

清热泻火胶囊微生物限度检查的方法学验证

孟庆龙^{1,2*}, 潘景芝³(1.长春市南关区中医院, 长春 130041; 2.吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 3.长春市传染病医院, 长春 130123)

中图分类号 R283.65; R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)35-3330-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.35.22

摘要 目的 建立清热泻火胶囊的微生物限度检查方法并进行验证。方法 按照2010年版《中国药典》规定,分别采用常规法、培养基稀释法、薄膜过滤法对清热泻火胶囊进行微生物限度检查,并根据对5种供试菌株的回收率结果进行方法学验证试验。结果:常规法试验对大肠埃希菌和黑曲霉的回收率均高于70%,白色念珠菌需通过培养基稀释法去除抑菌作用,而金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌则需通过薄膜过滤法试验进一步去除抑菌作用,从而使其回收率均达到70%以上。控制菌可按常规法进行检查。结论:清热泻火胶囊微生物限度检查时采用常规法进行霉菌和控制菌计数,采用培养基稀释法进行酵母菌计数,采用薄膜过滤法进行细菌计数,方法准确可靠,重复性好。

关键词 清热泻火胶囊;微生物限度检查;验证

Study on Method Validation of Microbial Limit Test for Qingre Xiehuo Capsules

MENG Qing-long^{1,2}, PAN Jing-zhi³(1.Changchun Nanguan District Hospital of TCM in Jilin Province, Changchun 130041, China; 2.College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 3.Changchun Hospital for Infectious Disease in Jilin Province, Changchun 130123, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method of microbial limit test for Qingre xiehuo capsules and validate the method. METHODS: According to Chinese Pharmacopoeia (2010 edition), conventional method, medium dilution method and membrane filtration method were used for microbial limit test of Qingre xiehuo capsules; methodology validation was conducted according to the results of recovery test for 5 kinds of strains. RESULTS: Recoveries of *Escherichia coli* and *Aspergillus niger* were higher than 70% by conventional method, and antimicrobial effect of *Candida albicans* had been removed by medium dilution method. *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* were required by the membrane filtration method for further removal of antimicrobial effect, and the recovery rate reached 70% above. The test bacteria had been detected by conventional method of control bacteria. CONCLUSIONS: In microbial limit test of Qingre xiehuo capsules, conventional method is usually used for mold and control bacteria count, medium dilution method for yeast counts and membrane filtration method for bacteria counts. The method is accurate, reliable and reproducible.

KEYWORDS Qingre xiehuo capsules; Microbial limit test; Validation

清热泻火胶囊具有清热燥湿、泻火解毒等功效,主要用于治疗带状疱疹、湿疹、肛周脓肿等临床常见病症^[1]。微生物限度检查用于判断非规定灭菌剂及原料、辅料是否符合药典的规定,也可用于指导制剂、原料、辅料的微生物质量标准制定,及指导生产过程中间产品微生物质量的监控。微生物限度检查结果容易受到试验条件等多种因素的影响,尤其是药品中含有对微生物生长有抑制作用的组分时,表现更为突出^[2]。2010年版《中国药典》作出了相关规定,即在进行药品微生物限度检查时,应对所检品种进行微生物限度方法验证,以确保检查方法的科学性和有效性^[3]。因此,本试验通过参考2010年版《中国药典》等相关文献资料,对长春市南关区中医院生产的清热泻火胶囊进行微生物限度检查及控制菌检查,并进行了方法学验证,以期对清热泻火胶囊临床使用的安全性和有效性提供可靠的实验依据。

1 材料

1.1 仪器

* 工程师, 硕士。研究方向: 制剂开发和质量标准。E-mail: mengqinglong1985@sina.com

医用净化工作台(吴江市金家坝医药净化设备厂);电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械一厂);生化培养箱(广东省医疗器械厂);电热恒温鼓风干燥箱(天津实验仪器厂);立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 药品

清热泻火胶囊(长春市南关区中医院自制,规格:0.5 g/粒,批号:20100716、20100717、20100718)。

1.3 试验菌株

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC (B) 26003]、大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC (B) 44102]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC (B) 63501]、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC (F) 98001]、黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC (F) 98003],均由中国食品药品检定研究院提供。

