

## 参蓉健腰酒微生物限度检查方法学的验证

王玉<sup>1</sup>, 毛德法<sup>1</sup>, 秦昆明<sup>1,2</sup>, 蔡宝昌<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京海昌中药集团, 南京 210061;

2. 南京中医药大学国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 南京 210029)

[摘要] 目的: 建立参蓉健腰酒的微生物限度检查方法。方法: 采用薄膜过滤法测定参蓉健腰酒对验证菌株的回收率, 并对控制菌检查法进行验证。结果: 确认此法可以用于参蓉健腰酒的微生物限度检查。在 3 次独立的平行试验中, 5 株试验菌回收率均大于 70%, 符合验证要求。控制菌(大肠埃希菌)采用常规法可检出。结论: 该方法消除了样品的抑菌性, 可用于该品种的微生物限度检查。

[关键词] 参蓉健腰酒; 微生物限度检查; 方法验证

[中图分类号] 284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0198-04

## Verification of Methodology on Microbial Limit Test for Shenrong Jianyaojiu

WANG Yu<sup>1</sup>, MAO De-fa<sup>1</sup>, QIN Kun-ming<sup>1,2</sup>, CAI Bao-chang<sup>1,2\*</sup>

(1. Nanjing Haichang Chinese Medicine Group Cooperation, Nanjing 210061, China;

2. Engineering Research Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

**[Abstract] Objective:** To establish a method for the microbial limit test of Shenrong Jianyaojiu. **Method:** The recovery rates of tested strains treated by Shenrong Jianyaojiu were determined by membrane filtration method. The test method of the control bacteria was verified. **Result:** In the parallel experiment of 3 indendence, 5 tested strains recovery rate all more than 70%. This method can be adopted in bacterial strain control of Shenrong Jianyaojiu. Routine test method can be test for control bacterias( *Escherichia coli* ). **Conclusion:** It can eliminate the antimicrobial properties, and it can be used for the microbial limit test for Shenrong Jianyaojiu.

**[Key words]** Shenrong Jianyaojiu; microbial limit test; validation of the method

作为中药制剂质量标准检查项目内容之一的微生物限度检查是保障药品使用安全的重要工作, 日益受到重视。微生物限度检查系检查非规定灭菌制剂及其原料、辅料受微生物污染程度的方法, 检查项目包括细菌数、霉菌数、酵母菌数及控制菌检查<sup>[1-2]</sup>。对于具有抑菌作用的中药制剂, 由于抑菌活性的干扰, 用常规法检查微生物限度的结果不能真实反映出药品中污染微生物的情况, 为此, 进行药品检验前

必须采用适当的方法消除供试液抑菌活性后<sup>[3-4]</sup>, 再根据《中国药典》规定的方法进行检查。同时, 所采用检测方法需进行验证试验, 以确认供试品的抑菌活性和保证测定方法的可靠性, 从而提高药品本身污染微生物的检出率。

参蓉健腰酒由人参、黄芪、黄精、玉竹、制何首乌、肉苁蓉、狗肾等 15 味中药饮片加工制成, 具有益肾健脾、强壮腰脊、舒经活络的功能, 用于脾肾两虚引起的腰脊酸痛, 两膝无力等症。由于参蓉健腰酒中乙醇具有一定的抑菌活性, 为了保证微生物限度检查结果的准确性, 更好的控制参蓉健腰酒的质量, 根据《中国药典》2010 年版<sup>[5]</sup>的要求, 我们对参蓉健腰酒微生物限度检查方法进行验证。

[收稿日期] 20100829(001)

[第一作者] 王玉, 本科, 工程师, 中药新药开发, Tel: 13851547247, E-mail: wjn0206@163.com

[通讯作者] \* 蔡宝昌, 教授, 博士生导师, 中药质量标准, Tel: 025-86798281, E-mail: bccai@126.com

## 1 仪器与试药

SW-CJ-1FD 净化工作台(苏州苏洁净化设备有限公司); YXQ-LS-100SII 立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司); BS224S 型电子天平(北京多利斯仪器有限公司); BG-160 隔水式培养箱(上海博迅实业有限公司); 电热恒温培养箱 HPX-9162MBE(上海博迅实业有限公司); 101 型电热干燥箱(吴江全顺烘箱制造厂); SPX-250B 型生化培养箱(上海博迅实业有限公司); AMB01832 薄膜过滤器(北京中西远大科技有限公司); 微孔滤膜(直径为 50 mm, 孔径为 0.45  $\mu\text{m}$ )。

