集菌薄膜过滤法

1)供试品溶液的处理:取供试品溶液 10 mL,先以 500 r/min 离心 5 min,取全部上清液,再以 3 000 r/min 离心 20 min,弃去上清液,留底部集菌液约 2 mL,加稀释液补至原量。将 20 mL 稀释液加入过滤器,加入上述供试品溶液 1 mL 后抽滤,冲洗液冲洗 3 次,每次 100 mL,并在最后一次加入试验菌液 1 mL。抽滤后即制得薄膜。2)试验组微生物计数验证:按供试品溶液处理方法制备薄膜,大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌薄膜贴于营养琼脂培养基,于 35 °C 温箱培养 48 h 后计数;白色念珠菌和黑曲霉薄膜贴于玫瑰红钠琼脂培养基,于 28 °C 温箱培养 72 h 后计数。3)菌液组微生物计数验证:取试验组菌液 1 mL 注入平皿中,每株试验菌平行制备 2 个平皿。大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌倾注营养琼脂培养基,于 35 °C 温箱培养 48 h 后计数;白色念珠菌和黑曲霉倾注玫瑰红钠琼脂培养基,于 28 °C 温箱培养 72 h 后计数。4)供试品溶液对照组微生物计数验证:按供试品溶液处理方法制备供试品薄膜,营养琼脂培养基和玫瑰红钠琼脂培养基各贴 2 个供试品薄膜。5)稀释剂对照组微生物计数验证:在稀释剂中加入试验菌液,配制成稀释剂对照液(每毫升 50~100 个细菌),按供试品溶液处理方法制备稀释剂对照组薄膜。将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌薄膜贴于营养琼脂培养基,于 35 °C 温箱培养 48 h 后计数;白色念珠菌和黑曲霉薄膜贴于玫瑰红钠琼脂培养基,28 °C 温箱培

养 72 h 后计数。

2.4 控制菌检查

2.4.1 试验组

由于供试品对大肠杆菌有抑菌活性,因而采用离心集菌薄膜过滤法。将 10 mL 供试品溶液按上述方法制备薄膜 5 张(每张过滤 2 mL 供试品溶液)和试验菌液 1 mL,加入 100 mL 胆盐乳糖培养基,于 37 °C 温箱培养 24 h;取上述培养物 0.2 mL,接种至含 5 mL MUG 培养基的试管内继续培养,分别于 5、24 h 后紫外灯下观察,观察后沿管壁加入数滴靛基质试剂,观察颜色变化。

2.4.2 阴性菌对照组

采用金黄色葡萄球菌,操作同试验组。

3 结果

3.1 离心沉淀集菌法试验结果

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌及黑曲霉的回收率均低于 70%,说明克拉霉素片对细菌有很强的抑菌作用,应建立新的方法,以消除供试品的抑菌活性并重新验证。采用离心沉淀集菌法对各菌株的回收率结果见表 1。

表 1 离心沉淀集菌法对各菌株的回收率

组别	试验次数	回收率/%				
		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
试验	1	52	48	46	58	53
	2	47	49	52	57	60
稀释剂对照	1	95	93	94	96	91
	2	92	95	92	93	90

3.2 离心集菌薄膜过滤法试验结果

采用离心集菌薄膜过滤法,验证试验结果较好,各菌株的回收率结果见表 2。

表 2 离心集菌薄膜过滤法对各菌株的回收率

组别	试验次数	回收率/%				
		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
试验	1	85	77	85	90	85
	2	79	78	78	80	84
稀释剂对照	1	93	95	95	91	90
	2	92	94	92	96	93

从表 2 可以看出,采用离心集菌薄膜过滤法检

测克拉霉素片,冲洗量为每张膜 300 mL,人工加入 5 种阳性代表菌,稀释剂对照组、试验组的菌落回收率均高于 70%,符合验证要求,说明经离心集菌薄膜过滤后,可消除克拉霉素片的抑菌活性。因此可采用该方法测定克拉霉素片的细菌数。

3.3 大肠杆菌检查验证结果

阴性菌对照组 MUG 及靛基质结果皆为阴性;试验组检出大肠杆菌,MUG 及靛基质 24 h 结果皆为阳性。结果见表 3。

表 3 大肠杆菌检查验证结果

组别	时间/h	MUG(荧光)	靛基质
试验	5	阴性	—
	24	阳性	阳性
阴性菌对照	5	阴性	—
	24	阴性	阴性

注:“—”表示未加指示剂

4 结论

由于克拉霉素对细菌生长有较强的抑制作用,而《中国药典》所规定的 5 株验证实验用菌株对克拉霉素均较为敏感,且验证实验表明一般离心集菌法难以彻底去除克拉霉素的抑菌活性,5 株实验菌的回收率达不到要求,因此克拉霉素片细菌数测定方法需改进,可以采用薄膜过滤法。笔者经过试验摸索,采用先以 500 r/min 低速离心,取上清液,再以 3 000 r/min 高速离心,用底部集菌液结合薄膜过滤的方法,使 5 株验证菌的回收率均达到要求。对于控制菌检查,按与样品相同处理方法制备的薄膜与不加供试品溶液的阳性对照比较,大肠杆菌生长正常。采用离心集菌薄膜过滤法很好地解决了克拉霉素片抑菌作用较强的问题,保证了该品种微生物限度检查方法的可靠性,也使克拉霉素片微生物限度检查的结果准确、可信。

参考文献

- [1] 马绪荣,苏德模.药品微生物学分析手册[M].北京:科学出版社,2000.
- [2] 杜平华,朱世真,赵鲁青.药品微生物限度检查预实验及方法验证的探讨[J].中国药品标准,2003,4(3):52-53.
- [3] 中国药典[S].二部.2005,附录.

(收稿日期 2009-02-08)

欢迎订阅 2010 年《现代药物与临床》杂志