

肝素钠微生物限度检查方法适用性研究

刘小静¹ 王亚婷¹ 刘建芬² 刘素彦^{1,*}

(1 华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 微生物药物国家工程研究中心, 河北省工业微生物代谢工程技术研究中心, 石家庄 050015; 2 华北制药华坤河北生物技术有限公司, 石家庄 050000)

摘要: **目的** 建立肝素钠的微生物限度检查方法。**方法** 采用 2015 年版中国药典(四部)通则下方法, 对肝素钠进行方法适用性试验, 确定适宜的微生物限度检查方法。**结果** 计数方法采用薄膜过滤法, 各试验菌比值均在 0.5~2 范围内, 控制菌采用常规法, 各阳性试验菌均检出, 阴性对照均无菌生长。**结论** 所验证的肝素钠微生物限度检查方法是可行的。

关键词: 肝素钠; 微生物限度检查; 适用性

中图分类号: R917 **文献标志码:** A

Microbial limit suitability test method for heparin sodium

Liu Xiao-jing¹, Wang Ya-ting¹, Liu Jian-fen² and Liu Su-yan¹

(New Drug Research and Development Co., Ltd. of NCPC, National Engineering Research Center of Microbial Medicine, Hebei Industry Microbial Engineering & Technology Research Center, Shijiazhuang 050015; 2 HuaKun Hebei Biological Technology Co., Ltd. of NCPC, Shijiazhuang 050000)

Abstract Objective To establish a microbial limit test method for Heparin Sodium. **Methods** Employ the methods of microbial limit test for heparin sodium, which were described in Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition). Determine the suitable microbial limit test. **Results** The recovery efficiency of the test organism was from 0.5 to 2 by the membrane filtration method. Using a conventional method, every positive microorganism can be detected while the negative control can not grow in the control bacteria examination. **Conclusion** The validated method of microbial limit test for heparin sodium is feasible.

Key words Heparin sodium; Microbial limit test; Suitability

肝素钠是黏多糖硫酸酯类抗凝血药。根据中国药典(2015版)要求, 供试品检查时, 应根据供试品理化特性和微生物限度标准等因素选择计数方法和控制菌检查, 所选方法的适用性须经确认^[1], 因此, 对肝素钠的微生物限度检查方法进行了适用性研究试验。

1 试验材料

肝素钠, 批号为 0120140101A、0120140102A 和

0120140103A, 均由华北制药生产; 菌种包括枯草芽孢杆菌 CMCC(B)6350、金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003、大肠埃希菌 CMCC(B)44102、铜绿假单胞菌 CMCC(B)10104、白念珠菌 CMCC(F)98001 和黑曲霉 CMCC(F)98003, 购自中国食品药品检定研究院; 胰酪大豆胨琼脂培养基, 沙氏葡萄糖琼脂培养基, 胰酪大豆胨液体培养基, 麦康凯液体培养基, 麦康凯琼脂培养基, RV 沙门菌增菌液体培养基, 木糖赖氨酸脱氧

收稿日期: 2018-07-17

基金项目: 河北省开发区发展专项资金 (No. 17249010C)

作者简介: 刘小静, 女, 生于 1984 年, 工程师, 主要从事药物微生物方面质量研究, E-mail: 94373689@qq.com

* 通讯作者, E-mail: liusuyan371@163.com

胆酸盐琼脂培养基, 溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基, 甘露醇氯化钠琼脂培养基, pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液, 均购自北京三药科技开发公司; 氯化钠, 购自天津永大化学试剂有限公司。

2 试验方法

2.1 菌液制备

取金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、白念珠菌的新鲜培养物, 用 0.9% 的无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的菌悬液。取黑曲霉的新鲜培养物加入 3~5mL 含 0.05% 聚山梨酯 80 的 0.9% 的无菌氯化钠溶液, 将孢子洗脱, 然后, 采用适宜的方法吸出孢子悬液至无菌试管内, 用含 0.05% 聚山梨酯 80 的 0.9% 的无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的黑曲霉孢子悬液^[2]。

2.2 计数方法适用性试验(平皿法)

2.2.1 供试液

供试液制备: 称取供试品 10g 于灭菌三角瓶中, 加 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100mL, 混匀, 作为 1:10 的供试液。

2.2.2 试验步骤

试验组: 取上述制备好的供试液 9.9mL 至无菌试管中, 加入 0.1mL 试验菌液(铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白念珠菌、黑曲霉),

混匀, 使供试液中含菌量不大于 100CFU/mL, 然后取 1mL 进行计数, 每种试验菌各加两个培养皿, 立即倾注胰酪大豆胨琼脂培养基, 再取含白念珠菌、黑曲霉的供试液 1mL 进行计数, 各加两个平皿, 立即倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基^[3]。

