

抗菌消炎胶囊微生物限度检查法的建立及方法学验证

霍昕¹, 刘波¹, 刘建华¹, 高玉琼¹, 黄顺菊², 岑颖²(1.贵州省生物技术研究开发基地, 贵阳 550002; 2.贵州省科晖制药厂, 贵州 清镇 551400)

摘要: 目的 建立抗菌消炎胶囊微生物限度检查的方法并验证。方法 按中国药典 2010 年版, 用大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉和白色念珠菌对抗菌消炎胶囊进行微生物限度检查方法学验证试验。细菌的计数方法为低速离心-培养基稀释联用法; 霉菌、酵母菌计数方法为培养基稀释法; 控制菌检查采用常规法检验。结果 抗菌消炎胶囊对细菌中的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌有很强的抑制作用, 对大肠埃希菌、白色念珠菌有一定的抑制作用。结论 该方法用于抗菌消炎胶囊的质量控制有效、可行。

关键词: 抗菌消炎胶囊; 微生物限度检查法; 验证

中图分类号: R283.65; R916.693

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2012)12-1121-04

Establishment and Validation of Microbial Limit Method for Kangjunxiaoyan Capsules

HUO Xin¹, LIU Bo¹, LIU Jianhua¹, GAO Yuqiong¹, HUANG Shunju², CEN Ying²(1.Guizhou Institute of Biotechnology Research and Development, Guiyang 550002, China; Kehui Pharmaceutical Factory in Guizhou Province, Qingzhen 551400, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish and validate the microbial limit test for Kangjunxiaoyan capsules. **METHODS** The microbial limit test for Kangjunxiaoyan capsules was validated using *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* and *Candida albicans* according to Chinese Pharmacopoeia 2010. Low speed centrifuge and medium dilution method were used with count of bacterium. Culture medium diluting method was used with counts mold and yeasts. Pathogenic bacteria could be tested when general method were used. **RESULTS** Kangjunxiaoyan capsules had very strong inhibition on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, they could make certain inhibition effect on *Escherichia coli* and *Candida albicans*. **CONCLUSION** The method is feasible, effective and can be used for quality control of Kangjunxiaoyan capsules.

KEY WORDS: Kangjunxiaoyan capsule; microbial limit test; verification

抗菌消炎胶囊是由金银花、大青叶、百部、金钱草、知母、黄芩、大黄 7 味中药组成的中药复方胶囊剂, 其制法为: 以上 7 味, 取部分金钱草及处方量的金银花、黄芩、大黄粉碎成细粉, 过筛; 另取剩余的金钱草及大青叶、知母、百部加水煎煮二次, 合并煎液, 过滤, 滤液浓缩至规定相对密度时, 与上述细粉混匀, 制成颗粒, 干燥, 粉碎成细粉, 过筛, 加入辅料适量, 混匀, 装入胶囊, 即得。其主要功效是清热解表、泻火解毒, 用于外感风热、内郁化火所致的风热感冒、咽喉肿痛、实火牙痛。方中 7 味药均有一定抗菌消炎作用^[1-7], 其中, 金银花为君药, 是天然植物中强有力的广谱抗生素。在对具有抗菌活性的药品进行微生物限度检查时, 应首先消除其抗菌活性, 以保证检验结果真实性、有效性。为了消除抗

菌消炎胶囊的抑菌作用, 真实反映该药品的微生物污染程度, 笔者按中国药典 2010 年版一部微生物限度检查法的要求对 3 批抗菌消炎胶囊进行细菌、霉菌及酵母菌计数方法的验证和控制菌检查方法的验证, 建立适合该药品的微生物限度检查方法。目前尚未见有关该制剂的微生物限度检查方法的报道。

1 材料

1.1 仪器

万级空气净化间、百级净化台(南通长城净化工程公司); LDZX-50KBS 型电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); SH-2 磁力搅拌器(北京东方开物科学器材有限公司); JJ200 型电子天平(美国双杰兄弟集团有限公司); DHG-9140A 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司); SPX-250B-E

作者简介: 霍昕, 女, 副主任药师 Tel: (0851)5713626 E-mail: hxss2000@yahoo.com.cn

型生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 80-2 型离心沉淀器(上海手术器械厂); HH-B11-420 型电热恒温培养箱(上海市跃进医疗器械一厂)。

