

冠心苏合胶囊微生物限度检查方法的验证

刘 静, 贾瑞波, 丁红雨

大连市食品药品检验所, 辽宁 大连 116021

摘要: 目的 确认冠心苏合胶囊微生物限度的检查方法和条件, 保证检验方法的科学性、准确性及完整性。方法 采用《中国药典》2010 年版(一部)附录“微生物限度检查法”项下相关内容进行方法学验证, 通过回收率的比较来确定适宜的检查方法。结果 细菌计数检查采用低速离心-薄膜过滤法; 霉菌和酵母菌计数及控制菌检查采用常规法。结论 该方法有效可行, 可用于冠心苏合胶囊微生物限度检查。

关键词: 冠心苏合胶囊; 微生物限度检查法; 低速离心-薄膜过滤法; 方法验证

中图分类号: R927 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)02-0107-004

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.02.007

Validation of determining microbial limit for Guanxin Suhe Capsules

LIU Jing, JIA Rui-bo, DING Hong-yu

Dalian Institute for Food and Drug Control, Dalian 116021, China

Abstract: Objective To determine the condition and method in the microbial limit test of Guanxin Suhe Capsules (GSC) in order to ensure the scientificity, accuracy, and integrity of the method. **Methods** The verification test was carried out according to the method of microbial limit test in the appendix of *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition, volume I), suitable method was confirmed by comparing recovery rate. **Results** Low-speed centrifugal and membrane filtration method was used for the bacterium count; routine method was used for total combined molds and yeasts count, the detection of *Escherichia coli*, and coliform bacteria. **Conclusion** The method is effective and feasible. It could be used for the microbial limit test of GSC.

Key words: Guanxin Suhe Capsules; microbial limit test; low-speed centrifugal and membrane filtration method; validation of method

冠心苏合胶囊具有理气宽胸、止痛的功效, 用于心绞痛、胸闷憋气, 为口服用药, 其主要成分为苏合香、冰片、乳香、檀香、土木香。其中苏合香、冰片、乳香均具有较强的抑菌活性^[1-3], 为保证该产品微生物限度检验方法的科学性、准确性及完整性, 消除药品成分本身存在的抑菌和杀菌作用, 准确检验出制剂受污染情况, 本文按照《中国药典》2010 年版一部附录微生物限度检查法^[4], 通过对 3 个批次的冠心苏合胶囊进行细菌、霉菌和酵母菌计数方法的验证, 及控制菌(大肠埃希菌、大肠菌群)检查方法的验证, 从而确立了该品种微生物限度检查方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

电子天平(德国赛多利斯); 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 生化培养箱(上海博讯实业有限

公司医疗设备厂); 薄膜过滤器(杭州高得泰林医疗器械有限公司); 生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司)。

1.2 菌种

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* [CMCC (B) 26 003]、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* [CMCC (B) 63 501]、大肠埃希菌 *Escherichia coli* [CMCC (B) 44 102]、白色念珠菌 *Candida albicans* [CMCC (F) 98 001]、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) [CMCC (F) 98 003] 均由中国食品药品检定研究院提供。

1.3 培养基

营养琼脂培养基(批号 111226)、玫瑰红钠琼脂培养基(批号 111222)、营养肉汤培养基(批号 101123)、胆盐乳糖培养基(BL)(批号 111115)、胆盐乳糖发酵培养基(批号 101108)、改良马丁培养基(批号 101102)、4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸培养

收稿日期: 2013-01-30

作者简介: 刘 静, 女, 本科, 主管药师。Tel: 15042455791 E-mail: ljgy7830@sina.com

基(MUG)(批号 110315)、曙红亚甲蓝琼脂培养基(EMB)(批号 101002)、pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液(批号 100705)均来源于北京三药科技开发公司。

1.4 稀释剂

0.9%无菌氯化钠溶液, 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液(pH 7.0), 新配。

1.5 药品

冠心苏合胶囊, 大连某制药有限公司生产, 批号为 111102、111103、111104。

2 方法和结果

2.1 菌液的制备

2.1.1 取经 34 °C 培养 24 h 的枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌的营养肉汤培养物 1 mL, 分别加入 9 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液, 以 10 倍递增稀释至含菌数为 50~100 cfu/mL 的菌悬液。

2.1.2 取经 25 °C 培养 48 h 的白色念珠菌改良马丁液体培养物 1 mL, 加入 9 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液, 以 10 倍递增稀释至含菌数为 50~100 cfu/mL 的菌悬液。

2.1.3 取经 25 °C 培养 7 d 的黑曲霉改良马丁琼脂斜面培养物, 加入 5 mL 含 0.05% 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液, 将孢子洗脱, 然后用管口带有能滤过菌丝装置的吸管, 吸出孢子悬液至无菌试管中, 再用含 0.05% 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液, 以 10 倍递增稀释至含菌数为 50~100 cfu/mL 的孢子悬液。

2.2 供试液的制备

取冠心苏合胶囊 10.0 g, 加入 100 mL 氯化钠-蛋白胨缓冲液(pH 7.0), 用匀浆仪搅拌, 混匀, 作为 1:10 供试液, 以 10 倍递增稀释制成 1:100、1:1 000 供试液。

