

中风复元口服液微生物限度检查法验证

★ 谭梅英* 张诚光 范宋玲 (广东省第二中医院 广州 510095)

摘要:目的:建立中风复元口服液的微生物限度检查方法。方法:测定中风复元口服液对5种试验菌的回收率,确定最适宜的检测方法,同时对控制菌检查方法进行验证。结果:采用常规方法检查并测定细菌、霉菌及酵母菌的菌回收率均大于70%,控制菌检查中,各阳性试验菌均检出,阴性对照无菌生长。结论:使常规方法可以验证中风复元口服液在试验条件下的抑菌作用并检测该品种所污染的各种微生物,为中风复元口服液的微生物限度检查提供了方法和依据。

关键词:中风复元口服液;微生物限度检查;方法学验证

中图分类号:R 927.11 文献标识码:B

Validation of microbial limit tests of oral liquid of stroke restoration

TAN Mei-ying, ZHANG Cheng-guang, FAN Song-ling

Guangdong Provincial the 2nd Hospital of T. C. M., Guangdong Guangzhou 510095, China

Abstract: Objective: To establish a method of microbial limit test for stroke restoration. Methods To determine the optimum method for microbial limit of oral liquid of stroke restoration by the recovery rate of the five kinds of microbial tests, as well as validating the method for control bacteria. Results: The rate of recovery of bacteria, mildew and yeast was over 70 percent and in the test of control bacteria, the bacteria of the positive test was detected, meanwhile the bacteria of negative test was not. Conclusion: Using the conventional method could validate the antimicrobial effect for oral liquid of stroke restoration and detect the various microorganism from different pollution. The method provided a scientific method and basis for the detecting microorganism of oral liquid of stroke restoration.

Key words: oral liquid of stroke restoration; microbial limit test; validation of method

微生物限度检查法检查项目包括细菌数、霉菌数、酵母菌数和控制菌检查,是测定制剂受微生物污染程度的有效方法。在进行微生物检查时必须先消除供试品中的抑菌活性,再根据要求进行检查和方法学验证,保证检查方法的准确性和可靠性。

中风复元口服液是我院多年用于治疗中风后遗症不断筛选和总结而成的经验方,主要成分为黄芪、赤芍、当归、制何首乌、桃仁、瓜蒌子、半夏、陈皮、莱菔子、石菖蒲,具有补气活血,化痰通腑的功效,临床主要用于中风恢复期、后遗症期;中风后肩手综合症,中风后便秘等。中风复元口服液疗效显著,深受患者欢迎。为有效控制药品的质量,保证微生物限度检查方法的科学性和检验结果的准确性,笔者根据《中国药典》2010年版^[1]附录微生物限度检查的新要求,对中风复元口服液进行了微生物限度检查的方法学验证,为更好保证中风复元口服液的质量和疗效提供保证和依据。

1 材料

1.1 仪器

SPX-250BS-II生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);MJ-250BS-II霉菌培养箱(上海新

苗医疗器械制造有限公司);ZHJH-C1214C智能型垂直流超净工作台(杭州汇尔仪器设备有限公司)。

1.2 样品

中风复元口服液(批号101101,101102,101103),广东省第二中医院自制,规格:10 mL。

1.3 培养基

营养琼脂培养基(批号101011);胆盐乳糖培养基(批号100925);营养肉汤培养基(批号101013);玫瑰红钠琼脂培养基(批号100830);曙红亚甲蓝琼脂培养基(批号100917)。

1.4 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B)26003];大肠埃希菌(*Escherichia Coli*) [CMCC(B)44102];枯草芽孢杆菌(*Bacillus Sulticis*) [CMCC(B)63501];白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F)98001];黑曲霉菌(*Aspeigillus niger*) [CMCC(F)98003];以上均来源于中国医学细菌保藏中心。

2 细菌、霉菌及酵母菌计数方法的验证^[2]

2.1 菌液的制备

分别接种金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus au-*

* 通讯作者:谭梅英,女,本科,主管中药师,E-mail:plumying@163.com.

reus) [CMCC (B) 26003]、大肠埃希菌 (*Escherichia Coli*) [CMCC (B) 44102] 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus Sulticis*) [CMCC (B) 63501] 至肉汤培养基,经 35℃ 培养 24 h,取其培养物,用 0.9% 的无菌氯化钠溶液按 10 倍稀释至 50 ~ 100 CFU · mL⁻¹ 的菌悬液,备用。

接种白色念珠菌 (*Candida albicans*) [CMCC (F) 98001] 至改良马丁培养基,经 25℃ 培养 24 h,取其培养物,用 0.9% 的无菌氯化钠溶液按 10 倍稀释至 50 ~ 100 CFU · mL⁻¹ 的菌悬液,备用。