菌液组: 取相应稀释液替代供试液, 按试验组操作加入试验菌液并进行计数。

供试品对照: 取制备好的供试液 1mL 至平皿, 平行 4 皿, 其中两个倾注胰酪大豆胨琼脂培养基, 另外两个倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基, 记录供试液的本底菌数。

阴性对照组: 吸取 1mL 稀释液至平皿, 平行 4 皿, 其中两个倾注胰酪大豆胨琼脂培养基, 另外两个倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基。

注入的融化培养基温度不超过 45℃, 平皿为 9cm 且每只平皿的培养基用量为 15~20mL, 轻转动平皿使培养基与供试品混合均匀, 凝固, 培养。需氧菌在 30~35℃ 培养 3d, 霉菌酵母菌在 20~25℃ 培养 5d, 点计每皿的菌落数。计算两个平皿的平均菌落数, 计算各个试验菌试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值。

2.2.3 适用性试验结果

验证试验结果: 菌落计数及试验菌比值计算结

表 1 平皿法计数试验结果
Tab. 1 Results of plate method

供试品批号	菌种名称	菌液组菌落数/(CFU/皿)	试验组菌落数/(CFU/皿)	供试品对照组/(CFU/皿)	试验组比值
0120140101A	白念珠菌	78、80	19、22	0、0	0.27
	黑曲霉	59、61	27、25		0.43
	铜绿假单胞菌	92、88	0、0		0
	金黄色葡萄球菌	64、62	0、0		0
	枯草芽孢杆菌	85、77	16、20		0.22
	白念珠菌	72、76	18、23	0、0	0.28
	黑曲霉	59、61	31、27		0.48

果见表 1。

2.2.4 结果讨论

各试验菌试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值均低于验证标准, 不能达到验证要求, 应重新采用其他方法进行验证。

2.3 需氧菌、霉菌及酵母菌计数方法适用性再试验(薄膜过滤法)

2.3.1 供试液

供试液制备: 称取供试品 10g 于灭菌三角瓶中, 加 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100mL, 混匀,

作为 1:10 的供试液。

2.3.2 试验步骤

试验组: 将少量 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液过滤润湿滤膜, 取上述制备好的供试液 9.9mL 至无菌试管中, 加入 0.1mL 试验菌液(铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉), 混匀, 使每 1mL 供试液中含菌量不大于 100CFU, 然后取 1mL 置少量 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中, 过滤, 并用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜 3 次, 每次约 100mL, 过滤完毕,

取出滤膜，菌面朝上贴在已凝固的胰酪大豆胨琼脂培养基平皿中；其中白色念珠菌和黑曲霉菌各制备两份，另外一份菌面朝上贴在已凝固的沙氏葡萄糖琼脂培养基平皿中。

菌液组：取稀释液代替供试液同试验组操作，冲洗 3 次，过滤完毕，取出滤膜，菌面朝上分别贴在已凝固的胰酪大豆胨琼脂培养基和沙氏葡萄糖琼脂培养基平皿中，置规定温度培养、观察。记录菌落数。

供试品对照：将少量 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液过滤润湿滤膜，分别取 1:10 供试液 1mL，置少量 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中，过滤，并用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜 3 次，每次约 100mL，过滤完毕，取出滤膜，菌面朝上贴在已凝固的胰酪大豆胨琼脂培养基和沙氏葡萄糖琼脂培养基平皿中，置规定温度培养、观察，记录供试液的本底菌数。

阴性对照组：取 1mL 稀释液代替供试液，与供试品对照同法操作，作为阴性对照。

需氧菌在 30~35 °C 培养 3d，霉菌酵母菌在 20~25 °C 培养 5d，点计每皿的菌落数。计算两个平皿的平均菌落数，计算各个试验菌试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值。计算结果见表 2。

2.3.3 结果与讨论

由表 2 的结果可知，对供试品需氧菌、霉菌及酵母菌计数方法适用性进行的试验，采用薄膜过滤法，每膜冲洗 3 次，每次约 100mL，各试验菌试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值均在 0.5~2 范围内，能够达到适用性试验要求。由于在试验过程中，也同时做了薄膜过滤法，冲洗 5 次的试验，试验结果和冲洗 3 次的试验结果相差无几，考虑到实际检测中的方便性，因此对肝素钠进行需氧菌、霉菌及酵母菌的计数检查方法选用薄膜过滤法，每膜冲洗 3 次，每次约 100mL。

