

曲安奈德原料药微生物总数检查法验证

郭俊玲

天津生物工程职业技术学院, 天津 300161

摘要: **目的** 建立曲安奈德的微生物限度检查法并进行验证。**方法** 按平皿法对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉 5 种试验菌分别进行 3 次独立的平行试验, 并分别计算各试验菌每次试验的回收率, 以验证细菌、霉菌及酵母菌计数方法的可行性。**结果** 营养琼脂培养基中添加 0.001% TTC 菌体显色剂能有效地对细菌着色, 保证细菌计数的准确性; 用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL 加 10 g 聚山梨酯 80 的方法制备样品液, 5 种试验菌均取得了很好的回收率 (>70%)。**结论** 所建立的曲安奈德原料药的细菌、霉菌及酵母菌的计数方法是可行的。

关键词: 微生物检查; 平皿计数法; 方法验证

中图分类号: R927.12

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2018)06-1057-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.06.021

Validation Tests for microbiological examination of Triamcinolone acetonide API

GUO Junling

Tianjin Vocational College of Bioengineering, Tianjin 300161, China

Abstract: **Objective** To establish a microbiological limit test for Triamcinolone acetonide API and verify it. **Methods** Three independent parallel tests were performed on five test strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, and *Aspergillus niger* according to the plate method. The recovery of each test strain was calculated, to verify the feasibility of bacteria, molds and yeasts count methods. **Results** The addition of 0.001% TTC bacterial chromogenic reagent to the nutrient agar medium could effectively stain the bacteria and ensure the accuracy of the bacterial count. The sterile pH 7.0 sodium chloride-peptone buffer 100 mL plus 10 g of polysorbate 80 was used to prepare the sample solution, and all the five test strains achieved good recovery (>70%). **Conclusion** The methods for counting the bacteria, molds and yeasts of Triamcinolone acetonide API was feasible.

Key words: microbiological examination; plate-count methods; method validation

曲安奈德是一种具有较强且较持久抗炎、抗过敏作用的糖皮质激素^[1], 以肌肉注射为例, 肌肉注射后在数小时内生效, 作用可维持 2~3 周^[2]。曲安奈德可用于各种皮肤病 (如神经性皮炎、湿疹、牛皮癣等)、支气管哮喘、过敏性鼻炎、关节痛、肩周围炎、腱鞘炎、急性扭伤、慢性腰腿痛及眼科炎症等的治疗^[3], 在口腔扁平苔藓、口腔黏膜下纤维化、重型阿弗他溃疡、口腔颌面血管瘤、颌骨中央性巨细胞肉芽肿、颞下颌关节紊乱等口腔疾病治疗中亦取得较好疗效^[4]。

微生物的生长受许多因素的影响, 在检查药品中污染的微生物时, 微生物的抗性、样品的处理方法、测定样品的浓度、测定方法、培养基、培养条

件等, 将直接影响检查结果, 所以美国药典、欧洲药典、中国药典中, 微生物限度检查^[5]均要求进行方法验证。

《中国药典》2015 年版规定, 当建立产品的微生物限度检查法时, 应进行细菌、霉菌及酵母菌计数方法的验证, 以确认所采用的方法适合于该产品的细菌、霉菌及酵母菌数的测定。若产品的组分或原检验条件发生改变可能影响检验结果时, 计数方法应重新验证。验证时, 按供试液的制备和细菌、霉菌及酵母菌计数所规定的方法及下列要求进行。对各试验菌的回收率应逐一进行验证。验证试验至少应进行 3 次独立的平行试验, 并分别计算各试验菌每次试验的回收率。

收稿日期: 2017-10-24

第一作者: 郭俊玲 (1969—), 主要从事制剂方向研究。E-mail: guojunling0215@126.com

当建立曲安奈德产品的微生物限度检查法时,因激素产品不溶于水或稀释液,样品液制备中需用表面活性剂——聚山梨酯 80 进行乳化;菌落计数时白色药渣会影响菌落的辨识,所以细菌检查用培养基中需加入细菌菌体显色剂;这两种物质的使用是否会对微生物有毒性,从而影响微生物的生长,影响菌数的准确计数,所以要进行验证。