2.3 细菌计数方法验证

2.3.1 试验组 取 1:10 供试液 10 mL, 先以 500 r/min 离心 3 min, 取上清液 1 mL (6 份), 分别加至含 100 mL 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液的薄膜过滤器中, 混匀, 滤过, 分别用 300 mL 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(pH 7.0) 冲洗滤膜(100 mL/次), 在最后一轮的冲洗液中分别加入含有 50~100 cfu/mL 枯草芽孢杆菌的菌悬液、金黄色葡萄球菌菌悬液、大肠埃希菌菌悬液 1 mL (每菌 2 份), 冲洗后取出滤膜, 菌面朝上贴于营养琼脂培养基中, 置 34 °C 培养 72 h, 分别点计菌落数。

2.3.2 菌液组 取含有 50~100 cfu/mL 的枯草芽孢杆菌菌液、金黄色葡萄球菌菌液、大肠埃希菌菌液 1 mL (每菌 2 份), 注入平皿中, 立即倾注营养琼脂培养基摇匀, 待凝固后, 置 34 °C 培养 72 h, 测定加入的试验菌菌数。

2.3.3 供试品对照组 取 1:10 供试液 10 mL, 先以 500 r/min 离心 3 min, 取上清液 1 mL (2 份), 分别加至含 100 mL 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液的薄膜过滤器中, 混匀, 滤过, 用 300 mL 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(pH 7.0) 冲洗滤膜(100 mL/次), 冲洗后取出滤膜, 菌面朝上贴于营养琼脂培养基中, 置 34 °C 培养 72 h, 分别点计菌落数。

2.3.4 稀释剂对照组 取稀释液代替供试品, 按实验组的方法测定菌落数。

2.4 霉菌和酵母菌计数方法的验证

2.4.1 试验组 取 1:10 供试液 1 mL (4 份) 注入平皿中, 分别加入含有 50~100 cfu/mL 白色念珠菌的菌悬液、黑曲霉孢子悬液 1 mL (各 2 份), 立即倾注玫瑰红钠琼脂培养基, 摇匀, 凝固, 置 25 °C 培养 120 h, 分别点计菌落数。

2.4.2 菌液组 取含 50~100 cfu/mL 白色念珠菌的菌悬液、黑曲霉孢子悬液 1 mL (各 2 份), 分别注入平皿中, 立即倾注玫瑰红钠琼脂培养基, 摇匀, 凝固, 置 25 °C 培养 120 h, 分别点计菌落数。

2.4.3 供试品对照组 取 1:10 供试液 1 mL (2 份) 注入平皿中, 立即倾注玫瑰红钠琼脂培养基, 摇匀, 凝固, 置 25 °C 培养 120 h, 分别点计菌落数。

2.4.4 稀释剂对照组 取稀释液代替供试品, 按实验组的方法测定菌落数。

2.5 控制菌检查方法的验证

2.5.1 菌液制备 取经 30~35 °C 培养 18~24 h 的大肠埃希菌的营养肉汤培养物 1 mL, 加入 9 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液, 以 10 倍递增稀释至含菌数为 10~100 cfu/mL 的菌悬液。

2.5.2 大肠埃希菌验证方法 ①供试品对照组 取 1:10 的供试液 10 mL, 加入胆盐乳糖增菌液中培养后, 按大肠埃希菌检查法进行检查; ②试验组 取 1:10 的供试液 10 mL 及大肠埃希菌菌液 1 mL, 加入胆盐乳糖增菌液中培养后, 按大肠埃希菌检查法进行检查; ③阳性对照组 取大肠埃希菌菌液 1 mL, 加入胆盐乳糖增菌液中培养后, 按大肠埃希菌检查法进行检查; ④阴性对照组 取稀释液代替供试品, 按实验组方法, 加入胆盐乳糖增菌液中培养

后,按大肠埃希菌检查法进行检查。

2.5.3 大肠菌群验证方法 ①供试品对照组 取含 10 mL 的胆盐乳糖发酵培养基管 6 支,分别加入 1:10、1:100、1:1 000 的供试液 1 mL (各 2 份),按大肠菌群检查法进行检查。②试验组 取含 10 mL 的胆盐乳糖发酵培养基管 6 支,分别加入 1:10、1:100、1:1 000 的供试液 1 mL (各 2 份)及大肠埃希菌菌液 1 mL,按大肠菌群检查法进行检查。③阳性对照 取含 10 mL 的胆盐乳糖发酵培养基管 2 支,分别加入大肠埃希菌菌液 1 mL,按大肠菌群检查法进行检查。④阴性对照 取含 10 mL 的胆盐乳糖发酵培养基管 2 支,分别加入稀释剂 1 mL,按大肠菌群检查法进行检查。

3 结果

3.1 细菌、霉菌及酵母菌的计数验证结果

稀释剂对照组的菌回收率均不低于 70%,试验

组菌回收率均不低于 70% (表 1),符合《中国药典》2010 年版一部附录 XIII C 关于计数方法的验证规定^[1]。确定冠心苏合胶囊采用低速离心-薄膜过滤法进行细菌计数。