2.3.4 适用性试验结果

表 2 薄膜过滤法计数试验结果
Tab. 2 Results of membrane filtration method

供试品批号	菌种名称	菌液组菌落数/(CFU/皿)	试验组菌落数/(CFU/皿)	供试品对照组/(CFU/皿)	试验组比值
0120140101A	白念珠菌	78、80	68、74	0、0	0.90
	黑曲霉	59、61	53、57		0.92
	铜绿假单胞菌	92、88	77、79		0.87
	金黄色葡萄球菌	64、62	64、70		1.06
	枯草芽孢杆菌	85、77	66、70		0.84
	白念珠菌	72、76	68、70	0、0	0.93
	黑曲霉	59、61	47、53		0.83

表 3 计数方法试验结果
Tab. 3 Microbial count method results of test

供试品批号	菌种名称	菌液组菌落数/(CFU/皿)	试验组菌落数/(CFU/皿)	供试品对照组/(CFU/皿)	试验组比值
0120140102A	白念珠菌	78、76	70、74	0、0	0.94
	黑曲霉	54、60	49、51		0.88
	铜绿假单胞菌	96、88	85、89		0.95
	金黄色葡萄球菌	85、79	75、81		0.95
	枯草芽孢杆菌	79、87	77、79		0.94
	白念珠菌	79、83	77、81	0、0	0.98
	黑曲霉	63、59	50、56		0.87
0120140103A	白念珠菌	81、87	78、84	0、0	0.96
	黑曲霉	64、58	55、51		0.87
	铜绿假单胞菌	89、87	81、83		0.93
	金黄色葡萄球菌	74、78	70、76		0.96
	枯草芽孢杆菌	86、78	69、75		0.88
	白念珠菌	81、85	77、83	0、0	0.96
	黑曲霉	59、65	48、52		0.81

采用薄膜过滤法冲洗3次的方法又对其他两批样品进行了试验,菌落计数结果和比值计算结果见表3。

由以上验证试验的结果可知取1:10的供试液采用薄膜过滤法进行需氧菌、霉菌酵母菌计数方法适用性,试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值均在0.5~2范围内,因此,肝素钠需氧菌、霉菌及酵母菌的计数,可以采用1:10的供试液用薄膜过滤法进行。

2.4 大肠埃希菌检查方法适用性试验

2.4.1 试验步骤

试验组:取1:10供试液10mL加入100mL胰酪大豆胨液体培养基中,同时加入1mL上述大肠埃希菌的菌悬液(不大于100CFU)。

供试液组:取供试液10mL加入100mL胰酪大豆

胨液体培养基中。

阳性对照:取大肠埃希菌的菌悬液1mL,直接接种至100mL胰酪大豆胨液体培养基中。

阴性对照:取稀释液10mL直接接种至100mL胰酪大豆胨液体培养基中。

将上述4组在30~35℃培养18~24h后,分别取培养物1mL,接种至100mL麦康凯液体培养基中,42~44℃培养24~48h。取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂培养基平板上,30~35℃培养18~72h。试验组和阳性对照在麦康凯琼脂培养基平板上生长的菌落形态应一致,供试液组和阴性对照组应无菌落生长。

2.4.2 试验结果

适用性试验独立进行3次,3次的试验结果见下

表4 大肠埃希菌检查方法适用性结果

Tab. 4 Suitability results of *E. coli* test

供试品批号	试验组	阳性对照	供试液组	阴性对照	结果
0120140101A	检出	检出	未检出	未检出	符合规定
0120140102A	检出	检出	未检出	未检出	符合规定
0120140103A	检出	检出	未检出	未检出	符合规定

表4。由表4结果可知,试验组和阳性对照组按上述方法测定后,阳性对照菌生长正常,试验组检出大肠埃希菌。阴性对照组和供试液组均未检出大肠埃希菌。因此可以采用1:10的供试液,按照大肠埃希菌的检查方法进行大肠埃希菌的检查。

2.5 铜绿假单胞菌检查方法适用性试验

2.5.1 试验步骤

试验组:取1:10供试液10mL加入100mL胰酪大豆胨液体培养基中,同时加入1mL铜绿假单胞菌的菌悬液(不大于100CFU)。

供试液组:取供试液10mL加入100mL胰酪大豆胨液体培养基中。

阳性对照:取铜绿假单胞菌的菌悬液1mL,直接接种至100mL胰酪大豆胨液体培养基中。

阴性对照:取稀释液10mL直接接种至100mL胰酪大豆胨液体培养基中。

将上述4组在30~35℃培养18~24h后,分别划线接种于溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基的平板上,30~35℃培养18~72h,观察所生长菌的菌落形态是否为铜绿假单胞菌,如平板上无菌落生长或生长的菌落形态特征与铜绿假单胞菌不符,则判供试品未检出铜绿假单胞菌。

