

# 归红祛风酒微生物限度检查的方法学验证研究

谢 芳, 刘渊漪, 黎向阳

**[摘要]** **目的:** 建立归红祛风酒的微生物限度检查方法。 **方法:** 利用薄膜过滤消除归红祛风酒中的絮状沉淀。分别采用培养基稀释法、薄膜过滤法对样品进行微生物限度检查; 根据 6 株阳性对照菌的实验组、菌液组、供试品对照组的结果进行方法学验证。 **结果:** 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菌落回收率均 > 70%; 通过控制菌检查, 阳性实验菌均能检出。 **结论:** 薄膜过滤法能够适应菌落计数, 归红祛风酒按照供试液制备法和控制菌检查法均能检出实验菌。

**[关键词]** 微生物检查; 薄膜过滤法; 归红祛风酒

**[中图分类号]** R 446.5      **[文献标志码]** A      **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.03.032

## Validation of the microbial limit inspection method of guihongqufeng wine

XIE Fang, LIU Yuan-yi, LI Xiang-yang

(Department of Pharmacy, The Traditional Chinese and Western Medicine Guanghua Hospital of Shanghai, Shanghai 200052, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the method of the microbial limit inspection of guihongqufeng wine. **Methods:** The flocculent precipitation of preparation was removed by membrane-filter procedure. The microbial limit of sample was inspected by culture medium dilution and membrane-filter procedure. The methodology was validated by the results of 6 positive bacteria experimental group, microbial group and control group. **Results:** The recoverys of bacterial colony in *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* were more than 70%. All positive bacteria could be detected by the control germ test. **Conclusions:** The membrane-filter procedure can count the bacterial colony, the test organisms can be checked out by the methods of liquid preparation and control germ test.

**[Key words]** microbial test; membrane-filter procedure; guihongqufeng wine

归红祛风酒具有祛风除湿、舒筋活络作用<sup>[1]</sup>, 用于类风湿性关节炎所致筋骨疼痛、四肢麻木等<sup>[2]</sup>。制剂中微生物污染状况的控制是药品质量控制的重要方面, 当药品本身具有抗干扰作用时, 应首先消除其干扰作用, 以保证检验结果的有效性。我们按照 2010 年版《中国药典》(一部) 中微生物限度检查方法学验证的规定<sup>[3]</sup> 和药品检验标准操作规范<sup>[4]</sup>, 对归红祛风酒的微生物限度检查方法进行了方法学验证实验, 现作报道。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 归红祛风酒, 每瓶 500 ml (批号 110308), 上海市光华中西医结合医院产。大肠埃希菌 [CMCC (B) 44102]、金黄色葡萄球菌 [CMCC (B) 26003]、枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63501]、沙门菌 [CMCC (B) 50094]、白色念珠菌 [CMCC (F) 98001]、黑曲霉 [CMCC (F) 98003] 由上海闸北食品药品检验所提供。营养琼脂培养基 (批号 100528)、营养肉汤培养基 (批号 100414)、玫瑰红钠琼脂培养

基 (批号 100520)、胆盐乳糖培养基 (批号 100601)、改良马丁琼脂培养基 (批号 100201)、MUG 培养基 (批号 100201)、pH7.0 氯化钠 - 蛋白冻缓冲液 (批号 100517)、四硫磺酸钠亮绿培养基 (批号 100315)、胆盐硫乳琼脂培养基 (批号 100425)、麦康凯琼脂培养基 (批号 100714)、三糖铁琼脂培养基 (批号 100421) 均由上海市中科昆虫生物技术开发有限公司提供。

**1.2 仪器** 立式压力蒸汽灭菌器 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂), 100 级超净工作台 (北京四达净化技术研究所), 电热恒温培养箱 (浙江嘉兴新腾电器厂), 生化培养箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂), 电动吸引器 (上海祁鑫医疗器械厂)。

**1.3 菌液制备** 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琼脂培养基上, 置 30 ~ 35 °C 培养 10 ~ 24 h, 分别取上述培养物用 0.9% 氯化钠注射液稀释成每毫升含菌数 50 ~ 100 cfu 的菌悬液。接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁琼脂培养基上, 置 23 ~ 28 °C 培养 24 ~ 48 h, 取上述培养物用 0.9% 氯化钠注射液稀释成每毫升含菌数 50 ~ 100 cfu 的菌悬液。接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂斜面培养基上, 置 23 ~ 28 °C 培养 5 ~ 7 d, 加入 3 ~ 5 ml 含 0.05% 聚山梨酯