1.2 菌株

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]均为不超过 5 代的菌株,均由贵州省药品检验所提供。

1.3 培养基

乳糖胆盐增菌液(批号: 20100718)、玫瑰红钠琼脂(批号: 20101003)、营养琼脂(批号: 20100428)改良马丁(批号: 090928)和改良马丁琼脂(批号: 100512)来自上海博微生物科技有限公司; 营养肉汤(批号: 20100712)、乳糖胆盐(发酵管)(批号: 20100412)、曙红亚甲蓝琼脂(EMB)(批号: 20100105)、4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸培养基(MUG)(批号: 20100328)均来自北京奥博生物技术有限责任公司; 所用试剂均为分析纯。

1.4 样品

抗菌消炎胶囊(贵州省科晖制药厂, 批号: 110301, 110302, 110303, 规格: 0.3 g/粒 \times 36 粒/盒)。

2 方法与结果

2.1 菌液制备^[8]

按中国药典 2010 年版(一部)微生物限度检查法接种金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中; 接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中; 接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂培养基中, 分别制成含菌数为 50~100 cfu \cdot mL⁻¹ 的菌悬液备用。

2.2 供试液的制备

取抗菌消炎胶囊 10 g, 加 pH 7.0 的灭菌氯化钠蛋白胨缓冲液至 100 mL, 放入水浴温度为 45 °C 的恒温振荡仪中振荡, 待溶散均匀即制成 1 : 10 的供试液, 备用。

2.3 细菌、霉菌及酵母菌计数方法选择试验及有效性验证试验

为选择有效的消除抑菌活性的方法, 用平皿法、培养基稀释法、低速离心沉淀-培养基稀释联用法处理供试液, 进行金黄色葡萄球菌、枯草芽

孢杆菌、大肠埃希菌、白色念珠菌及黑曲霉计数回收试验, 从几种方法对各菌的回收结果, 选择出各菌回收率在 70% 以上的方法作为有效方法, 并对上述各试验菌进行 3 个批号样品的有效性验证试验。

2.3.1 平皿法 每皿中加入 1 : 10 供试液 1 mL, 每皿分别加入试验菌 50~100 cfu, 立即倾注琼脂培养基 15~20 mL, 每种试验菌平行制备 2 个皿, 置规定温度, 培养、计数菌落数作为样品组; 不加入供试液, 同法测定相应加入的试验菌数, 作为菌液组; 不加入试验菌, 同法测定 1 : 10 供试液 1 mL 中的本底菌数作为供试液对照; 计算回收率: 回收率/%=[(样品组平均菌落数-供试液对照组平均菌落数)/菌液组平均菌落数] \times 100%。

2.3.2 培养基稀释法 取 1 : 10 供试液 1 mL 分注 2~10 个皿, 选择每皿加入 0.5, 0.25, 0.2, 0.1 mL, 其他操作同平皿法。

2.3.3 低速离心沉淀-培养基稀释联用法 取 1 : 10 供试液 10 mL, 注入灭菌离心管内, 500 r \cdot min⁻¹ 离心 3 min, 取出全部上层液加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨稀释剂至 10 mL 混匀, 即为 1 : 10 供试液, 其他操作同培养基稀释法。

2.3.4 回收率计算 取 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液分别加入各试验菌, 浓度为 50~100 cfu \cdot mL⁻¹; 500 r \cdot min⁻¹ 离心 3 min, 取出全部上层液(取出的量与样品组相同)混匀, 作为稀释剂对照组, 按细菌计数样品组菌落计数方法测定菌数; 各试验菌同时作菌液组, 计算回收率: 回收率/%=稀释剂对照组平均菌落数/菌液组平均菌落数 \times 100%。

2.3.5 结果

2.3.5.1 细菌、霉菌及酵母菌计数方法选择试验结果 试验组大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌及白色念珠菌回收率均 $<$ 70%, 表明本品具有抑菌活性, 应消除其抑菌活性后进行试验。大肠埃希菌用培养基稀释法每皿 0.25 mL 回收率为 76%; 金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌用培养基稀释法每皿 0.1 mL 回收率仍达不到 70%, 故采用低速离心-培养基稀释联用法进行试验, 结果: 每皿 0.25 mL 回收率均 $>$ 70%。结果见表 1。

2.3.5.2 方法有效性验证及结果 细菌计数验证: 取 500 r \cdot min⁻¹ 离心 3 min 处理得到 1 : 10 供试液。大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌验证: 每皿加入上述供试液 0.25 mL, 分别加入大肠