3.2 控制菌检查方法的验证结果

大肠埃希菌检查方法验证结果见表 2,大肠菌群检查方法验证结果见表 3。阴性对照组及供试品对照组均未检出试验菌,试验组和阳性对照组检出试验菌,符合《中国药典》2010 年版一部附录 XIII C 关于控制菌检查方法的验证规定。确定冠心苏合胶囊采用常规法进行霉菌和酵母菌计数及控制菌检查。

4 讨论

常规法 (1 mL/皿)、培养基稀释法 (0.5 mL/皿或 0.2 mL/皿)、薄膜过滤法是微生物检验中细菌、酵母菌及霉菌检查的 3 种常用方法,分别适于无抑菌作用、有弱抑菌作用以及强抑菌性的供试品^[4-5]。

表 1 细菌、霉菌及酵母菌计数方法验证结果 ($n=3$)

Table 1 Verification result of bacteria, total combined molds, and yeasts count ($n=3$)

组别	金黄色葡萄球菌		枯草芽孢杆菌		大肠埃希菌		白色念珠菌		黑曲霉	
	菌落数/ (cfu·mL ⁻¹)	回收率/ %	菌落数/ (cfu·mL ⁻¹)	回收率/ %	菌落数/ (cfu·mL ⁻¹)	回收率/ %	菌落数/ (cfu·mL ⁻¹)	回收率/ %	菌落数/ (cfu·mL ⁻¹)	回收率/ %
稀释剂	90	98	68	97	88	100	57	98	64	96
菌液	92		70		88		58		67	
试验	75	82	64	91	78	89	48	83	60	90
供试品	0		0		0		0		0	

表 2 大肠埃希菌检查方法验证结果 ($n=3$)

Table 2 Verification result of *E. coli* ($n=3$)

组别	BL 增菌培养	分离培养		
		MUG	靛基质	EMB
供试品	澄清	—	—	/
试验	混浊	+	+	/
阳性对照	混浊	+	+	/
阴性对照	澄清	—	—	/

+表示培养基有菌生长或呈阳性; —表示培养基无菌生长或呈阴性; 下表同

+ represents growth of bacterium in medium or is positive; — represents no growth of bacterium or is negative; same as below

表 3 大肠菌群检查方法验证结果 ($n=3$)

Table 3 Verification result of coliform bacteria ($n=3$)

组别	BL 发酵培养基	EMB	乳糖发酵培养基	结果
供试品	不产酸, 不产气	—	不产酸, 不产气	阴性
试验	产酸, 产气	+	产酸, 产气	阳性
阳性对照	产酸, 产气	+	产酸, 产气	阳性
阴性对照	不产酸, 不产气	—	不产酸, 不产气	阴性

对无微生物验证资料的药物新品种进行方法学验证的时候,应首先考虑采用常规法及培养基稀释法进行细菌计数方法的验证。当对冠心苏合胶囊采用上述这两种方法进行验证试验时,实验组的枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌的回收率均大于70%,而金黄色葡萄球菌的回收率均低于70%。说明冠心苏合胶囊对枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌无抑制作用,而对金黄色葡萄球菌有抑制作用,因此冠心苏合胶囊的细菌计数方法的验证拟采用低速离心-薄膜过滤法。首先用低速离心法除去供试品具有抑菌活性的不溶性颗粒、沉淀,再取上清液用薄膜过滤法进行方法学验证。并分别考察了冲洗量为300、400、500 mL时枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌的回收率,最后确定冲洗量为400 mL时,实验组上述3个菌的菌回收率均大于70%,即可达到消除药物成分的抑菌作用,同时稀释剂对照组菌回收率亦均超过70%。确定冠心苏合胶囊采用低速离心-薄膜过滤法,冲洗量为400 mL进行细菌计数;采用常规法进行霉菌和酵母菌计数及控制菌检查。

微生物限度方法学验证试验中所用的标准菌种

的传代次数不得超过5代,并需要定期进行菌种鉴定,以检查菌种是否变异及有无污染,保证验证结果的准确性。

当药品生产条件发生改变时,例如改变药物主要原料的原产地,采收时间、更换辅料或改变生产工艺等,应对原有的微生物限度检查方法进行再验证,从而顺利检出该类药品所污染的各种微生物,提高微生物的检出率,以保证检验方法的准确可靠。

参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志, 第35卷, 第2册 [M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [2] 刘幼君, 苏合香胶测定方法的研究 [J]. 中成药研究, 1986, (11): 35-36.
- [3] 张金艳, 李贻牵, 马 璠, 等. 冠心苏合丸系列组方药物血清对心肌细胞缺氧复氧损伤的影响 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(18): 14-18.
- [4] 王文丽, 马庆惠. 药品微生物限度检查方法的影响因素及对策 [J]. 中国医疗前沿, 2007, 2(17): 90.
- [5] 中国药典 [S]. 二部. 2010.