

3 种药品不同加菌时机对菌回收率的影响

李珏, 王知坚, 赵嘉

(浙江省食品药品检验所 杭州 310004)

摘要 目的: 对 2005 年版中国药典微生物限度检查法中细菌、霉菌及酵母菌计数方法验证试验中不同加菌时机对菌回收率的影响进行考察, 使得验证结果更加准确、可靠。方法: 收集了不同剂型、不同抑菌性的样品共 3 个, 比较了不同加菌时机与菌回收率的关系。结果: 这 3 种药品不同加菌时机的菌回收率结果存在显著性差异, 将现行标准中的加菌时机提前, 可能存在回收率偏低的情况。结论: 这 3 种药品不同加菌时机对菌回收率存在显著影响。

关键词: 药品; 剂型; 微生物限度; 细菌; 霉菌; 酵母菌; 计数; 方法验证; 加菌时机; 回收率

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)06-1116-03

Influence of the different time points to add bacteria for 3 drugs

LI Jue, WANG Zhi-jian, ZHAO Jia

(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

Abstract Objectives: To examine the effects of the different time points to add bacteria on the bacteria recovery in the bacteria, mold and yeast count method validation testing, which is recorded in the Microbial Limit Tests on ChP (2005). **Methods:** Collected six samples which have different formulations and different antimicrobial activities, and compared the relationship between the different time points to add bacteria and the bacteria recovery. **Results:** The bacteria recovery was significantly different due to the different time points to add bacteria. The recovery may reduce if to add bacteria ahead of the current standard time. **Conclusions:** The different time points to add bacteria have significantly influence on the bacteria recovery in the study.

Key words: drugs; microbe; limitation; bacterium; mycete; saccharomycetes; count; method validation; recovery

方法验证试验是 2005 年版中国药典新增内容, 实施已有 5 年时间, 它在保证检验方法的科学性和检验结果的准确性方面, 大大缩小了中国药典与国外药典的差距, 也使得我国药品微生物检查方法更加合理、科学和严谨^[1~3]。为使验证试验更加准确、可靠, 故对试验中的关键环节“加菌时机”进行研究, 分别考察了 3 种药品不同加菌时机对菌回收率的影响, 结果供药品质量标准制订者和质量控制人员参考。

1 实验方法

1.1 实验样品的选择 考虑到实验样品的剂型、供试品溶液制备方法以及计数方法对实验结果的影响, 在 3 个品种中, 剂型上覆盖了液体制剂、片剂、颗粒剂共 3 种剂型; 供试品溶液制备方法包括振摇法、保温振摇法、匀浆法共 3 种方法; 计数方法有平皿法和薄膜过滤法 2 种方法。实验样品均按 2005 年版

中国药典细菌、霉菌及酵母菌计数方法验证试验的规定, 确定了各自的计数方法^[4]。

1.2 实验设计 每一种样品按已验证的细菌、霉菌及酵母菌计数方法, 在方法测定的不同环节(按如下 A、B、C), 分别加入金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉 5 株试验菌株, 然后进行回收率的测定, 每一菌株平行试验 2 次。

A、取样后加菌: 称量或者量取供试品后, 加入试验菌悬液, 使最终供试液浓度为 $50 \sim 100 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 然后按经验证的计数方法进行供试液的制备及菌数测定。

B、供试液制备后加菌: 在制备好的供试液中加入试验菌悬液, 使最终供试液浓度为 $50 \sim 100 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 然后按经验证的计数方法进行菌数测定。

C、最后环节加菌: 即 2005 年版中国药典细菌、

霉菌及酵母菌计数方法验证试验中的加菌时机,为注皿后或者是在最后一次的冲洗液中,加入浓度为 $50 \sim 100 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的试验菌悬液,然后进行倾注琼脂培养基或者贴膜培养^[5 6]。

D、菌液组: 试验所用的菌悬液分别进行菌数测定。

1.3 回收率的计算 按照2005年版中国药典微生物限度检查法规定的培养条件培养之后,进行计数,并分别以菌液组为分母计算每一加菌实验环节的回收率。

1.4 统计分析 实验均采用单盲法原则。实验结果以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。组间比较采用双样本等方差 T 检验。 $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 实验结果

对3种药品A、B、C3组回收率汇总结果见表1。对A、B、C3组回收率数据进行统计学分析,结果提示,各组数据均有显著性差异($P < 0.05$),具有统计学意义。

表1 不同加菌时机回收率实验结果(%)
Tab 1 Result of recovery of the different time points to add bacteria

药品名称 (drug name)	供试液制备法 (preparation method)	计数方法 (count method)	加药时机 (time point to add bacteria)	菌株(strains)				
				金葡 (<i>S. aureus</i>)	大肠 (<i>E. coli</i>)	枯草 (<i>B. subtilis</i>)	白念 (<i>C. albicans</i>)	黑曲 (<i>A. niger</i>)
非索伪麻缓释片(Fexofenadine/pseudoephedrine sustained release tablets)	匀浆(homogenate method)	平皿法(plate count method)	A(X)	6	74	66	77	88
			B(X)	47	93	97	72	86
			C(X)	101	104	98	89	102
养正颗粒(Yangzheng granules)	保温振荡法(heat preservation and oscillation method)	平皿法(plate count method)	A(X)	8	84	43	52	79
			B(X)	28	108	97	79	90
			C(X)	72	97	100	98	82
藿香正气水(Huoxiang Zhengqi solution)	振荡法(oscillation method)	薄膜过滤(membrane filtration method)	A(X)	0	113	0	0	51
			B(X)	5	95	86	85	58
			C(X)	110	108	97	98	109