表 1 细菌、霉菌及酵母菌计数方法选择试验结果

Tab 1 Results of bacteria, yeast and mold counts

计数方法 方法	回收率/%				黑曲霉
	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	
平皿法 1 mL 培养基稀释法	21	12	0	46	81.4
0.5 mL	49	31	15	78	89
0.25 mL	76	44	46	82	97
0.2 mL	92	48	54	90	104
0.1 mL	99	60	58	102	96
低速离心沉淀-培养基稀释法					
1 mL		0	34		
0.5 mL		35	64		
0.25 mL		78	80		

埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌(每皿 50~100 cfu), 按低速离心-培养基稀释联用法进行试验; 霉菌及酵母菌计数验证取 1:0 供试液每皿 0.5 mL, 分别加入白色念珠菌、黑曲霉(每皿 50~100 cfu), 按培养基稀释法进行试验; 各菌均作 3 个批

表 2 5 种试验菌有效性验证回收试验结果

Tab 2 Results of five kinds of tests verified the effectiveness of the recovery test

菌种	样品批号	试验组/cfu	菌液组/cfu	供试品对照组/cfu	稀释剂对照组/cfu	稀释剂对照组回收率/%	试验组回收率/%
大肠埃希菌	110301	73	77	0	68	88.3	94.8
	110302	78	77	0	68	88.3	101.3
	110303	76	77	0	68	88.3	98.7
金黄色葡萄球菌	110301	67	80	0	74	92.5	83.8
	110302	69	80	0	74	92.5	86.3
	110303	65	80	0	74	92.5	81.3
枯草芽孢杆菌	110301	61	78	0	65	83.3	78.2
	110302	65	78	0	65	83.3	83.3
	110303	63	78	0	65	83.3	80.8
白色念珠菌	110301	55	69	0			79.7
	110302	57	69	0			82.6
	110303	53	69	0			76.8
黑曲霉	110301	58	68	0			85.3
	110302	57	68	0			83.8
	110303	51	68	0			75.0

表 3 大肠埃希菌方法验证试验结果

Tab 3 *Escherichia coli* method validation test results

组别	110301 BL(100 mL)			110302 BL(100 mL)			110303 BL(100 mL)		
	MUG	I	EMB	MUG	I	EMB	MUG	I	EMB
阴性对照	-	-	无菌落生长	-	-	无菌落生长	-	-	无菌落生长
供试品对照组	-	-	无菌落生长	-	-	无菌落生长	-	-	无菌落生长
阴性菌对照组	-	-	无菌落生长	-	-	无菌落生长	-	-	无菌落生长
试验组	+	+	典型菌落生长	+	+	典型菌落生长	+	+	典型菌落生长

注: 大肠埃希菌加菌 68 cfu、金黄色葡萄球菌加菌 76 cfu
Noe: *Escherichia coli* 68 cfu, *Staphylococcus aureus* 76 cfu

号样品的有效性验证。结果见表 2。

2.4 控制菌大肠埃希菌、大肠菌群检查方法有效性验证

2.4.1 方法

2.4.1.1 大肠埃希菌 取 1:10 供试液, 按中国药典 2010 年版(一部)微生物限度检查法分别进行试验组及阴性菌对照组对照组的验证。

2.4.1.2 大肠菌群 分别取 1:10, 1:100, 1:1000 供试液各 1 mL 及含 50~100 cfu 大肠埃希菌菌液按中国药典 2010 年版(一部)微生物限度检查法进行验证。

2.4.2 验证结果 采用低速离心-培养基稀释联用法, 试验菌大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌对 3 个批号样品回收率均>70%; 采用培养基稀释法, 试验菌白色念珠菌、黑曲霉对 3 个批号样品回收率也均>70%, 符合中国药典对药品微生物验证试验要求。结果见表 3~4。

表 4 大肠菌群方法验证试验结果

Tab 4 *Escherichia coli* form method validation test results

组别	110301				110302				110303			
	乳糖胆盐发酵管			EMB	乳糖胆盐发酵管			EMB	乳糖胆盐发酵管			EMB
	1:10	1:100	1:1000		1:10	1:100	1:1000		1:10	1:100	1:1000	
阴性对照	-	-	-	无菌落生长	-	-	-	无菌落生长	-	-	-	无菌落生长
供试品对照组	-	-	-	无菌落生长	-	-	-	无菌落生长	-	-	-	无菌落生长
阴性菌对照组	-	-	-	无菌落生长	-	-	-	无菌落生长	-	-	-	无菌落生长
试验组	+	+	+	典型菌落生长	+	+	+	典型菌落生长	+	+	+	典型菌落生长