1.4 稀释液及培养基

0.9%无菌氯化钠溶液、pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲溶液、营养琼脂培养基、营养肉汤培养基、胆盐乳糖培养基、改良的马丁琼脂培养基、玫瑰红钠琼脂培养基均由青岛海博生物技术有限公司提供。

2 方法

2.1 菌液的制备

将金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物接种至营养肉汤培养基中,于30~35℃培养18~24 h,然后分别取各菌种培养物1 ml,并用0.9%的无菌氯化钠溶液稀释10倍,制成50~100 CFU/ml的菌悬液,做活菌计数后备用^[4]。将白色念珠菌的新鲜培养物接种至改良的马丁琼脂培养基中,于23~28℃培养24~48 h,然后取菌种培养物1 ml,并用0.9%的无菌氯化钠溶液稀释10倍,制成50~100 CFU/ml的菌悬液,做活菌计数后备用^[5]。将黑曲霉的新鲜培养物接种至改良的马丁琼脂斜面培养基中,于23~28℃培养5~7 d,加入3~5 ml含0.05% (ml/ml)聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱,然后吸出孢子悬液至无菌试管内,用0.9%的无菌氯化钠溶液稀释10倍,制成50~100 CFU/ml的孢子悬液,做活菌计数后备用^[6]。

2.2 供试液的制备

取供试品10 g,加pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至100 ml,溶解混匀,作为1:10的供试液。

2.3 常规法测定菌回收率^[7]

(1)试验组:取1:10供试液1 ml加入平皿中,再分别加入上述5种代表性试验菌株50~100 CFU,以及15~20 ml营养琼脂培养基,培养,待凝固后置规定温度培养24~72 h,观察结果,平行制备3个平皿,做菌落数计数。(2)菌液组:除不加入供试液外,与试验组同法操作,测定相应加入的试验菌菌落数。(3)供试液组:除不加入试验菌外,与试验组同法操作,测定1:10供试液的平均菌落数,计算回收率。(4)回收率计算方法:菌回收率(%)=(试验组平均菌落数-供试液组平均菌落数)/菌液组平均菌落数×100%。

2.4 培养基稀释法测定菌回收率^[8]

(1)2倍稀释:取1:10供试液1 ml,平均加到2个平皿中,即为0.5 ml/皿,各倾注营养琼脂培养基及玫瑰红钠琼脂培养基20 ml,培养,观察结果。(2)5倍稀释:取1:10供试液1 ml,平均加到5个平皿中,即为0.2 ml/皿,各倾注营养琼脂培养基及玫瑰红钠琼脂培养基20 ml,培养,观察结果。试验分组与回收率计算方法同“2.3”项。

2.5 薄膜过滤法测定菌回收率^[9]

(1)试验组:取1:10供试液10 ml,以500 r/min离心5 min(离心半径13.5 cm)后,取上清液1 ml加入开放式滤器(滤膜先用冲洗液润湿)中,用pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗3次,每次100 ml,在最后一次冲洗液中分别加入已制备好的金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌各1 ml,冲洗完毕后取出滤膜贴于规定的琼脂培养基上,置规定温度下培养,并记录菌落数。(2)菌液组:不加供试液,在冲洗液中加入等量试验菌液后,其余操作同试验组。(3)供试液组:不加试验菌,与试验组同法测定供试液菌落数。回收率计算方法同“2.3”项。

2.6 控制菌(大肠埃希菌)检查法的验证^[10]

验证大肠埃希菌用金黄色葡萄球菌作为阴性对照菌。(1)阳性组:取1 ml含菌量为10~100 CFU/ml的大肠埃希菌对照菌液加入到100 ml胆盐乳糖增菌液中;(2)供试液组:取10 ml 1:10的供试液加入到100 ml胆盐乳糖增菌液中;(3)供试液+阳性菌:取含菌量为10~100 CFU/ml的大肠埃希菌对照菌液

1 ml和供试液10 ml,加入到100 ml胆盐乳糖增菌液中;(4)供试液+阴性菌:取含菌量为10~100 CFU/ml的金黄色葡萄球菌对照菌液1 ml和供试液10 ml,加入到100 ml胆盐乳糖增菌液中。依大肠埃希菌检查法进行检查。

3 结果

3.1 病原菌回收率的常规法测定结果

其金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌3个批次试验的回收率均<70%,可见常规法不能用于以上3种菌株的检查。而在3个批次的试验中,大肠埃希菌和黑曲霉的回收率均>70%,可见可以采用常规法对该药品的大肠埃希菌和黑曲霉进行计数检查,详见表1。

