

## · 论著 ·

## 水调散微生物限度检查的方法验证

何进<sup>1</sup>, 任雪<sup>1</sup>, 曹家辅<sup>1</sup>, 安晔<sup>1</sup>, 刘瑞霞<sup>2</sup> (1. 沈阳军区总医院药剂科, 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

**[摘要]** 目的 对水调散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实验进行细菌、真菌及酵母菌计数方法的验证; 采用相同的实验条件, 观察金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌在实验组、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 用离心沉淀法对细菌、真菌及酵母菌计数时, 各实验菌回收率在70%以上; 控制菌检查采用离心沉淀法, 实验组和阳性对照组检出金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌, 阴性对照组未检出菌株。结论 该方法简便可行, 结果准确, 适合于水调散制剂微生物限度检查。

**[关键词]** 水调散; 微生物限度检查; 方法验证

**[中图分类号]** R392

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2014)04-0282-03

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.04.011

## Validation for determination method of microbacteria limit of Shuitiaosan powder

HE Jin<sup>1</sup>, REN Xue<sup>1</sup>, CAO Jiafu<sup>1</sup>, AN Ye<sup>1</sup>, LIU Ruixia<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacy, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, China; 2. Department of Pharmacy, Shenyang Medical University, Shenyang 110016, China)

**[Abstract]** **Objective** To validate the determination method of microbacteria limit of Shuitiaosan powder. **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 *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in the test group, positive control group and negative control group in the same environment. **Results** The recovery rate of every trail strains was higher than 70% when centrifugal sedimentation methods were used in the counting bacteria and mould. To the examination of control bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were detected by the centrifugal sedimentation methods. The tested strains were observed in the test group and in the positive control group. No strains were observed in the negative control group. **Conclusion** The methods are simple, feasible, reliable and can be used for the examination of microbacteria limit.

**[Key words]** Shuitiaosan powder; microbacteria limit determination; method validation

水调散是沈阳军区总医院研制的制剂, 是一种由黄柏、煨(石膏)为主要药味的外用散剂, 具有清热解毒、消肿止痛的作用, 用于未溃破的疮疖疔毒。按照《中华人民共和国药典(一部)》2010版附录相关规定<sup>[1]</sup>进行微生物限度检查, 因许多药品本身具有抑菌性, 对微生物的检测有干扰, 因此在确定药品微生物限度检查方法时必须进行方法学验证, 以确保在实际检验条件下药品微生物检测方法的准确性、有效性和重现性<sup>[2,3]</sup>。本实验对水调散的微生物限度检查方法进行了验证, 为建立该制剂微生物限度检查方法提供依据。

## 1 实验材料

## 1.1 药品和培养基 水调散(沈阳军区总医院, 批

号: 20110107、20110210、20110321); 营养琼脂培养基(批号: 110316), 营养肉汤培养基(批号: 091008), 玫瑰红钠琼脂培养基(批号: 110224), 改良马丁琼脂培养基(批号: 100426), 胆盐乳糖(BL)培养基(批号: 090517), 蛋白胨(批号: 090712), 以上产品均购自北京三药科技开发公司。

**1.2 菌株** 大肠杆菌(*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]、黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(B) 98003]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B) 10104], 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(上海顾村光电仪器厂); 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

**[作者简介]** 何进, 主任药师, Tel: (024) 28851812, E-mail: hejin127@sina.com.

**[通讯作者]** 安晔, Tel: (024) 28856406.

式不锈钢消毒器(上海三申医疗器械有限公司)。

平皿计数法计数 结果见表1。

## 2 方法和结果

表1 微生物限度检查活菌计数结果

菌株	稀释级数	活菌计数(CFU/ml)	
		第1份	第2份
大肠杆菌	$1 \times 10^{-7}$	80	79
金黄色葡萄球菌	$1 \times 10^{-7}$	75	70
枯草芽孢杆菌	$1 \times 10^{-5}$	74	76
白色念珠菌	$1 \times 10^{-6}$	90	80
黑曲霉	$1 \times 10^{-5}$	75	72

