

· 药剂学 ·

复方参芪五味咀嚼片微生物限度检查的方法验证

何进¹, 史国兵¹, 高军¹, 杨晓东² (1. 沈阳军区总医院药剂科, 辽宁 沈阳 110840; 2. 大连医科大学临床药学, 辽宁 大连 116027)

[摘要] 目的 对复方参芪五味咀嚼片微生物限度检查方法进行验证。方法 采用平皿计数法, 通过5种阳性对照菌回收率试验进行细菌、霉菌及酵母菌计数方法的验证; 采用相同的实验条件, 观察大肠埃希菌在试验组、阳性对照组和阴性对照组中的检出情况验证控制菌检查方法。结果 细菌、霉菌及酵母菌计数用常规法时, 各试验菌回收率在70%以上; 控制菌检查中, 试验组和阳性对照组检出大肠埃希菌, 阴性对照组未检出菌。结论 本方法简便可行, 结果准确, 适合于微生物限度检查。

[关键词] 复方参芪五味咀嚼片; 微生物限度检查; 方法验证

[中图分类号] R94 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2011)05-0369-03

Validation for determination method of microbacteria limit of compound Shenqi Wuwei chewable tablets

HE Jin¹, SHI Guo-bing¹, GAO Jun¹, YANG Xiao-dong² (1. Department of Pharmacy, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110840, China; 2. Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

[Abstract] **Objective** To validate the determination method of microbacteria limit of compound shenqi wuwei chewable tablets. **Methods** Plate counting method was used. The method of counting bacteria and mould was validated by the recovery rates with 5 control strains. The method of checking control bacteria was validated by observing cultivation of *Escherichia coli* coliform in the test group, positive control group and negative control group under the same environment. **Results** The recovery rate of every trail bacteria was higher than 70% when common methods were used in the counting bacteria and mould; To the examination of control bacteria, *Escherichia coli* coliform was detected in the test group and positive control group, and hadn't been detected in the negative control group. **Conclusion** The method was simple, feasible, reliable and could be used for the examination of microbacteria limit.

[Key words] compound shenqi wuwei chewable tablets; microbacteria limit determination; validation

复方参芪五味咀嚼片是在原生脉饮的基础上, 增加黄芪制成的新型中药复方口服制剂, 由黄芪、人参、五味子、麦冬等中药材组成, 具有提高机体免疫力, 抗疲劳等功效。按照中国药典(2010年版)一部附录相关要求, 要进行微生物限度检查。笔者主要对复方参芪五味咀嚼片的细菌、霉菌及酵母菌计数方法, 及控制菌大肠埃希菌的检查方法进行验证, 以建立适合于该制剂的微生物限度检查方法, 为制剂进一步开发提供依据。

1 实验材料

1.1 药品和培养基 复方参芪五味咀嚼片(沈阳军区总医院, 批号 090925, 091029, 091030); 0.9% 氯化钠注射液(沈阳军区总医院, 2008022207)。营养琼脂培养基(批号 070104); 营养肉汤培养基(批号 071008); 玫瑰红钠琼脂培

培养基(批号 080216); 改良马丁琼脂培养基(批号 070426); 胆盐乳糖(BL)培养基(批号 070517); 4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸蛋白胨培养基(批号 070604); 蛋白胨(批号 070712); 均购自北京三药科技开发公司。

1.2 菌株 大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC (B) 44102]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC (B) 26003]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC (B) 63501]、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC (B) 98001] 和 黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC (B) 98003], 均为第3代菌株, 购自辽宁省药检所。

1.3 仪器 ZF-I型三用紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂); NC303-4A 电热恒温培养箱和 NC303-4 电热恒温培养箱(南京长江仪器厂); YX280B 手提式不锈钢消毒器(上海三申医疗器械有限公司)。

2 方法和结果

2.1 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液的制备 取磷酸二氢钾 3.56 g、磷酸氢二钠 7.23 g、氯化钠 4.30 g、蛋白胨 1.0 g,加水 1 000 ml,微温溶解,滤清,分装,灭菌。

2.2 供试液的制备 取复方参芪五味咀嚼片 10 g,置灭菌钵钵研成粉末,加适量 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液研匀并转移到灭菌烧瓶中,加 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 ml,在 45 °C 恒温水浴中保温震荡混匀,制成 1:10 倍的供试液。

2.3 菌液制备 分别取经 35 °C 培养 24 h 的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的新鲜培养物,以及经 25 °C 培养 48 h 的白色念珠菌新鲜培养物,用 0.9% 无菌氯化钠溶液 10 倍递增稀释成每 1 ml 含菌数 50~100 cfu 的菌悬液;取经 25 °C 培养 5 d 的黑曲霉新鲜培养物,用 5 ml 0.9% 无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱,吸出孢子悬液,用 0.9% 无菌氯化钠溶液 10 倍递增稀释成每 1 ml 含孢子数 50~100 cfu 的孢子悬液。以上各菌悬液或孢子悬液同时各取 2 份注入琼脂培养基培养,采用平皿计数法计数,结果见表 1。

表 1 微生物限度检查活菌计数

菌株	稀释级数	活菌计数(cfu/ml)	
		1号平皿	2号平皿
大肠埃希菌	1×10^{-5}	57	59
金黄色葡萄球菌	1×10^{-5}	85	93
枯草芽孢杆菌	1×10^{-5}	96	100
白色念珠菌	1×10^{-5}	80	70
黑曲霉	1×10^{-5}	69	59

2.4 细菌、霉菌及酵母菌计数方法的验证

2.4.1 验证方法与结果 ①试验组:采用平皿法,取 1:10 供试液及 50~100 cfu/ml/试验菌各 1 ml,依次加入平皿中,立即倾注相应琼脂培养基 20 ml,每株试验菌平行制备 2 个平皿,待凝固后,按规定温度培养 48~72 h,按菌落计数方法测定其菌数,进行 3 次的独立平行试验,并分别计算试验组和稀释剂对照组的菌回收率。依据《中华人民共和国药典》2010 年版一部附录微生物限度检查方法进行判定。结果见表 2。②菌液组:测定所加的试验菌数。③供试品对照组:取规定量 1:10 供试液,按菌落计数方法测定样品本底菌数。结果均未见菌生长。④稀释剂对照组:取稀释液 10 ml,同试验组方法测定菌数。结果 5 种试验菌回收率均大于 70%。

表 2 细菌、霉菌和酵母菌计数方法回收率结果(%,n=3)

组别	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
试验组	93.6 ± 3.5	75.8 ± 6.3	58.7 ± 6.5	74.2 ± 7.5	82.5 ± 5.9
菌液组	-	-	-	-	-
供试品对照组	-	-	-	-	-
稀释剂对照组	94.1 ± 7.3	94.5 ± 1.2	90.9 ± 7.6	86.1 ± 6.6	87.2 ± 4.0

2.4.2 样品细菌、霉菌或酵母菌计数检查 取 3 批样品各 10 g,分别用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 ml 制成 1:10 的供试液。取 1:10 供试液 10 ml,加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 ml,制成 1:100 的供试液。再取 1:100 供试液 10 ml,加 pH 7.0 无菌氯化钠(蛋白胨缓冲液至 100 ml,制成 1:1 000 的供试液。取 3 批样品各稀释级供试液各 1 ml 分别注入无菌平皿中,然后倾入 20 ml 冷至 45 °C 的营养琼脂培养基(细菌计数),另取 1:10 和 1:100 供试液各 1 ml 分别置无菌平皿中,倾入 20 ml 冷至 45 °C 的玫瑰红钠琼脂培养基(霉菌、酵母菌计数),混匀,凝固后倒置于特定温度的培养箱中培养(营养琼脂培养基的培养温度为 35 °C,培养时间为 48 h;玫瑰红钠琼脂培养基的培养温度为 25 °C,培养时间为 72 h)。每个稀释级的供试液平行作 2 份;另取稀释液 1 ml 作阴性对照。结果表明,3 批样品按验证方法检查,细菌、霉菌或酵母菌总数均 < 10 cfu/ml,均符合规定。

2.5 控制菌检查方法的验证

2.5.1 菌种选择 复方参芪五味咀嚼片为中药口服固体制剂,不含生药原粉,按照 2010 年版《中华人民共和国药典》一部附录微生物限度检查法中的有关控制菌检查方法,应检查大肠埃希菌。

2.5.2 菌液和供试液的制备 菌液按 2.3 项下方法制备,菌数控制在 10~100 cfu/ml。供试液按 2.2 项下方法制备。

2.5.3 验证方法与结果 取 100 ml 胆盐乳糖(BL)培养基 6 份,2 份分别加入 10 ml 供试液及 1 ml 10~100 cfu 大肠埃希菌悬液作为实验组,2 份分别加入 1 ml 10~100 cfu 大肠埃希菌悬液作为阳性对照组,2 份分别加入稀释剂 10 ml 作为阴性对照组,均在 35~37 °C 培养 18~24 h。取上述各培养物 0.2 ml,接种至含 5 ml MUG 培养基的试管内,培养,于 5,24 h 在 366 nm 紫外光下观察,同时用未接种的 MUG 培养基作本底对照,依据《中华人民共和国药典》2010 年版一部附录微生物

