

四味颗粒微生物限度检查方法学验证*

胡婧, 邓莉, 胡斌, 马攀, 陈勇川[△]

(陆军军医大学第一附属医院药学部, 重庆 400038)

摘要:目的 建立四味颗粒的微生物限度检查方法。方法 分别采用常规法、稀释法对四味颗粒的微生物限度检查方法进行验证。结果 取1:50供试液,采用稀释法测定需氧菌总数,回收率比值均为0.84~1.12;采用常规法测定霉菌和酵母菌总数,回收率比值在1.05~1.08;采用常规法验证控制菌(大肠埃希杆菌),检出阳性菌,阴性对照未检出。结论 可采用稀释法(1:50)测定四味颗粒需氧菌总数,以及常规法进行霉菌和酵母菌总数及控制菌检查。

关键词:四味颗粒;常规法;稀释法;微生物限度检查;质量控制

中图分类号:R932;R917

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)07-0026-04

Validation of Microbial Limit Test Method for Siwei Granules

HU Jing, DENG Li, HU Bin, MA Pan, CHEN Yongchuan

(Department of Pharmacy, The First Hospital Affiliated to AMU, Chongqing, China 400038)

Abstract: Objective To establish a microbial limit test method of Siwei Granules. **Methods** The microbial limit test method of Siwei Granules was validated by the routine method and dilution method. **Results** The total number of aerobic bacteria was determined by dilution method with 1:50 test solution, and the recovery ratio was 0.84-1.12. The total number of mould and yeast was determined by the routine method, and the recovery ratio was 1.05-1.08. The control bacteria (*Escherichia coli*) were verified by the routine method, the positive bacteria were detected, but negative control was not detected. **Conclusion** Dilution method (1:50) can be used to determine the total number of aerobic bacteria in Siwei Granules. The routine method can be used to examine the total number of mould and yeast, as well as the control bacteria.

Key words: Siwei Granules; routine method; dilution method; microbial limit test; quality control

药品的微生物限度检查是控制药品质量的一项重要检查项目,是制剂安全性检查的重要组成部分^[1]。自2005年版《中国药典》开始,就对微生物限度检查法的验证提出了具体要求:“当进行药品无菌检查或微生物限度检查时,应进行方法学验证,否则不能出具符合《中国药典》规定的结论。”2015年版《中国药典》相对于2010年版在非无菌产品微生物限度检查方面做了较大改动,修订后的微生物限度检查方法与《美国药典》要求基本一致^[2-3],在中国制药的国际化进程上又向前迈进了一大步。四味颗粒作为我院自制制剂,功能活血化瘀、软坚散结、镇痛消胀,临床运用在各种乳腺增生性疾病的治疗已多年,疗效确切。为确保其微生物限度检查质量安全性达到要求^[4],按照2015年版《中国药典》(四部)附录1105,1106,1107项下要求^[5],对四味颗粒的微生物限度检查法进行验证。由于四味颗粒为中药复方制剂,其含有多中中药成分,其中山楂对微生物具有抑菌作用,应消除其抑菌性后再进行检查,故采用稀释法和常规法相结合进行四味颗粒的微生物限度检查,以消除制剂中山楂的抑菌性。现报道如下。

1 仪器与材料

仪器:Thermo Scientific-1381 A2型生物安全柜(美

国 Thermo 公司);BL-150型电子天平(梅特勒托利多仪器<上海>有限公司);LRH-150F型生化培养箱(重庆四达实验仪器公司);MJ-180-II型霉菌培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);LDZX-75KBS型、LDZF-30KB-II型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械有限公司)。

试药:四味颗粒(医院制剂,批号分别为180205,180319,180402,规格为每包10g);pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液(北京三药科技开发公司,批号为170519);0.9%无菌氯化钠溶液(西南药业股份有限公司,批号为17034002)。

菌种:金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102],均由中国食品药品检定研究院提供,试验所用菌株均为第3代。

培养基:胰酪大豆胨液体培养基(批号为161205),胰酪大豆胨琼脂培养基(批号为1612192),沙氏葡萄糖液体培养基(批号为170815),沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号为1702134),麦康凯液体培养基(批号为161205),麦康凯琼脂培养基(批号为161212),均由北京三药科

