

乙肝转阴散微生物限度检查方法验证研究

吕建伟,唐勇琛,潘革卉(广西壮族自治区柳州市中医院药学部 545001)

【摘要】 目的 探讨乙肝转阴散的微生物限度分析和检查方法的有效性。**方法** 选择 5 种菌为阳性对照,采用平皿计数法,采用回收率试验对细菌、丝状真菌及酵母菌计数方法的回收率进行验证;采用相同的实验条件,观察大肠埃希菌、大肠菌群、沙门菌在试验组、阳性对照组和阴性对照组的检出情况验证控制菌检查方法。**结果** 经方法学验证试验得出,乙肝转阴散有抑菌作用,其微生物限度检查计数方法采用培养基稀释法,控制菌检查采用常规法。**结论** 验证后的微生物限度检查方法简便可行、准确无误,适合于乙肝转阴散的微生物限度检查。

【关键词】 乙肝转阴散; 微生物限度检查; 方法学验证

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.24.029 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)24-3310-02

Study on the Method of Microbial Limit Test for Yiganzhuanyin powders LV Jian-wei, TANG Yong-chen, PAN Ge-hui (the Traditional Medical Hospital of Liuzhou, Guangxi 545001, China)

【Abstract】 Objective To establish an examination method for microbial limit determination of Yiganzhuanyin powders. **Methods** Plate counting method was used. The method of counting bacteria and mould was validated by the recovery rates with 5 control trains. The method of checking control bacteria was validated by observing cultivation of Escherichia coli, coliform group and salmonella in the test group, positive control group and negative control group under the same environment. **Results** The results of validation test showed that Yiganzhuanyin powders had antibacterial activity. The culture media dilution method was used as the counting methods for the bacteria detection can be carried out by the conventional examination method. **Conclusion** The method was simple, feasible, reliable and could be used for the examination of microbacteria limit.

【Key words】 Yiganzhuanyin powders; examination of microbacteria limit; method validation

为确保微生物限度检查方法的可靠性和准确性,《中国药典》2010 版规定对微生物限度检查方法需进行方法学验证。目前,《中国药典》未收载具体药品的微生物限度检查方法,因而绝大多数药品均要进行验证试验后再建立适宜的微生物限度检查方法。乙肝转阴散具有扶正祛毒,活血软肝,健脾补肾,调节免疫等功能,可抑制乙肝病毒(HBV)复制,促进 HBV 表面抗原(HBsAg)、HBV e 抗原(HBeAg)及 HBV-DNA 转阴,改善和恢复肝脏功能,防止肝纤维化,主治急慢性乙肝及 HBV 携带者。为了较全面地反映乙肝转阴散的整体质量,确保用药安全,本文对其微生物限度检查方法进行验证和总结,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要设备 丝状真菌培养箱(MG-100B-Z 型,上海博讯实业有限公司医疗设备厂);恒温培养箱(PYX-DHS 型,上海市跃进医疗器械一厂);压力蒸汽灭菌器(MMQ-JD 型,山东中泰医疗器械股份有限公司);超净工作站(SW-CJ-1F 型,苏州安泰空气技术公司)。

1.2 主要培养基 玫瑰红琼脂培养基(批号:091013);营养琼脂培养基(批号:091016);胆盐乳糖培养基(批号:080730);改良马丁培养基(批号:090521);营养肉汤培养基(批号:050623);蛋白胨(批号:090608);四硫磺酸钠亮绿培养基(批号:090320);胆盐琼脂培养基(批号:090116);曙红亚甲蓝琼脂培养基(批号:090908)。上述培养基均由广西食品药品检验所生产。MUG 培养基(批号:20090327,青岛高科园海博生物技术有限公司)。

1.3 主要菌株 金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003、大肠埃希菌 CMCC(B)44102、黑丝状真菌 CMCC(F)98003、白色念珠菌

CMCC(F)98001、枯草芽孢杆菌 CMCC(B)63501、沙门菌 CMCC(B)50094 均购自广西食品药品检验所。

1.4 样品 乙肝转阴散(柳州市中医院药学部制剂室,批号:20111008、20120210、20120613)。

1.5 方法

1.5.1 菌液制备 制备新鲜营养肉汤培养基,并将含有大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的培养物置于肉汤培养基中,在 30~35℃ 条件下,孵化培养 18~24 h^[1]。在改良马丁培养基中置入预先接种有白色念珠菌的培养物,在 23~28℃ 条件下,孵化培养 24~48 h。孵化培养完毕后,以 0.9% 无菌氯化钠溶液连同上述培养物制备菌悬液,要求:50~100 cfu/mL^[2]。将改良马丁培养基斜面内接种黑曲霉的新鲜培养物,孵化培养 5~7 d 后加入 0.9% 无菌氯化钠溶液 5 mL,内含 0.05% 的聚山梨酯,洗脱并吸出孢子悬液,以制备好的 0.9% 无菌氯化钠溶液制备成含孢子悬液,要求:孢子数 50~100 cfu/mL^[3]。

