

9 种医院中药制剂微生物限度检查方法的建立

李晓东¹, 李娟², 郭朝晖³, 姜华^{1*}

(1. 甘肃省中医药研究院, 兰州 730050; 2. 甘肃省人民医院, 兰州 730000;
3. 甘肃省药品检验所, 兰州 730000)

[摘要] 目的: 建立益肾健骨丸等 9 种医院中药制剂微生物限度检查法。方法: 测定 9 种医院中药制剂对 5 种验证菌株的回收率, 并对控制菌的检查法进行验证。结果: 健胃消胀合剂、健胃止痛合剂、补肺益寿合剂 I 号和补肺益寿合剂 号 4 种供试品试验菌的回收率试验均高于 70%, 证明无抑菌现象; 制萎扶胃丸和运脾颗粒有一定程度的抑菌作用, 但可通过稀释法消除抑菌作用; 益肾健骨丸、杜仲腰痛丸和祛风颗粒的抑菌作用强, 必须采用薄膜过滤法才能彻底消除其抑菌作用。结论: 健胃消胀合剂、健胃止痛合剂、补肺益寿合剂 号和补肺益寿合剂 号可按常规方法进行微生物限度检查; 制萎扶胃丸和运脾颗粒按培养基稀释法进行微生物限度检查; 益肾健骨丸、杜仲腰痛丸和祛风颗粒则按薄膜过滤法进行微生物限度检查。

[关键词] 医院中药制剂; 微生物限度检查法; 方法验证

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)05-0199-03

医院中药制剂是由多味药材组成的复方制剂, 其中很多单味药材具有清热解毒、消痈消肿作用, 即可能具有抑菌活性, 那么对有抑菌作用的医院中药制剂按常规法做微生物限度检查, 药品中污染的微生物生长可能被抑制, 就会影响试验结果的可靠性, 所以对有抑菌作用的医院中药制剂做微生物限度检查时, 必须采用适当的方法, 对含抑菌成分的供试品消除抑菌活性后, 微生物限度检查结果才能反映出药品的真实污染情况。要判断检查方法的正确性和可行性, 必须对所采用的检验方法进行方法验证。本文对益肾健骨丸等 9 种医院中药制剂建立了相应的微生物限度检查方法, 根据制剂中成分的抑菌作用强度不同, 采用了常规法、培养基稀释法和薄膜过滤法进行了方法验证, 确立了各自可行的微生物限度检查法, 为规范医院中药制剂的微生物限度检查法提供科学依据^[1]。

1 材料

1.1 仪器 HTY-2000 集菌仪, 反复使用集菌培养器(杭州泰林医疗器械有限公司)。

1.2 菌种 大肠埃希菌 [CMCC(B) 44102]、枯草芽孢杆菌 [CMCC(B) 63501]、金黄色葡萄球菌 [CMCC(B) 26003]、白色念珠菌 [CMCC(F) 98

001], 黑曲霉菌 [CMCC(F) 9003], 由中国生物制品检定所提供。

1.3 培养基 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液、营养肉汤培养基、改良马丁培养基、营养琼脂培养基、改良马丁琼脂培养基、玫瑰红钠琼脂培养基、胆盐乳糖增菌液、曙红亚甲蓝琼脂培养基均由中国药品生物制品检定所提供。

1.4 样品 益肾健骨丸(批号 20080906, 20081026, 20081127), 杜仲腰痛丸(批号 20080918, 20080820, 20081127), 制萎扶胃丸(批号 20081127, 20081021, 20080917), 健胃消胀合剂(批号 20081125, 20081027, 20080610), 健胃止痛合剂(批号 20080306, 20080901, 2008111), 补肺益寿合剂 I 号(批号 20080813, 20080702, 20081126), 补肺益寿合剂 号(批号 20080701, 20080828, 20081110), 祛风颗粒(批号 20080825, 20080423, 20080219), 运脾颗粒(批号 20080909, 20080301, 20080605), 均由甘肃省中医院药剂科提供。

2 方法

2.1 菌液的制备 接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中, 置 35℃ 培养 20 h; 接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中 25℃ 培养 24 h, 然后分别用 0.9% 无菌氯化钠溶液 10 倍递增稀释, 制成 50~100 cfu/mL 的悬液; 接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁培养基中培养 5~7 d, 加入 3~5 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液, 将孢子洗脱, 吸出孢子悬液至无菌试管