*基金项目:总后勤部卫生部军队医疗机构制剂标准提高科研专项[14ZJZ02-2]。

第一作者:胡婧,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药物制剂与分析,(电话)023-68765490(电子信箱)18219797@qq.com。

[△]通信作者:陈勇川,男,硕士研究生,副主任药师,研究方向为药物分析与临床运用,(电话)023-68754462(电子信箱)zwmcy@163.com。

技开发公司提供。

2 方法与结果

2.1 计数培养基适应性检查^[6]

分别取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌及黑曲霉菌的菌液,均不大于100 cfu,分别注入无菌平皿中,立即倾注胰酪大豆胨琼脂培养基,每株试验菌平行制备2个平皿,混匀,凝固,置35℃培养3 d,计数;分别取白色念珠菌、黑曲霉菌的菌液,均不大于100 cfu,分别注入无菌平皿中,立即倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基,每株试验菌平行制备2个平皿,混匀,凝固,置25℃培养5 d,计数。同时,用相应对照培养基替代被检培养基进行上述试验。结果见表1。

表1 培养基适用性检查结果(cfu, n=2)

菌种类型	次数	胰酪大豆胨琼脂培养基			沙氏葡萄糖琼脂培养基			菌落形态大小
		被检	对照	比值	被检	对照	比值	
金黄色葡萄球菌	1	77	81	0.95	-	-		一致
	2	79	83		-	-		一致
铜绿假单胞菌	1	96	94	1.09	-	-		一致
	2	96	82		-	-		一致
枯草芽孢杆菌	1	86	88	0.99	-	-		一致
	2	91	90		-	-		一致
白色念珠菌	1	67	60	1.04	79	78	0.98	一致
	2	67	69		77	82		一致
黑曲霉	1	62	62	1.02	61	68	0.93	一致
	2	63	60		63	65		一致

2.2 常规法适用性试验

2.2.1 菌液制备

取经胰酪大豆胨液体培养基35℃培养24 h的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌液体培养物,分别用0.9%无菌氯化钠溶液稀释成适宜浓度的菌悬液,作活菌计数备用。

取经沙氏葡萄糖液体培养基25℃培养48 h的白色念珠菌液体培养物,用0.9%无菌氯化钠溶液稀释成适宜浓度的菌悬液,作活菌计数备用。

取经沙氏葡萄糖琼脂培养基25℃培养7 d的黑曲霉菌斜面培养物,加入含0.05% (mL/mL)聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱,吸出孢子悬液(用管口带有薄的无菌棉花或纱布能过滤菌丝的无菌毛细吸管),置无菌试管内,用0.9%无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的孢子悬液。

2.2.2 供试品溶液制备

取样品(批号为180205)10 g,加pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至100 mL,摇匀,制成1:10的供试品溶液。

2.2.3 回收率测定

试验组:取上述1:10供试品溶液9.9 mL,共5份,

每份分别加入金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌及黑曲霉菌菌悬液各0.1 mL,使每1 mL含菌落数不大于100 cfu,混匀,吸取各染菌供试品溶液1 mL注入平皿中,每份平行制备2个平皿,倾注胰酪大豆胨琼脂培养基,置35℃培养3 d,测定需氧菌总数。取上述1:10供试品溶液9.9 mL,共2份,每份分别加入白色念珠菌和黑曲霉试验菌菌悬液各0.1 mL,使每1 mL含菌数不大于100 cfu,混匀,吸取各染菌供试品溶液1 mL置平皿中,每份平行制备2个平皿,倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基,置25℃培养5 d,测定霉菌及酵母菌总数。

菌液对照组:吸取pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液9.9 mL,共5份,每份分别加入金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉菌菌悬液各0.1 mL,使每1 mL含菌落数不大于100 cfu,混匀,分别吸取1 mL置平皿中,每株试验菌平行制备2个平皿,倾注胰酪大豆胨琼脂培养基;另取pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液9.9 mL,共2份,每份分别加入白色念珠菌、黑曲霉菌菌悬液各0.1 mL,使每1 mL含菌数不大于100 cfu,混匀,分别吸取1 mL置平皿中,每株试验菌平行制备2个平皿,倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基。

供试品组:吸取上述1:10供试品溶液1 mL置平皿,平行制备4个平皿,其中2个倾注胰酪大豆胨琼脂培养基,作为测定需氧菌总数的供试品组;另外2个倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基,作为测定基霉菌和酵母菌总数的供试品组。

稀释液组:取相应量稀释液替代供试品溶液,同试验组操作,按试验组方法测定其菌落数,平行制备2个平皿。

结果:依照公式计算加菌回收率。试验组菌比值=(试验组平均菌落数-供试品组的平均菌落数)/菌液对照组的平均菌落数。按2015年版《中国药典(四部)》附录1105,1106,1107项下^[4]规定进行结果判断,回收率比值应为0.5~2。需氧菌总数验证试验结果见表2,霉菌和酵母菌总数见表3。可见,常规法可用于霉菌和酵母菌的计数,回收率为0.5~2.0;而对于细菌的计数,采用常规法检查时,供试品溶液对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的回收率均低于0.5,不符合规定。故本品对细菌的计数应重新选择适当的方法,先消除其抑菌活性后再进行验证。

2.3 稀释法(1:50)适用性试验

2.3.1 菌液制备

制备方法同2.2.1项。

2.3.2 供试品溶液制备

取样品10 g,加pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲

表2 1:10 供试品溶液需氧菌总数回收率比值($n=3$)

菌种类型	次数	菌落总数(cfu/mL)			回收率 比值
		试验组	菌液对照组	供试品组	
金黄色葡萄球菌	1	13	90	3	0.12
	2	15	89	4	
	3	14	88	3	
铜绿假单胞菌	1	89	73	3	1.08
	2	87	75	4	
	3	79	78	4	
枯草芽孢杆菌	1	39	89	4	0.42
	2	41	84	3	
	3	40	86	4	
白色念珠菌	1	79	68	5	1.12
	2	78	66	4	
	3	82	68	3	
黑曲霉	1	90	76	4	1.09
	2	87	79	3	
	3	83	73	4	

表3 1:10 供试品溶液霉菌和酵母菌回收率比值($n=3$)

菌种类型	次数	菌落总数(cfu/mL)			回收率 比值
		试验组	菌液对照组	供试品组	
白色念珠菌	1	85	72	0	1.08
	2	80	75	0	
	3	75	76	0	
黑曲霉	1	89	74	0	1.05
	2	78	80	0	
	3	75	78	0	

液至 100 mL, 摇匀, 制成 1:10 的贮备液; 再取 20 mL, 加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL, 摇匀, 制成 1:50 的供试品溶液。

2.3.3 回收率测定

试验组: 取上述 1:50 供试品溶液 9.9 mL, 共 5 份, 每份分别加入金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌及黑曲霉菌菌悬液各 0.1 mL, 使每 1 mL 含菌落数不大于 100 cfu, 混匀, 吸取各染菌供试品溶液 1 mL 置平皿中, 每份平行制备 2 个平皿, 倾注胰酪大豆胨琼脂培养基, 置 35 °C 培养 3 d, 测定需氧菌总数。

菌液对照组: 吸取 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 9.9 mL, 共 5 份, 每份分别加入金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉菌菌悬液各 0.1 mL, 使每 1 mL 含菌落数不大于 100 cfu, 混匀, 分别吸取 1 mL 置平皿中, 每株试验菌平行制备 2 个平皿, 倾注胰酪大豆胨琼脂培养基。

供试品组: 吸取上述 1:50 供试品溶液 1 mL 置平皿中, 平行制备 2 个平皿, 倾注胰酪大豆胨琼脂培养基, 作为测定需氧菌总数的供试品组。

稀释液组: 取相应量稀释液替代供试品溶液, 同试验组方法操作, 依法测定其菌落数, 平行制备 2 个平皿。

结果: 需氧菌总数稀释法验证试验结果见表 4。可见, 采用常规法, 控制菌能正常检出, 阴性对照未检出。符合 2015 年版《中国药典(四部)》微生物限度检查控制菌检查验证要求, 所以常规法可用于四味颗粒的控制菌检查。可见, 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌的回收率为 0.5~2.0, 符合规定, 本品细菌计数可采用稀释法(1:50)。