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 取水调散 10 g,加 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 ml,在 45℃ 恒温水浴中保温震荡混匀,500 r/min 离心 3 min,取其上清液作为 1:10 的供试液。

2.3 菌液制备 分别取经 35℃ 培养 24 h 的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的新鲜培养物,以及经 25℃ 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℃ 培养 5 d 的黑曲霉新鲜培养物,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

### 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 实验组:采用平皿法,取 1:10 供试液及 50~100 CFU/ml 实验菌各 1 ml 加入平皿中,立即倾注相应琼脂培养基 20 ml,每株实验菌平行制备 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 次独立的平行实验,并分别计算实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(一部)》2010 版附录微生物限度检查方法<sup>[2]</sup>进行判定 结果见表 2。

表2 细菌、真菌和酵母菌计数方法回收率结果(n=3,%)

组别	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉
实验组	99.8±5.7	99.1±7.9	95.5±9.3	96.8±2.7	98.4±1.7
菌液组	-	-	-	-	-
供试品对照组	-	-	-	-	-
稀释剂对照组	94.6±6.1	94.2±3.4	102.8±7.0	98.8±5.0	94.8±3.8

菌液组:测定所加的实验菌数。

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。

稀释剂对照组:取稀释液 1 ml,同实验组方法测定菌数。结果 5 种实验菌回收率均 >70%。

2.4.2 样品细菌、真菌或酵母菌计数检查 取 3 批样品各 10 g,按“2.2”项下方法制成 1:10 的溶液。取 1:10 溶液 10 ml,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液按 10 倍递增稀释法依次制成 1:100,1:1 000,1:10 000 的供试液。取 3 批样品的上述 3 种浓度供试液各 1 ml 分别加入平皿中,然后倾入 20 ml 冷至 45℃ 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 分别加入平皿中,倾入 20 ml 冷至 45℃ 的玫瑰红钠琼脂培养基(真菌、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℃,培养时间为 3 d;玫瑰红钠琼脂培养基的培养温度为 25℃,培养时间为 5 d)。每个稀释级的供试液平行制备 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、真菌或酵母菌总数均 <10 CFU/ml,符合规定。

### 2.5 控制菌检查方法的验证

2.5.1 菌种选择 按照《中华人民共和国药典(一部)》2010 版附录微生物限度检查法<sup>[4]</sup>中的有关控制菌检查方法,水调散应检查金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌。

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。供试液按本文“2.2”项下方法制备。

2.5.3 验证方法与结果 取 100 ml 营养肉汤培养基 6 份,2 份分别加入 10 ml 供试液(1:10)及 1 ml 10~100 CFU/ml 金黄色葡萄球菌作为实验组,2 份分别加入 1 ml 10~100 CFU/ml 金黄色葡萄球菌作为阳性对照组,2 份分别加入稀释剂 10 ml 作为阴性对照组,均在 30~35℃ 培养 24 h。取上述各增菌培养物,用接种环沾取 1~2 环培养液划线接种至甘露醇氯化钠琼脂培养基的平板上,35℃ 培养 24 h。另取 100 ml 胆盐乳糖培养基 6 份,其中:2 份分别加入 10 ml 供试液(1:10)及 1 ml 10~100 CFU/ml 铜绿假单胞菌悬液作为实验组;2 份分别加入 1 ml 10~100 CFU/ml 铜绿假单胞菌悬液作为阳

(下转第 317 页)

### 【参考文献】

- [1] 吴袁剑云, 英立平. 临床路径实施手册[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2002: 8.  
[2] 中华医学会呼吸病学分会. 社区获得性肺炎诊断和治疗指南 2006版[S]. 2006: 5.  
[3] 中华人民共和国卫生部药政司. 抗菌药物临床研究指导原则

[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 1993: 2.