限度检查方法进行判定,结果见表3。

表3 控制菌检查法验证结果

组别	结果			
	增菌培养	MUG 5 h	MUG 24 h	靛基质反应
试验组	+	+	+	+
阳性对照组	+	+	+	+
阴性对照组	-	-	-	-
本底对照	-	-	-	-

注: + 阳性反应; - 阴性反应

结果显示,控制菌检查阳性菌生长良好,阴性对照无菌生长。

2.5.4 样品控制菌检查 取3批样品1:10的供试液各10 ml,分别接种至胆盐乳糖培养基100 ml中;另取大肠埃希菌的10~100 cfu/ml菌悬液1 ml、pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液10 ml分别接种至同样培养基中作为阳性对照和阴性对照。按“2.5.3”项下方法操作,结果见表4。

表4 样品控制菌检查结果

批号	组别	结果		
		MUG 5 h	MUG 24 h	靛基质反应
090925	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	+	+	+
	D	-	-	-
091029	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	+	+	+
	D	-	-	-
091030	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	+	+	+
	D	-	-	-

注:A-实验组; B-阴性对照组; C-阳性对照组; D-本底对照组

结果表明,3批样品按验证方法检查,阳性对照检出大肠埃希菌,样品均未检出大肠埃希菌,阴性对照未见菌生长,结果符合规定。

3 讨论

3.1 方法验证 复方参芪五味咀嚼片采用常规法进行细菌、霉菌和酵母菌计数方法验证时,5种试验菌回收率均大于70%,表明本品对细菌、霉菌和酵母菌无抑制作用,可用常规法进行细菌、霉菌和酵母菌计数检查。

3.2 菌液制备 细菌、霉菌和酵母菌计数中菌液的制备尤为重要。菌液含菌数过多或过少,在回收率测定时误差都会增大。因此需要通过反复多次试验,摸索出接种环刮取菌苔的量及稀释菌液的经验方法,在菌液制备好时,同时进行活菌计数和供试品的方法验证,才能将菌数控制在50~100 cfu/ml之间,而且在进行3次独立平行试验时,3次试验的菌原液浓度应尽量一致,除黑曲霉孢子悬液外其他试验菌菌悬液最好现用现配,这样才能保证验证结果准确可靠。

【参考文献】

- [1] 中国药典. 2010年版. 一部[S]. 2010;附录 XIII C:79~88.
- [2] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010;351~368.

[收稿日期]2011-03-22

[修回日期]2011-04-08

(上接第352页)

【参考文献】

- [1] 谢林,梁艳,刘晓东,等. 西嗪伪麻缓释胶囊中盐酸伪麻黄碱在犬血浆中LC-MS法测定及其药代动力学[J]. 中国药科大学学报,2004,35(6):528.
- [2] 张鹏,张逸凡,陈笑艳,等. 三种伪麻黄碱制剂在中国健康人体的药动学及生物等效性[J]. 中国新药杂志,2006,15(17):1491.
- [3] Macek J, Ptacek P, Klima J. Rapid determination of pseudoephedrine in human plasma by HPLC[J]. J Chromatogr B, 2002, 766(2): 289.
- [4] 张善堂,舒冰,史天陆,等. 高效液相色谱法测定人血浆中

盐酸伪麻黄碱浓度[J]. 安徽医药,2006,10(2):110.

- [5] 张建军,欧丽娜,李伟,等. 小青龙颗粒中麻黄碱及伪麻黄碱在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中华中医药杂志,2010,25(12):1991.
- [6] 贺丰,罗佳波,陈飞龙,等. GC-MS法研究麻黄汤中麻黄碱、伪麻黄碱的人体内过程[J]. 中药新药与临床药理,2004,15(5):336.
- [7] 樊志君. HPLC-MS测定人血浆中伪麻黄碱[J]. 中医药导报,2007,13(6):108.
- [8] 史天陆,陈礼明,孙言才,等. 健康人血浆中伪麻黄碱浓度的LC-MS法测定[J]. 安徽医药,2008,12(11):1045.

[收稿日期]2011-08-17

[修回日期]2011-09-08