[收稿日期] 2013-01-16

[作者单位] 上海市长宁区光华中西医结合医院 药剂科, 200052

[作者简介] 谢 芳 (1967 -), 女, 主管药师。

80 的 0.9% 氯化钠注射液,将孢子洗脱。吸出孢子菌悬液至无菌试管中,用含 0.05% 聚山梨酯 80 的 0.9% 氯化钠溶液制成每毫升含菌数 50~100 cfu 的孢子菌悬液。

1.4 供试液制备 因本品中含有絮状沉淀,故先用无菌滤纸(定量中速)过滤除去沉淀物,再取过滤液 10 ml 加 pH7.0 的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 ml,混匀,作为供试液。

1.5 细菌、霉菌和酵母菌计数方法的验证 均重复进行 3 次独立平行实验。

1.5.1 实验组 取供试液 10 ml,薄膜过滤,用稀释液 600 ml 分 6 次冲洗,在最后 1 次的冲洗液中分别加入大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉 5 种菌悬液 1 ml(含 50~100 cfu),每株菌平行制备 2 张滤膜,菌面朝上,分别贴于营养琼脂培养基和玫瑰红钠培养基的平板上,细菌置 30~35℃ 培养 3 d,霉菌、酵母菌置 23~28℃ 培养 5 d。

1.5.2 菌液组 分别取菌液各 1 ml(含 50~100 cfu)到无菌培养皿中,然后注入相应的培养基,混匀。细菌置 30~35℃ 培养 3 d,霉菌、酵母菌置 23~28℃ 培养 5 d。同时做 2 份。

1.5.3 供试品对照组 取供试液 10 ml,薄膜过滤,用稀释液 600 ml 分 6 次冲洗,平行制备 4 张滤膜,菌面朝上各 2 张分别贴于营养琼脂培养基和玫瑰红

钠琼脂培养基的平板上,分别置 30~35℃ 培养 3 d 和 23~28℃ 培养 5 d。测定供试品的本底菌数。

1.5.4 稀释剂对照组 把供试液换成稀释剂,方法同实验组,每株菌平行制备 2 张滤膜,菌面朝上分别贴于营养琼脂培养基和玫瑰红钠琼脂培养基的平板上,分别置 30~35℃ 培养 3 d 和 23~28℃ 培养 5 d。

1.5.5 细菌、霉菌和酵母菌回收率测定

$$\text{实验组菌回收率}(\%) = \frac{\text{实验组平均菌落数} - \text{供试品对照组的平均菌落数}}{\text{菌液组的平均菌落数}} \times 100\%$$

$$\text{稀释剂对照组回收率}(\%) = \frac{\text{稀释剂对照组平均菌落数}}{\text{菌液组的平均菌落数}} \times 100\%$$

1.6 控制菌检查方法的验证 大肠埃希菌及沙门菌两种细菌验证方法相同,合并(1)菌液制备:接种上述菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中,30~35℃ 培养 18~24 h,用 0.9% 氯化钠注射液稀释成每毫升含 10~100 cfu 的菌悬液。分别测定加入的各个实验菌菌液中每毫升的菌数。(2)验证:取实验菌菌液 1 ml(即 10~100 cfu 试验菌)及经无菌脱脂棉过滤后配置的规定量供试液,按《中国药典》2010 年版(一部)附录 XIII C 薄膜过滤法进行检查。

## 2 结果

2.1 菌种回收率 5 株实验菌的实验组菌回收率和稀释剂对照组菌的回收率均大于 70%(见表 1)。

表 1 菌种回收率比较

菌种类型	试验次数	试验组/ cfu	菌液组/ cfu	供试品 对照组/cfu	稀释剂 对照组/cfu	试验组 菌回收率/%	稀释剂对照组 菌回收率/%
大肠埃希菌	1	67	89	0	79	75.3	88.8
	2	72	93	0	85	77.4	91.4
	3	75	93	0	96	80.6	103.2
金黄色葡萄球菌	1	81	96	0	87	84.4	90.6
	2	74	88	0	81	84.1	92.0
	3	69	81	0	83	85.2	102.5
枯草芽孢杆菌	1	69	83	0	77	83.1	92.8
	2	59	79	0	73	74.7	92.4
	3	59	76	0	79	77.6	103.9
白色念珠菌	1	48	61	0	55	78.7	90.2
	2	53	68	0	63	77.9	92.6
	3	58	68	0	61	85.3	89.7
黑曲霉	1	51	69	0	59	73.9	85.5
	2	49	63	0	57	77.8	90.5
	3	59	71	0	64	83.1	90.1