[收稿日期] 2009-10-15

[通讯作者] 姜华, Tel: (0931) 2687224, E-mail: Huajiang931@sina.com

中,用 0.9% 无菌氯化钠溶液 10 倍递增稀释,制成 50 ~100 cfu · mL⁻¹ 的孢子悬液,备用。

2.2 供试液的制备 固体制剂称取样品 10 g,加至 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL 中,置 45 ℃ 水浴振荡,乳钵研磨使溶解、混匀,制成 1 : 10 均匀的供试液;合剂取原液 10 mL,加至 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 90 mL 中,使样品完全分散均匀,作为 1 : 10 供试液,备用。

2.3 细菌、霉菌和酵母菌计数法回收率的测定

2.3.1 试验组 常规法,取 1 mL 1 : 10 供试液和 50 ~100 cfu 菌液注入 1 个平皿中,迅速倒入 15 ~20 mL 45 ℃ 左右的琼脂培养基,每个菌株制备 2 个平皿。培养基稀释法,方法与常规法相同,供试液改为 0.2 mL/皿。薄膜过滤法,取规定量的 1 : 10 供试液,按薄膜过滤法处理,用 45 ℃ 0.1% 蛋白胨无菌水溶液冲洗 3 次,每次 100 mL(在最后 1 次的冲洗液中加入试验菌 50 ~100 个)。取出滤膜,菌面朝上贴于相应的培养基平板上,做菌落计数。每株试验菌至少制备 1 个膜。以上 3 种方法制备的平皿,细菌在 35 ℃ 培养 48 h,霉菌在 25 ℃ 培养 72 h,计数,取平均值。

2.3.2 菌液组 测定加入的每 1 种试验菌数。

2.3.3 供试品对照组 按试验组的方法,不加菌液,测定供试品本底菌数。

2.3.4 计算回收率 回收率(%) = (试验组菌数 - 供试品组菌数) / 菌液组菌数 × 100%,《中国药典》2005 年版规定对各试验菌株的回收率均不得低于 70%。

3 结果

3.1 用常规法测定 9 种医院中药制剂细菌回收率 结果详见表 1。

从表 1 可见,益肾健骨丸、杜仲腰痛丸、制萎扶胃丸、祛风颗粒和运脾颗粒 5 种制剂用常规法,枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的回收率均在 70% 以下,说明 5 种制剂对 3 种菌均有较强的抑制作用,对白色念珠菌及黑曲霉无抑制作用。采用培养基稀释法测定 3 种抑菌菌株的回收率,结果详见表 2。

3.2 培养基稀释法测定 5 种制剂细菌回收率 从表 2 可见,采用 0.2 mL/皿供试液的培养基稀释法,益肾健骨丸、杜仲腰痛丸和祛风颗粒 3 种制剂对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的回收率仍低于

70%。根据样品在稀释剂中的溶解情况,选择薄膜过滤法对样品进行灭活处理,并对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌回收率试验进行验证。

表 1 常规法测定 9 种医院中药制剂
对各试验菌株的回收率/%

样品	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	白色念珠菌	黑曲霉
益肾健骨丸	66	65	67	95	96
杜仲腰痛丸	60	65	69	93	95
制萎扶胃丸	67	64	68	97	98
健胃消胀合剂	80	85	85	96	95
健胃止痛合剂	82	84	90	94	96
补肺益寿合剂 号	86	88	91	95	99
补肺益寿合剂 号	83	82	89	96	98
祛风颗粒	56	61	64	93	97
运脾颗粒	61	65	69	94	97

表 2 培养基稀释法对 3 个细菌菌株的
回收率(%, 0.2 mL/皿)

样品	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌
益肾健骨丸	65	67	92
杜仲腰痛丸	61	65	97
制萎扶胃丸	87	87	96
祛风颗粒	62	65	94
运脾颗粒	86	88	95

3.3 薄膜过滤法测定 3 种制剂细菌回收率 薄膜过滤法测定益肾健骨丸、杜仲腰痛丸和祛风颗粒 3 种制剂对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的回收率均达 100%,表明可用于上述 3 种制剂的微生物限度检查。

3.4 控制菌检查的方法验证^[11]

3.4.1 试验组 取规定量的供试液及 10 ~100 cfu 大肠埃希菌加入相应的增菌培养基中,依相应控制菌检查法检查。

3.4.2 阴性对照组 操作同试验组,试验菌改为 10 ~100 cfu 金黄色葡萄球菌。结果阴性对照菌组均未检出金黄色葡萄球菌,试验组均检出试验菌,方法成立。

3.5 微生物限度检查方法的确定

3.5.1 细菌计数法 通过验证,采用薄膜过滤法对样品进行灭活处理,能使被抑制最强的枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的回收率达到要求,说明在此试验条件下,样品中污染的各类细菌均能顺利检出,因