

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.16.007

痤疮散微生物限度检查方法的适用性试验研究

简晓莉,刘志承[△],李曙光,刘纪青

(广东省深圳市中医院,广东 深圳 518033)

摘要:目的 研究痤疮散的微生物限度检查方法。方法 按2015年版《中国药典(四部)》通则1105,1106,1107进行方法的建立和验证。结果 该产品对需氧菌中的金黄色葡萄球菌有较强的抑制作用,对枯草芽孢菌、白色念珠菌有一定的抑制作用,故需氧菌计数采用薄膜过滤法(1:20稀释级)、霉菌和酵母菌计数采用平皿法(1:20稀释级)进行检测,回收率均达50%~200%。控制菌中的金黄色葡萄球菌可采用稀释法(500 mL)进行检测,铜绿假单胞菌可采用常规法进行检测。结论 该方法可用于痤疮散的微生物限度检查。

关键词:痤疮散;微生物限度;薄膜过滤法;方法适用性

中图分类号:R372;R986

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)16-0020-03

Applicability Test of Microbial Limit Test for Cuochuang Powder

Jian Xiaoli, Liu Zhicheng, Li Shuguang, Liu Jiqing

(Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong, China 518033)

Abstract: Objective To study the method of microbial limit test for Cuochuang Powder. **Methods** Applicability test of microbial limit test was established and verified according to General rule 1105, 1106 and 1107 of *Chinese Pharmacopoeia* (2015 Edition, Volume IV).

Results This product had strong antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, had a certain inhibitory effect on *Candida albicans* and *Bacillus subtilis*. The total number of aerobic bacteria was measured by membrane filtration and washing (1:20 dilution grade), the total number of molds and yeasts were measured by culture medium dilution method (1:20 dilution grade), and the recovery rate was in the range of 50%~200%. *Staphylococcus aureus* in the control bacteria was detected by dilution method (500 mL), *Pseudomonas aeruginosa* was detected by the routine method. **Conclusion** This method is reliable and feasible, which can be used in microbial limit test of Cuochuang Powder.

Key words: Cuochuang Powder; microbial limit; membrane filtration method; applicability of method

痤疮散为我院临床应用20多年的院内制剂,有清热、祛风、杀虫等作用,主要用于治疗痤疮,外用疗效显著^[1-3]。2015年版《中国药典(四部)》的微生物限度检查法结合国情、参考欧美药典进行了修订,与2010年版《中国药典》的方法相比,在培养基、培养条件和检验方法上均有重大改进^[4]。为了提高痤疮散的质量标准,确保医院制剂的用药安全,本研究中根据2015年版《中国

药典(四部)》^[5]微生物限度检查法中的相关规定,对痤疮散的微生物限度检查法进行重新修订,并进行了适用性试验。现报道如下。

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器

TX323L型电子天平(日本岛津公司);LMQ.C型高压蒸汽灭菌器(山东博科生物产业有限公司);SPX-

第一作者:简晓莉,女,硕士研究生,主管中药师,主要从事中医院药检室工作,(电话)0755-82227594(电子信箱)16634289@qq.com。

[△]通信作者:刘志承,男,硕士研究生,主任中药师,研究方向为药物分析学,(电子信箱)jianxl126@126.com。

参考文献:

- [1] 张青,李亚军.原子吸收分光光度法测定水中的重金属铅和镉[J].当代化工,2015,44(5):1188-1190.
- [2] GB 15810-2000,一次性使用无菌注射器[S].
- [3] GB 8368-2005,一次性使用输液器重力输液式[S].
- [4] GB/T 14233.1-2008,化学分析方法:医用输液、输血、注射器具检验方法(第1部分)[S].
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:40-42.
- [6] 丁敏,王丽平,马兆堂.实例说明如何做火焰原子吸收分光光度法的方法学确认[J].临床医药文献杂志,2017,4(14):2613-2614.
- [7] 郭瑞娣.火焰原子吸收法测定重金属时常见问题及处理方法[J].江苏预防医学,2009,20(1):63-64.
- [8] JJG 694-2009,原子吸收分光光度计检定规程[S].

- [9] 夏小叶,冯秀珍.原子吸收分光光度法测定香丹注射液中的铅和镉的含量[J].中国现代药物应用,2013,7(16):3-4.
- [10] 邓勃.应用原子吸收与原子荧光光谱分析[M].北京:化学工业出版社,2003:231-239.
- [11] 邱德仁.原子光谱分析[M].上海:复旦大学出版社,2001:410-414.
- [12] 吴颖,冯利,陈中兰.石墨炉原子吸收法测定水中镉和铅[J].广州化工,2011,39(3):119-120.
- [13] 马啸华,徐橘.石墨炉原子吸收法测定自来水中的有害元素铅[J].商丘师范学院学报,2010,26(3):72-74.
- [14] 邓亮.分析石墨炉原子吸收法测定水中镉[J].生物技术世界,2012(5):47-49.
- [15] 姬莉莉.石墨炉原子吸收法测定水中镉测量不确定度分析[J].首都公共卫生,2014,8(2):80-83.