1.5.2 供试液制备 将 3 个批次乙肝转阴散混匀,并准确称量 10 g,加入 pH 为 7.0 的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中,定容至 100 mL,以 3 000 r/min 混匀 3 min^[4]。

1.5.3 方法验证 (1) 试验组。① 常规计数法:将 50~100 cfu 试验菌及 1 mL 供试液分别加入灭菌平皿中,并在 45℃ 条件下迅速转移至 20 mL 培养基中,平行制备 2 皿,待凝^[5-6]。细菌培养:在 30~35℃ 条件下,以琼脂培养基培养 3 d;丝状真菌和酵母菌培养:在 23~28℃ 培养箱中,以玫瑰红琼脂培养基 5 d^[7]。② 培养基稀释法:将 50~100 cfu 试验菌及 0.2 mL 供试液分别加入灭菌平皿中,转移、培养条件和时间与常规计数法相同。(2) 菌液组。平行制备 2 皿,并测定加入的试验菌

数,取均值。(3) 乙肝转阴散对照组。按试验组方法,不加菌悬液,测定乙肝转阴散菌数(本底菌数)。

1.5.4 控制菌检查法的验证^[2] (1) 大肠埃希菌常规法。① 试验组:取 1 mL 大肠埃希菌菌液及 10 mL 上述供试液,加入 100 mL 胆盐乳糖培养基中,在 30~35 ℃ 条件下孵化培养 24 h^[8]。② 阴性对照组:在 100 mL 胆盐乳糖培养基中加入 10 mL 稀释液,并在 30~35 ℃ 条件下孵化培养 24 h,取 0.2 mL 上述培养物,直接接种至含有 5 mL MUG 培养基的试管内培养,并分别于 5 h 和 24 h 在 366 nm 紫外灯下进行观察,以未接种的 MUG 培养基作为对照^[9]。(2) 大肠菌群常规法。① 试验组:取乙肝转阴散 10 g,加 pH 为 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓液至 100 mL,再加入大肠埃希菌 10~100 cfu,混匀,得 1:10 供试液加菌悬液即溶液 I (含供试品 0.1 g),取溶液 I 1 mL 加入到 9 mL pH 为 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中,混匀,得溶液 II (含乙肝转阴散 0.01 g),再取溶液 II 1 mL 加入到 9 mL pH 为 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中,混匀,得溶液 III (含乙肝转阴散 0.001 g)。取含 10 mL 胆盐乳糖发酵培养基管 3 支,分别加入溶液 I 1 mL、溶液 II 1 mL、溶液 III 1 mL。② 阴性对照组:另取 1 支 10 mL 胆盐乳糖发酵培养基管加入稀释液 1 mL 即得。培养 24 h,观察胆盐乳糖发酵管结果发现,试验组胆盐乳糖发酵培养基管(含溶液 I 1 mL)检出大肠菌群,胆盐乳糖发酵培养基管(含溶液 II 1 mL)、胆盐乳糖发酵培养基管(含溶液 III 1 mL)和阴性对照组均未检出。(3) 沙门菌常规法。① 试验组:取营养肉汤培养基 200 mL,加入乙肝转阴散 10 g 和沙门菌 10~100 cfu,混匀,即得。② 阴性对照组:取营养肉汤培养基 200 mL,加稀释液 10 mL 即得。培养 18~24 h。取 1 mL 上述培养物,直接接种于 10 mL 四硫磺酸钠亮绿培养基中,孵化培养 18~24 h,划线法接种于曙红亚甲蓝琼脂培养基和胆盐硫琼脂培养基上,孵化培养 24 h 后观察。结果发现试验组检出沙门菌,阴性对照未检出。

1.5.5 回收率测定 用常规法测定乙肝转阴散对 5 种试验菌株的回收率,平行测定 3 次。测定方法:以离心沉淀集菌+培养基稀释+中和法联合应用的方法,每种菌株做 2 次,菌株培养时间与常规计数法相同。