表4 1:50 供试品溶液需氧菌总数回收率比值($n=3$)

菌种类型	次数	菌落总数(cfu/mL)			回收率 比值
		试验组	菌液对照组	供试品组	
金黄色葡萄球菌	1	90	88	3	1.04
	2	85	79	5	
	3	88	76	4	
铜绿假单胞菌	1	86	73	3	1.12
	2	84	72	4	
	3	81	70	4	
枯草芽孢杆菌	1	79	84	4	0.84
	2	78	86	5	
	3	73	89	4	
白色念珠菌	1	90	77	5	1.11
	2	86	76	4	
	3	87	73	4	
黑曲霉	1	75	68	5	1.09
	2	79	69	4	
	3	75	61	5	

2.4 控制菌(大肠埃希菌)检查

试验组: 取 2.2.2 项下 1:10 供试品溶液 10 mL 及每 1 mL 含菌量不大于 100 cfu 的大肠埃希菌菌悬液, 同时加入 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中, 混匀, 35 °C 培养 24 h。取上述培养物 1 mL 接种至 100 mL 麦康凯液体培养基中, 42 °C 培养 24 h。取麦康凯液体培养物划线接种至麦康凯琼脂培养基平板上, 35 °C 培养 24 h, 观察结果。

菌液对照组: 不加供试品溶液, 其余操作与试验组相同。

供试品组: 取 2.2.2 项下 1:10 供试品溶液 10 mL, 以稀释液代替菌液, 同试验组方法操作。

稀释液组: 以稀释液代替供试品溶液, 不加菌液, 其余操作方法与试验组相同。

结果: 观察其菌落形态。验证结果见表 5。

表5 大肠埃希菌检查结果

菌种类型	试验组	菌液对照组	供试品组	阴性对照组
大肠埃希菌	+(24 h)	+(24 h)	-(24 h)	-(24 h)

注: - 表示无菌生长; + 表示试验菌生长良好。

2.5 样品微生物限度检查

采用稀释法(1:50)进行需氧菌总数的检查,常规法进行霉菌和酵母菌总数及控制菌的检查,对3批样品进行检验,结果见表6。可见,四味颗粒的微生物限度检查方法为需氧菌总数检查采用稀释法(1:50),霉菌和酵母菌总数及控制菌检查可采用常规法。结果表明,建立的检查方法符合规定,可用于四味颗粒微生物限度的检查。

表6 3批样品微生物限度检查结果(cfu/mL)

批号	需氧菌总数	霉菌和酵母菌数	大肠埃希菌
180205	4	0	阴性
180319	5	0	阴性
180402	4	0	阴性

3 讨论

中成药组分复杂,剂型众多,微生物检测方法的适用性试验就显得更为重要^[6-8]。四味颗粒为我院治疗乳腺增生类疾病的常用药物,临床用量极大,必须对制剂的安全性加以控制,而微生物限度检查则是安全性检查的重要环节。相对于前几版药典,2015年版《中国药典》在微生物限度检查方法和指导原则上均做出了较大修订,增加了供试品制备中的稀释液种类,采用胰酪大豆胨液体培养基和胰酪大豆胨琼脂培养基取代了营养肉汤和营养琼脂培养基;采用沙氏葡萄糖琼脂培养基取代了玫瑰红钠培养基检测霉菌与酵母菌总数,相对于2010年版所采用的培养基具有良好的广谱性,对目标微生物的选择性低,有利于微生物的修复与生长,提高了检出率^[9-10];在染菌方式上由试验菌最后加入改为配制样品时即加入试验菌,充分模拟了样品受微生物污染的状态,更能真实地体现样品的受污染程度,从而减少实验室之间和检验人员之间对结果的判断误差^[11]。本研究中则是在原有微生物限度检查方法基础上按照新版指导要求重新建立四味颗粒的微生物限度检查方法,并对其进行验证,建立了符合规定的微生物限度检查方法,以便在日常生产中更好地对药物制剂质量进行监督和把控,保证制剂质量的安全性和稳定性,保障广大人民群众的用药安全。

