

妥布霉素原料药微生物限度检查方法适用性试验

1、概述

妥布霉素的抗菌谱及抗菌作用与庆大霉素近似，对绝大多数肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌及葡萄球菌具有良好抗菌作用。

妥布霉素原料药的微生物限度检查的方法适用性试验，应采用薄膜过滤法。滤器可使用我公司生产的反复使用过滤器及滤膜（直径 50mm）。我公司实验室按照《中国药典》2015 版微生物限度检查法中“计数方法适用性试验”程序，以金黄色葡萄球菌作为代表菌种对该药品进行了方法适用性试验。现将实验过程及结果介绍如下，供同行参考。

2、实验用器材等

- 1) 样品：妥布霉素（批号：110901），由制药企业提供。
- 2) HTY-601 集菌仪（编号为JS-02-054）
- 3) 反复使用过滤器（FC50B）
- 4) 微孔滤膜（货号为：2004）
- 5) 金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003 第 5 代

3、实验步骤及结果

3.1 常规法

3.1.1 金黄色葡萄球菌菌液的制备：接种金黄色葡萄球菌的新鲜培养物至胰酪大豆胨液体培养基中，培养 18-24h，上述培养物用 0.9%的无菌氯化钠溶液稀释制成含菌量在 30-100cfu/ml 的菌悬液。

3.1.2 实验操作：取样品 10g，加 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100ml，摇匀，制成 1：10 的供试液。分别取该供试液 10ml，加至 90ml pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中，摇匀，制备 6 份。取备妥的过滤器，分别滤过供试液，取 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液，各份按 500ml、700ml、900ml 的梯度，分别对 6 份供试液进行冲洗，各个梯度制备 2 份。并分别取每个冲洗梯度的 1 个杯体，在最后 100ml 冲洗液中加入 30-100 cfu 金黄色葡萄球菌，另 1 杯体不加菌，作为供试品对照组（测定本底菌数）；另取一个过滤器过滤 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100ml，在最后 100ml 冲洗液中加入 30-100 cfu 金黄色葡萄球菌，作为稀释剂对照组。所有滤器滤干后取膜，菌面朝上贴于营养琼脂平板。置 30-35 度培养 48 小时，计数。

3.1.3 结果：稀释剂回收率达到 98%；试验组 3 个冲洗梯度的回收率测试结果，金黄色葡萄球菌均未生长，故采用减少供试品接种量的方法继续进行验证。

3.2 减少供试品接种量试验法

3.2.1 实验操作：取 1：10 供试液 1ml，加至 99ml pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液中，摇匀，制备 6 份，



浙江泰林生命科学有限公司
ZHEJIANG TAILIN LIFE SCIENCE CO.,LTD

各份按 300ml、500ml、700ml 的梯度冲洗，以下操作同常规法。

公司地址：浙江省杭州市富阳区东洲街道东洲工业功能区七号路33号等

邮编：311401 电话：0571-86589008 网址：www.tailingood.com

3.2.2 结果：稀释剂回收率达到 93%；试验组 3 个冲洗梯度的回收率测试结果仍未达到 70%。

3.3 薄膜过滤法

按照《中国药典》2015 版微生物限度检查法“计数方法适用性试验”中“若因供试品抗菌活性或溶解性较差的原因导致无法选择最低稀释级的供试液进行方法适用性试验时，应采用适宜的方法对供试液进行进一步的处理”的相关规定，继续采用薄膜过滤法进行验证。

3.3.1 实验操作：取该品的 1：100 的稀释液 1ml，稀释到 99mlpH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液中，摇匀，制备 4 份，各取 1 份按 300ml、500ml、700ml 的梯度冲洗，取 1 份经 700ml 冲洗作本底计数。以下操作同 3.1。

3.3.2 结果：稀释剂回收率达到 91%；3 个冲洗梯度的回收率均达到 70%。

3.3.3 重复试验：取 1：100 的稀释液，按 300ml、500ml、700ml 冲洗梯度重复试验 2 次。

3.3.4 结果：500ml 及 700ml 冲洗梯度的各 2 个杯体回收率均达到 70%；300ml 冲洗梯度未达到。3 个冲洗梯度 3 次试验的回收率及平均回收率均达到 70%的为 500ml 及 700ml 梯度。3 次试验的回收率具体情况见下表：

3 次试验的回收率及平均回收率

冲洗量 (ml)	每次试验组回收率 (%)	3 次试验平均回收率 (%)
300	97	/
	52	
	/	
500	94	81
	79	
	70	
700	96	81
	70	
	78	

注：各批稀释剂的回收率均达到 90%；稀释法 700ml 冲洗量测定的供试品本底数均为 0。

4、结论

妥布霉素原料药的微生物限度检查可按薄膜过滤法进行。具体操作为：取该品的 1：100 的稀释液 1ml，稀释至 99mlpH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中，全量过滤，按每膜 500ml 的冲洗量冲洗、贴膜、培养即可。

浙江泰林生物技术股份有限公司

浙江泰林生命科学有限公司

公司地址：浙江省杭州市富阳区东洲街道东洲工业功能区七号路33号等

邮编：311401 电话：0571-86589008 网址：www.tailinood.com



浙江泰林生命科学有限公司
ZHEJIANG TAILIN LIFE SCIENCE CO.,LTD

公司地址：浙江省杭州市富阳区东洲街道东洲工业功能区七号路33号等

邮编：311401 电话：0571-86589008 网址：www.tailinood.com