(收稿日期:2018-05-25)

150BY-Ⅱ型生化培养箱(北京鑫鼎腾达仪器设备有限公司);HH.B11.500-BY-Ⅱ型电热恒温培养箱(广州永程科学设备有限公司);电恒温水浴锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);1300 A2型生物安全柜(赛默飞世尔科技<中国>有限公司)。

1.2 试药

痤疮散(深圳市中医院院内制剂,批号分别为20160223,20160303,20160309);胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA,批号为3105210),沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,批号为3105268),胰酪大豆胨液体培养基(TSB,批号为3105171),沙氏葡萄糖液体培养基(SDB,批号为3105054),甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号为3105175),溴化十六烷基三甲琼脂培养基(批号为3105130),无菌氯化-蛋白胨缓冲液(pH=7.0,批号为3105256),均购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.3 试验菌株

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]菌株,均购自中国食品药品检定研究院,且均使用第3代培养物。

2 方法与结果

2.1 微生物计数法适用性试验

2.1.1 菌液制备

金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌:取TSB新鲜培养液,稀释至不大于100 cfu/mL,备用。

白色念珠菌:取SDB新鲜培养液,稀释至不大于10⁴ cfu/mL及不大于100 cfu/mL,备用。

黑曲霉:取孢子悬液,稀释至不大于10⁴ cfu/mL及不大于100 cfu/mL,备用。

2.1.2 供试液制备

从2个(或以上)包装中取本品10 g,加稀释液至100 mL,45℃保温振摇使其分散均匀(pH=6.5),静置,取上清液,得1:10供试液;取1:10供试液,分别稀释成1:20,1:50,1:100的供试液。

2.1.3 供试液中微生物的回收

需氧菌总数(平皿倾注法):试验组取无菌试管5支,分别加2.1.2项下制备的供试液各9.9 mL及2.1.1项下制备的菌液各0.1 mL,混匀,取1 mL置无菌平皿中,倾注TSA依法培养、计数,每株试验菌平行制备2个平皿。供试液对照组取无菌试管1支,以稀释液替代菌液,同试验组操作。菌液对照组取无菌试管5支,以稀释液替代供试液,同试验组操作。

需氧菌总数(薄膜过滤法):试验组取2.1.2项下制备的1:20供试液的上清液1 mL,加至装有100 mL pH=7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液过滤器中(φ75 mm

滤膜),混匀,滤尽,再按300 mL/膜(冲洗3次,每次100 mL)的冲洗量冲洗,在最后100 mL冲洗液中各加2.1.1项下制备的菌液1 mL(不大于100 cfu/mL),取滤膜依法培养、计数。供试液对照组除不加菌外同试验组操作。菌液对照组以稀释液替代供试液,同试验组操作。

霉菌和酵母菌总数(平皿倾注法):试验组取无菌试管2支,分别加2.1.2项下制备的1:10,1:20供试液9.9 mL及2.1.1项下制备的白色念珠菌及黑曲霉菌液各0.1 mL,混匀,取1 mL于无菌平皿中,倾注SDA依法培养、计数,每株试验菌平行制备两个平皿。供试液对照组取无菌试管1支,以稀释液替代菌液,同试验组操作。菌液对照组取无菌试管2支,以稀释液替代供试液,同试验组操作。

2.1.4 微生物回收率计算

微生物回收率=(试验组菌落数-供试液对照组菌落数)/菌液对照组菌落数×100%。结果见表1和表2。

表1 需氧菌总数计数适用性试验回收率(%)

供试液	批号	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉
1:10 (平皿法)	20160223	0	110	0	39	70
	20160303	0	92	0	46	69
	20160309	0	113	0	48	66
1:20 (平皿法)	20160223	0	103	15	92	65
	20160303	0	98	20	89	70
	20160309	0	99	16	90	64
1:50 (平皿法)	20160223	0	105	48	88	69
	20160303	0	102	49	91	61
	20160309	0	97	43	90	63
1:100 (平皿法)	20160223	0	101	89	89	69
	20160303	0	93	88	89	70
	20160309	0	97	93	86	62
1:20 (薄膜过滤法)	20160223	76	99	90	90	66
	20160303	83	106	86	87	64
	20160309	76	96	85	91	60

表2 真菌和酵母菌总数计数适用性试验回收率(%)

供试液	批号	白色念珠菌	黑曲霉
1:10(平皿法)	20160223	41	80
	20160303	45	76
	20160309	46	72
1:20(平皿法)	20160223	90	75
	20160303	84	81
	20160309	88	76

2.2 控制菌检查法适用性试验

2.2.1 菌液制备

金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌:取TSB新鲜培养液,稀释至不大于100 cfu/mL,备用。

2.2.2 金黄色葡萄球菌检查方法适用性试验

增菌培养: 试验组取 100, 200, 500 mL TSB, 加 2.1.2 项下制备的 1:10 供试液 10 mL 及 2.2.1 项下制备的金黄色葡萄球菌 1 mL, 混匀, 依法培养 18~24 h。供试液对照组以稀释液代替菌液, 同试验组操作。阴性对照组以稀释液替代供试液及菌液, 同试验组操作。