本验证包括细菌、霉菌及酵母菌计数方法——平皿计数法的验证,以确定所采用的方法适合于该产品的细菌、霉菌及酵母菌数的测定;按平皿法对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉 5 种试验菌分别进行 3 次独立的平行试验,并分别计算各试验菌每次试验的回收率,以验证细菌、霉菌及酵母菌计数方法的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠埃希菌 CMCC(B)44103-6、金黄色葡萄球菌 CMCC (B) 26003-27、枯草芽孢杆菌 CMCC (B) 63501-13、白色念珠菌 CMCC (F) 98001-15、黑曲霉 CMCC (F) 98003-9,购自中国食品药品检定研究院;营养琼脂培养基、玫瑰红钠培养基,北京三药科技开发公司出品;2,3,5-氯化三苯基四氮唑,天津福晨化学试剂厂出品;聚山梨酯 80,天津中和盛泰化工有限公司出品,购自天津药检所。

1.2 菌液制备

1.2.1 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌菌液制备 分别接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基内培养 18~24 h,用 0.9% 无菌氯化钠溶液连续稀释至 10^{-6} ,制得含菌数为 50~100 cfu/mL 的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的 3 种细菌菌悬液。

1.2.2 白色念珠菌菌液制备 接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基内培养 24~48 h。用 0.9% 无菌氯化钠溶液连续稀释至 10^{-6} ,制得含菌数为 50~100 cfu/mL 的白色念珠菌酵母菌悬液。

1.2.3 黑曲霉菌液制备 接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂斜面培养基内培养 5~7 d,加入 3~5 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱。然后,用管口带有薄的无菌棉花或纱布(能过滤菌丝)的无菌毛细吸管吸出孢子悬液至无菌试管内,用 0.9% 无菌氯化钠溶液连续稀释至 10^{-6} ,制得含孢子数为 50~100 cfu/mL 的黑曲霉孢子悬液。

1.3 样品液制备

准备 3 份 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,每份 100 mL,45°C 保温。在 3 份上述溶液中,分别加入 5、10、15 g 无菌聚山梨酯 80,充分振摇使乳化。取 3 份供试品,每份 10 g,于 3 个无菌研钵中,分别加入上述 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 90 mL(分别内含 5、10、15 g 聚山梨酯 80),充分研磨,制得 3 份供试品的 1:10 悬浮液,待用。

1.4 培养基准备

1.4.1 1%TTC 溶液的制备 称取 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 0.1 g 溶于 10 mL 纯化水中,121°C 15 min 灭菌后即得。

1.4.2 培养基制备 将 4 份营养琼脂培养基加热溶化,放凉至 60°C 左右,一份 1 000 mL 营养琼脂培养基加入 1 mL 1% TTC 溶液,摇匀,制得 0.001% TTC 营养琼脂培养基;一份 1 000 mL 营养琼脂培养基加入 0.5 mL 1% TTC 溶液,摇匀,制得 0.000 5% TTC 营养琼脂培养基;一份 1 000 mL 营养琼脂培养基加入 1.5 mL 1% TTC 溶液,摇匀,制得 0.001 5% TTC 营养琼脂培养基;一份 200 mL 营养琼脂培养基不加显色剂;50°C 水浴保温,待倾注平皿。将玫瑰红钠琼脂培养基加热溶化,50°C 水浴保温,待倾注平皿。

1.5 平皿的制备

1.5.1 试验组 对于大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌 3 种细菌试验菌的验证:取样品液 1.0 mL 和 50~100 cfu 试验菌,分别注入平皿中,立即倾注已预先融化并放凉至 45°C 左右(不烫手)的 0.001% TTC 营养琼脂培养基,混匀,每株试验菌平行制备 2 个平皿,按平皿法计数;对于白色念珠菌酵母菌试验菌、黑曲霉菌试验菌的验证:取样品液 1.0 mL 和 50~100 cfu 试验菌,分别注入平皿中,立即倾注已预先溶化并放凉至 45°C 左右(不烫手)的玫瑰红钠琼脂培养基,混匀,每株试验菌平行制备 2 个平皿,按平皿法计数。

1.5.2 菌液组 将 50~100 cfu 该试验菌,按平皿计数法测定该试验菌的菌含量。

1.5.3 稀释剂对照组 将 1.0 mL 10^{-6} (含 50~100 cfu 该试验菌)菌悬液与 3 份 1.0 mL pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液(分别内含 100:5、100:10 或 100:15 聚山梨酯 80)注入平皿中,立即倾注相应的琼脂培养基,按平皿法计数。