四味颗粒由山楂、鸡血藤、麦芽、通草4味中药制成。山楂具有一定的抗菌活性,对多数致病菌和杆菌具有抑制作用,以山楂核提取物为主要杀菌成分的皮肤消毒剂,对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌具有较好的杀菌效果,且稳定性较好^[12];在对14种中药乙醇提取物对大肠杆菌的体外抑菌试验中,山楂表现出了良好的抑菌能力^[13]。本研究中,采用常规法进行需氧菌总数检查时,回收率均低于0.5,制剂显示出了对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等需氧菌的抑

菌作用,因此需抑制其抗菌活性。一般来说,中药制剂采用稀释法和薄膜过滤法以消除其抑菌活性^[14-15],采用稀释法(1:20,1:50,1:100)3个稀释级考察,结果1:50的回收率可达到0.5~2.0,可消除其抑菌活性;而在进行控制菌检查时,采用常规法制剂却未显示出对大肠埃希杆菌的抑菌活性,推测本制剂在制备过程中,抑制大肠杆菌的成分浓度未达到有效地最低抑菌浓度。由于中成药大多为复方制剂,且经过制备过程,药理活性也会发生变化,因此个性化地对中药制剂进行微生物限度检查方法的建立及验证显得尤为重要,不仅能避免由于其本身的抑菌活性掩盖了药品制剂本身的受污染程度,还能简化操作步骤,提高检出效率。

参考文献:

- [1] 胡昌勤. 药品微生物控制现状与展望[J]. 中国药学杂志, 2015,50(20):1747.
- [2] 王洪家. 解毒散结颗粒《中国药典》2015年版微生物限度检查方法学验证[J]. 天津药学,2016,4(28):17-19.
- [3] 李趣嫦,江艳芳.《中国药典》2010版与2015版微生物限度检查法对四种药物检测结果的比较[J]. 中国药品标准, 2015,16(2):86-90.
- [4] 杨静,李晓翠,徐逸飞. 四种医院制剂微生物限度检查法验证试验[J]. 中国医药科学,2015,19(5):51-53.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:140-151.
- [6] 宋勤,杜平华. 中成药微生物限度检查方法的探讨[J]. 中国药事,2006,20(1):46.
- [7] 陈志禹,夏佳,席时东. 八珍丸的中国药典2015年版微生物学检查结果分析与评价[J]. 药物分析杂志,2016,36(3):418.
- [8] 陈志禹,夏佳,席时东. 八珍系列制剂微生物限度检查法的建立及检验结果分析[J]. 药物分析杂志,2016,36(4):739.
- [9] 杨晓莉,李辉,马英英,等. 中国药典2015年版非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法解读[J]. 药物分析杂志, 2016,36(6):1101.
- [10] 杨晓莉,李辉,马英英,等. 中国药典2015年版非无菌产品微生物限度检查:控制菌检查法解读与对策[J]. 中国药师, 2016,19(4):7480.
- [11] 李伟. 鞣酐凝胶微生物限度检查方法适用性试验的研究[J]. 天津药学,2015,27(4):24-26.
- [12] 李长青,吴伟,佟颖. 山楂核提取物杀菌效果及影响因素的研究[J]. 中国消毒学杂志,2007,24(1):50-52.
- [13] 南萃瑶,王小莺. 14种中药乙醇提取物对大肠杆菌的体外抑菌试验[J]. 中兽医学杂志,2017(5):6-8.
- [14] 吕晓英,龙子江. 具有抑菌成分的中药制剂细菌数、霉菌数的检验方法的探讨[J]. 中成药,2002,24(6):481.
- [15] 潘雯,关倩明,林玲. 7种具有抑菌成分中成药的微生物限度检查方法验证[J]. 广东药学院学报,2012,28(6):623-627.

(收稿日期:2018-10-08)