枯草芽孢杆菌[CMCC(B) 63501]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B) 26003]、大肠埃希菌[CMCC(B) 44102]、白色念珠菌[CMCC(F) 98001] 和黑曲霉菌[CMCC(F) 98003] 等由江苏省药品检验所提供。

参蓉健腰酒由海昌中药集团提供(规格 500 mL/瓶, 批号 081218, 081220, 081223)。

玫瑰红钠琼脂培养基(100117)、营养肉汤培养基(091128)、营养琼脂培养基(091222)、改良马丁培养基(091203)、改良马丁培养基(091203) 等均由江苏省药品检验所提供。pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液和 0.9% 无菌氯化钠溶液均按《中国药典》2010 年版一部附录方法配制。

## 2 方法

### 2.1 菌液制备

**2.1.1 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌菌悬液的制备** 分别接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的新鲜斜面培养物 1 白金耳至 10 mL 营养肉汤培养基中, 在 35  $^{\circ}\text{C}$  中培养 18 ~24 h。然后取上述新鲜培养物 1 mL, 加入 9 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液中, 10 倍稀释至细菌数约为 50 ~100 cfu·mL<sup>-1</sup> 的菌悬液, 备用。

**2.1.2 白色念珠菌、黑曲霉菌悬液的制备** 取白色念珠菌的新鲜斜面培养物 1 白金耳接种至 10 mL 改良马丁培养基中, 25  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 ~48 h。然后取上述培养物 1 mL, 加入到 0.9% 无菌氯化钠溶液 9 mL 中, 混匀, 10 倍稀释至细菌数约为 50 ~100 cfu·mL<sup>-1</sup> 的菌悬液, 备用。

接种黑曲霉的新鲜培养物于改良马丁琼脂斜面培养基上, 25  $^{\circ}\text{C}$  培养 5 ~7 d 至大量孢子产生, 加 0.9% 无菌氯化钠溶液 10 mL 将孢子洗脱, 吸出孢子悬液, 加入蒙有灭菌纱布的无菌试管中。取此孢子

悬液 1 mL, 加入到 0.9% 无菌氯化钠溶液 9 mL 中, 10 倍稀释至约为 50 ~100 cfu·mL<sup>-1</sup> 的菌悬液, 备用。

**2.2 供试液的制备** 开启净化台 30 min, 超净台中操作, 精密量取参蓉健腰酒 10 mL, 置于无菌锥形瓶中, 加入灭菌后恒温至 45  $^{\circ}\text{C}$  的 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL, 摇匀, 火焰灭菌瓶口并加塞, 得到供试液, 备用。

### 2.3 细菌、霉菌、酵母菌计数方法验证

**2.3.1 试验组** 取 2.2 项下供试液 1 mL, 以无菌操作加入过滤器内, 用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液, 冲洗滤膜 3 次, 每次 100 mL, 在最后 1 次的冲洗液中分别加入上述的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、白色念珠菌、黑曲霉菌菌液(50 ~100 cfu·mL<sup>-1</sup>) 各 1 mL, 平行 2 张滤膜, 过滤后, 取滤膜, 将其菌面朝上贴于相应培养基上培养, 按菌落计数方法测定菌落数。

**2.3.2 菌液组** 分别取大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌与枯草芽孢杆菌菌液 1 mL 注入平皿中, 并立即倾注营养琼脂培养基, 平行制备 2 个平皿, 置 35 ~36  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h; 白色念珠菌、黑曲霉分别取 1 mL 菌液分别注入平皿中, 并立即倾注玫瑰红钠琼脂培养基, 平行制备 2 个平皿, 置 24 ~25  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h, 测定加入的试验菌数。

**2.3.3 供试品对照组** 取 2.2 项下供试液 1 mL, 以无菌操作加入过滤器内, 用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液, 冲洗滤膜 3 次, 每次 100 mL。平行 2 张滤膜, 过滤后, 取出滤膜, 菌面朝上贴于琼脂培养基平板上培养。细菌、霉菌及酵母菌各制备 2 个平皿, 测定供试品本底菌数。

**2.3.4 稀释剂对照组** 取 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液 300 mL, 以无菌操作加入过滤器内, 每次 100 mL, 在最后 1 次的冲洗液中分别加入上述的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、白色念珠菌、黑曲霉菌菌液(50 ~100 cfu·mL<sup>-1</sup>) 各 1 mL, 平行 2 张滤膜, 过滤后, 取滤膜, 将其菌面朝上贴于相应培养基上培养, 按菌落计数方法测定菌落数。

**2.3.5 回收率计算** 试验菌的回收率是计数方法验证的判断指标。

试验组菌回收率 = (试验组平均菌落数 - 供试品平均菌落数) / 菌液组平均菌落数  $\times 100\%$ 。

稀释剂对照组的菌回收率 = 稀释剂对照组平均菌落数 / 菌液组平均菌落数  $\times 100\%$

## 2.4 控制菌检查方法学验证(大肠埃希菌检查)

**2.4.1 试验组** 取 2.2 项下供试液各 10 mL, 以无菌操作加入过滤器内, 用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液, 冲洗滤膜 3 次, 每次 100 mL, 在最后 1 次的冲洗液中加入 1 mL 大肠埃希菌悬液(50 ~100 cfu·mL<sup>-1</sup>), 平行 2 张滤膜, 过滤后, 取滤膜, 接入胆盐乳糖培养基 100 mL 中, 培养 18 ~24 h。

**2.4.2 阴性菌对照组** 取稀释液 300 mL, 以无菌操作加入过滤器内, 平行 2 张滤膜, 过滤后, 取滤膜, 接入胆盐乳糖培养基 100 mL 中, 培养 18 ~24 h。

**2.4.3 供试品对照组** 取 2.2 项下供试液各 10 mL, 以无菌操作加入过滤器内, 用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液, 冲洗滤膜 3 次, 每次 100 mL, 平行 2 张滤膜, 过滤后, 取滤膜, 接入胆盐乳糖培养基 100 mL 中, 培养 18 ~24 h。

**2.4.4 控制菌检查** 取上述培养液各 0.2 mL, 分

别接种至 5 mL 甲基伞形酮葡萄糖酸苷 (MUG) 培养基管内培养, 分别于 5 h 与 24 h, 置 366 nm 紫外光下观察, 同时用未接种的 MUG 培养基作本底对照。若管内培养物呈现荧光, 为 MUG 阳性; 不呈现荧光, 为 MUG 阴性。观察后沿培养管的管壁加入靛基质试液数滴, 液面呈玫瑰红色, 为靛基质阳性; 呈试剂本色, 为靛基质阴性, 本底对照应为阴性。

### 3 结果

**3.1 细菌、霉菌及酵母菌计数方法验证(表 1)** 按照 2.3 项下细菌、霉菌、酵母菌计数方法试验。由表 1 可见, 薄膜过滤法在独立 3 次试验中, 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、枯草芽孢杆菌和黑曲霉菌的回收率均达 70% 以上, 说明该方法适合于参蓉健腰酒的细菌、霉菌及酵母菌计数。

表 1 菌落计数及回收率测定(薄膜过滤法, n = 2) (̄±s)

| 试验菌     | 样品批号   | 菌液组菌落数 /cfu | 供试品对照组菌落数 /cfu | 试验组菌落数 /cfu | 稀释剂对照组菌落数 /cfu | 试验组菌回收率 /% | 稀释剂对照组菌回收率 /% |
|---------|--------|-------------|----------------|-------------|----------------|------------|---------------|
| 大肠埃希菌   | 081218 | 96          | 0              | 82          | 93             | 85         | 96            |
|         | 081220 | 96          | 0              | 82          | 93             | 85         | 96            |
|         | 081223 | 89          | 0              | 79          | 77             | 89         | 87            |
| 金黄色葡萄球菌 | 081218 | 90          | 0              | 77          | 84             | 86         | 93            |
|         | 081220 | 102         | 0              | 85          | 92             | 83         | 90            |
|         | 081223 | 96          | 0              | 83          | 84             | 86         | 87            |
| 枯草芽孢杆菌  | 081218 | 95          | 0              | 81          | 91             | 85         | 96            |
|         | 081220 | 98          | 0              | 88          | 89             | 90         | 91            |
|         | 081223 | 97          | 0              | 79          | 82             | 81         | 85            |
| 白色念珠菌   | 081218 | 84          | 0              | 76          | 80             | 89         | 95            |
|         | 081220 | 86          | 0              | 80          | 76             | 93         | 88            |
|         | 081223 | 89          | 0              | 82          | 85             | 92         | 95            |
| 黑曲霉菌    | 081218 | 87          | 0              | 71          | 85             | 82         | 98            |
|         | 081220 | 95          | 0              | 83          | 87             | 87         | 92            |
|         | 081223 | 100         | 0              | 82          | 80             | 82         | 80            |

### 3.2 控制菌检查方法验证结果

按照 2.4 项下控制菌检查方法进行试验, 3 批样品大肠埃希菌试验组均可检出试验菌, 阴性组均无菌生长, 阴性菌对照组均无生长, 结果见表 2。

试验结果发现试验组均检出试验菌, 而阴性菌对照组未检出, 说明按此供试液制备法和控制菌检查法可以进行参蓉健腰酒的控制菌检查, 故可按常规法进行控制菌检查。

表 2 参蓉健腰酒控制菌验证

| 控制菌   | 批号     | 试验组 | 阴性菌对照组 | 供试品组 |
|-------|--------|-----|--------|------|
| 大肠埃希菌 | 081218 | 阳性  | 阴性     | 阴性   |
|       | 081220 | 阳性  | 阴性     | 阴性   |
|       | 081223 | 阳性  | 阴性     | 阴性   |

### 4 讨论

由于参蓉健腰酒中主要成分乙醇有抑菌作用,

因此在检验时应排除其抑制作用,使之不干扰染菌限度检查,结果方属有效。实验结果显示:采用薄膜过滤法能很好地消除参蓉健腰酒中乙醇的抑菌作用,排除干扰,结果准确可靠。参蓉健腰酒是溶液型的中药制剂,能完全溶解于稀释液,在进行薄膜过滤之前不必采用离心等操作步骤,操作简便,快速。采用薄膜过滤法进行验证时,由于对供试品进行了特殊方法处理,必须设立稀释剂对照组,该组试验除了评价供试液制备方法对微生物影响的程度,还可以综合评价滤器内壁吸附作用、冲洗过程损伤及滤膜毒性对试验菌回收率的影响。

本试验所采用的灭菌柜、洁净室空气净化系统、培养箱等均应按相应要求先行验证并符合规定。验证试验所用菌株传代次数不得超过 5 代,试验菌液要保存在 2 ~8 的冰箱内,可在 1 周内使用,但要求在每次接种时须重新计数,以保证稀释菌液的准确浓度。菌种处理和微生物鉴别必须与其他的微生物检查用洁净室严格分开,并保持相对负压。每次试验结束后要对洁净室层流台及整个实验室环境消毒。人员离开后,打开臭氧消毒。所有与菌种相关

的试验废弃物均应经过灭菌处理后方可丢弃。

通过对参蓉健腰酒进行细菌、霉菌及酵母菌计数方法及控制菌检查的验证研究,结果发现采用薄膜过滤法对 5 种试验菌的回收率均高于 70%,说明薄膜过滤法可用于参蓉健腰酒的微生物限度检查;控制菌检查可使用常规法进行检查。

#### [参考文献]

- [1] 耿敬军,张俊.药品微生物检查验证试验现状调查与建议[J].中国药房,2006,17(21):1652.
- [2] 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):1813.
- [3] 张玉兰,洪建文,罗翰宇.复方丹参片微生物限度检查方法的建立[J].中药材,2005,28(8):827.
- [4] 陈建启,刘炳茹,谢梅娟.清感九味丸微生物限度检查的方法验证[J].中国民族医药杂志,2008,14(1):13.
- [5] 中国药典.一部[S].2010:附录 XIII C.

[责任编辑 邹晓翠]