1.5.4 供试品对照组 分别取 1.0 mL 样品液注入

每一平皿中,立即倾注相应的琼脂培养基、按平皿法测定供试品本底菌数。

1.5.5 培养与计数 (1)对于大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌3种细菌试验菌的验证:将其试验组、菌液组、稀释剂对照组、供试品对照组的营养琼脂培养基平板放30~35℃培养箱内培养,逐日点计菌落数,以48h的菌落数报告。(2)对于白色念珠菌酵母菌试验菌、黑曲霉菌试验菌的验证:将其试验组、菌液组、稀释剂对照组、供试品对照组的玫瑰红钠琼脂培养基平板放23~28℃培养箱内培养,逐日点计菌落数,以72h的菌落数报告。

1.5.6 回收率计算 稀释剂对照组回收率=稀释剂对照组菌落数/菌液组菌落数,试验组回收率=(试验组菌落数-供试品对照组菌落数)/菌液组菌落数。

2 结果

2.1 不同浓度的菌体显色剂对3种细菌菌落形成的影响情况

从数据(表1)可以看出,0.000 5% TTC与0.001% TTC对细菌菌落的正常检出影响不大,但0.000 5% TTC着色效果较差,随着TTC浓度加大,会对细菌产生毒性,细菌检出率下降。所以,采用0.001% TTC的营养琼脂培养基进行下面的试验。

2.2 验证试验结果

2.2.1 大肠埃希菌平皿计数法验证数据

分别制备含5、10、15 g聚山梨酯80的pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100 mL,30~35℃培养48h后测各组菌落数,计算回收率。结果见表2。含10 g聚山梨酯80的供试品溶液试验组和稀释剂对照组回收率均较高,含5 g聚山梨酯80的供试品溶液稀释剂对照组大肠埃希菌的回收率比含10 g聚山梨酯80的供试品溶液稍有提高,但试验组的回收率下降且小于70%。

2.2.2 金黄色葡萄球菌平皿计数法验证数据 分别制备含5、10、15 g聚山梨酯80的pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100 mL,30~35℃培养48h后测各组菌落数,计算回收率。结果见表3。含10 g聚山梨酯80的供试品溶液试验组和稀释剂对照组回收率均较高,含5 g聚山梨酯80的供试品溶液稀释剂对照组大肠埃希菌的回收率比含10 g聚山梨酯80的供试品溶液稍有提高,但试验组的回收率有下降,且试验组数据波动大。

2.2.3 枯草芽孢杆菌平皿计数法验证数据 分别制备含5、10、15 g聚山梨酯80的pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100 mL,30~35℃培养48h后测各组菌落数,计算回收率。结果见表4。含10 g聚山梨酯80的供试品溶液试验组和稀释剂对照组回收率均较高,含5 g聚山梨酯80的供试品溶液稀释剂对照组大肠埃希菌的回收率比含10 g聚山梨酯80的供试品溶液稍有提高,但试验组的回收率有下降且小于70%,且试验组数据差异大。

表1 不同浓度的菌体显色剂对3种细菌菌落形成的影响

Table 1 Effects of different concentration of chromogenic agents on the formation of three bacterial colonies

TTC	大肠埃希菌菌落数				金黄色葡萄球菌菌落数				枯草芽孢杆菌菌落数			
	1	2	3	平均	1	2	3	平均	1	2	3	平均
0	47	56	62	55	77	66	85	76	62	67	78	69
0.0005%	53	55	60	56	75	81	72	76	66	63	72	67
0.001%	50	54	60	55	74	71	80	75	63	62	70	65
0.0015%	38	41	47	42	60	55	65	60	56	49	60	55

表2 大肠埃希菌平皿计数法验证试验

Table 2 Verifying test of *Escherichia coli* with plate counting method

组别	pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL:10 g 聚山梨酯 80		pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL:15 g 聚山梨酯 80		pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL:5 g 聚山梨酯 80	
	菌落数		菌落数		菌落数	
	回收率/%		回收率/%		回收率/%	
试验	68	94	54	69	60	69
菌液	54		54		54	
稀释剂对照	51	89	35	67	54	98
供试品对照	20		18		22	

表3 金黄色葡萄球菌平皿计数法验证试验

Table 3 Verification test of *Staphylococcus aureus* by plate counting method

组别	pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL:10 g 聚山梨酯 80		pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL:15 g 聚山梨酯 80		pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL:5 g 聚山梨酯 80	
	菌落数	回收率/%	菌落数	回收率/%	菌落数	回收率/%
试验	83	92	66	72	71	76
菌液	74		74		74	
稀释剂对照	72	97	52	70	70	95
供试品对照	15		13		18	