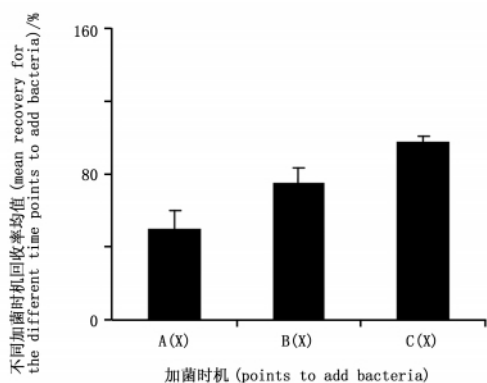


图1 不同加菌时机对菌回收率的影响

Fig 1 Influence of the different time points to add bacteria on the bacteria recovery

3 讨论

3.1 从总体的组间统计结果可见,A-C、B-C和A-B之间的回收率结果都存在显著差异。从图1可见,A-C和B-C之间的回收率均表现为A、B两组回收率低于C组的回收率。结果表明,如果在方法验证中,将试验组的加菌时机提前,可能存在回收率偏低的情况,对正确判断供试品是否存在抑菌作用,以及是否需要调整实验方法都存在一定的风

险。

3.2 造成A-C之间回收率存在显著差异的原因在于:(1)试验菌与样品接触的时间;(2)A组在进行供试液制备时对试验菌可能造成的损失;(3)A组需要对含菌供试液进行取样操作。例如:藿香正气水,在样品原液中即A组中加入菌悬液,对菌有直接的抑制和杀灭作用,从而导致A组的回收率显著低于C组。

3.3 造成B-C之间回收率存在显著差异的原因在于:(1)试验菌与样品的接触时间;(2)B组试验菌稀释菌液需要在供试液中进行分散;(3)B组需要对含菌供试液进行取样操作。例如:藿香正气水,在供试液制备后加入试验菌,对菌有直接的抑制和杀灭作用,导致B组的回收率显著低于C组。又如非索伪麻缓释片经匀浆制备成供试液后,性状较为粘稠,菌悬液加入后难混匀,取样误差大,造成B组和C组回收率结果有较大差异。

3.4 造成A-B之间回收率存在显著差异的原因在于:(1)试验菌接触样品的浓度和接触时间;(2)供试品的分散方式。仍然以藿香正气水为例,该产品供试液制备较为简单,不存在制备过程中试验菌

损失的问题,同时该产品流动性好,加入菌液后也容易分散,不存在取样误差的影响。导致 A-B 之间回收率有显著差异的原因就在于该产品有抑菌性,A 组和 B 组试验菌接触供试品的浓度和时间都是不相同的。

3.5 为了保证实验数据尽可能地反映不同加菌时机对加菌回收率的影响,排除其他因素的影响,实验方法设计中严格控制了 A、B、C 3 组样品与菌悬液作用时间的一致性,这样可以尽量避免由于作用时间长短不一造成加菌回收率的不同。需要说明的是,即便按照拟订的实验方案,尽可能减小不同组间因试验菌接触样品的时间不同而造成的影响,但是,实验方法决定了这种影响仍是无法完全避免的,对于有抑菌作用的样品而言,这种影响就显得比较明显。

3.6 按照 A 组的实验设计可以考察包括供试品的抑菌作用、供试液的制备过程、含菌样品的取样误差等诸多因素对最终回收率的影响。因此,可以考虑在验证时按 A 组的方法完成实验。需要说明的是,如果采用 A 加菌时机进行方法验证,需重新修订后续的实验步骤。

参考文献

- 1 GUO Ming(国明),ZHU Qing-fen(祝清芬),ZHENG Li-zhen(郑力真). Analysis on problems of validation test for sterility test, microbial limit determination and bacterial endotoxins test(无菌、微生物限度及细菌内毒素检查方法学验证中常见问题及分析). *Drug Stand China*(中国药品标准) 2008 9(1):46
 - 2 SU De-mo(苏德模),HU Chang-qin(胡昌勤),TE Yu-xiang(特玉香) *et al.* Studies on A medium for detection of total viable aerobic count(一种细菌计数培养基的试验研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2005 25(6):692
 - 3 YUAN Lin-na(袁林娜),SONG Qin(宋勤). Experiments on the recovery of bacteria and fungi by the method of low speed centrifuge in microbial limit tests(微生物限度检查法中低速离心法回收细菌、真菌试验方法的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007 27(10):1620
 - 4 MA Yue(马越),TE Yu-xiang(特玉香),DU Ping-hua(杜平华) *et al.* Validation method used for microbial limits of 16 kinds of traditional Chinese medicine(16 种中成药微生物限度检查法方法验证). *Drug Stand China*(中国药品标准) 2005 5(6):12
 - 5 ChP(中国药典). 2005. Vol I(一部):Appendix(附录) X III
 - 6 ChP(中国药典). 2005. Vol II(二部):Appendix(附录) XI
- (本文于 2010 年 7 月 13 日收到)

《药物分析杂志》稿件在线管理系统已开通

本刊于 2008 年 10 月 23 日开通稿件在线管理系统。从即日起,凡投稿本刊,请登录 <http://www.ywfxzz.cn> 进行网上投稿。

该系统采用 E-mail 作为用户名进行注册。

网上投稿的同时需寄单位介绍信及稿件处理费 50 元。

作者在线投稿后,可在线了解稿件情况:编辑-送审-专家已审-待编辑处理稿件-退修-编辑加工完成-已刊出等。

读者可在线查看本刊目录,了解本刊编委及其他信息,并可在线订阅本刊。

投稿过程中如遇技术问题,请与技术支持联系:010-69296712。

谢谢合作!

《药物分析杂志》编辑部