注: 大肠埃希菌加菌 66 cfu、金黄色葡萄球菌加菌 74 cfu
Noe: *Escherichia coli* 66 cfu, *Staphylococcus aureus* 74 cfu

由结果可见, 在 3 个批号样品的试验中, 阴性对照组未检出阴性对照菌, 试验组检出阳性试验菌, 可按此方法进行抗菌消炎胶囊的控制菌检查。

通过 5 株试验菌、3 次独立平行试验的回收率方法学验证, 抗菌消炎胶囊的微生物限度检查方法为: 细菌、霉菌、酵母菌计数检查方法为: 采用离心沉淀-培养基稀释联用法, 取本品 1:10 供试液取 1 mL 分注 4 皿, 测定细菌数。采用培养基稀释法, 取 1:10 供试液 1 mL 分注 2 皿, 测定霉菌及酵母菌数。控制菌检测可采用常规法。

3 讨论

抗菌消炎胶囊为中药复方制剂, 其中的金银花、金钱草、黄芩、大黄为原粉加入, 故在实验设计中尽量不考虑采用薄膜过滤法, 以免影响结果判断。

按中国药典 2010 年版(一部)微生物限度检查法的要求, 采用低速离心沉淀法将离心条件控制在 500 r·min⁻¹ 离心 3 min 以内, 对试验菌回收率影响较小。不溶性药物颗粒低速离心后, 可因其质量大于菌细胞下沉至管底, 达到既去除颗粒沉淀, 又尽量降低高速离心法对试验菌回收率的影响的目的。

当细菌生长小而密集时, 极易发生计数误差。故菌落计数时应仔细观察, 必要时借助放大镜, 以排除细小药渣的干扰计数; 如难区别, 可适当延长培养时间。

除去供试品抑菌作用的方法有培养基稀释法、离心沉淀法、薄膜过滤法等, 或几法联用^[9]。本品中的 7 味中药材都具有一定得抑菌活性, 验

证试验结果也表明, 供试品对试验菌株均有抑菌作用, 因此采用培养基稀释法、离心沉淀-培养基稀释联用法进行试验, 结果各规定菌株的回收率达到药典要求。本方法用于抗菌消炎胶囊的质量控制有效、可行。

REFERENCES

- [1] TANG M, LIU Y, WANG Y, et al. The *in vitro* antibacterial activity of the crude extract of total flavonoids from *Lonicera japonica* [J]. China Pharmacy(中国药房), 2008, 19(30): 2321-2322.
- [2] FEI N, YANG J J. Comparison of the antibacterial activity *in vitro* of Rhubarb and other three kinds of Chinese herbal medicine [J]. Heilongjiang Med Sci(黑龙江医药科学), 2010, 33(1): 18-19.
- [3] MA J, CHENG L, REN Y, et al. Experimental study on main pharmacodynamics of Xiaoyan tablets [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2005, 27(6): 687-690.
- [4] YANG Y M, XING H Z H. Acute cholecystitis acute episode of Jinqiancao granules [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med(江西中医药), 2007, 38(298): 41-42.
- [5] HAN Y X, ZHOU Y, YUAN R N. The effect of the antibacterial activity *in vitro* of different prepared products of Rhizoma Anemarrhenae [J]. China Pharm(中国药业), 2008, 17(2): 25.
- [6] YAN M ZH, ZUO F, SONG H Y, et al. Comparative study on antibacterial effects of Huangqin decoction and its metabolisms [J]. China J Chin Mater Med(中国中药), 2003, 28(3): 243-245.
- [7] YANG J W, WANG Q H, WU Z X, et al. Methodology validation study of microbial limit examination of Qingyi oral liquid [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(10): 939-941.
- [8] ChP(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: Appendix 79, Appendix 138.
- [9] MA D M, MA X Y. Drug Microbiological Inspection Technology(药品微生物学检验技术) [M]. Vol 7. Beijing: Hualing Press, 2007: 218.

收稿日期: 2012-01-09