表4 枯草芽孢杆菌平皿计数法验证

Table 4 Validation of plate counting method for *Bacillus subtilis*

组别	pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL:10 g 聚山梨酯 80		pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL:15 g 聚山梨酯 80		pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL:5 g 聚山梨酯 80	
	菌落数	回收率/%	菌落数	回收率/%	菌落数	回收率/%
试验	74	78	64	68	70	69
菌液	65		65		65	
稀释剂对照	60	92	50	77	62	95
供试品对照	23		20		25	

2.2.4 白色念珠菌平皿计数法验证数据 分别制备含 5、10、15 g 聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL，23~28℃ 培养 72 h 后测各组菌落数，计算回收率。结果见表 5。含 10 g 聚山梨酯 80 的供试品溶液试验组和稀释剂对照组回收率均较高，含 5 g 聚山梨酯 80 的供试品溶液稀释剂对照组大肠埃希菌的回收率比含 10 g 聚山梨酯 80 的供试品溶液稍有提高，但试验组的回收率有下降，且试验组数据差异大。

2.2.5 黑曲霉平皿计数法验证 分别制备含 5、10、15 g 聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL，23~28℃ 培养 72 h 后测各组菌落数，计算回收率。结果见表 6。含 10 g 聚山梨酯 80 的试验组和稀释剂对照组回收率均较高，含 5 g 聚山梨

酯 80 的稀释剂对照组大肠埃希菌的回收率比含 10 g 聚山梨酯 80 的供试品溶液稍有提高，但试验组的回收率有下降，且试验组数据差异大。

3 讨论

通过此次验证试验可见，细菌计数培养基中菌体显色剂使用、样品液制备中表面活性剂的使用，都会对微生物菌落的正常检出有一定影响。从数据可知，0.001% TTC 菌体显色剂能有效地对细菌着色，并能保证细菌计数的准确性。用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL 加 10 g 聚山梨酯 80 的方法制备样品液，取得了很好的回收率。大肠埃希菌稀释剂对照组、试验组的菌回收率均高于 70%；金黄色葡萄球菌稀释剂对照组、试验组的菌回收率均高于 70%；枯草芽孢杆菌稀释剂对照组、试验组

表5 白色念珠菌平皿计数法验证

Table 5 Validation of plate counting method for *Candida albicans*

组别	pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL:10 g 聚山梨酯 80		pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL:15 g 聚山梨酯 80		pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL:5 g 聚山梨酯 80	
	菌落数	回收率/%	菌落数	回收率/%	菌落数	回收率/%
试验	54	83	49	72	50	74
菌液	58		58		58	
稀释剂对照	55	95	45	78	58	100
供试品对照	6		7		7	

表6 黑曲霉平皿计数法验证

Table 6 Validation of plate counting method for *Aspergillus niger*

组别	pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL:10 g 聚山梨酯 80		pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL:15 g 聚山梨酯 80		pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL:5 g 聚山梨酯 80	
	菌落数	回收率/%	菌落数	回收率/%	菌落数	回收率/%
试验	52	87	46	76	48	78
菌液	54		54		54	
稀释剂对照	49	91	45	83	52	96
供试品对照	5		5		6	

的菌回收率均高于 70%; 白色念珠菌稀释剂对照组、试验组的菌回收率均高于 70%; 黑曲霉稀释剂对照组、试验组的菌回收率均高于 70%。而加大聚山梨酯 80 用量制备样品液, 5 种菌的回收率均有不同程度的下降甚至不合格。缩小聚山梨酯 80 用量制备样品液, 对稀释剂对照组回收率没影响, 但试验组回收率下降明显, 且样品分散效果不理想, 数据波动较大。

综上所述, 在曲安奈德原料药微生物总数测定方法中, 细菌菌体显色剂采用 0.001% TTC 的浓度, 样品液制备中聚山梨酯 80 用量采用 100 mL:10 g 的比例是适宜的。

参考文献

- [1] 殷英霞, 陈建华, 吴香丽, 等. 球后注射曲安奈德治疗黄斑水肿对老年患者血糖水平的影响 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2018, 17(2): 97-100.
- [2] 范晓梅, 刘丽丹. 醋酸曲安奈德玻璃体腔注射在治疗老年黄斑水肿患者中的应用 [J]. 检验医学与临床, 2018, 15(2): 266-269.
- [3] 郭 敏, 刘 宏, 季可非, 等. 曲安奈德局部给药制剂的研究进展 [J]. 中国药师, 2016, 19(03): 559-562.
- [4] 郑利光, 华 红. 曲安奈德外用治疗口腔黏膜病的研究进展 [J]. 实用口腔医学杂志, 2015, 31(2): 278-281.
- [5] 中国药典 [S]. 2015.