表1 病原菌的回收率测定结果(常规法)

Tab 1 Recovery rate of pathogens with general method

菌种	批号	平均菌落数,CFU/ml			回收率,%	\bar{x} ,%
		菌液组	试验组	供试品组		
金黄色葡萄球菌	20100716	97	49	0	50.52	42.88
	20100717	102	37	0	36.27	
	20100718	86	36	0	41.86	
大肠埃希菌	20100716	69	67	0	97.10	94.97
	20100717	75	71	0	94.67	
	20100718	73	68	0	93.15	
枯草芽孢杆菌	20100716	99	35	0	35.35	44.71
	20100717	104	53	0	50.96	
	20100718	92	44	0	47.83	
白色念珠菌	20100716	95	61	0	64.21	60.58
	20100717	100	58	0	58.00	
	20100718	84	50	0	59.52	
黑曲霉	20100716	93	80	0	86.02	91.43
	20100717	81	76	0	93.83	
	20100718	72	68	0	94.44	

3.2 病原菌回收率的稀释法测定结果

稀释法通过培养基将供试品吸收后,可消除本品对白色念珠菌的抑制作用,3个批次试验的回收率均>70%;但金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的回收率还是未能满足试验要求。因此,可以采用稀释法对该药品的白色念珠菌进行计数检查,详见表2。

3.3 病原菌回收率的薄膜过滤法测定

采用薄膜过滤法(冲洗量为200 ml)对供试品进行检查,金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌3个批次试验的回收率均>70%,可见可以采用薄膜过滤法(冲洗量为200 ml)对该药品的金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌进行计数检查,详见表3。

3.4 控制菌(大肠埃希菌)检查方法的验证

阳性组和供试液加阳性菌组3个批次试验的靛基质和MUG均呈阳性,表明均检出大肠埃希菌;而供试液组和供试液加阴性菌组3个批次试验的靛基质和MUG均呈阴性,表明均未检出大肠埃希菌,详见表4。由表4可见,该药品的控制菌(大肠埃希菌)可按常规法进行检查。

4 讨论

微生物限度检查方法学验证的目的是确认供试品在所采用的检查方法和检验条件下是否存在抑菌作用,从而确保供试品所污染的微生物能够被充分检出^[11]。在对可能存在抑菌成分的药品进行微生物限度检查时,首先要求供试品本身在

表2 金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌的回收率测定结果(稀释法)

Tab 2 Recovery rate of *S. aureus*, *B. subtilis* and *C. albicans* with dilution method

菌种	稀释倍数	药品批号	平均菌落数,CFU/ml			回收率,%	\bar{x} ,%
			菌液组	试验组	供试品组		
金黄色葡萄球菌	2	20100716	97	51	0	52.58	48.51
		20100717	102	45	0	44.12	
		20100718	86	42	0	48.84	
	5	20100716	97	53	0	54.64	
		20100717	102	62	0	60.78	
		20100718	86	48	0	55.81	
枯草芽孢杆菌	2	20100716	99	47	0	47.47	51.08
		20100717	104	58	0	55.77	
		20100718	92	46	0	50.00	
	5	20100716	99	62	0	62.63	
		20100717	104	59	0	56.73	
		20100718	92	62	0	67.39	
白色念珠菌	2	20100716	95	77	0	81.05	77.95
		20100717	100	79	0	79.00	
		20100718	84	62	0	73.81	
	5	20100716	95	78	0	82.11	
		20100717	100	90	0	90.00	
		20100718	84	70	0	83.33	

表3 金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的回收率测定结果(薄膜过滤法)

Tab 3 Recovery rate of *S. aureus* and *B. subtilis* with membrane filtration method

菌种	冲洗量,ml	药品批号	平均菌落数,CFU/ml			回收率,%	\bar{x} ,%
			菌液组	试验组	供试品组		
金黄色葡萄球菌	100	20100716	97	71	0	73.20	73.84
		20100717	102	73	0	71.57	
		20100718	86	66	0	76.74	
	200	20100716	97	79	0	81.44	
		20100717	102	86	0	84.31	
		20100718	86	66	0	76.74	
枯草芽孢杆菌	100	20100716	99	90	0	90.91	91.51
		20100717	104	96	0	92.31	
		20100718	92	84	0	91.30	
	200	20100716	99	89	0	89.90	
		20100717	104	98	0	94.23	
		20100718	92	87	0	94.57	

表4 大肠埃希菌控制菌验证试验结果

Tab 4 Validate tests of control bacteria of *E. coli*

批号	阳性组		供试液组		供试液+阳性菌		供试液+阴性菌	
	靛基质	MUG	靛基质	MUG	靛基质	MUG	靛基质	MUG
20100716	阳性	阳性	阴性	阴性	阳性	阳性	阴性	阴性
20100717	阳性	阳性	阴性	阴性	阳性	阳性	阴性	阴性
20100718	阳性	阳性	阴性	阴性	阳性	阳性	阴性	阴性

试验条件下有效排除其抑菌作用的干扰,从而保证限度检验的正常进行,使被检微生物能够正常生长和繁殖^[12]。根据2010年版《中国药典》规定,细菌和霉菌以及酵母菌计数方法验证的回收率均应 $\geq 70\%$ ^[3]。中药制剂的微生物限度检查通常与常规药品卫生检验方法相同,但由于中药制剂往往含有多种复杂的活性成分,其中任何一种成分具有抑菌作用均可

影响微生物限度检查的准确性^[13]。因此,与其他分析方法一样,中药制剂的微生物限度检查也应通过方法学验证,证明所采用的方法是适宜的,以确保检查方法的完整性和准确性。

本研究分别采用常规法、培养基稀释法、薄膜过滤法对清热泻火胶囊进行了微生物限度检查方法的验证试验。其中采用常规法对大肠埃希菌和黑曲霉无影响,其试验组的回收率均达70%以上,故控制菌和霉菌可采用常规法进行微生物限度检查。但是,由于本供试品对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌具有明显的抑制作用,采用常规法不能消除其抑菌性,故采用稀释法进行微生物限度检查方法验证。结果显示,只有白色念珠菌的回收率 $> 70\%$,故酵母菌可采用培养基稀释法进行微生物限度检查。对于常规法和培养基稀释法均未达到要求的金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌采用薄膜过滤法进行微生物限度检查方法验证,其结果表明试验组的回收率均大于70%,故细菌可采用薄膜过滤法进行微生物限度检查。由此可见,通过以上3种方法能够有效解决清热泻火胶囊中抑菌成分的干扰问题,并能真实、准确地反映药物中污染存活的菌落数,检出率较高。

参考文献

- [1] 长春市南关区中医院.清热泻火胶囊:中国,2010101990 83.3[P].2010-10-13.
- [2] 苏德模,马绪荣.药品微生物学检验技术[M].北京:华龄出版社,2007,1:209.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录70.
- [4] 熊青,李香斌,谭小辉.仙阳壮肾胶囊微生物限度检查的方法学验证[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(22):86.
- [5] 莫小林,伍小燕,韦振源,等.10种中药制剂微生物限度检查方法学的验证[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(13):56.
- [6] 孙蕾,杨竞,张克勤.脑立清胶囊微生物限度检查法的建立及方法学验证[J].中国药房,2009,20(18):1 418.
- [7] 张明生,高家荣,孟楣.黄枳胶囊微生物限度检查方法的建立[J].中国医院药学杂志,2009,29(13):1 145.
- [8] 彭洁,陈浩桢,林丽英.喉疾灵胶囊微生物限度检查方法的研究[J].中药材,2009,32(11):1 776.
- [9] 白林,陈利平,高翠萍,等.舒郁胶囊微生物限度检查的方法学验证研究[J].中华医院感染学杂志,2009,19(21):2 835.
- [10] 梁摇净,肖摇华.丹参舒心胶囊微生物限度检查方法验证试验研究[J].安徽医药,2011,15(5):575.
- [11] 王翠蓉,丁艳霞.对速效止泻胶囊微生物限度检查方法的探讨[J].时珍国医国药,2010,21(6):1 533.
- [12] 张光华,代红,余立.中药含原粉制剂微生物限度检查方法的研究[J].中国中药杂志,2007,32(18):1 932.
- [13] 陶红.中药制剂微生物限度检查方法研究进展[J].中国药房,2010,21(19):1 813.

(收稿日期:2013-09-16 修回日期:2013-11-17)