2 结 果

2.1 试验菌株回收率 用常规法测定乙肝转阴散对 5 种试验菌株的回收率,平行测定 3 次,大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢菌、白色念珠菌和黑曲菌的平均回收率分别为(65.7±4.5)%、(63.0±4.0)%、(79.3±2.1)%、(62.7±5.5)%和(85.0±2.7)%。乙肝转阴散对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的回收率低于 70.0%,证明乙肝转阴散对这些菌株有抑制作用,不能用常规法进行微生物限度检查。以培养基稀释法对上述检查中存在抑菌效果的乙肝转阴散中微生物限度进行测定,结果表明大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的回收率分别为(79.0±4.6)%、(81.0±4.6)%和(80.0±3.6)%。乙肝转阴散对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的回收率均高于 70.0%,证明乙肝转阴散对这些菌株无抑制作用,可用培养基稀释法进行微生物限度检查。

2.2 控制菌检查法的验证 以靛基质试液沿培养管管壁加入并观察,试验组检出大肠埃希菌,而阴性对照组未检出。试验组的胆盐乳糖发酵培养基管(含溶液 I 1 mL)检出大肠菌群,胆盐乳糖发酵培养基管(含溶液 II 1 mL)、胆盐乳糖发酵培养基管(含溶液 III 1 mL)和阴性对照组均未检出。试验组检出沙门

菌,阴性对照组未检出。

3 讨 论

由以上结果可见,采用常规法检查乙肝转阴散的微生物限度,人工污染 5 种代表菌株,该样品对枯草芽孢菌、黑曲菌的回收率均高于 70.0%,符合规定要求,但该样品对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的回收率均低于 70.0%,表明该样品对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌有抑制作用,不能用常规法进行微生物限度检查,改用培养基稀释法进行试验,结果发现该样品对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的回收率均低于 70%,因而可消除样品对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的抑菌作用。因此,乙肝转阴散的微生物限度检查可用培养基稀释法。

乙肝转阴散为含生药原粉和动物组织的口服中药复方制剂,按照《中国药典》2010 版(一部)附录“微生物限度检查法”中有关控制菌检查方法的规定,应检查大肠埃希菌、大肠菌群和沙门菌,以符合规定的微生物限度标准^[1]。由控制菌检查法的验证结果可知,各试验组可检出大肠埃希菌、大肠菌群和沙门菌,阴性对照组未检出,因此,可用常规法进行控制菌检查。

由于国家药品标准未明确各类药品微生物限度进行检查的具体方法,本文根据《中国药典》2010 版的具体要求和相关准则^[10],对含抑菌成分的中药制剂的微生物限度进行检查,必须消除供试液抑菌活性后,再根据《中国药典》规定的方法进行检查。同时,所采用的检测方法需进行验证试验,本试验是对乙肝转阴散微生物限度检查的方法学验证,建立简便可行、安全可靠的检查方法。

参考文献

- [1] 梁学政,陈惠红,陶红,等. 5 种袋装中药汤剂微生物限度检查方法验证[J]. 现代中西医结合杂志,2010,19(31): 3436-3437.
- [2] 朱吉士,张雪原,林晓辉. 翠莲解毒片微生物限度检查方法的研究[J]. 海峡药学,2010,22(4):46-47.
- [3] 陈华龙,王莉蓓,谭莉萍. 姜胆咳喘片微生物限度检查方法的验证[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):67-68.
- [4] 刘晓丽,刘爱明. 金匱肾气丸微生物限度检查法的研究[J]. 中南药学,2013,11(5):379-381.
- [5] 王绮琼,赖水招,王莉蓓. 复方半枝莲胶囊微生物限度检查方法验证研究[J]. 中国药物与临床,2011,11(11): 1289-1290.
- [6] 王丽环,李素霞,王刚. 连花清瘟胶囊微生物限度检查方法学验证[J]. 中国中医药现代远程教育,2011,9(7):151-152.
- [7] 张婷,郑绍忠,刘全芳. 复方首乌藤合剂微生物限度检查的验证[J]. 中国医药导报,2011,8(31):76-78.
- [8] 郑兆银,陈延晶,贺蕾. 胃安颗粒微生物限度检查方法的验证[J]. 天津药学,2012,24(4):1-3.
- [9] 孔燕兴,黄校锋,黄亚彬. 益气复原合剂微生物限度检查方法的验证[J]. 中国中医药现代远程教育,2012,18(18):154-155.
- [10] 吴晓玲,郑丽莉,陈引秀. 虎标万金油控制菌检验方法的研究[J]. 中国药师,2004,7(6):432-433.