- [4] 丁玉峰, 吴方建. 药物经济学理论及应用[J]. 中国药师, 2004, 7(7): 507-510.  
[5] 周玉清. 三种胃溃疡伴幽门螺旋菌感染治疗方案的成本-效果分析[J]. 海峡药学, 2003, 15(2): 73-74.

[收稿日期] 2013-05-08 [修回日期] 2013-11-12  
[本文编辑] 李睿曼

(上接第283页)

性对照组; 2份分别加入稀释剂10 ml作为阴性对照组。上述各组均在30~35℃培养24 h。取上述各增菌培养物, 用接种环沾取1~2环培养液划线接种至溴化十六烷基三甲基铵琼脂培养基的平板上, 35℃培养24 h。依据上述检查方法进行判定, 结果显示, 实验组和阳性对照组控制菌生长良好, 阴性对照组未检出。详见表3。

表3 检查控制菌的结果

组别	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌
阴性对照组	-	-
阳性对照组	+	+
实验组	+	+

2.5.4 样品控制菌检查 取3批样品1:10的供试液各10 ml, 分别接种至营养肉汤培养基100 ml中; 另取金黄色葡萄球菌的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。另取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; 取铜绿假单胞菌的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。3批样品按验证方法检查, 供试品组及阴性对照组均未见细菌生长, 结果符合规定(表4)。

表4 样品控制菌检查结果

组别	批号 20110107		批号 20110210		批号 20110321	
	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌
阴性对照组	-	-	-	-	-	-
阳性对照组	+	+	+	+	+	+
供试品组	-	-	-	-	-	-

### 3 讨论

在对药品进行微生物限度检查方法验证时, 采用预实验方法对验证菌株抑菌活性的强弱进行预测, 为正式实验提供依据, 同时减少工作量及试剂、试剂的浪费, 提高工作效率。根据《中华人民共和国药典(一部)》微生物限度检查方法的规定, 含抑菌成分的制剂, 必须消除供试液的抑菌活性, 然后再进行微生物限度检查。预实验结果表明, 水调散有抑菌作用, 且由于该制剂是由原药材细粉制成的散剂, 制成供试液时存在大量的不溶性颗粒, 采用常规法进行细菌、真菌和酵母菌计数检查及控制菌检查时, 对结果判断有干扰。而采用离心沉淀法时, 既能消除本品在检查条件下的抑菌作用, 又可排除对菌落计数的干扰, 使污染的微生物顺利检出。

微生物限度检查方法验证为活菌计数实验, 其实验方法受菌悬液浓度、培养基、培养条件、实验操作等诸多因素影响<sup>[5]</sup>。每次验证实验应尽量平行, 以保证实验的可重复性, 且日常检验方法应与验证方法保持一致, 以保证检验结果的准确性。

微生物的污染、生长和繁殖是影响中药制剂

质量的重要因素, 也是中药制剂生产过程中比较突出的问题。尤其是中药原粉入药的散剂, 从药材清洗、干燥、粉碎到制剂成形工艺过程, 每一环节都有可能染菌。因此, 为了保证中药制剂质量, 使制剂中不含或少含微生物, 必须控制中药制剂生产整个环节中的微生物限度, 严格执行符合《中华人民共和国药典(一部)》的相关规定。

### 【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[S]. 北京: 化学工业出版社出版, 2010: 附录: 88.  
[2] 李晓东, 李娟, 焦正花, 等. 我国医院中药制剂微生物限度检查存在的问题分析与建议[J]. 甘肃中医, 2009, 22(12): 15-17.  
[3] 冒兴建, 闫玉梅, 秦建. 中药口服制剂维生素限度检查不合格的原因及解决办法[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(10): 130-131.  
[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[S]. 北京: 化学工业出版社出版, 2010: 附录: 79-88.  
[5] 杨静. 药品微生物限度检查法的影响因素分析[J]. 中国药事, 2008, 22(12): 1095-1096.

[收稿日期] 2013-05-18 [修回日期] 2013-12-02  
[本文编辑] 李睿曼