取经 20℃ 培养一周的黑曲霉菌 (*Aspeigillus niger*) [CMCC (F) 98003] 斜面培养物,加 0.9% 的无菌氯化钠溶液 3 ~ 5 mL,洗下霉菌孢子,用带有棉花的球形吸管取出孢子菌液,用标准比浊管比浊后,加入 0.9% 的无菌氯化钠溶液稀释为 50 ~ 100 CFU · mL⁻¹ 的孢子悬液,做活菌计数,备用。

2.2 供试液的制备

取中风复元口服液 10 mL,加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL,用匀浆仪搅拌,混匀,制成 1: 10 供试液,备用。

2.3 常规法回收率的测定

2.3.1 供试品对照组 取规定量供试液 1 mL,注入平皿,按中国药典 2010 年版培养及菌落计数方法测定供试品本底菌数。

2.3.2 试验组 取供试液 1 mL 和试验菌液 1 mL (约 50 ~ 100 CFU 试验菌),分别注入平皿中,立即倾注琼脂培养基,平行置备两个平皿,按中国药典 2010 年版培养及菌落计数方法测量其菌落数。

2.3.3 菌液组 取试验菌液 1 mL (约 50 ~ 100 CFU 试验菌) 注入平皿中,立即倾注琼脂培养基,平行置备两个平皿,按中国药典 2010 年版培养及菌落计数方法测定试验中加入的活菌数。

2.3.4 回收率结果 计算公式如下:试验组回收率 = $\frac{\text{试验组菌落数}-\text{供试品组菌落数}}{\text{菌液组菌落数}}$,要求规定回收率

不低于 70%。平均回收率结果见表 1。

表 1 三批样品细菌、霉菌及酵母菌方法验证的平均回收率 (%)

供试品批号	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉菌	大肠埃希菌
101101	86	94	88	97	83
101102	90	89	87	96	81
101103	88	93	91	93	85

从表 1 结果可以看出:采用常规方法检验中风复元口服液对 5 株代表菌株的抑菌活性,结果表明供试品 5 种菌回收率试验均大于 70%,表明本品无明显抑菌作用,可用常规方法进行微生物限度检查。

3 控制菌检查方法的验证^[3]

3.1 试验组

取 1: 10 供试液 1 mL 加入到 120 mL 的胆盐乳

糖培养基中,再加入 50 ~ 100 CFU 大肠埃希菌,按中国药典 2010 年版一部微生物限度检查项下大肠埃希菌检查法进行检查,试验结果见表 2。

3.2 阴性菌对照组

取 1: 10 供试液 1 mL 加入到 120 mL 胆盐乳糖培养基中,再加入 50 ~ 100 CFU 的金黄色葡萄球菌,按与试验组相同的方法进行试验,试验结果见表 2。

3.3 供试品对照组

取 1: 10 供试液 1 mL,按与试验组相同的检查法进行检查,试验结果见表 2。

表 2 控制菌检查方法验证结果

供试品批号	试验组	阴性菌对照组	供试品对照组
101101	+	-	-
101102	+	-	-
101103	+	-	-

“+”表示检出;“-”表示未检出。

由表 2 可见,中风复元口服液对大肠埃希菌没有抑制作用,可采用常规法进行检验。

4 成品微生物限度检查

取中风复元口服液供试品三批,按《中国药典》微生物限度检查法项下常规方法进行有关微生物检查。检验结果见表 3。

表 3 三批中风复元口服液微生物检查结果

批号	细菌数 CFU · mL ⁻¹	霉菌、酵母菌 数 CFU · mL ⁻¹	大肠埃希菌	活螨
101101	10	< 10	-	-
101102	9	< 10	-	-
101103	9	< 10	-	-

“-”表示未检出。

由上表试验结果可以看出中风复元口服液微生物检查结果均符合口服给药制剂微生物限度标准。

5 结论

采用常规法对中风复元口服液进行细菌数、霉菌及酵母菌数的测定,大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌,白色念珠菌和黑曲霉的回收率试验均高于 70%,在中风复元口服液对抑菌活性没有影响的前提下进行控制菌检查,结果均表明中风复元口服液无明显抑菌活性,可采用直接取样按常规方法进行细菌数、霉菌及酵母菌数和控制菌大肠埃希菌的检查。通过三批样品微生物限度试验表明中风复元口服液达到了口服给药制剂的标准。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典. 一部[S]. 2010:附录:79 - 88, 138
- [2] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 87 - 105
- [3] 张晔. 牛黄上清片微生物限度检查方法验证[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(6): 17 - 18.

(收稿日期: 2012-01-15)