选择和分离培养: 取增菌培养物划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基平板上, 30~35℃ 培养 18~72 h。

2.2.3 铜绿假单胞菌检查方法适用性试验

增菌培养: 试验组取 100 mL TSB, 加 2.1.2 项下制备的 1:10 供试液 10 mL 及 2.2.1 项下制备的铜绿假单胞菌 1 mL, 混匀, 依法培养 18~24 h。供试液对照组以稀释液代替菌液, 同试验组操作。阴性对照组以稀释液替代供试液及菌液, 同试验组操作。

选择和分离培养: 取增菌培养物划线接种于溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基平板上, 30~35℃ 培养 18~72 h。结果见表 3。

表 3 金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌适用性试验结果

菌种	培养基用量 (mL)	批号	试验组	供试液 对照组	菌液 对照组
金黄色葡萄球菌	100	20160223	-	-	+
		20160303	-	-	+
		20160309	-	-	+
	200	20160223	-	-	+
		20160303	-	-	+
		20160309	-	-	+
	500	20160223	+	-	+
		20160303	+	-	+
		20160309	+	-	+
铜绿假单胞菌	100	20160223	+	-	+
		20160303	+	-	+
		20160309	+	-	+

注: “+”表示有菌生长,“-”表示无菌生长。

3 讨论

本品剂型为散剂, 在需氧菌总数薄膜过滤法试验中, 1:10 供试液上清液易吸入药品粉末, 过滤困难, 经纱布过滤仍难以改善, 故取 1:20 供试液进行薄膜过滤法方法适用性试验。

本品由大黄、黄连、白芷、防风等 9 味药组方, 这些药物成分对微生物均有抑制作用^[6-15]。3 批样品的验证试验结果表明, 本品对需氧菌中的枯草芽孢菌、白色念珠菌有抑制作用, 对金黄色葡萄球菌有较强抑菌性。采用 1:100 稀释级供试液进行平皿法试验, 金黄色葡萄球菌几乎没有回收。采用薄膜过滤法, 用 300 mL pH=7.0 的氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗即可消除其抑菌作用, 回收率在 2015 年版《中国药典(四部)》附录规定的

50%~200% 之间, 说明薄膜过滤法应用于本品需氧菌总数的微生物检查具有可行性。由表 2 可见, 本品对霉菌及酵母菌总数中的白色念珠菌有微弱的抑菌性, 采用 1:20 供试液进行平皿法试验能消除其抑菌性, 2 种试验菌均在 2015 年版《中国药典(四部)》附录规定的 50%~200% 之间, 方法可行。控制菌方法验证试验结果表明, 本品对金黄色葡萄球菌有较强抑制作用, 加入 100 mL 及 200 mL 培养液, 试验组仍无菌生长, 需加培养液至 500 mL 才能消除其抑菌性。由表 3 可见, 采用常规方法检查疮疮散中的铜绿假单胞菌, 试验组为阳性, 方法可行。本方法验证结果准确、可靠、重复性好, 可用于疮疮散的微生物限度检查。

参考文献:

- [1] 赵跃凤, 杨桂先, 金培志. 中药疮疮散治疗面部痤疮的疗效观察与护理[J]. 当代护士, 2011(4):86-87.
- [2] 赵跃凤. 穴位自血疗法联合疮疮散外敷对痤疮疗效及肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素 8 的影响[J]. 护士进修杂志, 2014, 29(11):979-981.
- [3] 郭岱炳, 杨玉峰, 王丽娟, 等. 复方香连涂膜剂治疗寻常型痤疮的疗效观察[J]. 河北中医药学报, 2013, 28(2):10-11.
- [4] 陈志禹, 席时东. 中国药典 2015 年版八珍胶囊和八珍片微生物限度检查与探讨[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(5):628-634.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 附录 1105-附录 1107.
- [6] 李广峰. 大黄的药理作用及临床应用分析[J]. 中国医药指南, 2013, 11(16):317.
- [7] 黄娟, 张庆莲, 皮凤娟, 等. 大黄的药理作用研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2014, 14(3):282-283.
- [8] 曾芳, 李媛. 大黄有效化学成分及其药理作用[J]. 当代医学, 2013, 19(12):149-150.
- [9] 成中河. 浅谈中药大黄的炮制运用与药理初探[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(103):175-176.
- [10] 尹丽丽. 黄连的药理作用及现代研究进展[J]. 中医临床研究, 2016, 8(28):144-145.
- [11] 徐萍, 顾治平. 黄连的药理作用研究进展[J]. 临床医药文献杂志, 2017, 4(27):5333.
- [12] 王维琪. 黄连有效成分的药理研究与进展[J]. 中医临床研究, 2016, 8(26):147-148.
- [13] 朱艺欣, 李宝莉, 马宏胜, 等. 白芷的有效成分提取、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国医药导报, 2014, 11(31):159-162.
- [14] 张倩, 陈进春. 白芷活性成分的研究进展[J]. 中医临床研究, 2016, 8(28):145-146.
- [15] 刘双利, 姜程曦, 赵岩, 等. 防风化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(10):2146-2152.

(收稿日期:2018-04-03)