2.5.2 试验结果

适用性试验独立进行3次,3次的试验结果见表5。由表5结果可知,3次试验中试验组和阳性对照组按上述方法测定后,阳性对照菌在24h时正常生长,划线接种后菌落形态与铜绿假单胞菌一致,检出铜绿假单胞菌。阴性对照组培养物澄清,划线接种后无菌落生长,判未检出铜绿假单胞菌。

2.6 沙门菌检查方法验证

2.6.1 试验步骤

试验组:称取10g供试品加入100mL胰酪大豆胨液体培养基中,溶解混匀,同时加入1mL沙门菌的菌悬液(不大于100CFU)。

供试品组:称取10g供试品加入100mL胰酪大豆胨液体培养基中。

阳性对照:取沙门菌的菌悬液1mL,直接接种至100mL胰酪大豆胨液体培养基中。

阴性对照:100mL胰酪大豆胨液体培养基不加供试品。

将上述4组在30~35℃培养18~24h,取培养物0.1mL接种于10mL RV沙门增菌液体培养基中,在30~35℃培养18~24h后,划线接种于木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基平板上,在30~35℃培养18~24h,观察所生长菌的菌落形态是否为沙门菌。无菌落生长或生长菌落形态特征与沙门菌不符,则未检出沙门菌。

表 5 铜绿假单胞菌检查结果

Tab. 5 Suitability results of *P. aeruginosa* test

供试品批号	试验组	阳性对照	供试液组	阴性对照	结果
0120140101A	检出	检出	未检出	未检出	符合规定
0120140102A	检出	检出	未检出	未检出	符合规定
0120140103A	检出	检出	未检出	未检出	符合规定

表 6 沙门菌检查方法验证结果

Tab. 6 Suitability results of *Salmonella* test

供试品批号	试验组	阳性对照	供试液组	阴性对照	结果
0120140101A	检出	检出	未检出	未检出	符合规定
0120140102A	检出	检出	未检出	未检出	符合规定
0120140103A	检出	检出	未检出	未检出	符合规定

2.6.2 试验结果

验证试验独立进行 3 次, 3 次的试验结果见表 6。由表 6 结果可知, 3 次试验中试验组和阳性对照组按上述方法测定后, 阳性对照菌在 24h 时正常生长, 划线接种后菌落形态与沙门菌一致, 检出沙门菌。阴性对照组培养物澄清, 划线接种后无菌落生长, 判未检出沙门菌。

2.7 金黄色葡萄球菌检查方法验证

2.7.1 验证试验步骤

试验组: 取 1:10 供试液 10mL 加入 100mL 胰酪大豆胨液体培养基中, 同时加入 1mL 金黄色葡萄球菌的菌悬液 (不大于 100CFU)。

供试液组: 取供试液 10mL 加入 100mL 胰酪大

豆胨液体培养基中。

阳性对照: 取金黄色葡萄球菌的菌悬液 1mL, 直接接种至 100mL 胰酪大豆胨液体培养基中。

阴性对照: 取稀释液 10mL 直接接种至 100mL 胰酪大豆胨液体培养基中。

将上述 4 组在 30~35℃ 培养 18~24h, 取上述培养物分别划线接种于划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基的平板上, 培养 18~72h, 观察所生长菌的菌落形态是否为金黄色葡萄球菌, 如平板上无菌落生长或生长的菌落形态特征与金黄色葡萄球菌不符, 则判供试品未检测出金黄色葡萄球菌。

2.7.2 试验结果

表 7 金黄色葡萄球菌检查方法验证结果

Tab. 7 Suitability results of *S. aureus* test

供试品批号	试验组	阳性对照	供试液组	阴性对照	结果
0120140101A	检出	检出	未检出	未检出	符合规定
0120140102A	检出	检出	未检出	未检出	符合规定
0120140103A	检出	检出	未检出	未检出	符合规定

验证试验独立进行 3 次, 3 次的试验结果见表 7。由表 7 结果可知, 3 次试验中试验组和阳性对照组的阳性对照菌在 24h 时正常生长, 划线接种后菌落形态与金黄色葡萄球菌一致, 检出金黄色葡萄球菌。阴性对照组培养物澄清, 划线接种后无菌落生长, 判未检出金黄色葡萄球菌。

3 结论

根据验证试验结果, 确定肝素钠微生物限度检查方法为: 需氧菌、霉菌和酵母菌数测定可采用薄膜过滤法, 冲洗液为 pH7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲

液, 每膜冲洗 3 次, 每次约 100mL; 控制菌的检查可按照控制菌检查项下大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌的检查方法进行 (中国药典 2015 年版四部通则 1106)^[1]。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 版 (四部) [S]. 北京: 中国医药科技出版, 2015: 140-152.
- [2] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范 [M]. 北京: 中国医药科技出版, 2010.
- [3] 国家药典委员会. 中国药典分析检测技术指南 [M]. 北京: